

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 557**

51 Int. Cl.:
C07K 14/195 (2006.01)
C12P 1/06 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05712250 .9**
96 Fecha de presentación: **27.01.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1848731**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.10.2007**

54 Título: **Antibiótico 107891, sus factores, sales farmacéuticamente aceptables y composiciones, y uso de los mismos**

30 Prioridad:
26.01.2005 US 45628

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.09.2012

73 Titular/es:
SENTINELLA PHARMACEUTICALS, INC.
("SENTINELLA")
47 HULFISH STREET, SUITE 310
PRINCETON NJ 08542, US

72 Inventor/es:
LAZZARINI, Ameriga;
GASTALDO, Luciano;
CANDIANI, Gianpaolo;
CICILIATO, Ismaela;
LOSI, Daniele;
MARINELLI, Flavia;
SELVA, Enrico y
PARENTI, Franco

74 Agente/Representante:
Torner Lasalle, Elisabet

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 387 557 T3

DESCRIPCIÓN

Antibiótico 107891, sus factores, sales farmacéuticamente aceptables y composiciones, y uso de los mismos.

El documento WO2005/014628 da a conocer el antibiótico 107891, sus componentes factores A1 y A2, su preparación y su uso.

5 El documento WO2006075988 da a conocer derivados del antibiótico 107891 y su uso.

La presente invención se refiere a una sustancia antibiótica de origen microbiano, denominada de manera arbitraria antibiótico 107891, que es un complejo que comprende factores A1 y A2 (que no están dentro del alcance de la presente invención). La invención se caracteriza por los compuestos según la reivindicación 1. La invención se refiere además a sales farmacéuticas aceptables del mismo, a composiciones farmacéuticas del mismo y a su uso como agente antibacteriano. También se da a conocer un procedimiento para preparar el antibiótico 107891 que incluye cultivar *Microbispora sp.* 107891 (identificada a continuación en el presente documento como *Microbispora sp.* ATCC PTA-5024) o una variante o mutante de la misma que mantiene la capacidad de producir dicho antibiótico, recuperar el antibiótico de la invención a partir del micelio y/o a partir del caldo de fermentación, aislar la sustancia pura mediante medios cromatográficos. El antibiótico 107891 es un agente antimicrobiano novedoso con una estructura peptídica que contiene lantionina y metil-lantionina como constituyentes. Estas son las características típicas de los lantibióticos y, en particular, del subgrupo que actúa principalmente sobre la biosíntesis de la pared celular.

Los lantibióticos son péptidos, que contienen el aminoácido de tioéter lantionina así como varios otros aminoácidos modificados (H. G. Sahl y G. Bierbaum, (1998) "Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria", Ann. Rev. Microbiol. 52:41-79). La mayoría de los lantibióticos conocidos tienen actividad antibacteriana, aunque se han notificado algunos como activos sobre diferentes dianas farmacológicas. Los lantibióticos antibacterianos pueden dividirse ampliamente en dos grupos basándose en sus estructuras: los lantibióticos tipo A son péptidos normalmente alargados, anfífilos, mientras que los lantibióticos tipo B son compactos y globulares (O. McAuliffe, R. P. Ross y C. Hill, (2001): "Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action", FEMS Microb. Rev. 25:285-308). La nisina es el representante típico de lantibiótico tipo A, mientras que la actagardina (gardimicina) y la mersacidina pertenecen a la subclase de lantibióticos tipo B. Tanto los lantibióticos de tipo nisina como de tipo mersacidina interaccionan con el lípido II de precursores de peptidoglicano unidos a membrana, aunque las dos clases se diferencian en los efectos que producen sobre el proceso de proliferación bacteriana. Los lantibióticos de tipo nisina destruyen principalmente las bacterias mediante permeabilización de la membrana citoplasmática (H. Brotz, M. Josten, I. Wiedemann, U. Schneider, F. Gotz, G. Bierbaum y H. G. Sahl, (1998): "Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics", Mol. Microbiol. 30:317-27), mientras que los lantibióticos de tipo mersacidina destruyen principalmente las células bacterianas inhibiendo la biosíntesis de la pared celular (H. Brotz, G. Bierbaum, K. Leopold, P. E. Reynolds y H. G. Sahl, (1998): "The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II", Antimicrob Agents Chemother. 42:154-60).

Dos antibióticos producidos por la cepa NRRL 30420 de *Microbispora corallina*, identificados como antibiótico MF-BA-1768 α_1 y MF-BA-1768 β_1 , respectivamente, se describen en el documento US 6.551.591 B1. Los datos fisicoquímicos notificados en la patente anteriormente identificada (por ejemplo datos de espectrometría de masas, peso molecular, contenido de aminoácidos) y comparación de tiempos de retención en análisis experimentales de LC-EM muestran claramente que el complejo de antibiótico 107891 así como sus componentes factor A1 y factor A2, que no están dentro del alcance de la presente invención, son entidades químicas distintas de los antibióticos MF-BA 1768 α_1 y MF-BA-1768 β_1 .

El documento EP 0592835A2 describe antibióticos antitumorales BU-4803TA₁, A₂, B, C₁, C₂ y D. Los antibióticos BU-4803TA₁ A₂ y B se recuperan a partir del caldo de fermentación de *Microbispora* ATCC 55327 (AA 9966) mientras que los antibióticos BU4803TC₁, C₂ y D son productos de la transformación de los antibióticos BU 4803TA₁, A₂ y B, respectivamente, cuando se almacenan estos productos en dimetilsulfóxido. Los datos fisicoquímicos notificados en el documento EP 0592835 A para los antibióticos anteriores (por ejemplo, aspecto, absorción UV, peso molecular, actividad antitumoral) muestran claramente que son sustancias químicas distintas del complejo de antibiótico 107891.

CEPA Y FERMENTACIÓN

Se aisló *Microbispora sp.* 107891 en el medio ambiente y se depositó el 27 de febrero de 2003 en la Colección Americana de Cultivos Tipo ("American Type Culture Collection", ATCC), 10801 University Blvd, Manassas VA, 20110-2209 EE.UU., bajo la disposición del tratado de Budapest. A la cepa se le asignó el número de registro PTA- 5024.

La producción de antibiótico 107891 se logra cultivando una cepa de *Microbispora sp.* que puede producirlo, es decir, *Microbispora sp.* ATCC PTA-5024 o una variante o mutante de la misma que mantiene la capacidad para producir dicho antibiótico; aislando el antibiótico resultante del caldo de cultivo completo y/o del micelio separado y/o del caldo de fermentación filtrado; y purificando el antibiótico aislado mediante medios cromatográficos. En cualquier caso, se prefiere producir el antibiótico 107891 en condiciones aerobias en un medio de nutrientes acuoso que contiene fuentes fácilmente asimilables de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas. Pueden usarse muchos de los medios de nutrientes habitualmente empleados en el campo de la fermentación, sin embargo se prefieren ciertos medios.

5 Fuentes de carbono preferidas son sacarosa, fructosa, glucosa, xilosa y similares. Fuentes de nitrógeno preferidas son harina de semilla de soja, peptona, extracto de carne, extracto de levadura, triptona, aminoácidos, caseína hidrolizada y similares. Entre las sales inorgánicas que pueden incorporarse en el medio de cultivo, están las sales solubles habituales que pueden proporcionar sodio, potasio, hierro, zinc, cobalto, magnesio, calcio, amonio, cloruro, carbonato, sulfato, fosfato, nitrato e iones similares.

10 Preferiblemente, la cepa que produce el antibiótico 107891 se cultiva previamente en un tubo de fermentación o en un frasco de agitación, luego se usa el cultivo para inocular fermentadores en recipiente para la producción de cantidades sustanciales de sustancias. El medio usado para el cultivo previo puede ser el mismo que el empleado para fermentaciones mayores, pero también pueden emplearse otros medios. La cepa que produce el antibiótico 107891 puede hacerse crecer a una temperatura de entre 17°C y 37°C, siendo las temperaturas óptimas de alrededor de 28-30°C.

15 Durante la fermentación, puede monitorizarse la producción de antibiótico 107891 mediante bioensayo con microorganismos sensibles y/o mediante análisis de HPLC. La producción máxima de antibiótico 107891 se produce generalmente tras cerca de 90 horas y antes de 200 horas de fermentación.

El antibiótico 107891 se produce cultivando *Microbispora sp.* ATCC PTA-5024 o una variante o mutante de la misma que puede producir el antibiótico 107891, y se encuentra en los caldos de cultivo y/o en el micelio.

En esta descripción y reivindicaciones, el término "antibiótico 107891", a menos que se especifique lo contrario, identifica el complejo de antibiótico 107891 que comprende los factores A1 y A2, factores A1 y A2 que no están dentro del alcance de la presente invención.

20 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *Microbispora sp.* ATCC PTA-5024

25 *Microbispora sp.* ATCC PTA-5024 crece bien en diversos medios sólidos convencionales. Se midieron las dimensiones microscópicas usando el cultivo que se hizo crecer en agar de ácido húmico-sales de elementos traza (composición en g/l: ácido húmico 0,5, FeSO₄*7H₂O 0,001, MnCl₂*4H₂O 0,001, ZnSO₄*7H₂O 0,001, NiSO₄*6H₂O 0,001, MOPS 2, agar 20) al que se le añade 1 ml/l de disolución de vitaminas (clorhidrato de tiamina 25 mg/l, pantotenato de calcio 250 mg/l, ácido nicotínico 250 mg/l, biotina 0,5 mg/l, riboflavina 1,25 g/l, cianocobalamina 6,25 mg/l, ácido paraminobenzoico 25 mg/l, ácido fólico 500 mg/l, clorhidrato de piridoxal 500 mg/l).

30 En cultivo líquido (medio V6, composición en g/l: dextrosa 22, extracto de carne 5, extracto de levadura 5, caseína 3, NaCl 1,5) no se observa fragmentación del micelio tras 6 días de crecimiento a 28°C. El examen microscópico con agar de ácido húmico-sales de elementos traza (tras 21 días de incubación a 28°C) revela un micelio de sustrato ramificado, no fragmentado, y un micelio aéreo monopodialmente ramificado; también pueden observarse muchas hifas aéreas largas, lineales y poco ramificadas. Esporóforos cortos que surgen lateralmente de ramificaciones o directamente de las hifas aéreas principales transportan pares de esporas longitudinales característicos. Las esporas son globosas y no motrices. No se observan cuerpos de tipo esporangio ni otras estructuras particulares.

35 CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO DE *Microbispora sp.* ATCC PTA-5024

40 Se hizo crecer *Microbispora sp.* ATCC PTA-5024 durante seis días en medio líquido AF/MS (véase el ejemplo 1) a 28°C y 200 rpm, luego se transfirió (inóculo al 5%) a un nuevo medio líquido AF/MS y se hizo crecer durante otros 6 días y finalmente se inoculó (inóculo al 7%) en 100 ml de medio líquido V6 (véase el ejemplo 1). Tras 6 días de crecimiento a 28°C y 200 rpm, se recogió el micelio mediante centrifugación y se lavó tres veces mediante solución salina estéril, luego se diluyó para proporcionar un inóculo adecuado. Se cultivaron en línea alícuotas de la suspensión de manera de cultivo cruzado sobre diversos medios recomendados por Shirling y Gottlieb (E. B. Shirling y D. Gottlieb, (1966): "Method for Characterization of Streptomyces species", Int. J. Syst. Bacteriol. 16:313-340), y medios recomendados por S.A. Waksman (1961): "The Actinomycetes", The Williams and Wilkins Co., Baltimore. Vol. 2:328-334.

45 Se determinó la capacidad para usar una variedad de hidratos de carbono como fuente de carbono y energía usando medio ISP4 sin almidón, al que se le añadió 1 ml/l de la disolución de vitamina descrita anteriormente como medio basal; cada fuente de carbono se añadió a la concentración final del 1% (p/v).

50 Se determinó la tolerancia a NaCl, el intervalo de pH de crecimiento así como la capacidad para crecer a diferentes temperaturas sobre medio ISP2. Se incubaron todos los medios a 28°C durante tres semanas; las descripciones se refieren a 21 días a menos que se especifiquen. Se evaluó el color con luz del día natural, usando el Atlas de Color de Maerz y Paul (A. Maerz y M. R. Paul, 1950 - A Dictionary of Colour, 2ª edición. McGraw- Hill Book Co. Inc., Nueva York). Se evaluó la capacidad para reducir los nitratos en nitritos en medio de nitrato pegajoso según el procedimiento descrito por Williams *et al.* (S. T. Williams, M. Goodfellow, G. Alderson, E. M. H. Wellington, P. H. A. Sneath y M. J. Sackin, 1983 - Numerical classification of Streptomyces and related genera - J. Gen. Microbiol. 129, 1743-1813).

55 El crecimiento, aspecto de colonias, color de sustrato y micelio aéreo y producción de pigmento para la cepa *Microbispora sp.* ATCC PTA-5024 se registran en la tabla I. El crecimiento vegetativo está presente en la mayoría de los medios usados, a diferencia del micelio aéreo que sólo está presente en algunos de ellos. No se muestra ninguna

pigmentación evidente sobre ningún medio usado. Las características fisiológicas de la cepa se presentan en la tabla II. El crecimiento y la producción de micelio aéreo están presentes a 17°C pero no a 43°C. La producción de micelio aéreo sobre ISP2 está presente a pH superior a 6, mientras que está ausente en presencia de NaCl al 1%.

La capacidad para usar diversos hidratos de carbono para el crecimiento se muestra en la tabla III.

5

Tabla I: Características de crecimiento de *Microbispora sp.* ATCC PTA-5024

MEDIO	CRECIMIENTO Y MORFOLOGÍA	CÓDIGO DE COLOR INVERSO
ISP 2 Agar de extracto de levadura- extracto de malta	Crecimiento abundante, superficie ondulada; buena producción de micelio aéreo rosado (2A8). Ligera producción de pigmento soluble anaranjado/marrón claro.	5 E 12 anaranjado/rojo
ISP 3 Agar de harina de avena	Crecimiento abundante; buena producción de micelio aéreo rosado (2A8), particularmente en las ramificaciones de las líneas de cultivo cruzado. Ligera producción de pigmento soluble anaranjado.	11 H 10 anaranjado/rosa
ISP 4 Agar de sales inorgánicas- almidón	Buen crecimiento; no se produce micelio aéreo. No se producen pigmentos solubles. Almidón hidrolizado.	11 I 9 naranja
Glu/Asp Agar de glucosa-asparagina	Crecimiento discreto, delgado; producción de micelio aéreo delgado, beis/rosado (9B4) en las ramificaciones de las líneas de cultivo cruzado. No se producen pigmentos solubles.	12 K 12 anaranjado/marrón claro
ISP 6 Agar de peptona-extracto de levadura-hierro	Crecimiento escaso, con colonias individuales rosadas que crecen en altura, enrevesadas, con una superficie lisa; no se produce micelio aéreo. No hay oscurecimiento del medio.	nd
ISP 7 Agar de tirosina	Poco crecimiento de un micelio de sustrato delgado, anaranjado/marrón claro; no se produce micelio aéreo. No hay oscurecimiento del medio.	nd
ISP3+YE Agar de harina de avena / extracto de levadura al 1%	Crecimiento abundante, superficie ondulada; producción muy escasa de micelio aéreo delgado, rosado. No se producen pigmentos solubles.	4 B 12 anaranjado/rojo

(ISP4 y agar de glucosa - asparagina con adición de 1 ml/L de disolución de vitaminas)

Tabla II: Características fisiológicas de *Microbispora sp.* ATCC PTA-5024

PRUEBA	REACCIÓN
Hidrólisis de almidón	Positiva
Hidrólisis de caseína	Negativa

Digestión de maleato de calcio	Negativa
Peptonización de leche litmus	Negativa
Coagulación de leche litmus	Negativa
Licuefacción de gelatina	De negativa a ligeramente positiva
Reacción de tirosina	Negativa
Reducción de nitrato	Positiva
Intervalo de pH de crecimiento (14 días)	Sin crecimiento a 4,2, bueno a de 5,5 a 8,8; no se sometió a prueba fuera de este intervalo. El micelio aéreo está ausente a pH ≤ 6,5
% de tolerancia de NaCl	≤ 2; ausencia de micelio aéreo a ≥ 1.
Intervalo de temperatura de crecimiento	De 17°C a 37°C. Presencia de micelio aéreo en el intervalo completo; sin crecimiento a 43°C

Tabla III: uso de fuentes de carbono por *Microbispora sp.* ATCC PTA-5024

Fuente de carbono	Crecimiento (14 días)
Arabinosa	++
Celulosa	-
Fructosa	++
Inositol	+/-
Manitol	+++
Rafinosa	-
Ramnosa	-
Sacarosa	+++
Xilosa	+++
Glucosa	++
Glicerol	++
Sin azúcar	-
+++ abundante; ++ buen crecimiento; + crecimiento moderado; +/- crecimiento escaso; - sin crecimiento; el micelio aéreo siempre estaba ausente.	

CARACTERÍSTICAS QUIMIOTAXONÓMICAS DE *Microbispora sp.* ATCC PTA-5024

- 5 Se hizo crecer *Microbispora sp.* ATCC PTA-5024 en medio GYM (glucosa 4 g/l; extracto de levadura 4 g/l; extracto de malta 10 g/l) a 28°C en un agitador giratorio y se recogió el micelio, se lavó dos veces con agua destilada estéril y posteriormente se liofilizó. Se llevaron a cabo análisis de aminoácidos según el método de Stanek y Roberts, (J. L. Stanek y G. D. Roberts, (1974): "Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography", Appl. Microbiol. 28:226-231). Se extrajeron menaquinonas y lípidos polares siguiendo el
- 10 procedimiento de Minnikin *et al.* (D. E. Minnikin, A. G. O'Donnell, M. Goodfellow., G. Alderson, M. Athalye, A. Schaal y J. H. Parlett, (1984): "An integrated procedure of isoprenoid quinones and polar lipids", J. Microbiol. Meth. 2:233-241). Se analizaron lípidos polares mediante cromatografía de capa fina (D. E. Minnikin, V. Patel, L. Alshamaony y M. Goodfellow, (1977): "Polar lipid composition in the classification of Nocardia and related bacteria", Int. J. Syst. Bacteriol. 27:104-117), menaquinonas mediante HPLC (R. M. Kroppenstedt, (1982): "Separation of bacterial menaquinones by
- 15 HPLC using reverse phase RP18 and a silver loaded ion exchanger as stationary phase", J. Liquid. Chromat. 5:2359-

- 2367; R. M. Kroppenstedt, (1985): "Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms", en: Chemical Methods in Bacterial Systematics. No20 SAB Technical Series págs. 173-199, M. Goodfellow and D. E. Minnikin eds, Academic Press, Londres) y ésteres metílicos de ácidos grasos mediante cromatografía de gas-líquido respectivamente (L. T. Miller, (1982): "A single derivatization method for bacterial fatty acid methyl esters including hydroxy acids", J. Clin. Microbiol. 16:584-586; M. Sasser, (1990): "Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids", USFCC News Letters 20:1-6). Se comprobó la presencia de ácidos micólicos mediante el procedimiento de Minnikin *et al.* (D. E. Minnikin, L. Alshamaony, y M. Goodfellow, (1975): "Differentiation of Mycobacterium, Nocardia and related taxa by thin layer chromatographic analysis of whole organism methanolizates", J. Gen. Microbiol. 88:200-204).
- 5
- 10 Hidrolizados de células completas de la cepa *Microbispora sp.* ATCC PTA-5024 contienen ácido meso-diaminopimélico como diaminoácido del peptidoglicano. Las menaquinonas predominantes son MK-9 (III, VIII-H₄), MK-9 (H₂) y MK-9 (H₀). El patrón de lípidos polares se caracteriza por la presencia de fosfatidiletanolamina, metilfosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, difosfatidil-glicerol, fosfatidil-inositol, fosfatidil-inositolmanósidos y fosfolípido que contiene N-acetilglucosamina, es decir fosfolípido tipo IV según Lechevalier *et al.* (H. A. Lechevalier, C. De Briève y M. P. Lechevalier, (1977): "Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition", Biochem. Syst. Ecol. 5:246-260). Los componentes principales del patrón de ácidos grasos son anteiso 15:0, iso 16:0, n- 16:0, anteiso 17:0 y 10-metilheptadecanoico (10-Me-17:0), es decir, 3c según Kroppenstedt (R. M. Kroppenstedt, (1985): "Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms", en: Chemical Methods in Bacterial Systematics. No20 SAB Technical Series págs. 173-199. M. Goodfellow and D. E. Minnikin eds, Academic Press, Londres). No se detectan ácidos micólicos.
- 15
- 20

SECUENCIACIÓN DE ADNr 16S DE *Microbispora sp.* ATCC PTA-5024

- Se logró la secuencia parcial del gen de ARNr 16 (ADNr 16S), es decir 1443 nucleótidos, correspondiente al 95% del ARNr entero, de la cepa *Microbispora sp.* ATCC PTA-5024, siguiendo procedimientos publicados (P. Mazza, P. Monciardini, L. Cavaletti, M. Sosio y S. Donadio, (2003): "Diversity of Actinoplanes and related genera isolated from an Italian soil", Microbial Ecol. 5:362-372). Se notifica en la SEQ ID NO 1.
- 25

- Se comparó esta secuencia con la de la cepa *Microbispora corallina* NRRL 30420 (MF-BA-1768), según se notifica en el documento US 6.551.591 B1. Se alinearon las dos secuencias y se encontraron diferencias en 31 de 1456 posiciones alineadas, que representaban una divergencia de secuencia global del 2,13%. Dos cepas cualesquiera que comparten identidad de secuencia de menos del 97,5% pertenecen normalmente a especies diferentes (Stackebrandt, E. y Embley, M. T. (2000) "Diversity of Uncultured Microorganisms in the Environment" en: Nonculturable Microorganisms in the Environment, R. R. Colwell and D. J. Grimes (eds). ASM, Press, Washington DC, págs. 57-75). Por tanto, un nivel del 2% de divergencia de secuencia es bastante alto (Rossellò-Mora, R., y Amann, R. (2001). "The Species Concept for Prokaryotes". FEMS Microbiol. Rev. 25:39-67) e indica que *Microbispora sp.* ATCC PTA-5024 y *Microbispora corallina* NRRL 30420 (MF-BA-1768) son cepas diferentes.
- 30

IDENTIDAD DE LA CEPA *Microbispora sp.* ATCC PTA-5024

35

Se asigna la cepa que produce antibiótico 107891 al género *Microbispora*, familia *Streptosporangiaceae* debido a las siguientes características quimiotaconómicas y morfológicas:

- presencia de ácido meso-diaminopimélico en la pared celular;
 - cantidad principal de MK-9 (III, VIII-H₄) y fosfolípido tipo IV según Lechevalier *et al.* (H. A. Lechevalier, C. DeBriève y M.P. Lechevalier, (1977): "Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition", Biochem. Syst. Ecol. 5:246-260);
 - perfil de ácidos grasos de 3c según Kroppenstedt (R. M. Kroppenstedt, (1992): "The genus Nocardopsis", en: The Prokaryotes, Vol II, págs. 1139-1156, A. Balows, H. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer eds; Nueva York, Springer- Verlag);
 - ausencia de ácidos micólicos;
 - formación de pares de esporas longitudinales característicos sobre las puntas de esporóforos cortos que se ramifican lateralmente de hifas aéreas. Esporas no motrices.
 - secuencia parcial del gen de ARNr 16 (ADNr 16S), es decir 1443 nucleótidos, correspondiente al 95% del ARNr entero, notificada en SEQ ID NO. 1, que muestra una identidad de >97% con respecto a las secuencias de ADNr 16S de especies de *Microbispora* descritas.
- 40
- 45
- 50

Tal como con otros microorganismos, las características de la cepa que produce antibiótico 107891 están sujetas a variación. Por ejemplo, pueden obtenerse variantes artificiales y mutantes de la cepa mediante tratamiento con diversos mutágenos conocidos, tales como rayos UV, y productos químicos tales como ácido nitroso, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, y muchos otros. Todas las variantes y mutantes naturales y artificiales de la cepa *Microbispora sp.*

ATCC PTA-5024 que pueden producir antibiótico 107891 se consideran equivalentes a la misma para el fin de esta invención y por tanto están dentro del alcance de la invención.

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTIBIÓTICO 107891

5 Tal como se mencionó anteriormente, el antibiótico 107891 se encuentra distribuido casi por igual en el micelio y en la fracción filtrada del caldo de fermentación.

10 Puede procesarse el caldo recogido para separar el micelio del sobrenadante del caldo de fermentación y puede extraerse el micelio con un disolvente miscible con agua para obtener una disolución que contiene el antibiótico 107891, tras eliminación del micelio gastado. Este extracto de micelio puede entonces procesarse por separado o en combinación con el sobrenadante según los procedimientos notificados a continuación en el presente documento para la fracción de sobrenadante. Cuando el disolvente miscible con agua puede provocar interferencias con las operaciones para recuperar el antibiótico del extracto de micelio, puede eliminarse el disolvente miscible con agua mediante destilación o puede diluirse con agua hasta una concentración que no interfiera.

15 Se pretende que el término "disolvente miscible con agua" tal como se usa en esta solicitud, tenga el significado facilitado actualmente en la técnica a este término y se refiere a disolventes que, en las condiciones de uso, son miscibles con agua en un intervalo de concentración razonablemente amplio. Ejemplos de disolventes orgánicos miscibles con agua que pueden usarse en la extracción de los compuestos de la invención son: alcanos inferiores, por ejemplo alcanos (C_1-C_3) tales como metanol, etanol y propanol; fenil-alcanos (C_1-C_3) tales como alcohol bencílico; cetonas inferiores, por ejemplo cetonas (C_3-C_4) tales como acetona y etil metil cetona; éteres cíclicos tales como dioxano y tetrahidrofurano; glicoles y sus productos de eterificación parcial tales como etilenglicol, propilenglicol y monometil éter de etilenglicol, amidas inferiores tales como dimetilformamida y dietilformamida; ácido acético, dimetilsulfóxido y acetonitrilo.

25 La recuperación del compuesto a partir del sobrenadante del caldo de fermentación del microorganismo productor se realiza según técnicas conocidas en sí mismas que incluyen la extracción con disolventes, precipitación mediante adición de productos no disolventes o cambio del pH de la disolución, mediante cromatografía de reparto, cromatografía de reparto en fase inversa, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular y similares o una combinación de dos o más de dichas técnicas. Un procedimiento para recuperar los compuestos de la invención a partir del cultivo de fermentación filtrado incluye la extracción de antibiótico 107891 con disolventes orgánicos no miscibles con agua, seguido de precipitación a partir de los extractos concentrados, posiblemente añadiendo un agente de precipitación.

30 También en este caso, se pretende que el término "disolvente no miscible con agua" tal como se usa en esta solicitud, tenga el significado actualmente facilitado en la técnica para dicho término y se refiere a disolventes que, en las condiciones de uso, son ligeramente miscibles o prácticamente no miscibles con agua en un intervalo de concentración razonablemente amplio, adecuados para su uso pretendido.

35 Ejemplos de disolventes orgánicos no miscibles con agua que pueden usarse en la extracción de los compuestos de la invención a partir del caldo de fermentación son:

40 alcanos de al menos cuatro átomos de carbono que pueden ser lineales, ramificados o cíclicos tales como n-butanol, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 3,3-dimetil-1-butanol, 4-metil-1-pentanol, 3-metil-1-pentanol, 2,2-dimetil-3-pentanol, 2,4-dimetil-3-pentanol, 4,4-dimetil-2-pentanol, 5-metil-2-hexanol, 1-heptanol, 2-heptanol, 5-metil-1-hexanol, 2-etil-1-hexanol, 2-metil-3-hexanol, 1-octanol, 2-octanol, ciclopentanol, 2-ciclopentiletanol, 3-ciclopentil-1-propanol, ciclohexanol, cicloheptanol, ciclooctanol, 2,3-dimetil-ciclohexanol, 4- etilciclohexanol, ciclooctilmetanol, 6-metil-5-hepten-2-ol, 1-nonanol, 2-nonanol, 1-decanol, 2-decanol y 3-decanol; cetonas de al menos cinco átomos de carbono tales como metil isopropil cetona, metil isobutil cetona, metil n-amil cetona, metil isoamil cetona y mezclas de los mismos.

45 Tal como se sabe en la técnica, la extracción de producto a partir del caldo de fermentación filtrado puede mejorarse ajustando el pH a un valor apropiado, y/o añadiendo una sal orgánica apropiada que forma un par de iones con el antibiótico, que es soluble en el disolvente de extracción.

Tal como se sabe en la técnica, la separación de fases puede mejorarse salando la fase acuosa.

50 Cuando, tras una extracción, se recupera una fase orgánica que contiene una cantidad sustancial de agua, puede ser conveniente destilar mediante azeótropo el agua de la misma. Generalmente, esto requiere añadir un disolvente que puede formar mezclas azeotrópicas mínimas con el agua, seguido por la adición de un agente de precipitación para precipitar el producto deseado, si es necesario. Ejemplos representativos de disolventes orgánicos que pueden formar mezclas azeotrópicas mínimas con agua son: n-butanol, benceno, tolueno, butil éter, tetracloruro de carbono, cloroformo, ciclohexano, 2,5-dimetilfurano, hexano y m-xileno; siendo el disolvente preferido n-butanol.

55 Ejemplos de agentes de precipitación son éter de petróleo, éteres de alquilo inferior, tales como etil éter, propil éter y butil éter, y cetonas de alquilo inferior tales como acetona.

Según un procedimiento preferido para recuperar antibiótico 107891, el caldo de fermentación filtrado puede ponerse en contacto con una matriz de adsorción seguido por elución con un disolvente polar, miscible con agua o una mezcla de los mismos, concentración hasta obtener un residuo aceitoso a presión reducida, y precipitación con un agente de precipitación del tipo ya mencionado anteriormente.

5 Ejemplos de matrices de adsorción que pueden usarse convenientemente en la recuperación de los compuestos de la invención son poliestireno o resinas de poliestireno-divinilbenceno mixtas (por ejemplo M112 o S112, Dow Chemical Co.; Amberlite® XAD2 o XAD4, Rohm & Haas; Diaion HP 20, Mitsubishi), resinas acrílicas (por ejemplo XAD7 o XAD8, Rohm & Haas), poliamidas tales como policaprolactamas, nailon y polivinilpirrolidonas reticuladas (por ejemplo Polyamide-CC 6, Polyamide-SC 6, Polyamide-CC 6,6, Polyamide-CC 6AC y Polyamide-SC 6AC, Macherey-Nagel & Co., Alemania; PA 400, M. WoelmAG, Alemania); y la resina de polivinilpirrolidona PVP-CL, (Aldrich Chemie GmbH & Co., KG, Alemania) y dextranos reticulados de poros controlados (por ejemplo Sephadex® LH-20, Pharmacia Fina Chemicals, AB). Preferiblemente, se emplean resinas de poliestireno, prefiriéndose particularmente la resina Diaion HP 20.

15 En el caso de resinas de poliestireno, resinas de poliestireno-divinilbenceno, resinas de poliamida o resinas acrílicas, un eluyente preferido es un disolvente miscible con agua o sus mezclas acuosas. Las mezclas acuosas pueden contener tampones a un valor de pH apropiado.

También en este caso, se pretende que el término "disolvente miscible con agua", tal como se usa en esta descripción y reivindicaciones, tenga el significado actualmente facilitado en la técnica a dicho término tal como se describió anteriormente.

20 Los sucesivos procedimientos para el aislamiento y la purificación del antibiótico pueden llevarse a cabo en extractos combinados a partir del sobrenadante del caldo y a partir del micelio. Por ejemplo, cuando la parte del producto de antibiótico contenida en el caldo de fermentación filtrado o el sobrenadante se recupera mediante absorción sobre una resina de absorción y la parte del producto de antibiótico contenida en el micelio se extrae a partir del mismo con un disolvente miscible con agua, seguido por adsorción sobre una resina de absorción, las fracciones eluidas de cada uno de los dos conjuntos de resinas de absorción pueden combinarse, opcionalmente tras concentración, y luego procesarse adicionalmente como un cultivo unitario. Alternativamente, cuando los dos conjuntos de resinas de absorción utilizados para las fases de extracción separadas son del mismo tipo y tienen las mismas características funcionales, pueden combinarse entre sí y puede someterse la mezcla a una etapa de elución unitaria, por ejemplo, con un disolvente miscible con agua o una mezcla del mismo con agua.

30 En cualquier caso, sea cual sea el procedimiento adoptado para recuperar el antibiótico 107891 bruto, la etapa de purificación sucesiva se lleva a cabo normalmente con la mezcla de los materiales brutos resultantes de la combinación de los productos que se originan de las fases de extracción separadas.

35 La purificación del antibiótico 107891 bruto puede lograrse mediante cualquiera de las técnicas conocidas por sí mismas pero se realiza preferiblemente por medio de procedimientos cromatográficos. Ejemplos de estos procedimientos cromatográficos son los notificados con respecto a la etapa de recuperación y también incluyen cromatografía sobre fases estacionarias tales como gel de sílice, alúmina, silicato de magnesio activado y similares o cromatografía de fase inversa sobre gel de sílice silanizado que tiene diversas derivatizaciones funcionales, y eluyendo con disolventes miscibles con agua o mezcla acuosa de disolventes miscibles con agua de la clase mencionada anteriormente.

40 Por ejemplo, puede emplearse cromatografía de HPLC preparativa, usando RP-8 o RP-18 como fase estacionaria y una mezcla de tampón $\text{HCOONH}_4:\text{CH}_3\text{CN}$ como sistema de elución.

45 Las fracciones activas recuperadas de la etapa de purificación se combinan entre sí, se concentran a vacío, se precipitan mediante adición de un agente de precipitación de la clase mencionada anteriormente y se secan o liofilizan en rondas única o iterativas. En el caso de que el producto contenga cantidades residuales de formiato de amonio u otras sales tamponantes, pueden eliminarse mediante absorción del antibiótico 107891 sobre una columna de extracción de fase sólida, por ejemplo, una columna de resina de fase inversa tal como SPE Superclean LCP18 Supelco (Bellefonte PA, EE.UU.) seguido por lavado con agua destilada y elución con una mezcla de disolventes acuosa apropiada, por ejemplo metanol:agua. Entonces se recupera el antibiótico eliminando los disolventes de elución.

Por consiguiente, se obtiene una preparación seca de complejo de antibiótico 107891 purificado como un polvo blanco.

50 Tal como es habitual en esta técnica, la producción así como las etapas de recuperación y purificación pueden monitorizarse mediante una variedad de procedimientos analíticos incluyendo ensayo inhibitorio frente a microorganismos sensibles y control analítico usando HPLC o HPLC acoplada a espectrometría de masas.

Una técnica de HPLC analítica preferida se realiza con un instrumento de Waters (Waters Chromatography, Milford, MA) equipado con una columna Waters Simmetry-shield RP8, 5 μ (250 x 4,6 mm) eluida a una velocidad de flujo de 1 ml/min y a una temperatura de 50°C.

La elución se realizó con un programa de múltiples etapas: tiempo=0 (30% de fase B); tiempo=8 min (30% de fase B); tiempo=28 min (40% de fase B).

La fase A era acetonitrilo:tampón de formiato de amonio 100 mM (pH: 5,0) 5:95 (v/v) y la fase B era acetonitrilo. El detector UV funcionaba a 282 nm.

- 5 Se dividió el efluente de la columna con una razón de 5:95 y se desvió la mayor parte (cerca de 950 µl/min) hacia un detector de red de fotodiodos. Los 50 µl/min restantes se desviaron hacia la fase de contacto de ESI de un espectrómetro de masas de trampa iónica Finnigan LCQ (Thermoquest, Finnigan MAT, San José CA).

El análisis de espectrometría de masas se realizó con las siguientes condiciones:

condiciones de entrada de muestra:

- 10 gas de separador (N₂) 60 psi;

gas auxiliar (N₂) 5 psi;

calentador capilar 250°C;

ajustes de tensión de entrada de muestra:

polaridad tanto positiva como negativa;

- 15 tensión de pulverización de iones +/-5 kV;

tensión capilar +/-19 V;

condiciones de barrido: tiempo de iones máximo 200 ms;

tiempo de iones 5 ms;

microbarrido completo 3;

- 20 segmento: duración 30 min, acontecimientos de barrido positivos (150-2000 m/z) y negativos (150-2000 m/z).

En estas condiciones de HPLC analítica, los factores A1 y A2 del antibiótico 107891, que no están dentro del alcance de la presente invención, mostraron tiempos de retención de 13,2 min y 13,9 min, respectivamente. En el mismo sistema de HPLC, el factor A2 de ramoplanina (L. Gastaldo, R. Ciabatti, F. Assi, E. Restelli, J. K. Kettenring, L. F. Zerilli, G. Romanò, M. Denaro y B. Cavalleri, (1992): "Isolation, structure determination and biological activity of A-16686 factors A'1, A'2 and A'3 glycolipodepsipeptid antibiotics", J. Ind. Microbiol. 11:13-18) eluyó con un tiempo de retención de 7,5 min.

25

Los factores A1 y A2 de antibiótico 107891 (que no están dentro del alcance de la presente invención) pueden separarse de una muestra purificada de complejo de antibiótico 107891 mediante HPLC preparativa.

30

Se separó el factor A1 (que no está dentro del alcance de la presente invención) y se purificó sobre una columna Symmetry Prep. C18 a partir del complejo de antibiótico 107891 purificado disuelto en DMSO:ácido fórmico 95:5 (v/v) usando una elución en gradiente lineal de 25 minutos desde el 30% hasta el 45% de fase B con una velocidad de flujo de 3,5 ml.

La fase B era acetonitrilo. La fase A era tampón de formiato de amonio 25 mM pH 4,5:acetonitrilo 95:5 (v/v).

35

Se separó el factor A2 (que no está dentro del alcance de la presente invención) y se purificó mediante elución isocrática sobre una columna Symmetry Prep. C18 a partir de una muestra de complejo de antibiótico 107891 purificado disuelto en una mezcla de ácido acético:acetonitrilo:tampón de formiato de amonio 100 mM (pH 4) 50:120:80 (v/v). Se realizó la elución isocrática a una velocidad de flujo de 7 ml con una mezcla de tampón de formiato de amonio 100 mM pH 4:acetonitrilo en la proporción 82,5:17,5 (v/v).

40

Ya que el antibiótico 107891 tal como se muestra mediante valoración ácido/base en 2- metoxietanol (MCS):H₂O 12:3 (v/v), contiene una función básica, puede formar sales con ácidos adecuados según procedimientos convencionales y también puede existir en la forma de base libre.

45

El antibiótico 107891, cuando se obtiene en la forma de base libre, puede convertirse con ácidos en las correspondientes sales, que incluyen sales farmacéuticamente aceptables no tóxicas. Las sales adecuadas incluyen aquellas sales formadas mediante reacción convencional con ácidos tanto orgánicos como inorgánicos, por ejemplo, ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, acético, trifluoroacético, tricloroacético, succínico, cítrico, ascórbico, láctico, maléico, fumárico, palmítico, cólico, pamoico, mucico, glutámico, canfórico, glutárico, glicólico, ftálico, tartárico, láurico, esteárico, salicílico, metanosulfónico, bencenosulfónico, sórbico, pícrico, benzoico, cinámico y similares. Las

5 sales de adición de antibiótico 107891 con ácidos pueden prepararse según los procedimientos habituales comúnmente empleados. Como ejemplo, se disuelve antibiótico 107891 en forma de base libre, en la cantidad mínima de un disolvente adecuado, normalmente un alcohol inferior, o una mezcla de alcohol inferior/agua, se añade gradualmente la cantidad estequiométrica de un ácido seleccionado adecuado a la disolución obtenida y se precipita la sal obtenida mediante adición de un producto no disolvente. Entonces se recupera la sal de adición que se forma mediante filtración o evaporación de los disolventes.

Alternativamente, estas sales pueden prepararse en una forma sustancialmente anhidra mediante liofilización; en este caso se disuelve una sal de antibiótico 107891 con ácido volátil con una cantidad adecuada de ácido no volátil. Entonces se filtra la disolución para eliminar cualquier producto insoluble y se liofiliza en rondas únicas o iterativas.

10 También puede obtenerse una sal de adición específica a partir de una disolución de otra sal de antibiótico 107891 cuando la sal deseada se precipita tras la adición del anión apropiado.

15 La transformación del compuesto de la invención que no está en forma de sal para dar las sales de adición correspondientes, y la inversa, es decir, la transformación de una sal de adición de un compuesto de la invención para dar la forma que no es una sal, están dentro de la habilidad técnica ordinaria y quedan abarcadas por la presente invención.

La formación de sales de antibiótico 107891 puede servir para varios fines, incluyendo la separación, purificación de dicho antibiótico 107891 y su uso como agentes terapéuticos o promotores del crecimiento animal. Para fines terapéuticos, se emplean habitualmente las sales farmacéuticamente aceptables.

20 El término "sales farmacéuticamente aceptables" identifica aquellas sales no tóxicas que pueden utilizarse en la terapia de animales de sangre caliente.

Puede administrarse el complejo de antibiótico 107891 como tal o en mezcla con portadores farmacéuticamente aceptables y también puede administrarse junto con otros agentes antimicrobianos tales como penicilinas, cefalosporinas, aminoglicósidos y glicopéptidos.

25 Por tanto, la terapia conjunta incluye administración secuencial, simultánea y separada del principio activo de una manera en la que los efectos terapéuticos del primero administrado no han desaparecido completamente cuando se administra el siguiente.

30 Los compuestos de la invención, o sus sales de adición farmacéuticamente aceptables, pueden formularse en formas adecuadas para administración parenteral, oral o tópica. Para la administración i.v. en el tratamiento de cualquier infección que implica un microorganismo sensible al antibiótico, una formulación parenteral está, por ejemplo, en agua con un agente de solubilización apropiado tal como polipropilenglicol o dimetilacetamida y un agente tensioactivo (por ejemplo monooleato de polioxietilensorbitano o aceite de ricino polietoxilado) o formulaciones basadas en ciclodextrinas o fosfolípidos en agua estéril para inyección. También puede obtenerse una formulación inyectable con una ciclodextrina apropiada.

35 También puede usarse el complejo de antibiótico 107891 en una forma farmacéutica adecuada tal como una cápsula, un comprimido o una suspensión acuosa para administración oral o con cremas o jaleas convencionales para aplicaciones tópicas. Además de su uso como medicamentos en la terapia de seres humanos y veterinaria, los compuestos de la invención también pueden usarse como promotores del crecimiento animal. Para este fin, se administra un compuesto de la invención por vía oral en una alimentación adecuada. La concentración exacta empleada es la que se requiere para proporcionar el principio activo en una cantidad eficaz promotora del crecimiento cuando se consumen cantidades normales de alimentación.

45 La adición del principio activo de la invención a la alimentación del animal se logra preferiblemente preparando una mezcla previa de alimentación apropiada que contiene el principio activo en una cantidad eficaz e incorporando la mezcla previa a la ración completa. Alternativamente, puede combinarse un complemento alimenticio o concentrado intermedio que contiene el principio activo en la alimentación. La manera en la que pueden prepararse y administrarse tales mezclas previas de alimentación y raciones completas se describen en libros de referencia (tales como "Applied Animal Nutrition", W. H. Freedman and CO., S. Francisco, EE.UU., 1969 o "Livestock Feeds and Feeding" 0 and B books, Corvallis, Ore., EE.UU., 1977).

CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL ANTIBIÓTICO 107891

A) Espectrometría de masas:

50 en experimentos de EM con un instrumento Thermofinnigan LCQ deca equipado con una fuente de electrospray, usando una mezcla de calibración Thermofinnigan, el antibiótico 107891 proporciona dos iones doblemente protonados a $m/z=1124$ y a $m/z 1116$ correspondientes a la composición de isótopos inferiores de los factores A1 y A2 del complejo (que no están dentro del alcance de la presente invención), respectivamente. Las condiciones de electrospray fueron: tensión de pulverización: 4,7 kV; temperatura capilar: 220°C; tensión capilar: 3 V; modo de infusión 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Se registraron espectros a partir de una disolución de 0,2 mg/ml en metanol/agua 80/20 (v/v) con ácido trifluoroacético al

0,1% y se notifican en la figura 1A (espectro de baja resolución de barrido completo) y 1B (espectro de alta resolución de barrido ampliado).

5 B) El espectro infrarrojo de antibiótico 107891 registrado en KBr con un espectrofotómetro Bruker FT-IR modelo IFS 48, muestra máximos de absorción a (cm^{-1}): 3263; 2929; 1661; 1533; 1402; 1114; 1026. El espectro infrarrojo se notifica en la figura 2. Las bandas de absorción a 1631, 1596 y 1346 se atribuyen a cantidades residuales de formiato de amonio.

C) El espectro UV de antibiótico 107891, realizado en metanol/ H_2O (en una razón de 80:20) con un espectrofotómetro de Perkin-Elmer Lambda 16, muestra dos hombros a 226 y 267 nm. El espectro UV se notifica en la figura 3

10 D) El espectro ^1H -RMN se registró en la mezcla metanol- d_4 : H_2O (pH 4,3, HCl) 40:10 (v/v) a 40°C con un espectrómetro BrukerAMX 600 aplicando una secuencia de supresión de agua. Como patrón interno se consideró la señal residual de metanol- d_4 a 3,31 ppm.

15 El espectro ^1H -RMN de antibiótico 107891 se notifica en la figura 4. El espectro ^1H -RMN de antibiótico 107891 disuelto en metanol- d_4 : H_2O (HCl 0,01 N) 40:10 (v/v) muestra los siguientes grupos de señales (en ppm) a 600 MHz usando MeOH- d_4 como patrón interno (3,31 ppm), [\square]=ppm, multiplicidad; (atribución): 0,93 d (CH_3), 0,98 d (CH_3), 1,07 t (CH_3 superpuestos), 1,18 t (CH_3 superpuestos), 1,26 s (CH_3), 1,30 t (CH_3 superpuestos), 1,62-1,74 m (CH_2), 1,78 d (CH_3), 1,80 d (CH_3), 2,03 m (CH_2), 2,24 m (CH), 2,36 m (CH_2), 2,72- 3,8 m (CH alfa peptídicos), 3,8-5,2 m (CH alfa peptídicos), 5,53-6,08 s (CH_2), 5,62 d (doble enlace de CH), 6,42 m (CH), 6,92 d (doble enlace de CH), 7,0-7,55 m (CH aromáticos), 7,62-10,4 d y m (NH aromáticos y peptídicos).

20 E) El espectro ^{13}C -RMN se registró en la mezcla metanol- d_4 : H_2O (pH 4,3, HCl) 40:10 (v/v) a 40°C con un espectrómetro BrukerAMX 600 usando como patrón interno la señal residual de metanol- d_4 a 49,15 ppm. El espectro ^{13}C -RMN desacoplado de bb (banda ancha) de antibiótico 107891 se notifica en la figura 5.

El espectro ^{13}C -RMN de antibiótico 107891 disuelto en metanol- d_4 : H_2O (HCl 0,01 N) 40:10 (v/v) muestra los siguientes grupos de señales (en ppm) a 600 MHz usando MeOH- d_4 como patrón interno (49,15 ppm), [\square]=ppm; (atribución): 13,6-23,2 (CH_3 alifáticos), 26,16-73 (CH_2 alifáticos y CH alfa peptídicos), 105 -136 (CH aromáticos y con doble enlace y carbonos cuaternarios), 164,3-176,3 (carbonilos peptídicos).

25 F) Se disolvió complejo de antibiótico 107891 en 2-metoxietanol (MCS): H_2O 12:3 (v/v) que contenía un exceso molar de ácido clorhídrico 0,01 M. Entonces se retrovaloró la disolución con una disolución de hidróxido de potasio 0,01 N. La curva de valoración resultante mostró una función ionizable básica.

COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS DE ANTIBIÓTICO 107891

A) Determinación de aminoácidos “resistentes a ácido” en el complejo de antibiótico 107891

30 Se sometió el antibiótico 107891 a una hidrólisis ácida completa (HCl 6 N, 105°C, 24 h) y se identificaron los componentes de aminoácidos del antibiótico resistentes al tratamiento ácido. Los aminoácidos lábiles en medio ácido no pudieron detectarse con este enfoque. Se estudió el hidrolizado mediante análisis de HPLC-EM y GC-EM, tras una derivatización adecuada, en comparación con una mezcla de aminoácidos patrón derivatizados de manera similar. Para el análisis de HPLC se trató la muestra hidrolizada con carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo (kit reactivo AccQ-Tag™ Fluor), para el análisis de GC con una mezcla de HCl 3 N en metanol anhidro y anhídrido trifluoroacético.

35 Se llevó a cabo el análisis de HPLC cualitativa con un sistema de cromatografía de líquidos con detección de DAD y EM simultánea. El procedimiento de HPLC tenía las siguientes condiciones:

Columna: AccQ-Tag™ (Waters C18 NovoPak 4 μm , 3,9 x 150 mm)

Temperatura de columna: 37°C

40 Flujo: 1 mL/min.

Fase A: acetato de amonio 140 mM pH 5 (ácido acético)

Fase B: agua:acetonitrilo 60:40 (v/v)

Programa de elución

Tiempo (min.)	0	5	30	35	40	41
% de B	5	5	80	95	95	5

45

Detección UV: 254 nm

Las condiciones de EM fueron las siguientes:

Espectrómetro: Finnigan LCQ Deca equipado con fuente de electrospray habitual.

Temperatura capilar: 250°C

5 Tensión de fuente: 4,70 KV

Corriente de fuente: 80 µA

Tensión capilar: -15 V

Se llevó a cabo el análisis de GC cualitativa con un cromatógrafo de gas equipado con detección EM-EI.

El método de GC tenía las siguientes condiciones:

10 Columna: J & W Scientific DB-5, 30 m x 0,254 mm ID x 0,25 µm FT

Gas portador: helio

Modo de inyección: sin fraccionamiento

Temperatura de inyector: 200°C

Temperatura de línea de transferencia: 300°C

15 Programa de temperatura: desde 50°C hasta 100°C a 2,5°C/min (10 min), desde 100°C hasta 250°C a 10°C/min (15 min), 15 min a 250°C

Volumen de inyección: 1 µl

Las condiciones de EM fueron las siguientes:

Espectrómetro: Finnigan TSQ700

20 Modo de ionización: impacto de electrones

Ajuste de tensión:

Corriente de filamento: 400 mA

Multiplicador de electrones: 1400 V

Energía de electrones: 70 eV

25 Modo de iones positivos

Condición de barrido:

Intervalo de barrido: 40-650 amu

Tiempo de barrido: 1 s

30 En los cromatogramas de LC/EM y GC/EM obtenidos con el hidrolizado de antibiótico 107891, se identificaron los siguientes aminoácidos junto con otros picos no identificados: lantionina, metil-lantionina, glicina, prolina, valina, ácido aspártico (los estudios de RMN indican que esto es un producto de transformación de asparagina, que genera ácido aspártico mediante hidrólisis), fenilalanina y leucina.

35 Se sometieron los factores A1 y A2 de antibiótico 107891 (que no están dentro del alcance de la presente invención) a hidrólisis ácida completa en las mismas condiciones (derivatización y HPLC-EM) notificadas para el complejo. Se llevó a cabo el análisis de GC-EM en un instrumento Thermo Finnigan Trace GC-EM equipado con un inyector PTV.

El procedimiento de GC tenía las siguientes condiciones:

Columna: Restek RTX-5MS, 15 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm FT

Gas portador: helio

Temperatura de superficie de contacto: 250°C

Programa de temperatura: 1,5 min a 50°C, desde 50°C hasta 100°C a 20°C/min, 1 min a 100°C, desde 100°C hasta 135°C a 20°C/min, 1 min a 135°C, desde 135°C hasta 250° a 20°C/min, 1 min a 250°C

Volumen de inyección: 1 µl

5 Inyector: modo sin fraccionamiento, temperatura de base 50°C, temperatura de transferencia 280°C, razón de transferencia 14,5°C/min

Las condiciones de EM fueron las siguientes:

Modo de ionización: impacto de electrones

Ajuste de potencial:

Corriente de filamento: 149 µA

10 Multiplicador de electrones: 200 V

Energía de electrones: 70 eV

Modo de iones positivos:

Condiciones de barrido:

Intervalo de barrido: 33-500 amu

15 Tiempo de barrido: 0,6 s

B) Determinación de 5-clorotriptófano en el complejo de antibiótico 107891

Se realizó la hidrólisis completa de complejo 107891 purificado según el método descrito por Simpson R J, Neuberger M R, Liu T Y, "Complete Aminoacid Analysis of Proteins from a Single Hydrolysate". Journal Biol. Chem (Estados Unidos), 10 de abril, 1976, 251 (7), 1936-40.

20 Este procedimiento de hidrólisis evita la degradación de aminoácidos normalmente inestables durante la digestión con ácidos minerales y por tanto permite la determinación de estos aminoácidos, incluyendo triptófano, a partir de un hidrolizado de un péptido. Se compró una muestra de patrón de 5-cloro-DL-triptófano de Biosynt AG, Staad, Suiza y se confirmó su estructura mediante análisis de RMN; se compró DL-triptófano de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania.

25 Los patrones de triptófano y 5-clorotriptófano eluyeron a tiempos de retención de 8,1 minutos y 11,5 minutos correspondientes a M+H⁺ a m/z 205 y 239, respectivamente.

Pudo detectarse el triptófano de patrón con el sistema cromatográfico usado con un límite de detección de 0,3 µg/ml. Este valor es inferior al valor que habría sido indicativo de la presencia de dicho aminoácido en la muestra de antibiótico sometida a prueba. Se obtuvieron resultados idénticos a partir del análisis de LC-EM de un hidrolizado de una muestra purificada de complejo de antibiótico 107891.

30 ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE FACTOR A1 Y FACTOR A2 DE ANTIBIÓTICO 107891 (que no está dentro del alcance de la presente invención)

35 El factor A1 de antibiótico 107891 (que no está dentro del alcance de la presente invención) proporciona un ión doblemente protonado a m/z=1124 y el factor A2 (que no está dentro del alcance de la presente invención) a m/z 1116 correspondientes a la composición de isótopos inferiores en experimentos de EM con un instrumento Thermofinnigan LCQ deca equipado con una fuente de electrospray, usando una mezcla de calibración Thermofinnigan. Las condiciones de electrospray fueron: tensión de pulverización: 4,7 kV; temperatura capilar: 250°C; tensión capilar: 8 V; modo de infusión 10 µl/min. Se registraron espectros a partir de una disolución 0,1 mg/ml en acetonitrilo:agua 50:50 (v/v) con ácido acético al 0,5% y se notifican en la figura 6A (espectro de baja resolución de barrido completo y 6B (espectro de alta resolución de barrido ampliado) y en la figura 7A (espectro de baja resolución de barrido completo) y B (espectro de alta resolución de barrido ampliado).

40 COMPARACIÓN DE FACTOR A1 Y FACTOR A2 DE ANTIBIÓTICO 107891 (que no están dentro de la presente invención) CON ANTIBIÓTICOS MF-BA-1768 α_1 Y MF-BA-1768 β_1

45 A) Se adquirió *Microbispora corallina* NNRL 30420 (MF-BA-1768), descrita en el documento US 6.551.591 B1, de la colección NNRL. En un experimento exploratorio, se fermentó la cepa *M. corallina* NNRL 30420 (MFBA- 1768) en un matraz Erlenmeyer en las condiciones descritas en el documento US 6.551.591 B1. Se extrajo el caldo recogido mediante dilución con metanol. Tras la centrifugación del micelio, se cargó el sobrenadante sobre una resina de absorción de poliestireno HP20, se eluyó con una mezcla de metanol:agua 70:30, que se redujo hasta un volumen pequeño y entonces se liofilizó. En el cromatograma dos picos mostraron señales de 1091 y 1108 [M+2H]²⁺,

correspondientes al $[M+2H]^{2+}$ notificado en el documento US 6.551.581 B1 para MF-BA-1768 β_1 y MF-BA-1768 α_1 , respectivamente.

5 B) En un experimento adicional, se realizó una fermentación en tanque de 30 l de la cepa *Microbispora sp.* NRRL 30420 (MF-BA-1768) y se procesó el caldo recogido siguiendo la descripción del documento US 6.551.591 B1. Tras las etapas de purificación secuenciales sobre resina de poliestireno HP20 y resina de poliamida CC 6 0,1-0,3 mm (Macherey-Nagel), se obtuvieron dos sustancias individuales en forma pura mediante HPLC preparativa sobre una columna C18 Phenomenex de 10 μ de tamaño de partícula (Torrance CA, EE.UU.) Luna (250 x 12,2 mm) eluida a una velocidad de flujo de 27 ml/min con el siguiente programa de múltiples etapas: tiempo = 0 min (32% de fase B); tiempo = 8 min (32% de fase B); tiempo = 20 min (36% de fase B); tiempo = 32 min (90% de fase B). La fase A era ácido fórmico al 0,05% (v/v) en agua, la fase B era CH₃CN.

10 Estas sustancias mostraron actividad antibacteriana frente a estafilococos y enterococos tal como se muestra en la tabla IV. En experimentos de LC-EM las dos sustancias mostraron señales de iones protonados dobles $[M+2H]^{++}$ correspondientes a antibiótico MF-BA-1768 α_1 y MF-BA-1768 β_1 , tal como se describe en la patente estadounidense 6.551.591 B1.

15

Tabla IV

CEPA	CIM (μ g/ml)				
	MF-BA-1768 α_1	MF-BA-1768 β_1	107891 A1	107891 A2	Complejo 107891
1400 <i>Staphylococcus aureus</i> ais. clín. Met r	0,13	0,5	0,13	0,13	0,13
568 <i>Enterococcus faecium</i> ais. clín.	4	16	1	2	2
569 <i>Enterococcus faecium</i> ais. clín. Van A	4	8	1	2	2
559 <i>Enterococcus faecalis</i> ais. clín.	4	8	1	2	1
560 <i>Enterococcus faecalis</i> ais. clín. Van A	4	8	0,5	1	0,5

Las condiciones experimentales de las pruebas antimicrobianas fueron las mismas que las utilizadas para las pruebas notificadas en la tabla VI a continuación.

20 Los análisis de LC-EM de los antibióticos aislados MF-BA-1768 α_1 y MF-BA-1768 β_1 se realizaron con una columna Symmetry C₁₈ (5:1) 4,6 x 250 mm (Waters; Milford MA, EE.UU.) equipada con una precolumna Symmetry C₁₈ (5:1) 3,9 x 20 mm (mantenidas ambas en un horno a una temperatura de 50°C). Se realizó la elución a una velocidad de flujo de 1 ml/min con el siguiente programa de elución de múltiples etapas: tiempo = 0 min (30% de fase B); tiempo = 8 min (30% de fase B); tiempo = 20 min (45% de fase B); tiempo = 24 min (90% de fase B) y tiempo = 28 min (90% de fase B). La fase A era tampón HCOONH₄ 25 mM pH 4,5:CH₃CN 95:5 (v/v) y la fase B era CH₃CN. El equipo de HPLC se acopló con un espectrómetro de masas de trampa iónica Finnigan LCQ (Thermoquest, Finnigan MAT, San José CA, EE.UU.). Se desviaron 100 μ l/min de los efluyentes de la columna hacia la fase de contacto de ESI del espectrómetro de masas LCQ. Se realizó el análisis de EM en las siguientes condiciones: entrada de muestra: flujo de gas de separador (N₂) 25 psi, flujo de gas auxiliar 5 psi; calentador capilar: 210°C; polaridad de tensión de entrada de muestra tanto positivo como negativo; tensión de pulverización de iones: +/-4,75 KV; tensión capilar: +/-12 V; condiciones de barrido: tiempo de iones máximo 50 ms; microbarrido completo 3.

30 Se analizaron los factores de antibiótico individuales MF-BA-1768 α_1 y MF-BA-1768 β_1 y factores A1 y A2 de antibiótico 107891 (que no están dentro del alcance de la presente invención) de manera individual y en mezcla. Los resultados se resumen en la siguiente tabla V.

TABLA V

	Tiempo de ret. (min)	$[M+2H]^{2+}$
MF-BA-1768 β_1	12,86	1091

A1 de antibiótico 107891	16,3	1124
A2 de antibiótico 107891	16,81	1116
MF-BA-1768 α_1	18,1	1108

En el mismo sistema cromatográfico, se eluyó factor A2 de ramoplanina (L. Gastaldo, R. Ciabatti, F. Assi, E. Restelli, J. K. Kettenring, L. F. Zerilli, G. Romanò, M. Denaro y B. Cavalleri, (1992): "Isolation, structure determination and biological activity of A-16686 factors A'1, A'2 and A'3 glycolipodepsipeptide antibiotics", J. Ind. Microbiol. 11:13- 18) con un tiempo de retención de 11,00 min.

ESPECTROSCOPIA DE RMN DE FACTOR A1 Y FACTOR A2 DE ANTIBIÓTICO 107891 (que no están dentro del alcance de la presente invención)

Se registraron espectros de ^1H -RMN de factor A1 (que no está dentro del alcance de la presente invención) y factor A2 (que no está dentro del alcance de la presente invención) de antibiótico 107891 en la mezcla $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (1:1) a 298 K con un espectrómetro Bruker AMX 600 aplicando una secuencia de supresión de agua. Como patrón interno se consideró la señal residual de acetonitrilo- d_3 a 1,94 ppm.

A) El espectro de ^1H -RMN de factor A1 de antibiótico 107891 se notifica en la figura 8.

B) El espectro de ^1H -RMN desacoplado de bb de factor A2 de antibiótico 107891 (que no está dentro del alcance de la presente invención) se notifica en la figura 9.

Los espectros de ^{13}C -RMN de factor A1 y factor A2 de antibiótico 107891 (que no están dentro del alcance de la presente invención) se registraron en la mezcla $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (1:1) a 298 K con un espectrómetro Bruker AMX 600 usando como patrón interno la señal residual de acetonitrilo- d_3 a 1,39 ppm.

ESPECTROS UV E IR DE FACTOR A1 Y FACTOR A2 DE ANTIBIÓTICO 107891 (que no están dentro del alcance de la presente invención)

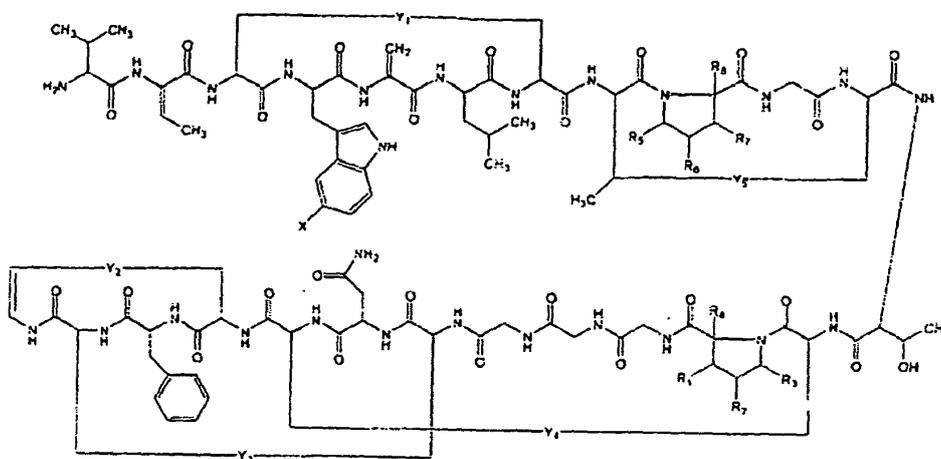
A) El espectro infrarrojo de factor A1 de antibiótico 107891 registrado en KBr con un espectrofotómetro Bruker FT-IR modelo IFS 48, se notifica en la figura 12.

B) El espectro UV de factor A1 de antibiótico 107891 (que no está dentro del alcance de la presente invención) registrado en metanol: H_2O 80:20 (v/v) con un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 16, se notifica en la figura 13.

C) El espectro infrarrojo de factor A2 de antibiótico 107891 (que no está dentro del alcance de la presente invención) registrado en KBr con un espectrofotómetro Bruker FT-IR modelo IFS 48, se notifica en la figura 14.

D) El espectro UV de factor A2 de antibiótico 107891 (que no está dentro del alcance de la presente invención) registrado en metanol: H_2O 80:20 (v/v) con un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 16, se notifica en la figura 15.

Basándose en los datos fisicoquímicos notificados anteriormente, puede asignarse la siguiente fórmula estructural al antibiótico 107891 (SEQ ID NO: 2): los compuestos según la reivindicación 1:



en la que X es H o un halógeno (F, Cl, Br, I), Y_1 , Y_2 , Y_3 , Y_4 e Y_5 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en S, S-O, S=O, O-S=O y O=S=O; y en la que R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 se seleccionan

independientemente del grupo que consiste en H, OH, alquilo (ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido) y arilo (sustituido o no sustituido), siempre que al menos uno de Y₁, Y₂, Y₃, Y₄ e Y₅ sea diferente de S.

En una realización alternativa, R₁, R₂, R₃ y R₄ pueden ser H u OH. Por tanto, las posibles combinaciones de R₁, R₂, R₃ y R₄ incluyen las siguientes.

5

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
H	H	H	H
OH	H	H	H
H	OH	H	H
H	H	OH	H
H	H	H	OH
OH	OH	H	H
OH	H	OH	H
OH	H	H	OH
H	OH	OH	H
H	H	OH	OH
H	OH	H	OH
OH	OH	OH	H
OH	OH	H	OH
OH	H	OH	OH
H	OH	OH	OH
OH	OH	OH	OH

De manera similar, R₅, R₆, R₇ y R₈ pueden ser H u OH. Por tanto, las posibles combinaciones de R₅, R₆, R₇ y R₈ incluyen las siguientes.

R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
H	H	H	H
OH	H	H	H
H	OH	H	H
H	H	OH	H
H	H	H	OH
OH	OH	H	H
OH	H	OH	H
OH	H	H	OH
H	OH	OH	H

H	H	OH	OH
H	OH	H	OH
OH	OH	OH	H
OH	OH	H	OH
OH	H	OH	OH
H	OH	OH	OH
OH	OH	OH	OH

ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO* DE ANTIBIÓTICO 107891

5 Se determinó la actividad antimicrobiana del antibiótico 107891 mediante el método de microdilución de caldo según las recomendaciones del Comité Nacional para las Normas de Laboratorios Clínicos ("National Committee for Clinical Laboratory Standards", NCCLS, documento M7-A5).

Las cepas usadas fueron aislados clínicos o cepas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). El resultado de las pruebas se notifica en la tabla VI y la tabla VII.

10 Se disolvió antibiótico 107891 en DMSO para obtener una disolución madre de 1000 µg/ml, y posteriormente se diluyó en agua para obtener una disolución de trabajo. Los medios usados fueron caldo Mueller Hinton ajustado con cationes (CAMHB) para *Staphylococci*, *M. catarrhalis*, *Enterococci* y *L. monocytogenes*; caldo Todd Hewitt (THB) para *Streptococci*; medio GC + Isovitalex al 1% + hemina al 1% para *Neisseria spp.*; infusión de cerebro y corazón + complemento C al 1% para *H. influenzae*; caldo de lactobacilos para *Lactobacilli*; Middlebrook 7H9 enriquecido con Middlebrook OADC para *M. smegmatis*; medio RPMI 1640 para *C. albicans*, Caldo Wilkins Chalgren + oxirasa (1:25 v/v) para *Clostridia*; caldo Brucella que contiene cisteína (0,5 g/L) para *Propionibacteria*. Los inóculos para las bacterias
15 fueron de 10⁵ UFC/ml. El inóculo de *C. albicans* fue de 1 X 10⁴ UFC/ml. Todas las pruebas se realizaron en presencia del 0,02% de albúmina de suero bovino (BSA). Se incubaron los cultivos a 35°C en aire excepto las cepas de *Clostridia* y *Propionibacteria* que necesitaron atmósfera anaerobia. Tras 18-24 horas se realizaron lecturas visuales y se determinaron las CIM. La CIM se definió como la menor concentración de antibiótico a la que no hay crecimiento visible.

TABLA VI: Actividad antimicrobiana de antibiótico 107891

Microorganismo		CIM (µg/ml)
		107891
819	<i>Staph. aureus</i> Smith ATCC19636	≤ 0,13
4061	<i>Staph. aureus</i> LIM1	≤ 0,13
3798	<i>Staph. aureus</i> aislado clín. VISA	2
1400	<i>Staph. aureus</i> aislado clín. Met-R	≤ 0,13
613	<i>Staph. aureus</i> aislado clín. Met-R	≤ 0,13
3797	<i>Staph. aureus</i> aislado clín. VISA Me	2
4064	<i>Staph. aureus</i> LIM2 GISA Met-R	0,5
1729	<i>Staph. haemolyticus</i> Met-R	8
1730	Met-S	2
147	<i>Staph. epidermidis</i> ATCC12228	≤ 0,13
1139		4
44	<i>Strept. pneumoniae</i> Pen-S	≤ 0,13
2868	Pen-I	≤ 0,13

49	<i>Strept. pyogenes</i>	≤ 0,13
559	<i>Ent. faecalis</i> Van-S	1
560	<i>Ent. faecalis</i> Van-A	0,5
A533	<i>Ent. faecalis</i> Van-A	1
568	<i>Ent. faecium</i> Van-S	2
569	<i>Ent. faecium</i> Van-A	1
B518	<i>Ent. faecium</i> Van-A	2
A6345	<i>Ent. faecium</i> Van-A Lnz-R	4
3754	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	32
884	<i>Listeria garviae</i>	≤ 0,13
148	<i>Listeria delbrueckii</i> ATCC4797	4
1450	<i>Listeria monocytogenes</i>	0,125
833	<i>Haemophilus influenzae</i>	32
970	<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 19418	32
3924	<i>Moraxella catharralis</i>	1
76	<i>Moraxella catharralis</i> ATCC8176	0,25
1613	<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC13090	0,5
997	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0,25
47	<i>Escherichia coli</i>	>128
145	<i>Candida albicans</i>	>128

TABLA VII: Actividad antimicrobiana de antibiótico 107891 frente a bacterias anaerobias

Microorganismo	MIC (µg/ml)
	Antibiótico 107891
ATCC 27520 <i>Propionibacterium limphophilum</i>	0,015
ATCC 25564 <i>Propionibacterium granulosum</i>	0,03
ATCC 14157 <i>Propionibacterium propionicus</i>	4
P9 <i>Propionibacterium acnes</i>	0,125
1329 <i>Propionibacterium acnes</i>	0,5
ATCC 25746 <i>Propionibacterium acnes</i>	0,015
ATCC 6919 <i>Propionibacterium acnes</i>	0,125
ATCC 6922 <i>Propionibacterium acnes</i>	≤ 0,0039
ATCC 1348 <i>Propionibacterium acnes</i>	0,25

4018 <i>Clostridium difficile</i>	≤ 0,125
4025 <i>Clostridium difficile</i>	≤ 0,125
4022 <i>Clostridium difficile</i>	≤ 0,125
4032 <i>Clostridium perfringens</i>	≤ 0,125
4043 <i>Clostridium butyricum</i>	≤ 0,125
4009 <i>Clostridium beijerinckii</i>	≤ 0,125
4052 <i>Clostridium septicum</i>	≤ 0,125
60601 <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	>128

El antibiótico 107891 muestra una buena actividad antibacteriana frente a bacterias gram-positivas.

5 El intervalo de CIM frente a *Staphylococcus spp.*, incluyendo cepas resistentes a meticilina (MRSA) e intermedio de glicopéptidos (GISA), es = 0,13-4 µg/ml y frente a aislados clínicos recientes de *Enterococcus spp.*, incluyendo resistente a vancomicina (VRE), es de 0,5-4 µg/ml. Frente a *Streptococcus spp.*, las CIM son ≤ 0,13 µg/ml.

El antibiótico 107891 también es activo frente a cepas gram-positivas anaerobias; las CIM son ≤ 0,13 µg/ml frente a *Clostridia* y ≤ 0,004-4 µg/ml frente a *Propionibacteria*. Se mostraron actividades antimicrobianas frente a cepas de *L. monocytogenes* (CIM de 0,125 µg/ml) y *Lactobacilli* (intervalo de CIM ≤ 0,13-4 µg/ml).

10 Algunas bacterias gram-negativas son sensibles al antibiótico 107891; las CIM son de 1-0,25 µg/ml frente a *M. catharralis*, de 0,5-0,25 µg/ml frente a *Neisseria spp.* y de 32 µg/ml frente a *H. influenzae*.

El antibiótico 107891 no es activo frente a las cepas de *E. coli* y *C. albicans* sometidas a prueba.

En experimentos de muerte con respecto al tiempo, el antibiótico 107891 muestra actividad bactericida frente a las cepas *S. aureus* GISA y *E. faecalis* VanA; a las 24 horas la concentración bactericida es el valor de CIM en caldo de Mueller Hinton.

15 *S. aureus* puede provocar infecciones potencialmente mortales y MRSA tiene significación clínica particular porque es resistente a todas las penicilinas y cefalosporinas y también a otros múltiples antibióticos; además se extiende fácilmente de paciente en paciente provocando estallidos de infección con importantes implicaciones para las instalaciones de atención sanitaria (W. Witte, (1999): "Antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: epidemiological aspects", Journal of Antimicrobial Chemotherapy 44:1-9). El Sistema de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales Nacional ("National Nosocomial Infection Surveillance System", NNIS) de los Centros para el Control de las Enfermedades ("Centers for Disease Control", CDC) notificó que la resistencia a la meticilina entre *S. aureus* en hospitales de los EE.UU. aumentó desde el 2,4% en 1975 hasta el 29% en 1991, con un grado superior de resistencia en unidades de cuidados intensivos (L. Archibald, L. Philips, D. Monnet, J. E. Jr Mc Gowan, F. Tenover, R. Gaynes, (1997): "Antimicrobial resistance in isolates from inpatients and outpatients in the United States: increasing importance of the intensive care unit", Clinic Infect. Dis. 24:211-5). Las infecciones por estafilococos nosocomiales están asociadas con morbilidad considerable, prolongando la duración de la estancia y aumentando los costes de hospitalización. La mayoría de las cepas de MRSA son resistentes frente a varios de los agentes antimicrobianos usados más comúnmente, incluyendo macrólidos, aminoglucósidos y los antibióticos de β-lactamas en uso actualmente, incluyendo la última generación de cefalosporinas.

30 Los patógenos adquiridos en hospitales resistentes a vancomicina responsables de infecciones (tales como endocarditis, meningitis y septicemia) presentan un desafío terapéutico creciente (Y. Cetinkaya, P. Falk y C. G. Mayhall, (2000): "Vancomycin-resistant enterococci", Clin. Microbiol. Rev. 13:686-707; L. B. Rice, (2001): "Emergence of vancomycin-resistant enterococci", Emerg. Infec. Dis. 7:183-7).

35 *S. pneumoniae* y *M. catarrhalis* son patógenos importantes reconocidos de seres humanos. Son una causa común de infecciones de las vías respiratorias, particularmente otitis media en niños e infecciones de las vías respiratorias bajas en ancianos. Recientemente se han aceptado *M. catarrhalis* y *S. pneumoniae* como los patógenos más comunes de las vías respiratorias (M. C. Enright y H. McKenzy, (1997): "Moraxella (Branhamella) catarrhalis. Clinical and molecular aspect of a rediscovered pathogen", J. Med. Microbiol. 46:360-71).

40 *Clostridia* son responsables de diferentes enfermedades: gangrena gaseosa e infecciones de heridas relacionadas, tétanos, botulismo, diarrea asociada con antibióticos (CDAD) y colitis pseudomembranosa. La mayoría de estos microorganismos producen exotoxinas que desempeñan un papel importante en la patogénesis de las enfermedades. *C. difficile* es el agente causante responsable del 25% de los casos de CDAD y de prácticamente todos los casos de colitis

pseudomembranosa. A lo largo de los últimos años, la aparición de coinfección por *C. difficile* se ha producido en pacientes con colonización o infección por enterococos resistentes a vancomicina (J. G. Bartlett, (1992): "Antibiotic associated diarrhea", Clin. Infect. Dis. 15:573-581).

5 ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO* DE FACTORES A1 Y A2 DE ANTIBIÓTICO 107891, factores que no están dentro del alcance de la presente invención

La tabla VIII notifica las actividades antimicrobianas de los factores A1 y A2 individuales, factores que no están dentro del alcance de la presente invención, del antibiótico 107891. Se determinaron las CIM mediante un método de dilución de microcaldo tal como se describió anteriormente.

TABLA VIII: Actividad antimicrobiana de los factores A1 y A2 de antibiótico 107891

Microorganismo		MIC (µg/ml)	
		Factor A1	Factor A2
819	<i>Staph. aureus</i> Met-S	≤0,03	≤0,03
1524	<i>Staph. aureus</i> Met-R	≤0,03	≤0,03
2235	<i>Staph. aureus</i> Met-R	0,06	0,06
3894	<i>Staph. epidermidis</i> Met-R	≤0,03	0,06
3881	<i>Staph. epidermidis</i> Met-R	0,06	≤0,03
602	<i>Staph. haemolyticus</i> Met-R	0,25	0,25
3919	<i>Strept. pneumoniae</i> Pen-R	≤0,0015	≤0,0015
3915	<i>Strept. pneumoniae</i> Pen-S	≤0,0015	≤0,0015
4323	<i>Ent. faecalis</i> VanA	≤0,03	≤0,03
J1	<i>Ent. faecalis</i> VanA	1	1
4341	<i>Ent. faecalis</i> VanB	0,5	0,5
4397	<i>Ent. faecalis</i> VanB	1	1
4341	<i>Ent. faecalis</i> VanB	2	2
6349	<i>Ent. faecium</i> Van A LNZ-R	2	2
4	<i>Ent. faecium</i> Van A	1	1
3	<i>Ent. faecium</i> Van A	0,5	0,5
D561	<i>Ent. faecium</i> Van A	2	2
A8	<i>Ent. faecium</i> Van A	0,5	0,5
4339	<i>Ent. faecium</i> VanD	0,25	0,25
4174	<i>Ent. gallinarum</i>	1	1
997	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0,5	0,25
1613	<i>Neisseria meningitidis</i>	0,25	0,25
1016	<i>Propionibacterium. acnes</i>	≤0,03	0,06

10

ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VIVO* DE ANTIBIÓTICO 107891

Se usaron ratones ICR hembra (Harlan Italia SpA - S. Pietro al Natisone, Italia) que pesaban 23-25 g en experimentos de infección letal aguda en ratones inmunocompetentes o neutropénicos. Se indujo neutropenia mediante dos

administraciones intraperitoneales de ciclofosfamida, 200 y 100 mg/kg, cuatro días y un día, respectivamente, antes de infectarse los ratones.

5 Se indujo la infección inoculando por vía intraperitoneal en ratones inmunocompetentes (8 animales/dosis/grupo de tratamiento) una suspensión bacteriana o bien de aislado clínico de estafilococos resistentes a meticilina (*Staph. aureus* SA3817) o bien de una cepa sensible a meticilina habitual (*Staph. aureus* Smith ATCC19636), o inoculando en ratones neutropénicos un aislado clínico de enterococos resistentes a glicopéptido (*Ent. faecalis* A533). Las exposiciones bacterianas (cerca de 10^6 células/ratón) se facilitaron suspendidas en 0,5 ml de mucina bacteriológica al 5% (Difco). Los animales no tratados murieron en un plazo de 24-72 h tras la infección. El tratamiento con antibiótico comenzó en un plazo de 10-15 min tras la exposición. Se administró antibiótico 107891 una vez por vía intravenosa o por vía subcutánea en diferentes formulaciones acuosas. La dosis eficaz al 50% (DE₅₀) y límites de confianza al 95% se calcularon mediante el método de Spearman-Kärber (D. J. Finney, (1952): "The Spearman-Kärber method", en: Statistical methods in biological assay. págs. 524-530, Charles Griffin & Co., Ltd., Londres) a partir del porcentaje de animales que sobrevivieron en el día 7. Los resultados se notifican en la siguiente tabla IX.

El antibiótico 107891 no es tóxico hasta la dosis máxima sometida a prueba de 200 mg/kg.

15 TABLA IX DE₅₀ de antibiótico 107891 en infecciones letales agudas en ratones

Formulación	Cepa	Vía	DE ₅₀ mg/kg	Límites de confianza al 95%
A	MSSA	i.v.	2,1	1,7 - 2,7
		s.c.	2,1	1,7 - 2,7
A	VanA	i.v.	3,2	2,7 - 3,9
		s.c.	11,1	9,2 - 13,5
B	MRSA	s.c.	4,2	3,5 - 5,1
C	VanA	i.v.	3,7	2,8 - 4,9
		s.c.	12,7	10,7 - 15,0

Formulaciones:

A: 10% (v/v) de DMSO, 10% (p/v) de beta-hidroxi-propil-ciclodextrina (Sigma), 80% (v/v) de glucosa al 5% (p/v) en H₂O

B: 10% (v/v) de DMSO, 40% (v/v) de PEG 400 en CH₃COOH acuoso 0,1 M

C: 50% (v/v) de PEG 400 en H₂O

Cepas:

I. MSSA: *Staph. aureus* Smith 819 ATCC19636

II. MRSA: *Staph. aureus* 3817, aislado clínico

III. VanA: *Ent. faecalis* A533, aislado clínico, en ratones neutropénicos

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 La figura 1A (espectro de baja resolución de barrido completo) y 1B (espectro de alta resolución de barrido ampliado) representan espectros de masas del antibiótico 107891 que muestran un ión doblemente protonado a m/z 1124 y m/z 1116.

La figura 2 representa el espectro de absorción IR del antibiótico 107891 dispersado en KBr.

La figura 3 representa el espectro de UV del antibiótico 107891 disuelto en metanol:H₂O.

La figura 4 representa el espectro de ¹H-RMN registrado en la mezcla metanol-d₄:H₂O (pH 4,3, HCl) 40:10 (v/v) a 40°C con un espectrómetro Bruker AMX 600 aplicando una secuencia de supresión de agua.

25 La figura 5 representa el espectro de ¹³C-RMN registrado en la mezcla metanol-d₄:H₂O (pH 4,3, HCl) 40:10 (v/v) a 40°C con un espectrómetro Bruker AMX 600.

La figura 6A (espectro de baja resolución de barrido completo) y 6B (espectro de alta resolución de barrido ampliado) representan espectros de masas del factor A1 de antibiótico 107891 (que no está dentro del alcance de la presente invención) que muestran un ión doblemente protonado $[M+2H]^{2+}$ a m/z 1124.

5 La figura 7A (espectro de baja resolución de barrido completo) y 7B (espectro de alta resolución de barrido ampliado) representan espectros de masas del factor A2 de antibiótico 107891 (que no está dentro del alcance de la presente invención) que muestran un ión doblemente protonado $[M+2H]^{2+}$ a m/z 1116.

La figura 8 representa el espectro de ^1H -RMN del factor A1 de antibiótico 107891 (que no está dentro del alcance de la presente invención) registrado en la mezcla $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (1:1) a 298 K con un espectrómetro Bruker AMX 600 aplicando una secuencia de supresión de agua.

10 La figura 9 representa el espectro de ^1H -RMN del factor A2 de antibiótico 107891 (que no está dentro del alcance de la presente invención) registrado en la mezcla $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (1:1) a 298 K con un espectrómetro Bruker AMX 600 aplicando una secuencia de supresión de agua.

La figura 10 representa el espectro de ^{13}C -RMN del factor A1 de antibiótico 107891 (que no está dentro del alcance de la presente invención) registrado en la mezcla $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (1:1) a 298 K con un espectrómetro Bruker AMX 600.

15 La figura 11 representa el espectro de ^{13}C -RMN del factor A2 de antibiótico 107891 (que no está dentro del alcance de la presente invención) registrado en la mezcla $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (1:1) a 298 K con un espectrómetro Bruker AMX 600.

La figura 12 representa el espectro de absorción IR del factor A1 de antibiótico 107891 (que no está dentro del alcance de la presente invención) dispersado en KBr.

20 La figura 13 representa el espectro de UV del factor A1 de antibiótico 107891 (que no está dentro del alcance de la presente invención) disuelto en metanol: H_2O .

La figura 14 representa el espectro de absorción IR del factor A2 de antibiótico 107891 (que no está dentro del alcance de la presente invención) dispersado en KBr.

La figura 15 representa el espectro de UV del factor A2 de antibiótico 107891 (que no está dentro del alcance de la presente invención) disuelto en metanol: H_2O .

25 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Método de fermentación de *Microbispora sp.* ATCC PTA-5024

30 Se mantuvo la cepa *Microbispora sp.* ATCC PTA-5024 sobre agar de harina de avena inclinado durante 2-3 semanas a 28°C. Se rascó el contenido microbiano de una inclinación con 5 ml de agua estéril y se inoculó dentro de matraces Erlenmeyer de 500 ml que contenían 100 ml de medio de siembra (AF/MS) que estaba compuesto por (g/l): dextrosa 20, extracto de levadura 2, harina de semilla de soja 8, NaCl 1 y carbonato de calcio 4. Se preparó el medio en agua destilada y se ajustó el pH a 7,3 antes de la esterilización a 121°C durante 20 min. Se hicieron crecer los matraces inoculados a 28°C, sobre un agitador giratorio que funcionaba a 200 rpm. Tras 4-6 días, se inoculó el 5% de este cultivo en una segunda serie de matraces que contenían el mismo medio de fermentación. Tras 72 horas de incubación, se transfirieron 200 ml dentro de un biorreactor de 4 l que contenía 3 l del mismo medio vegetativo.

35 Se llevó a cabo la fermentación a 30°C, con una agitación a 700 rpm y una aireación de 0,5 vvm. Tras 72 horas se transfirió el cultivo (1,5 l) dentro de un biorreactor de 20 l que contenía 15 l del mismo medio vegetativo. Se llevó a cabo la fermentación durante 48 horas a 30°C, con una agitación a 500 rpm y una aireación de 0,5 vvm y luego se transfirió al tanque de producción. Se realizó la producción de antibiótico 107891 en un fermentador de 300 l que contenía 200 l del medio de producción M8 compuesto por (g/l): almidón 20, glucosa 10, extracto de levadura 2, caseína hidrolizada 4, extracto de carne 2 y carbonato de calcio 3. Se preparó el medio en agua desionizada y se ajustó el pH a 7,2 antes de la esterilización a 121°C durante 25 min. Tras enfriar, se inocularon en el fermentador aproximadamente 14 l (7%) de cultivo previo. Se hizo funcionar el fermentador a 29°C, con una agitación a 180 rpm y una aireación de 0,5 vvm con una altura piezométrica de 0,36 bar. Se recogió el fermentador tras 98 horas de fermentación.

45 Se monitorizó la producción del antibiótico 107891 mediante HPLC tal como se describió anteriormente, tras la extracción del caldo de cultivo completo con el mismo volumen de metanol. Se realizó la extracción a temperatura ambiente con agitación durante una hora.

Ejemplo 2: Método de fermentación alternativo de *Microbispora sp.* ATCC PTA-5024

50 Se inoculó *Microbispora sp.* ATCC PTA-5024 dentro de matraces Erlenmeyer de 500 ml que contenían 100 ml de medio de crecimiento (G1) constituido por g/l: glucosa 10, maltosa 10, aceite de soja 10, harina de semilla de soja 8, extracto de levadura 2 y carbonato de calcio 4. Se preparó el medio en agua desionizada y se esterilizó a 120°C x 20 min. sin ajuste de pH. Se incubaron los matraces inoculados durante 120-168 horas a 28°C, con una agitación a 200 rpm hasta que se observó un buen crecimiento. Entonces se usaron los matraces para inocular (3%) un biorreactor de 4 l que

contenía 3 l de medio de siembra AF/MS, que está compuesto tal como se describió en el ejemplo 1. Tras 120 horas de fermentación a 30°C, agitación a 700 rpm y aireación de 0,5 vvm, se transfirieron 1,5 l del cultivo a un biorreactor de 20 l que contenía 15 l del mismo medio vegetativo. Se llevó a cabo la fermentación durante 96 horas a 30°C, agitación a 600 rpm y aireación de 0,5 vvm, y entonces se transfirió al tanque de producción.

5 Se obtuvo la producción de antibiótico en un fermentador de 300 l que contenía 200 l del medio productivo (V6) constituido por (g/l): dextrosa 20, extracto de levadura 5, extracto de carne 5, caseína hidrolizada 3, peptona 5 y NaCl 1,5. Se preparó el medio en agua desionizada y se ajustó el pH a 7,5 con NaOH, y se esterilizó a 121°C durante 20 min.

10 Se inocularon en el fermentador 14 l de cultivo de siembra (7%) y se llevó a cabo la fermentación a 29°C, con agitación a 180 rpm, aireado con 100 l de aire convencional por minuto (0,5 vvm). Se monitorizó la producción de antibiótico 107891 mediante HPLC tal como se describió anteriormente. Se recogió la fermentación tras aproximadamente 160 horas.

Ejemplo 3 Recuperación de antibiótico 107891

15 Se filtró el caldo de fermentación descrito en el ejemplo 1 mediante un sistema de filtración tangencial (membrana de 0,1 µm de tamaño de poro, Koch Carbo-Cor, Koch Wilmington, EE.UU.) para obtener 170 l de sobrenadante y 30 l de micelio concentrado. Se encontró el complejo de antibiótico 107891 tanto en el filtrado (A) como en el micelio (B).

20 (A) Se agitó el caldo filtrado durante una noche a temperatura ambiente en presencia de resina de poliestireno Diaion HP-20 (4 l). Entonces se recuperó la resina, se lavó con 10 l de metanol:agua 4:6 (v/v) y se eluyó de manera discontinua inicialmente con 10 l de metanol:agua 9:1 (v/v) y luego con 10 l de metanol:butanol:agua: 9:1:1 (v/v). Se concentraron las fracciones eluidas combinadas que contenían antibiótico 107891 hasta un pequeño volumen con un evaporador giratorio y luego se liofilizaron, dando 32 g de material de partida. Se disolvió este material de partida en n-butanol (1 l) y luego se extrajo secuencialmente tres veces con 800 ml de agua. Se concentró la fase orgánica a presión reducida hasta obtener un residuo aceitoso, que se disolvió en metanol. Tras la adición de éter de petróleo, se obtuvieron 5 g de preparación de antibiótico bruto mediante precipitación.

25 (B) Tras la adición de 25 l de metanol, se agitó la parte retenida que contenía el micelio durante 1 hora y se filtró para obtener 45 l de extracto de micelio. Entonces se diluyó esta disolución con agua (20 l) y se agitó durante una noche a temperatura ambiente con resina de poliestireno Diaion HP-20 (1 l). Entonces se recuperó la resina, se lavó con 2 l de metanol:agua 40:60 (v/v) y se eluyó secuencialmente de manera discontinua con 3 l de metanol:agua 85:15 (v/v) y luego con 2 l de metanol:agua 90:10 (v/v). Se monitorizaron las fracciones eluidas para determinar la presencia de antibiótico 107891 mediante un ensayo de difusión de agar sobre *Staphylococcus aureus* y mediante un procedimiento de HPLC analítica tal como se notificó anteriormente.

30

Se combinaron las fracciones eluidas que contenían antibiótico 107891, se concentraron a presión reducida y se liofilizaron, dando 8,1 gramos de antibiótico 107891 bruto.

Ejemplo 4: Recuperación alternativa de antibiótico 107891

35 Se llevó el caldo recogido de la fermentación en tanque de 200 l descrita en el ejemplo 2 a pH 6,8 y se filtró el caldo mediante filtración tangencial (membrana de 0,1 µ de tamaño de poro, Koch Carbo-Cor). Se agitó el permeado (180 l) de manera discontinua durante toda la noche a temperatura ambiente con 2 l de resina Diaion HP20 (Mitsubishi Chemical) y entonces se recogió la resina.

40 Se añadió metanol (25 l) a la parte retenida en el equipo de filtración tangencial (aproximadamente 20 l) que contenía el micelio concentrado. Se agitó esta suspensión durante 1 hora y luego se filtró con el sistema de microfiltración para dar un volumen retenido residual de aproximadamente 20 l. Entonces se añadió metanol adicional (25 l) y se repitió el procedimiento anterior secuencialmente durante un total de 5 ciclos. Se diluyeron los extractos de metanol combinados (aproximadamente 125 l) con 160 l de agua desmineralizada y se agitaron de manera discontinua durante toda la noche a temperatura ambiente con 3 l de resina Diaion HP 20. Entonces se recogió la resina, y se combinó con la resina Diaion HP 20 usada para extraer el permeado de caldo según el procedimiento descrito anteriormente. Se lavó la resina combinada dentro de una columna cromatográfica con 20 l de agua:metanol 6:4 (v/v). Se eluyó el antibiótico 107891 con 23 l de metanol:tampón de formiato de amonio 50 mM pH 3,5:n-butanol 9:1:1 (v/v). Entonces se concentró a vacío este eluato hasta un volumen final de 3 l. Entonces se cargó la disolución concentrada a pH 4,5 sobre una columna de 2,5 l de poliamida CC 6 0,1-0,3 mm (Macherey-Nagel) condicionada con agua:metanol 7:3 (v/v). Se lavó la columna con agua:metanol 7:3 (v/v) y luego con tampón de formiato de amonio 25 mM pH 3,5:metanol 7:3 (v/v). Se eluyó el antibiótico con mezcla agua:metanol 3:7 (v/v) y luego con 1:9 (v/v). Se completó la elución con tampón de formiato de amonio 25 mM pH 2,8:metanol a una razón de 1:9 (v/v). Se combinaron los eluatos que contenían antibiótico 107891 y se concentraron a vacío hasta un volumen final de 1 l. Se llevó el pH de la disolución concentrada desde 4 hasta 5,7 con hidróxido de amonio 7 M y luego se centrifugó la mezcla para recoger el precipitado. Se suspendió este sólido en agua y se liofilizó, dando 6,96 g de preparación de antibiótico 107891.

50

55 Ejemplo 5: Purificación de antibiótico 107891

5 Se purificó antibiótico 107891 bruto (3,6 g), preparado tal como se describió en el ejemplo 3, mediante cromatografía a presión media sobre 100 g de fase inversa C8 (EC) 40-70 µm de tamaño de partícula, 60A de tamaño de poro, IST (International Sorbent Technology, Mid-Glamorgan, R.U.) usando un sistema de cromatografía de presión media Büchi B-680 (Büchi laboratories-technik AG, Flawil Switzerland) equipado con un formador de gradiente B-687, colector de fracciones B-684, columna de vidrio B-685 70 X 460 mm. Se condicionó previamente la resina con una mezcla de fase A:fase B 8:2 (v/v) y entonces se eluyó a 25 ml/min con 60 min de gradiente lineal desde el 20% hasta el 60% de fase B en 60 min.

La fase A fue acetonitrilo:tampón de formiato de amonio 20 mM (pH 6,6) 10:90 (v/v); y la fase B fue acetonitrilo:tampón de formiato de amonio 20 mM (pH: 6,6) 90:10 (v/v).

10 Se combinaron las fracciones que contenían antibiótico 107891, se concentraron a vacío y se liofilizaron dos veces en agua, dando 430 mg de antibiótico 107891 purificado.

Ejemplo 6: Purificación de antibiótico 107891 mediante HPLC preparativa

15 Se purificó adicionalmente el antibiótico 107891 mediante HPLC preparativa sobre una columna Lichrosorb RP8 preempaquetada de Hibar (7 µm de tamaño de partícula) RT 250-25 mm, Merck, usando una elución en gradiente lineal de 25 minutos de desde el 30% hasta el 45% de fase B, con una velocidad de flujo de 30 ml/min. La fase A fue tampón de formiato de amonio 25 mM pH 4,5:acetonitrilo 95:5 (v/v) y la fase B fue acetonitrilo.

20 Se disolvió una muestra de antibiótico 107891 del ejemplo 5 (300 mg) en 1,5 ml 350:1 de DMSO:ácido fórmico 95:5 (v/v) y se procesaron 300 µl en cada serie cromatográfica. El antibiótico 107891 se eluyó normalmente a los 15-16 minutos. Se combinaron las fracciones eluidas de 5 series cromatográficas, que contenían antibiótico 107891, y se concentraron a vacío. Se liofilizó secuencialmente la disolución residual en agua tres veces, dando 31 mg de antibiótico 107891 como un polvo blanco.

Ejemplo 7: Separación y purificación de factores A1 y A2 individuales (que no están dentro del alcance de la presente invención) de antibiótico 107891

25 Se separaron los factores A1 y A2 (que no están dentro del alcance de la presente invención) y se purificaron del complejo de antibiótico 107891 del ejemplo 5 mediante HPLC preparativa sobre una columna Symmetry Prep C18 (7 µm de tamaño de partícula) 7,8 x 300 mm Waters (Mildfold EE.UU.) usando dos programas de elución diferentes.

18. Uso de los compuestos según la reivindicación 1 y una sal no tóxica de los mismos con un ácido como promotor del crecimiento animal.

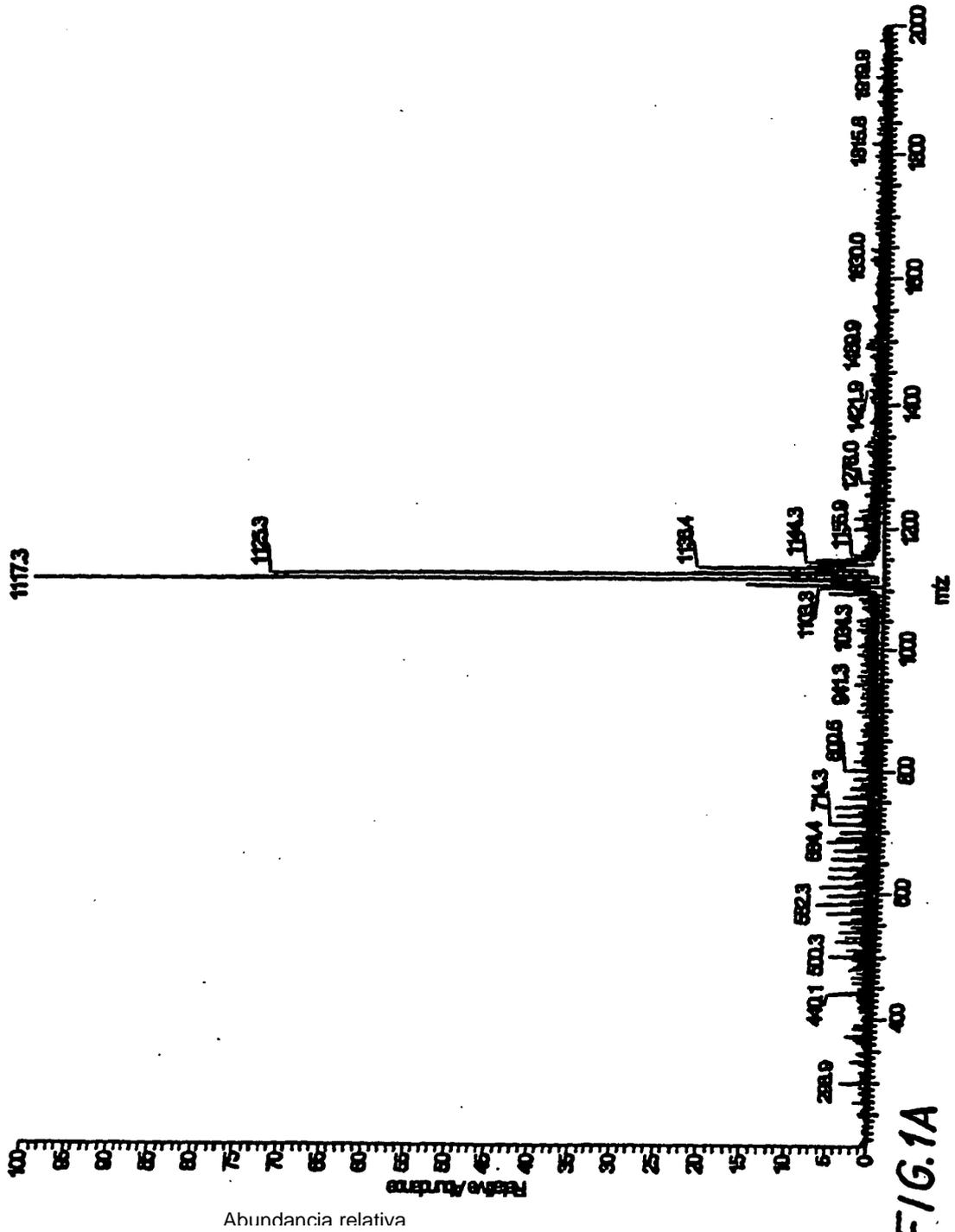


FIG.1A

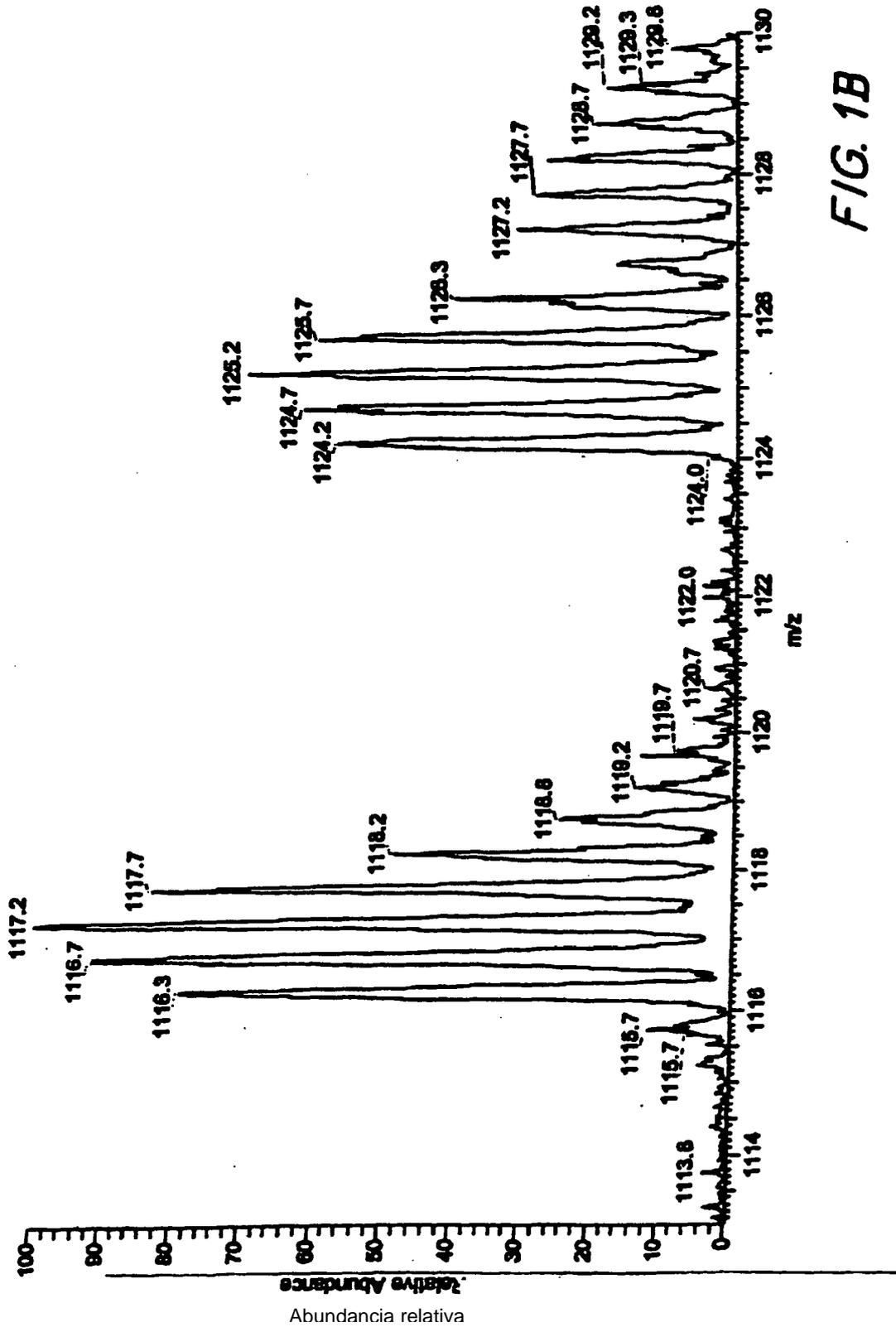


FIG. 1B

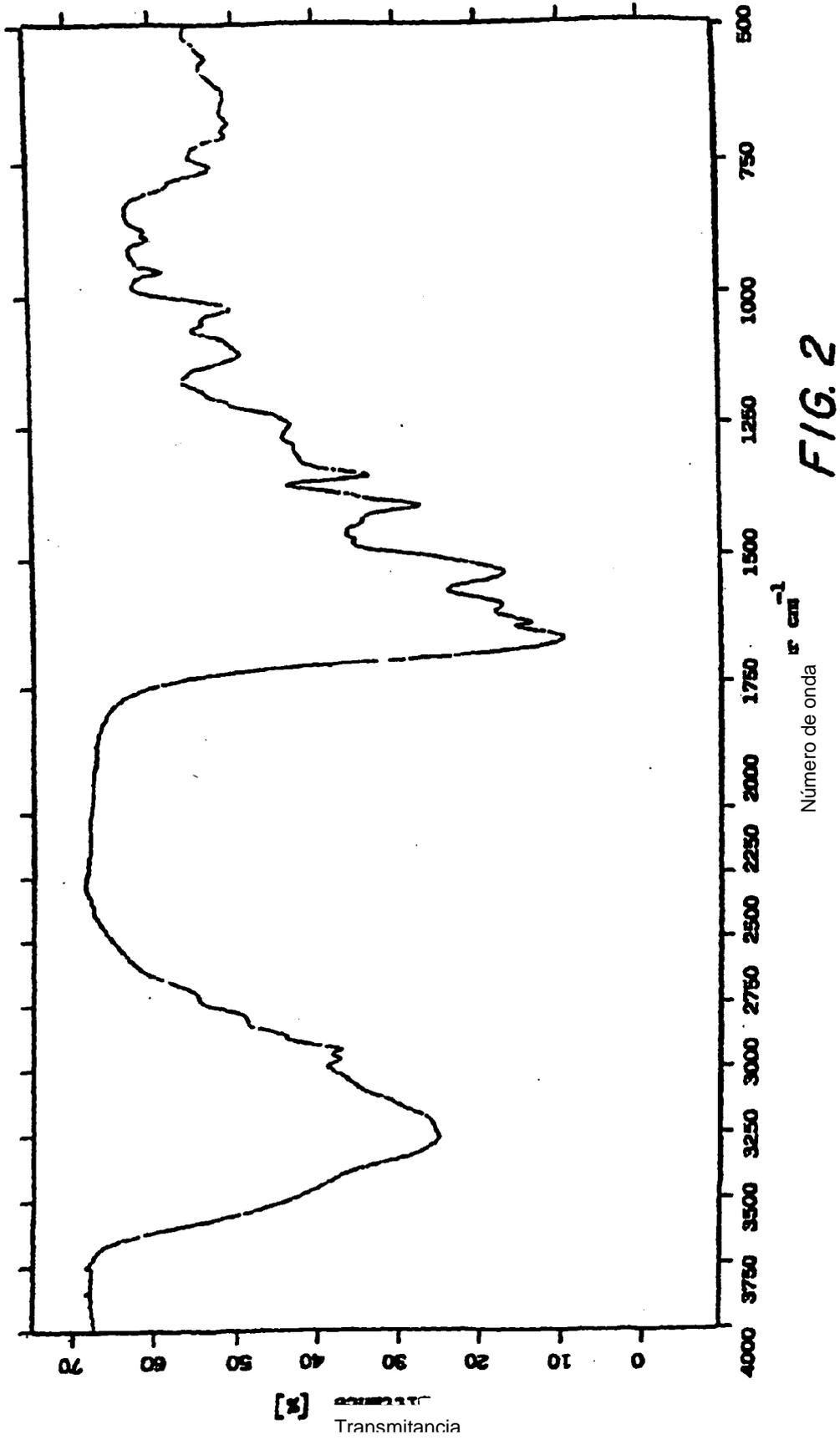


FIG. 2

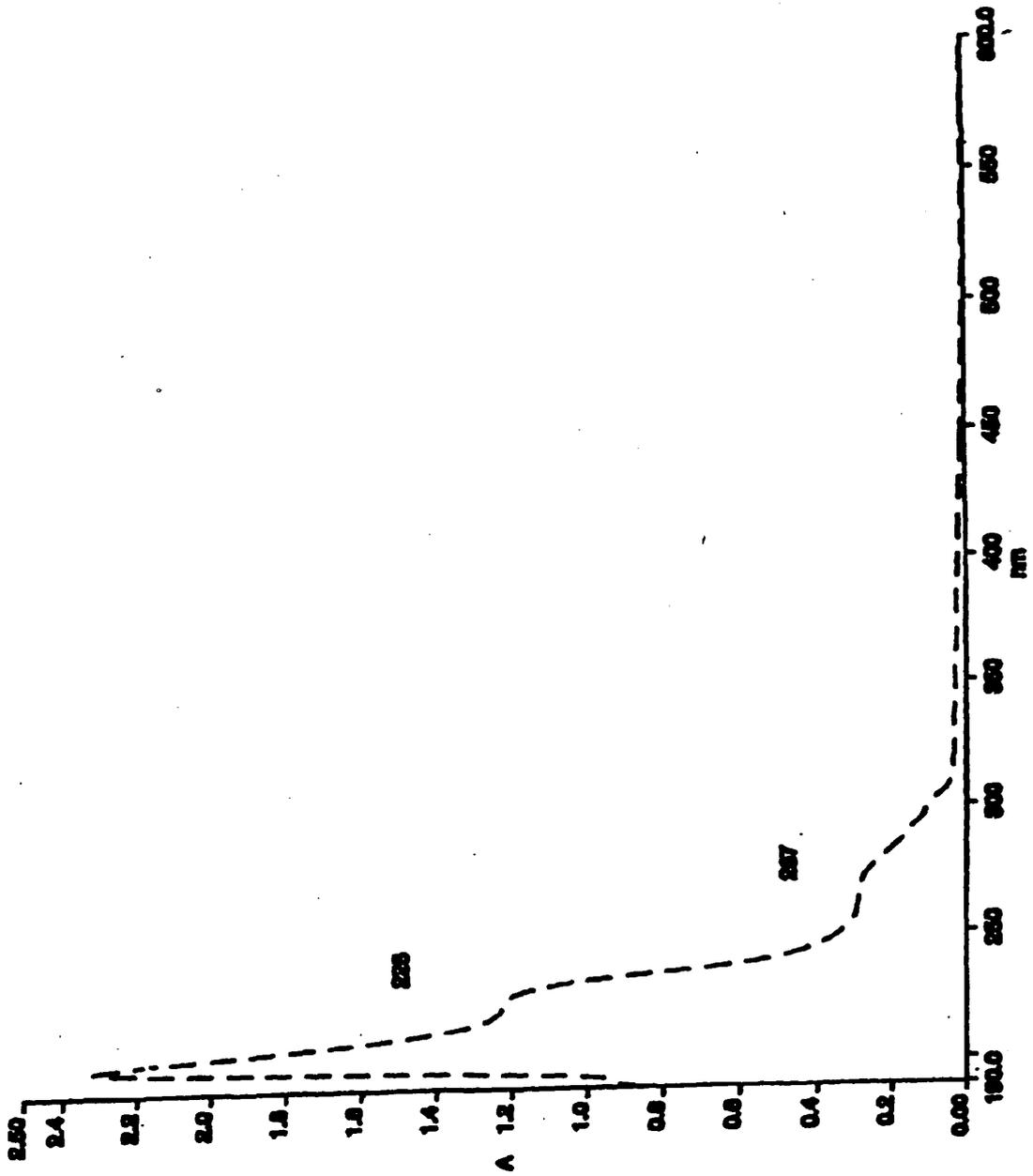
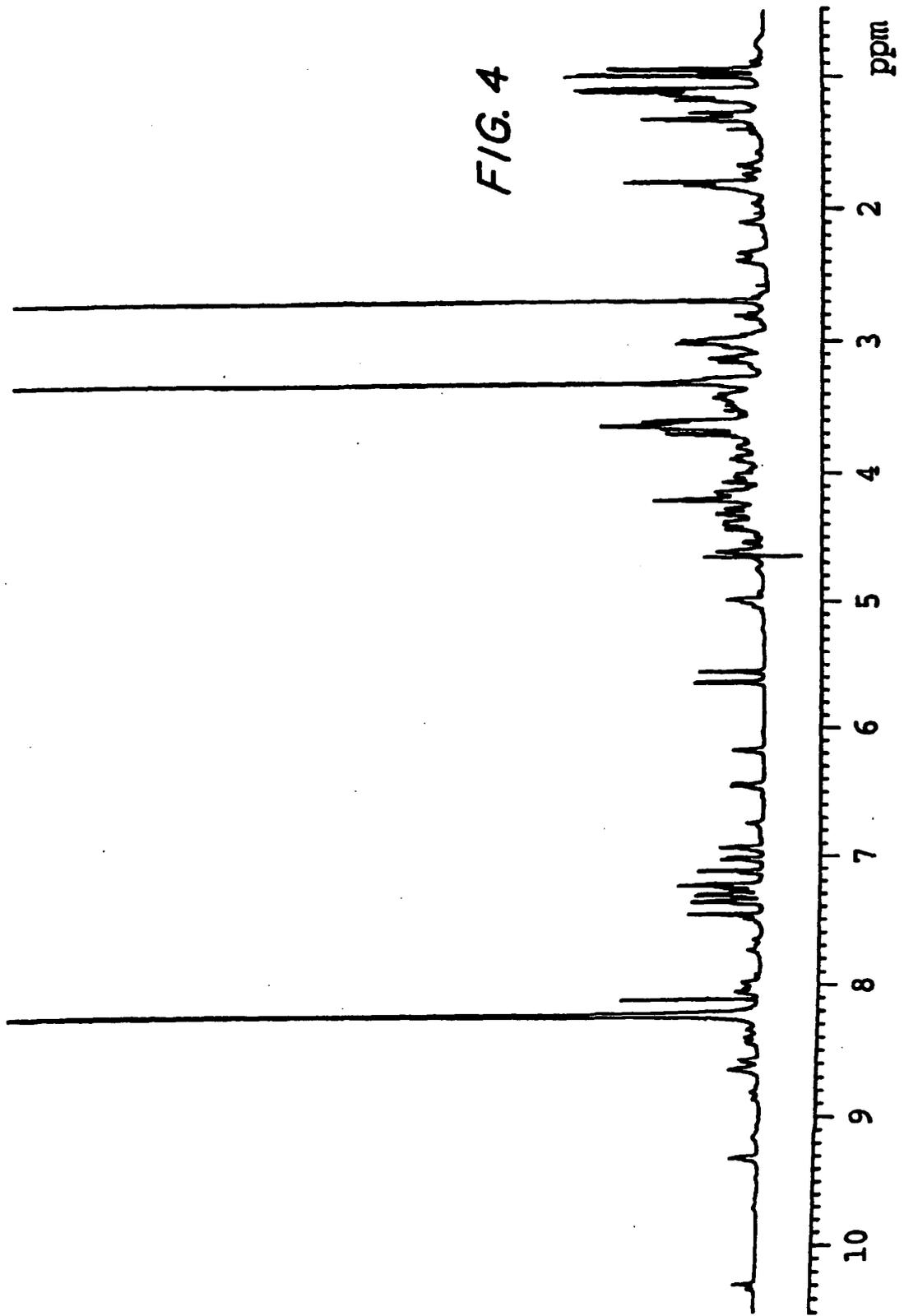


FIG. 3



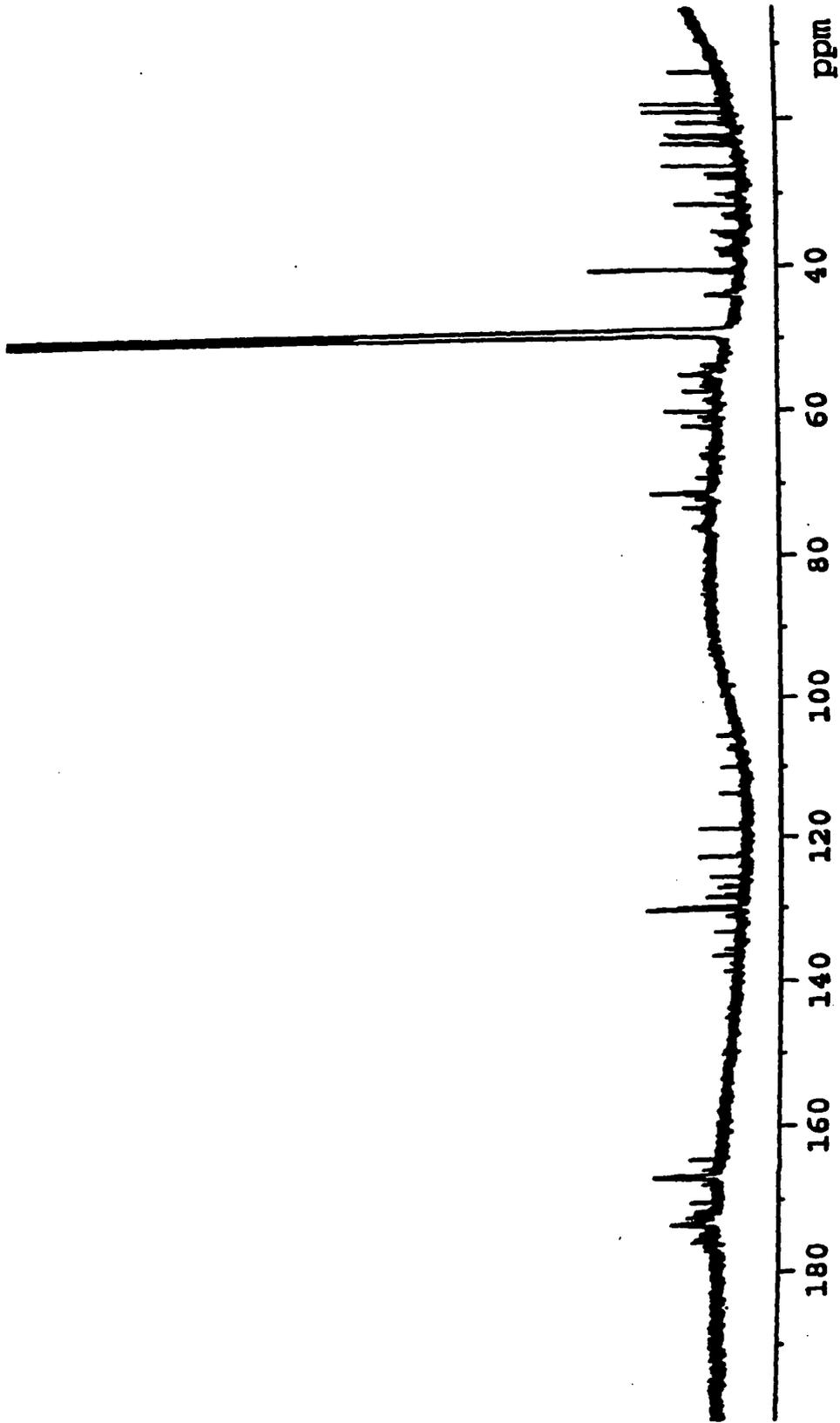


FIG. 5

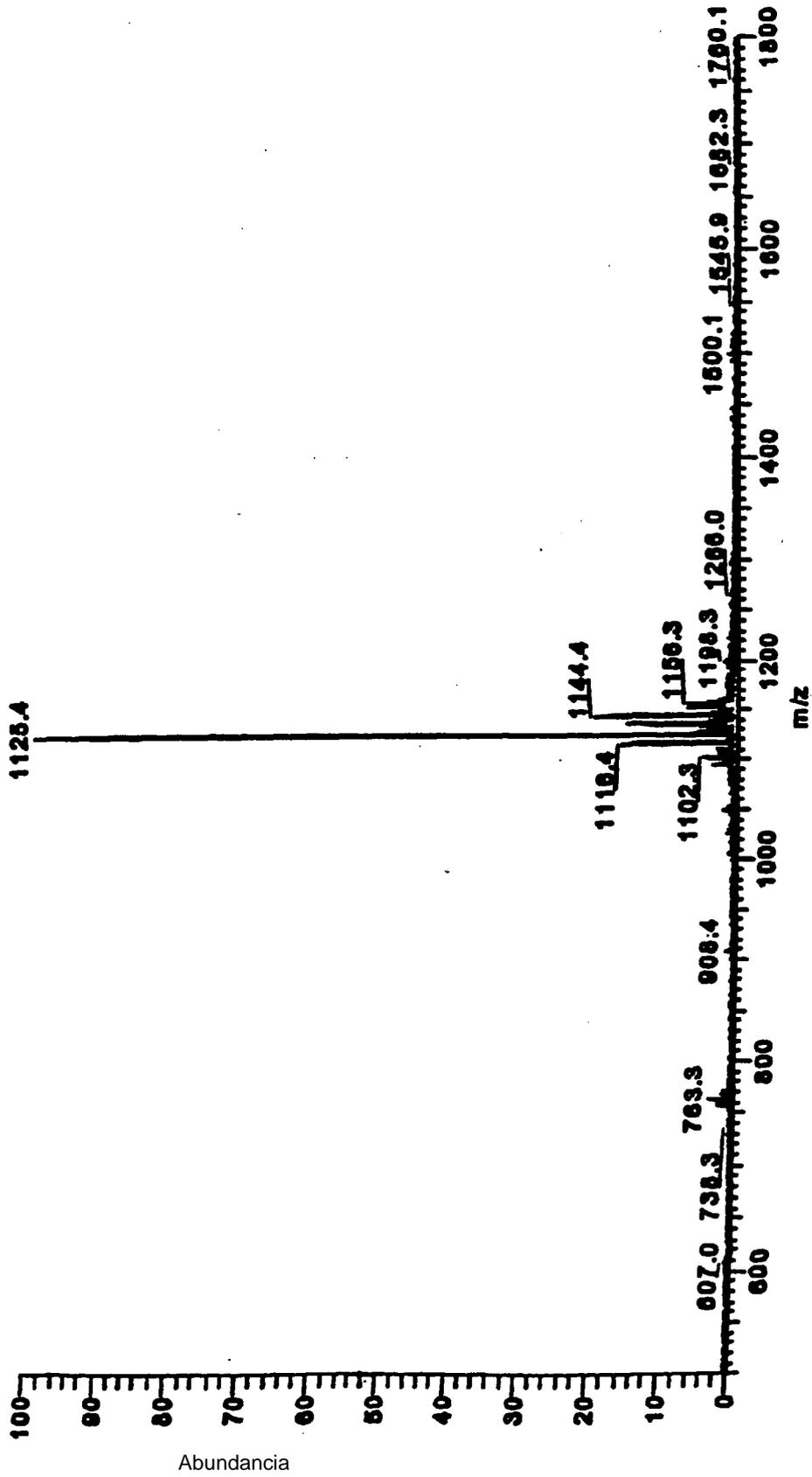


FIG. 6A

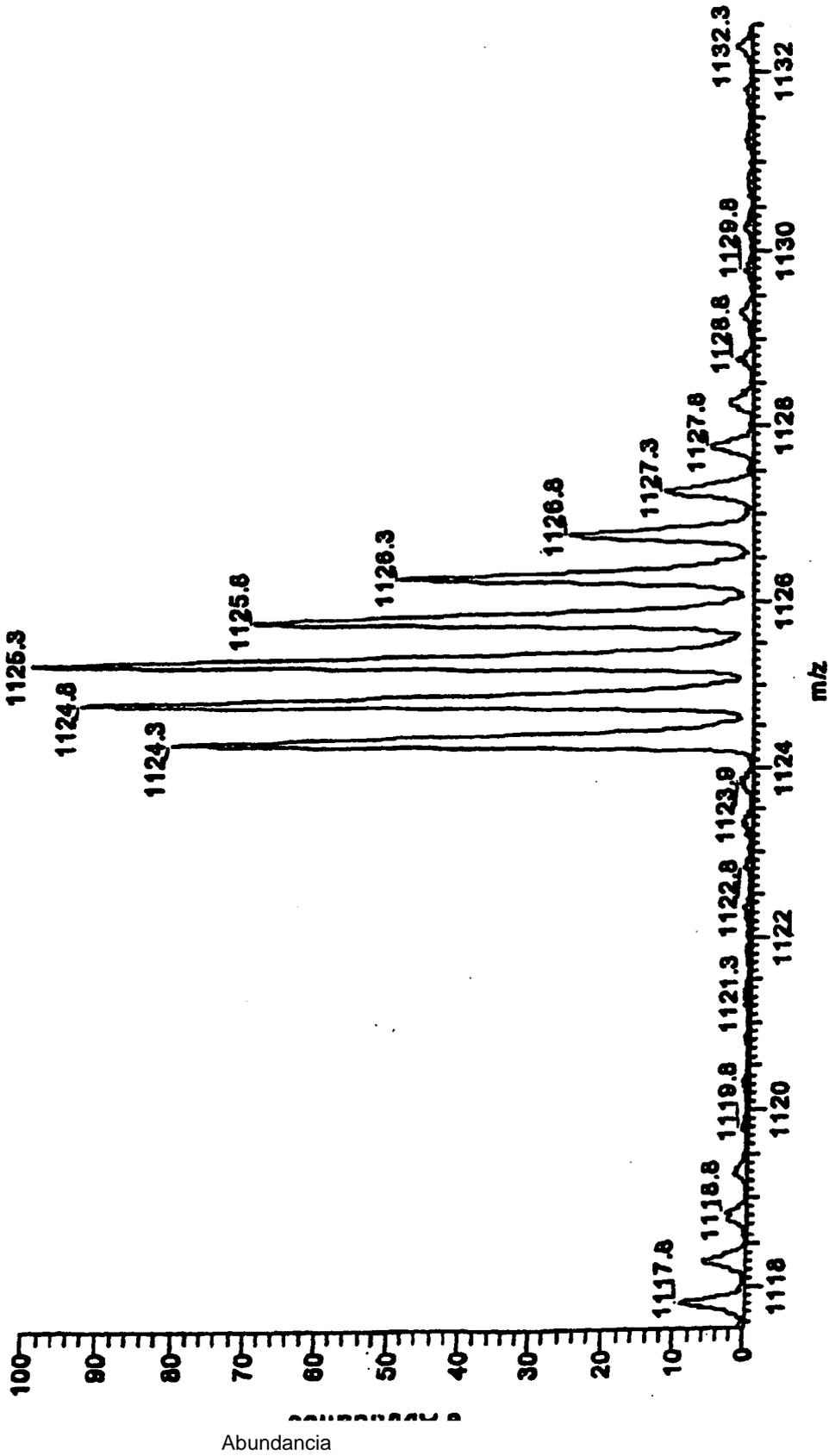


FIG. 6B

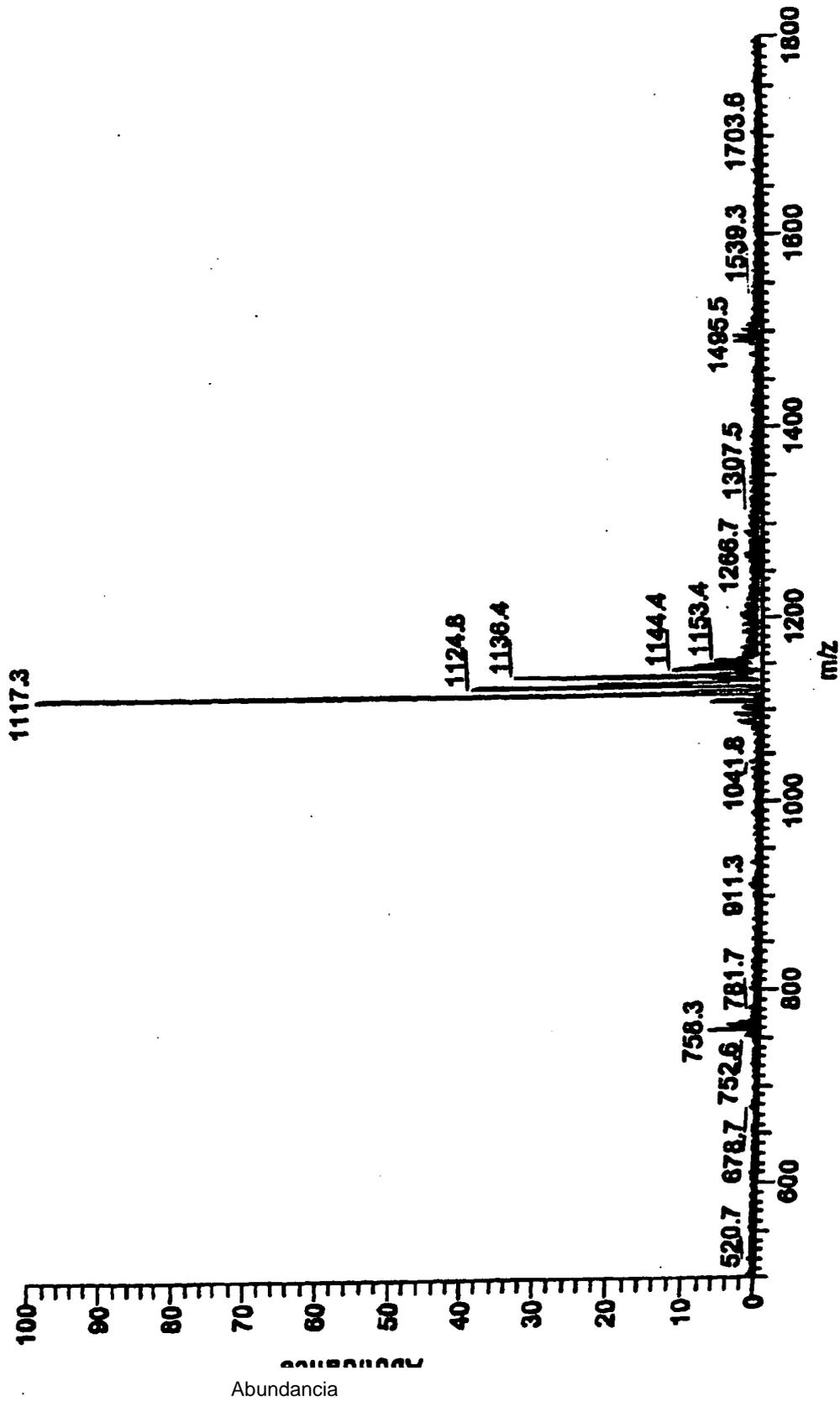


FIG. 7A

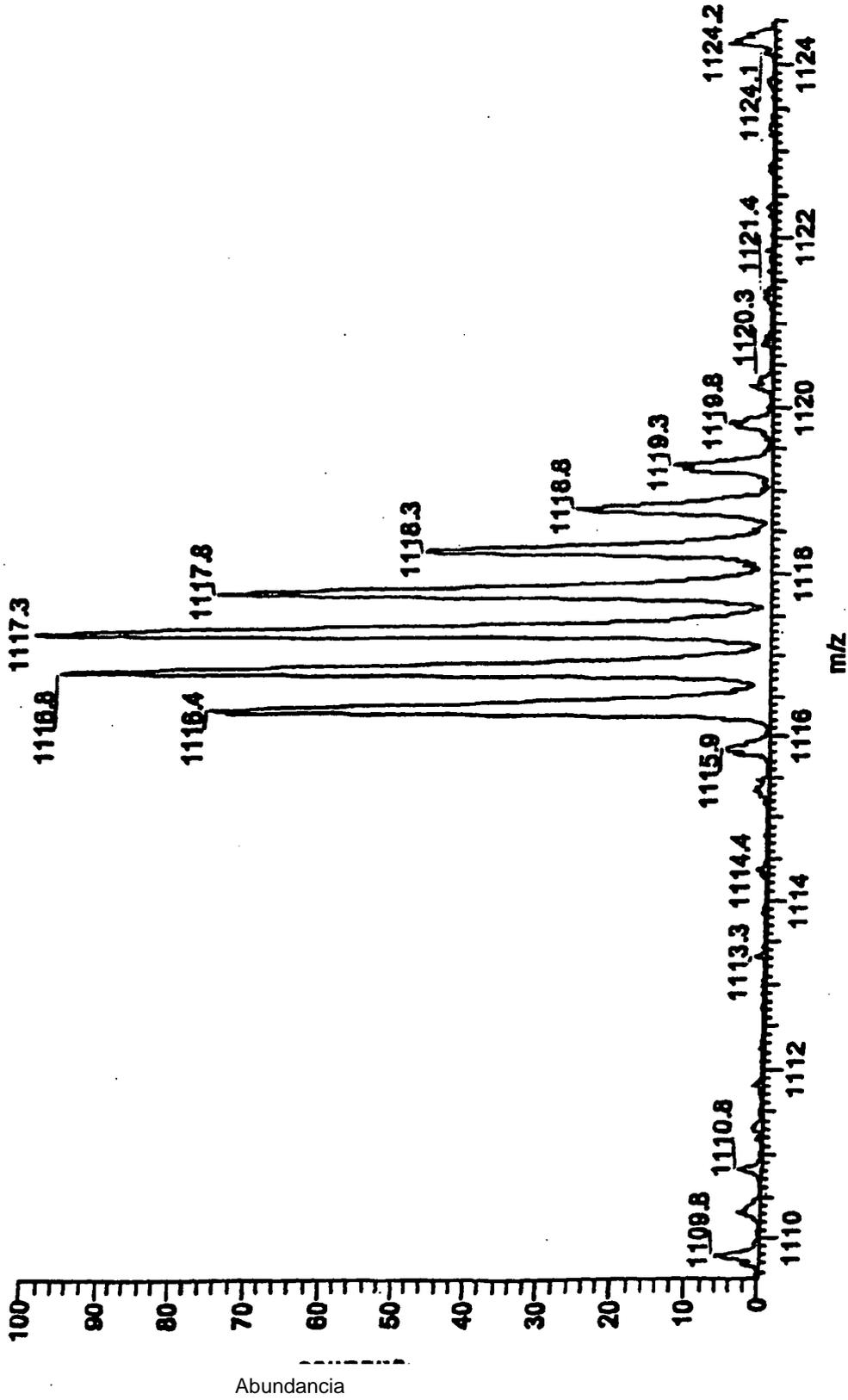
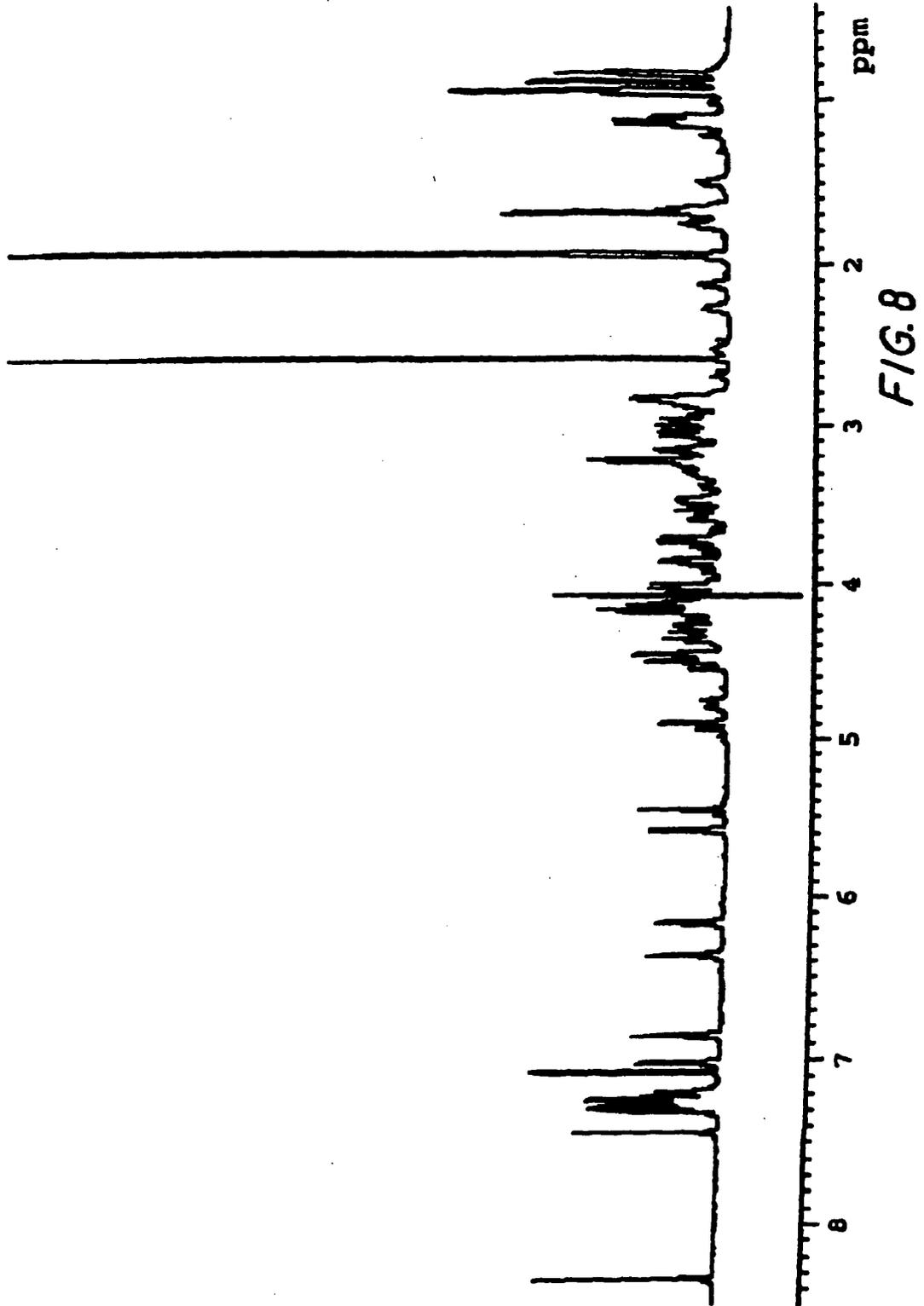


FIG. 7B



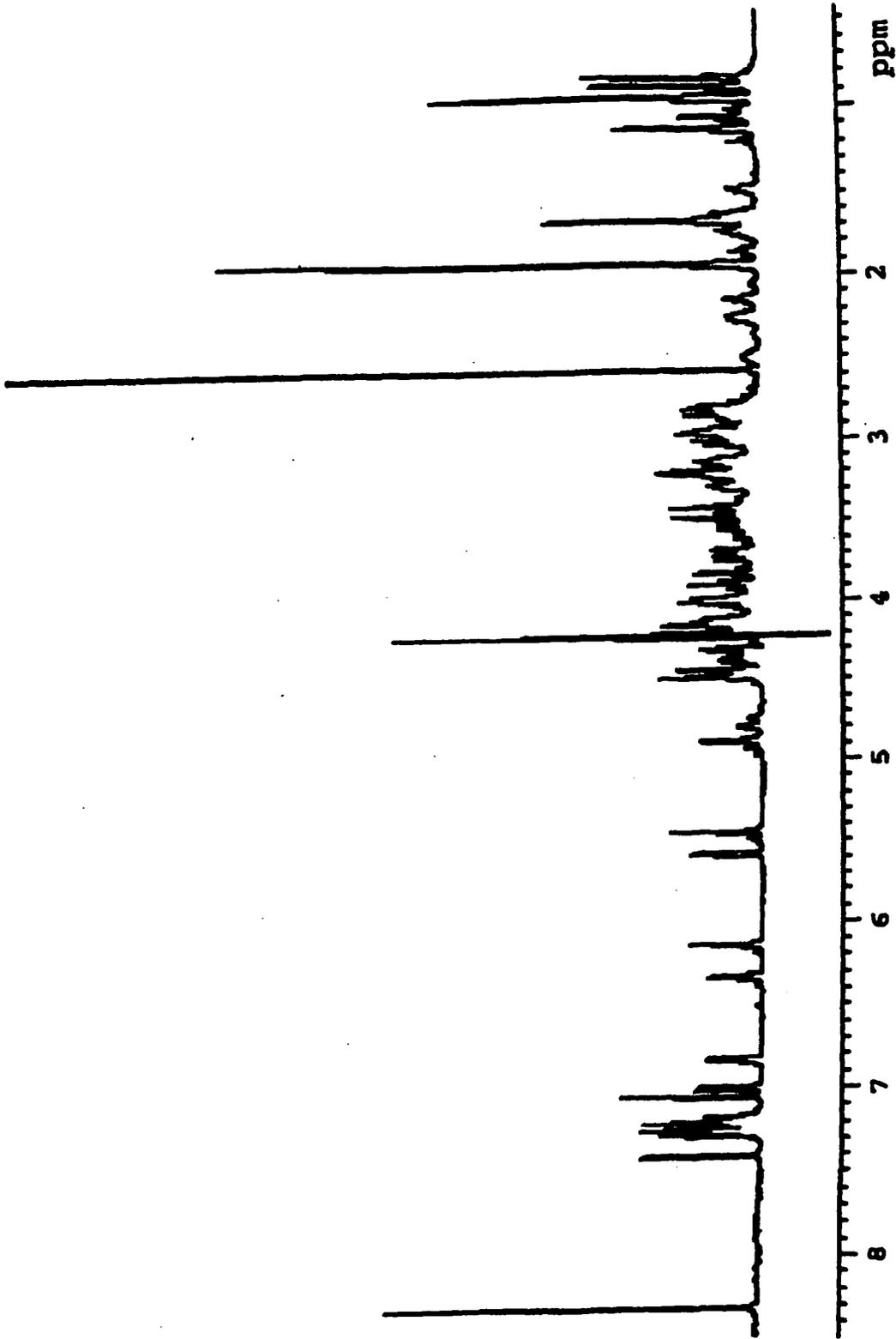


FIG. 9

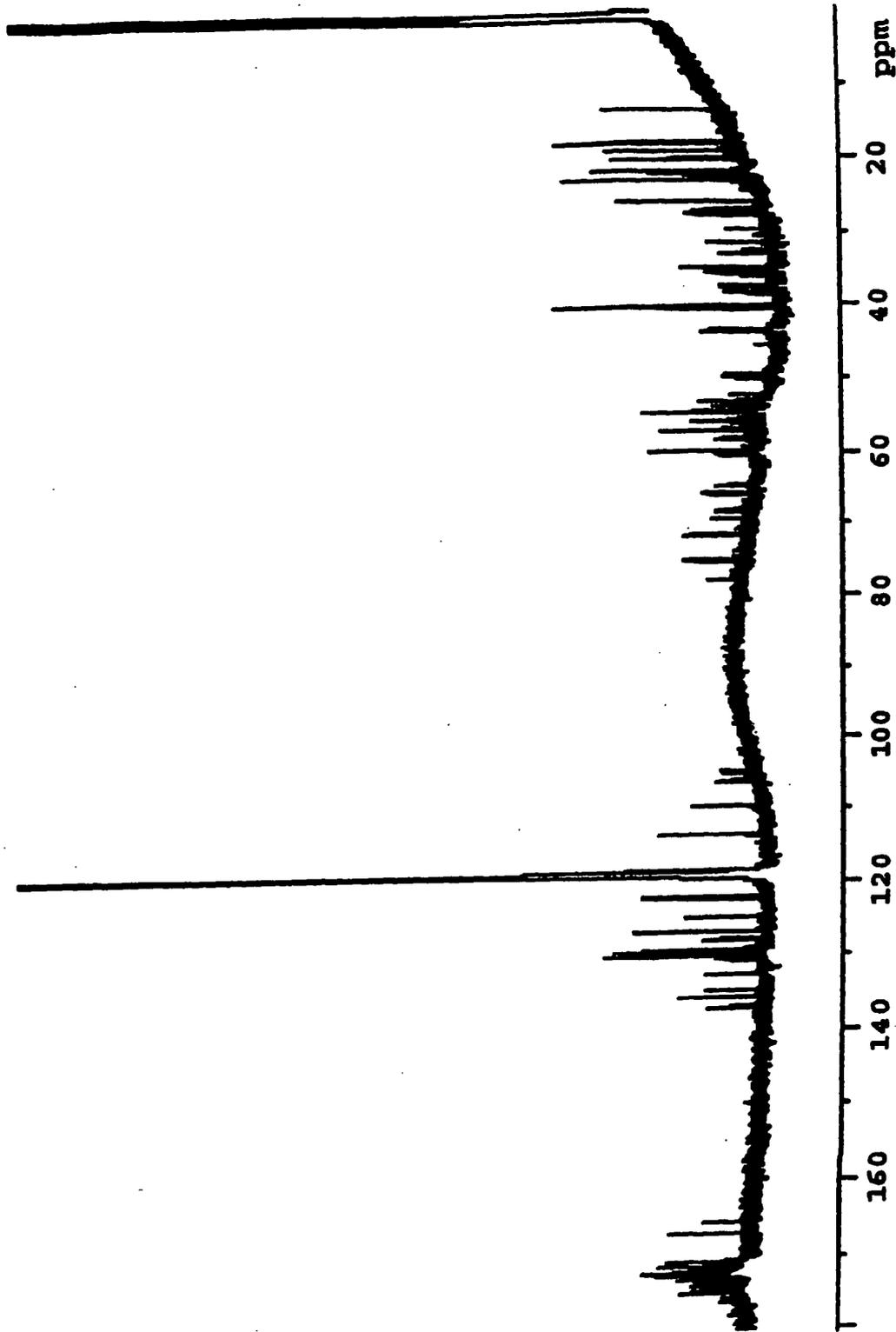


FIG. 10

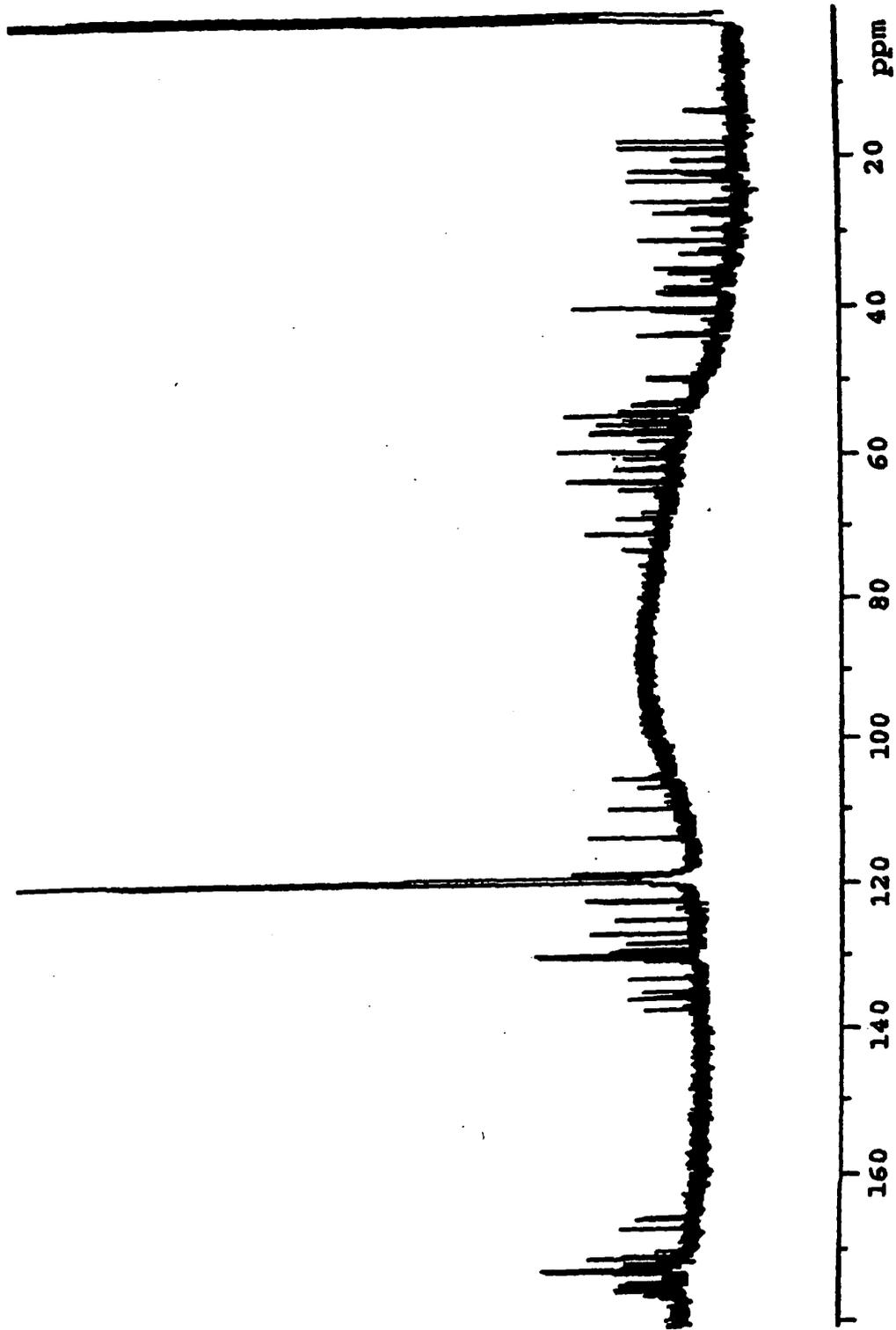


FIG.11

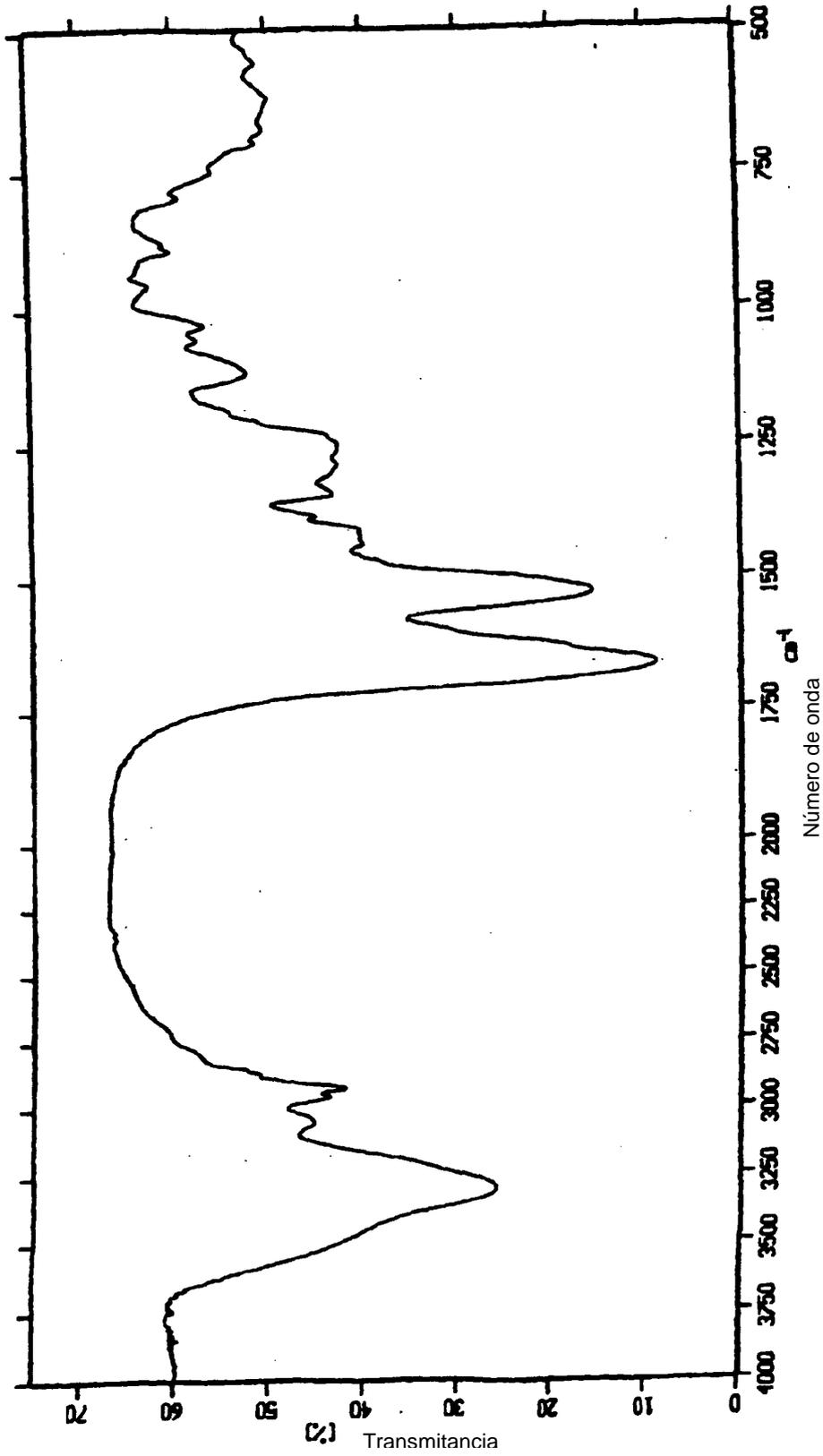


FIG. 12

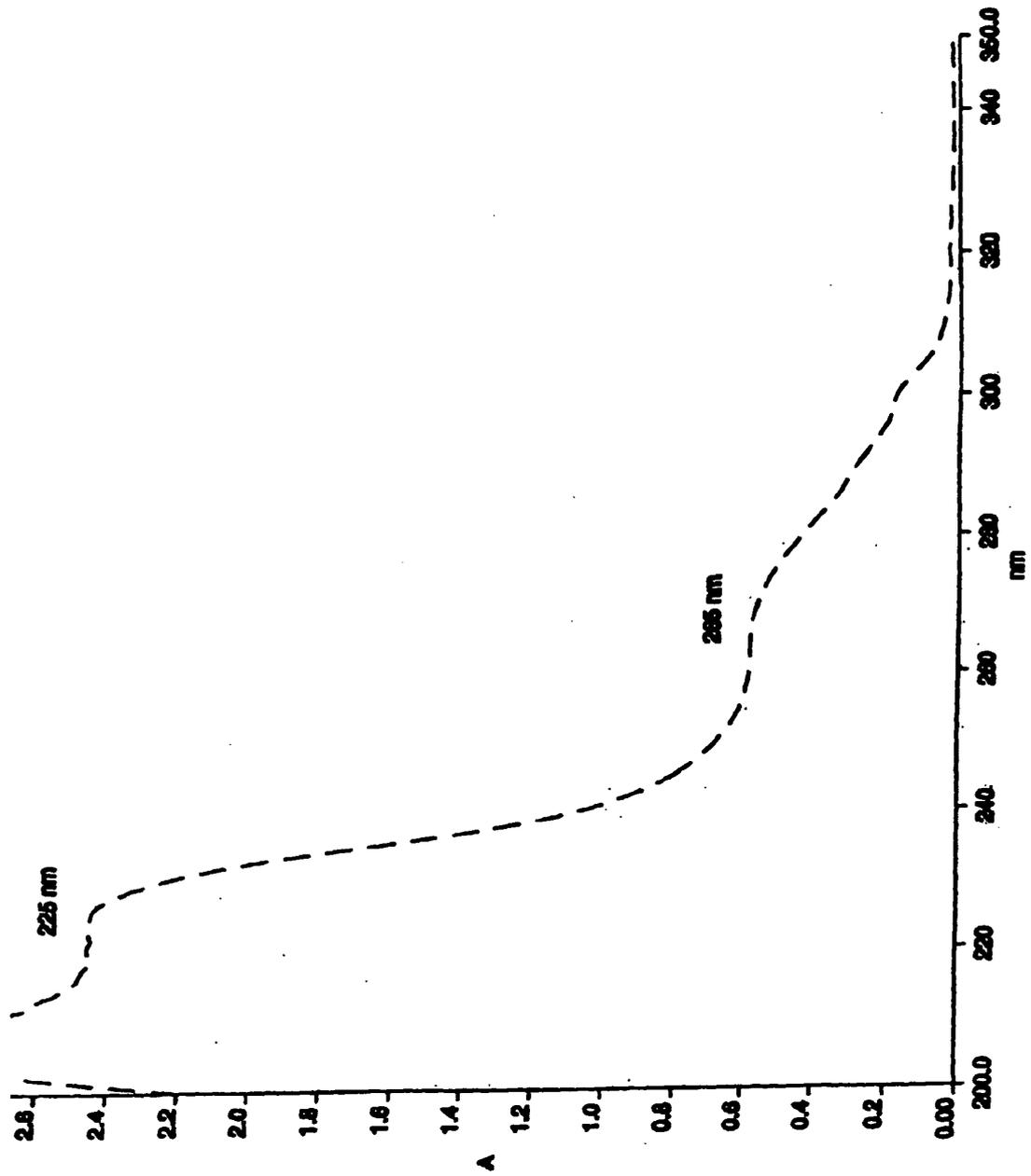


FIG. 13

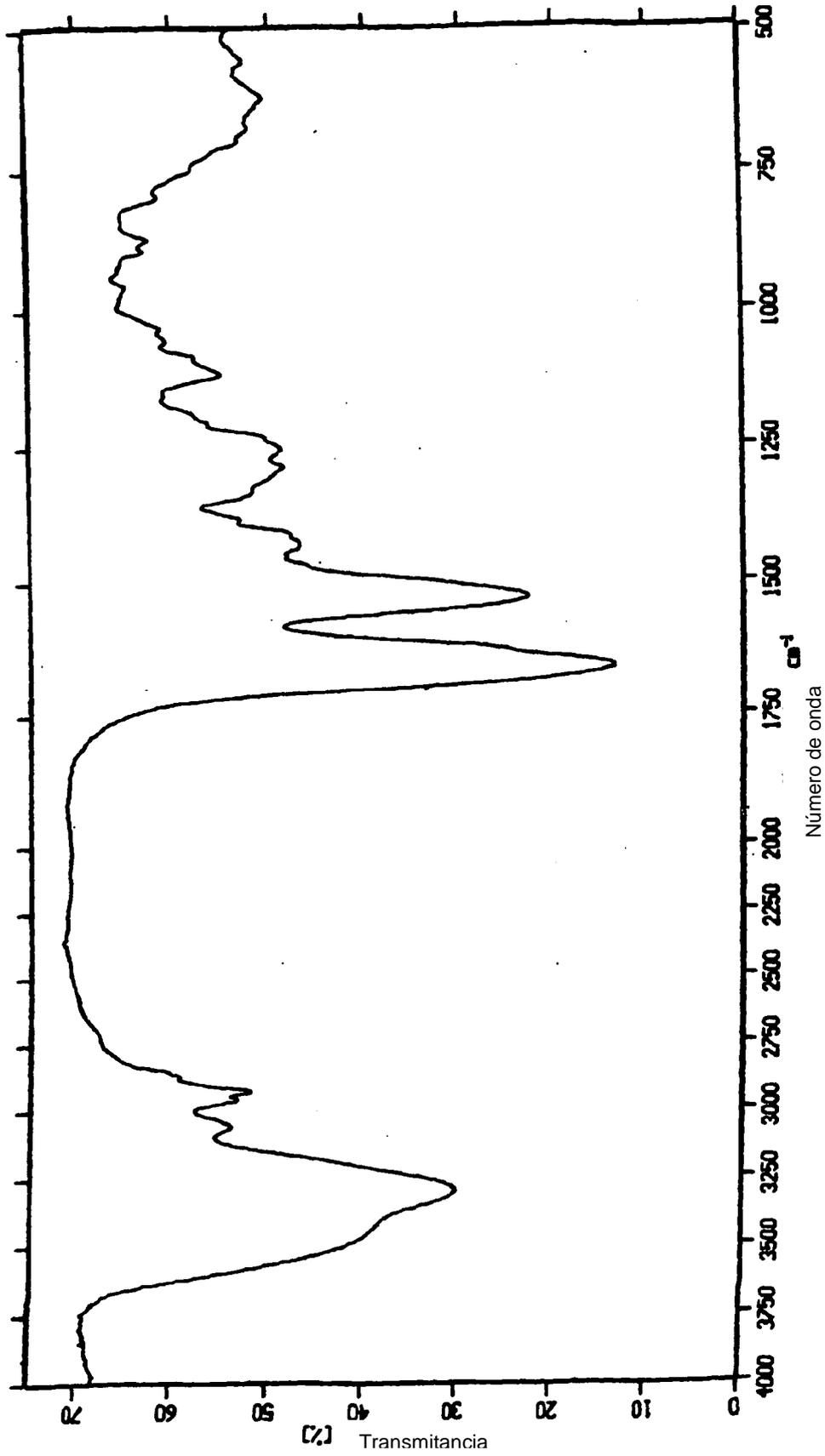


FIG. 14

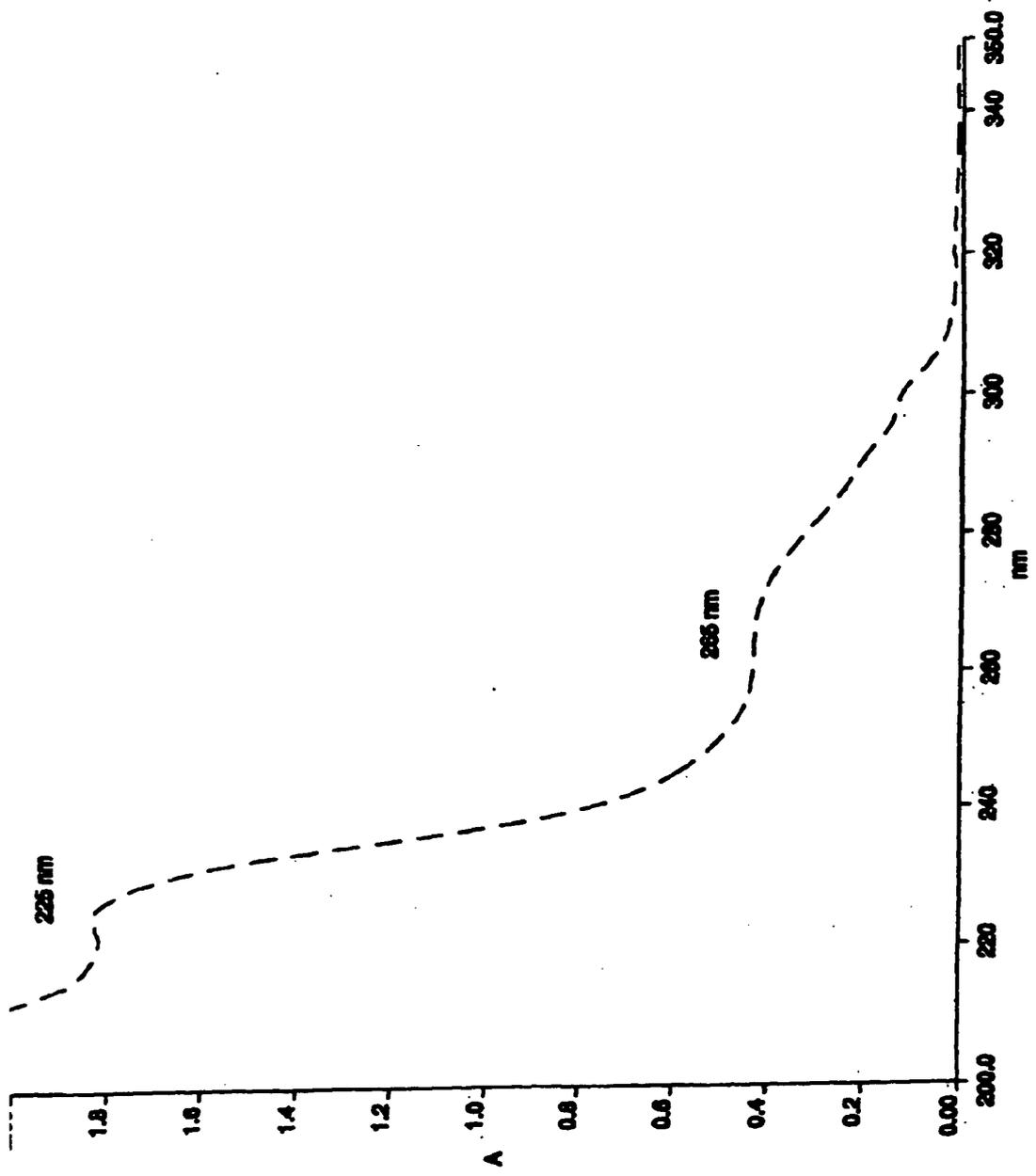


FIG. 15