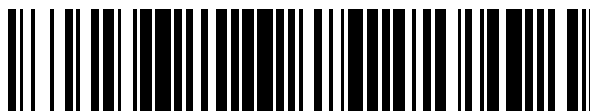


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 085**

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: **05723117 .7**
96 Fecha de presentación: **19.01.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1855705**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.11.2007**

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

30 Prioridad:
12.01.2005 US 035296

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.11.2012

73 Titular/es:
SENTINELLA PHARMACEUTICALS, INC.
("SENTINELLA") (100.0%)
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 2 391 085 T3

DESCRIPCIÓN

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

El documento WO2005/01468 da a conocer el antibiótico 107891, sus factores componentes A1 y A2, su preparación y su uso.

- 5 La presente invención se refiere a una sustancia antibiótica de origen microbiano, arbitrariamente denominada antibiótico 107891, que es un complejo. La invención se caracteriza por los compuestos según la reivindicación 1. La invención versa, además, sobre las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, composiciones farmacéuticas de los mismos y sobre su uso como agente antibacteriano. También se da a conocer un procedimiento para preparar el antibiótico 107891 que incluye el cultivo de *Microbispora* sp. 107891 (identificada en lo sucesivo como *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024) o de una variante o mutante de la misma que mantenga la capacidad de producir dicho antibiótico, recuperándose el antibiótico de la invención a partir del micelio y/o del caldo de fermentación aislando la sustancia pura mediante medios cromatográficos.

- 15 El antibiótico 107891 es un agente antimicrobiano novedoso con una estructura peptídica que contiene lantionina y metilantionina como constituyentes. Estas son las características típicas de los lantibióticos y, en particular, del subgrupo que actúa fundamentalmente en la biosíntesis de la pared celular.

- 20 Los lantibióticos son péptidos que contienen el tioéter aminoácido lantionina, así como varios aminoácidos modificados adicionales (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 ha documentado la actividad de algunos en diferentes dianas farmacológicas. Los lantibióticos antibacterianos pueden clasificarse a grandes rasgos en dos grupos con base en su estructura: los lantibióticos de tipo A son, típicamente péptidos anfífilos alargados, mientras que los lantibióticos de 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 del lantibiótico de tipo A, mientras que la actagardina (gardimicina) y la mersacidina pertenecen a la subclase de lantibióticos de tipo B. Tanto los lantibióticos de tipo nisina como los de tipo mersacidina interactúan con el lípido II de los precursores peptidoglicano unidos a la membrana, aunque las dos clases difieren en los efectos que producen en el proceso de proliferación bacteriana. Los lantibióticos de tipo nisina matan bacterias fundamentalmente mediante la 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 matan la célula bacteriana fundamentalmente 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).

- 35 El documento US 6.551.591 B1 describe dos antibióticos producidos por la cepa NRRL 30420 de *Microbispora corallina*, identificados como los antibióticos MF-BA-1768 α_1 y MF-BA-1768 β_1 , respectivamente. Los datos fisicoquímicos documentados en la patente identificada anteriormente (por ejemplo, datos de espectroscopia de masas, peso molecular, contenido de aminoácidos) y la comparación de los tiempos de retención en análisis experimentales de LC-MS muestran claramente que el complejo antibiótico 107891 está constituido por entidades químicas diferenciadas de los antibióticos MF-BA 1768 α_1 y MF-BA-1768 β_1 .

- 40 El documento EP 0592835A2 describe los antibióticos antitumorales BU-4803TA $_1$, A $_2$, B, C $_1$, C $_2$ y D. Los antibióticos BU 4803TA $_1$, A $_2$ y B se recuperan del caldo de fermentación de *Microbispora* ATCC 55327 (AA 9966), mientras que los antibióticos BU4803TC $_1$, C $_2$ y D son productos de transformación de los antibióticos BU 4803TA $_1$, A $_2$ y B, respectivamente, cuando estos productos se almacenan en sulfóxido de dimetilo. Los datos fisicoquímicos documentados en EP 0592 835 A para los antibióticos anteriores (por ejemplo, aspecto, absorción UV, peso molecular, actividad antitumoral) muestran claramente que son sustancias químicas diferenciadas del complejo antibiótico 107891.

Cepa y fermentación

- 50 Se aisló *Microbispora* sp. 107891 en el entorno y se depositó el 27 de febrero de 2003 en la Colección Estadounidense de Cultivos Tipo (ATCC), 10801 University Blvd, Manassas, Virginia 20110-2209, EE. UU. bajo la disposición del Tratado de Budapest. Se asignó a la cepa el número de acceso PTA-5024.

- 55 La producción del antibiótico 107891 se logra cultivando una cepa de *Microbispora* sp. capaz de producirlo, es decir, *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 o una variante o mutante de la misma que mantenga la capacidad de producir dicho antibiótico; aislando al antibiótico resultante de todo el caldo de cultivo y/o del micelio separado y/o del caldo de fermentación filtrado; y purificando el antibiótico aislado a través de medios cromatográficos. En cualquier caso, es preferible producir el antibiótico 107891 en condiciones anaerobias en un medio nutriente acuoso que contenga fuentes fácilmente asimilables de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas. Pueden usarse muchos de los medios nutrientes habitualmente empleados en el campo de la fermentación; sin embargo, se prefieren ciertos medios.

Las fuentes preferentes de carbono son la sacarosa, la fructosa, la glucosa, la xilosa y similares. Las fuentes preferentes de nitrógeno son la harina de soja, la peptona, el extracto de carne, el extracto de malta, el extracto de levadura, la triptona, los aminoácidos, la caseína hidrolizada y similares. Entre las sales inorgánicas que pueden incorporarse en el medio de cultivo hay las habituales sales solubles capaces de producir iones de sodio, potasio, hierro, cinc, cobalto, magnesio, calcio, amonio, cloruro, carbonato, sulfato, fosfato, nitrato y similares.

Preferentemente, la cepa que produce el antibiótico 107891 es cultivada de antemano en un tubo de fermentación o en un matraz oscilante; luego se usa el cultivo para inocular tarros de fermentación para la producción de cantidades sustanciales de sustancias. El medio usado para el precultivo puede ser el mismo que el empleado para fermentaciones mayores, pero también pueden emplearse otros medios. La cepa que produce el antibiótico 107891 puede ser cultivada a una temperatura entre 17°C y 37°C, estando las temperaturas óptimas alrededor de 28-30°C.

Durante la fermentación, la producción del antibiótico 107891 puede ser monitorizada mediante bioensayo sobre microorganismos susceptibles y/o análisis de HPLC. La máxima producción del antibiótico 107891 ocurre generalmente después de aproximadamente 90 horas y antes de las 200 horas de fermentación.

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

En la presente descripción y en las reivindicaciones, la expresión "antibiótico 107891", a no ser que se especifique otra cosa, identifica al complejo antibiótico 107891.

Características morfológicas de la *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024

La *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 se desarrolla bien en diversos medios sólidos estándar. Las dimensiones microscópicas fueron medidas usando el cultivo desarrollado sobre agar de ácido húmico-sales de traza (composición en g/l: ácido húmico 0,5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,001, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,001, MOPS 2, agar 20) añadido con 1 ml/l de una solución 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).

En cultivo líquido (medio de V6, composición en g/l: dextrosa 22, extracto de malta 5, extracto de levadura 5, caseína 3, NaCl 1,5) no se observa fragmentación alguna del micelio después de 6 días de cultivo a 28°C. El examen microscópico en agar de ácido húmico-sales de traza (después de 21 días de incubación a 28°C) revela un sustrato ramificado no fragmentado de micelio y un micelio aéreo ramificado de forma monopodal; también son visibles muchas hifas aéreas lineales y ramificadas deficientemente. Los pares longitudinales característicos de esporas son portados por esporóforos cortos que surgen lateralmente de las ramas o directamente de las hifas aéreas principales. Las esporas son globulosas y carecen de motilidad. No se observan cuerpos de tipo esporangio ni otras estructuras particulares.

Características del cultivo de la *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024

Se cultivó *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 durante seis días en medio líquido AF/MS (véase el Ejemplo 1) a 28°C y 200 rpm, luego fue transferida (inóculo al 5%) a un nuevo medio líquido AF/MS y fue cultivada 6 días más y, por último, inoculada (inóculo al 7%) en 100 ml de medio líquido V6 (véase el Ejemplo 1). Después de 6 días de cultivo a 28°C y 200 rpm, se cosechó el micelio mediante centrifugación y fue lavado tres veces con solución salina estéril, luego se diluyó para proporcionar un inóculo adecuado. Se cultivaron en estrías alícuotas de la suspensión en forma entrecruzada 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).

La capacidad de uso de varios hidratos de carbono como fuente de carbono y energía fue determinada usando un medio ISP4 sin almidón, al que se añadió 1 ml/l de la solución de vitaminas descrita en lo que antecede como medio basal; se añadió cada fuente de carbono con la concentración final del 1% (p/v).

La tolerancia al NaCl, el intervalo de pH de crecimiento, así como la capacidad de desarrollarse a diferentes temperaturas fueron determinados sobre un medio de ISP2. Todos los medios fueron incubados a 28°C durante tres semanas; las descripciones se refieren a 21 días, a no ser que se especifique otra cosa. El color fue evaluado con luz diurna natural usando el atlas de colores de Maerz y Paul (A. Maerz y M. R. Paul, 1950 - A Dictionary of Colour, 2ª edición. McGraw-Hill Book Co. Inc., Nueva York). La capacidad de reducir nitratos a nitritos fue evaluada en un medio acuoso con nitratos según el procedimiento descrito por Williams y otros (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).

El desarrollo, el aspecto de las colonias, el color del micelio del sustrato y aéreo y la producción de pigmentos para la cepa *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 están consignados en la Tabla I. Hay presente desarrollo vegetativo en la mayoría de los medios usados, a diferencia del micelio aéreo, que está presente solo en algunos de ellos. No se

muestra ninguna pigmentación evidente en ningún medio usado. La Tabla II presenta las características fisiológicas de la cepa. El desarrollo y la producción de micelio aéreo están presentes a 17°C, pero no a 43°C. La producción de micelio aéreo en ISP2 está presente con un pH mayor de 6, aunque está ausente en presencia de NaCl al 1%.

La Tabla III muestra la capacidad de uso de diversos hidratos de carbono para el cultivo.

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

MEDIO	DESARROLLO Y MORFOLOGÍA	CÓDIGO DE COLOR INVERSO
ISP 2 Agar extracto de levadura-extracto de malta	Desarrollo abundante; superficie arrugada; 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	Desarrollo abundante; buena producción de micelio aéreo rosado (2A8), particularmente en las ramas de las estrias entrecruzadas. Ligera producción de pigmento soluble anaranjado.	11 H 10 anaranjado/rosado
ISP 4 Agar de sales inorgánicas-almidón	Buen desarrollo; no se produce micelio aéreo alguno. No se produce ningún pigmento soluble. Almidón hidrolizado.	11 I 9 naranja
Glu/Asp Agar de glucosa-asparagina	Desarrollo discreto; producción de micelio aéreo beis/rosado (9B4) delgado en las ramas de las estrias entrecruzadas. No se produce ningún pigmento soluble.	12 K 12 anaranjado/marrón claro
ISP 6 Agar de peptona-extracto de levadura-hierro	Desarrollo escaso, con colonias aisladas rosadas cultivadas en altura, retorcidas, con una superficie lisa; no se produce micelio aéreo alguno. Sin oscurecimiento alguno del medio.	nd
ISP 7 Agar de tirosina	Desarrollo deficiente de un micelio anaranjado/marrón claro en sustrato delgado. Sin oscurecimiento alguno del medio.	nd
ISP3+YE Agar de harina de avena /extracto de levadura al 1%	Desarrollo abundante, superficie arrugada; muy escasa producción de micelio aéreo rosado delgado. No se produce ningún pigmento soluble.	4 B 12 anaranjado/rojo

(ISP4 y el agar de glucosa-asparagina fueron añadidos con 1 ml/L de la solución de vitaminas)

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

ENSAYO	REACCIÓN
Hidrólisis de almidón	Positiva
Hidrólisis de caseína	Negativa
Digestión de maleato de calcio	Negativa
Peptonización de leche tornasol	Negativa
Coagulación de leche tornasol	Negativa
Licuefacción de gelatina	Negativa a ligeramente positiva
Reacción de tirosina	Negativa
Reducción de nitratos	Positiva
Intervalo de pH del cultivo (14 días)	sin desarrollo a 4,2, bueno a 5,5 a 8,8; no se probó fuera de este intervalo. Micelio aéreo ausente con pH ≤ 6,5
% de tolerancia al NaCl	≤ 2; ausencia de micelio aéreo a ≥ 1
Intervalo de temperaturas del cultivo	17°C a 37°C. Presencia de micelio aéreo en todo el intervalo; sin desarrollo alguna a 43°C

Tabla III: Utilización de fuentes de carbono por parte de la *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024

Fuente de carbono	Desarrollo (14 días)
Arabinosa	++
Celulosa	-
Fructosa	++
Inositol	+/-
Manitol	+++
Rafinosa	-
Ramnosa	-
Sacarosa	+++
Xilosa	+++
Glucosa	++
Glicerol	++

Fuente de carbono	Desarrollo (14 días)
Sin azúcar alguno	-
+++ abundante; ++ buen desarrollo; + desarrollo moderado; +/- desarrollo escaso; - ningún desarrollo; el micelio aéreo siempre está ausente.	

Características quimiotaxonómicas de la *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024

Se cultivó *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 en un medio de GYM (glucosa 4 g/l; extracto de levadura 4 g/l; extracto de malta 10 g/l) a 28°C en un agitador rotatorio y se cosechó el micelio, lavado dos veces con agua destilada estéril y, después, secado por congelación. Los análisis de aminoácidos se llevaron a cabo según el procedimiento de Staneck y Roberts, (J.L. Staneck y G.D. Roberts, (1974): "Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography", Appl. Microbiol. 28: 226-231). Se extrajeron las menaquinonas y los lípidos polares siguiendo el procedimiento de Minnikin y otros (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). Los lípidos polares fueron analizados mediante cromatografía en capa delgada (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), las menaquinonas mediante HPLC (R. M. Kroppenstedt, (1982): "Separation of bacterial menaquinones by 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. Nº 20 SAB Technical Series pp.173-199, M. Goodfellow y D.E. Minnikin eds., Academic Press, Londres) y los ésteres metílicos de ácidos grasos por cromatografía 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). La presencia de ácidos micólicos se verificó mediante el procedimiento de Minnikin y otros (D. E. Minnikin, L. Alshamaony y M. Goodfellow, (1975): "Differentiation of Mycobacterium, Nocardia and related taxa by thin layer chromatographic analysis of whole organism methanolyzates", J. Gen. Microbiol. 88: 200-204).

Los hidrolizatos de la célula completa de la cepa *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 contienen ácido meso-diaminopimélico como ácido diamínico 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, fosfatidil-glicerol, difosfatidil-glicerol, fosfatidil-inositol, fosfatidil-inositolmanósidos y N-acetilglucosamina con contenido de fosfolípidos, es decir, fosfolípidos de tipo IV según Lechevalier y otros (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 fundamentales del patrón de ácidos grasos son anteiso 15:0, iso 16:0, n-16:0, anteiso 17:0, y 10-metil-heptadecanoico (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. Nº 20 SAB Technical Series, pp. 173-199. M. Goodfellow y D. E. Minnikin eds., Academic Press, Londres). No se detectan ácidos micólicos.

Secuenciación de ADNr 16S de *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024

La secuencia parcial del gen ARNr 16 (ADNr 16S), es decir, 1443 nucleótidos, correspondiente al 95% de todo el ARNr de la cepa *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 se logró 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 documenta en la ID SEC Nº 1.

Se comparó esta secuencia con la de la cepa *Microbispora corallina* NRRL 30420 (MF-BA-1768), según aparece documentada en US 6.551.591 B1. Las dos secuencias fueron alineadas y se encontraron diferencias en 31 de 1456 posiciones alineadas, que representaban una divergencia total de la secuencia del 2,13%. Normalmente, dos cepas cualesquiera que comparan menos del 97,5% de identidad de secuencia pertenecen 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 y D. J. Grimes (eds.). ASM, Press, Washington DC, pp. 57-75). Por lo tanto, un nivel del 2% de divergencia en la secuencia es bastante elevado (Rosselló-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.

Identidad de la cepa *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024

La cepa que produce el antibiótico 107891 está asignada al género *Microbispora*, familia *Streptosporangiaceae*, debido a las siguientes características quimiotaxonómicas y morfológicas:

- presencia de ácido meso-diaminopimélico en la pared celular;

- cantidad importante de MK-9(III, VIII-H₄) y de fosfolípido de tipo IV según Lechevalier y otros (H. A. Lechevalier, C. De Briève 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 Nocardiosis", en: The Prokariotes, Vol II, pp. 1139-1156, A. Balows, H. Truper, M. Dworkin, W. Harder y 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 sin motilidad.
- secuencia parcial del gen de ARNr 16 (ADNr 16S), es decir 1443 nucleótidos, correspondientes al 95% del ARNr completo, documentada en la ID SEC N° 1, que muestra una identidad > 97% con respecto a las secuencias de ADNr 16S de especies de *Microbispora* descritas.

Como ocurre con otros microorganismos, las características de la cepa que produce el 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. Se considera que todas las variantes y mutantes naturales y artificiales de la cepa *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 capaces de producir el antibiótico 107891 que son equivalentes para el fin de la presente invención y, por lo tanto, están dentro del alcance de la invención.

Extracción y purificación del antibiótico 107891

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.

- El caldo recogido puede tratarse 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 tratarse entonces por separado o en combinación con el sobrenadante según los procedimientos documentados a continuación en el presente documento para la fracción sobrenadante. Cuando el disolvente miscible con agua puede interferir 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.

La expresión "disolvente miscible con agua", tal como se usa en esta solicitud, se pretende que tenga el significado dado actualmente en la técnica a esta expresión 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: alcoholes inferiores, por ejemplo alcoholes (C₁-C₃) tales como metanol, etanol y propanol; fenil-alcoholes (C₁-C₃) tales como alcohol bencílico; cetonas inferiores, por ejemplo cetonas (C₃-C₄) 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 etilenglicol monometil éter, amidas inferiores tales como dimetilformamida y dietilformamida; ácido acético, dimetilsulfóxido y acetonitrilo.

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 no disolventes o cambio del pH de la disolución, mediante cromatografía de partición, cromatografía de partición 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 del antibiótico 107891 con disolventes orgánicos no miscibles con agua, seguido de precipitación a partir de los extractos concentrados, posiblemente añadiendo un agente de precipitación.

También en este caso, la expresión "disolvente no miscible con agua", tal como se usa en esta solicitud, se pretende que tenga el significado dado actualmente en la técnica a dicha expresión 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 previsto.

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:

- alcoholes 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.

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

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

- 10 Cuando, tras una extracción, se recupera una fase orgánica que contiene una cantidad sustancial de agua, puede ser conveniente destilar azeotrópicamente el agua de la misma. Generalmente, esto requiere añadir un disolvente capaz de formar mezclas azeotrópicas mínimas con el agua, seguido de la adición de un agente de precipitación al 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.

- 15 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 preferente para recuperar el antibiótico 107891, el caldo de fermentación filtrado puede ponerse en contacto con una matriz de adsorción mediante 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.
- 20

- 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, tipos de nailon y polivinilpirrolidonas reticuladas (por ejemplo Poliamida-CC 6, Poliamida-SC 6, Poliamida-CC 6,6, Poliamida-CC 6AC y Poliamida-SC 6AC, Macherey-Nagel & Co., Alemania; PA 400, M. Woelm AG, Alemania); y la resina de polivinilpirrolidona PVP-CL, (Aldrich Chemie GmbH & Co., KG, Alemania) y dextranos reticulados de poro controlado (por ejemplo Sephadex® LH-20, Pharmacia Fine Chemicals, AB). Preferentemente, se emplean resinas de poliestireno, siendo particularmente preferida la resina Diaion HP 20.
- 25

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

- También en este caso, la expresión "disolvente miscible con agua", tal como se usa en esta descripción y en las reivindicaciones, se pretende que tenga el significado actualmente dado en la técnica a dicha expresión, tal como se describió anteriormente.
- 35

- 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 del micelio. Por ejemplo, cuando la porción 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, pueden combinarse las fracciones eluidas de cada uno de los dos conjuntos de resinas de absorción, opcionalmente tras concentración, y luego tratarse 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 juntos 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.
- 40
- 45

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 sobre la mezcla de los materiales brutos resultantes de la combinación de los productos que se originan de las fases de extracción separadas.

- La purificación del antibiótico 107891 bruto puede lograrse mediante cualquiera de las técnicas conocidas por sí mismas, pero se realiza preferentemente por medio de procedimientos cromatográficos. Ejemplos de estos procedimientos cromatográficos son los documentados 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.
- 50
- 55

Por ejemplo, puede emplearse cromatografía de HPLC preparativa usando RP-8 o RP-18 como fase estacionaria y una mezcla de tampón de HCOONH_4 : CH_3CN como sistema de elución.

5 Las fracciones activas recuperadas de la etapa de purificación se combinan, se concentran al 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, estas 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 la SPE Superclean LCP18 Supelco (Bellefonte, Pensilvania, EE. UU.) seguido de lavado con agua destilada y elución con una mezcla apropiada de disolvente acuoso, por ejemplo etanol:agua. Entonces se recupera el antibiótico eliminando los disolventes de elución.

10 En consecuencia, se obtiene una preparación seca del complejo antibiótico 107891 purificado como un polvo blanco. Tal como es habitual en esta técnica, la producción, así como las etapas de recuperación y purificación, puede monitorizarse mediante varios procedimientos analíticos que incluyen el ensayo inhibitorio frente a microorganismos sensibles y el control analítico usando HPLC o HPLC acoplada a espectrometría de masas.

15 Una técnica de HPLC analítica preferente se realiza sobre un instrumento Waters (Waters Chromatography, Milford, Massachusetts) equipado con una columna Waters Symmetry-shield RP8, de 5μ ($250 \times 4,6$ mm) eluida con una velocidad de flujo de 1 ml/min y a una temperatura de 50°C .

20 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.

Se dividió el efluente de la columna con una proporción de 5:95 y se desvió la mayor parte (aproximadamente 950 $\mu\text{l/min}$) hacia un detector con matriz de fotodiodos. Los 50 $\mu\text{l/min}$ restantes se desviaron hacia la superficie de contacto de ESI de un espectrómetro de masas de trampa iónica Finnigan LCQ (Thermoquest, Finnigan MAT, San José, California).

25 El análisis de espectrometría de masas se realizó en las siguientes condiciones:

Condiciones de entrada de muestra:

Gas de impulsión (N_2) 413,69 kPa;

Gas auxiliar (N_2) 34,47 kPa;

Calentador capilar 250°C ;

30 Ajustes de potencial de entrada de muestra:

Polaridad tanto positiva como negativa;

Potencial de pulverización de iones +/- 5 kV;

Potencial capilar +/- 19 V;

Condiciones de barrido: tiempo de iones máximo 200 ms;

35 Tiempo de iones 5 ms;

Microbarrido completo 3;

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

40 En estas condiciones de HPLC analítica, los factores A1 y A2 del antibiótico 107891 mostraron tiempos de retención de 13,2 min y 13,9 min, respectivamente. En el mismo sistema de HPLC, el factor A2 de la ramoplanina (L. Gastaldo, R. Ciabatti, F. Assi, E. Restelli, J. K. Kettenring, L. F. Zerilli, G. Romanó, 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) eluyó con un tiempo de retención de 7,5 min.

45 Dado que el antibiótico 107891, tal como se muestra por la titulación ácido/base en 2-metoxietanol (MCS): H_2O 12:3 (v/v), contiene una función básica, es capaz de formar sales con ácidos adecuados según procedimientos convencionales y puede existir también en la forma de base libre.

El antibiótico 107891, cuando se obtiene en la forma de base libre, puede transformarse con ácidos en las correspondientes sales, que incluyen sales farmacéuticamente aceptables no tóxicas. Sales adecuadas incluyen aquellas sales formadas mediante reacción estándar con ácidos tanto orgánicos como inorgánicos, por ejemplo,

- ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, acético, trifluoroacético, tricloroacético, succínico, cítrico, ascórbico, láctico, maleico, fumárico, palmítico, cólico, pamoico, mícico, glutámico, canfórico, glutárico, glicólico, ftálico, tartárico, láurico, esteárico, salicílico, metanosulfónico, bencenosulfónico, sórbico, picrico, benzoico, cinámico y similares. Las sales de adición del antibiótico 107891 con ácidos pueden prepararse según los procedimientos habituales comúnmente empleados. Por ejemplo, se disuelve el antibiótico 107891, en forma de base libre, en la mínima cantidad de un disolvente adecuado, típicamente 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 no disolvente. La sal de adición que se forma se recupera entonces mediante filtración o evaporación de los disolventes.
- 5 Alternativamente, estas sales pueden prepararse en una forma sustancialmente anhidra mediante liofilización; en este caso, se disuelve una sal del antibiótico 107891 con ácido volátil con una cantidad adecuada de ácido no volátil. Luego se filtra la disolución para eliminar cualquier resto 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 del antibiótico 107891 cuando la sal deseada precipita con 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 experiencia técnica ordinaria y están abarcadas por la presente invención.
- 20 La formación de sales del antibiótico 107891 puede servir para varios fines, incluyendo la separación y la 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.
- La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" identifica aquellas sales no tóxicas que pueden utilizarse en el tratamiento de animales de sangre caliente.
- 25 Puede administrarse el complejo de antibiótico 107891 como tal o en mezcla con vehículos farmacéuticamente aceptables y también puede administrarse junto con otros agentes antimicrobianos tales como penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos y glucopéptidos.
- Por tanto, la terapia conjunta incluye la administración secuencial, simultánea y separada del principio activo de una manera en la que los efectos terapéuticos del primero administrado no ha 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 implique un microorganismo sensible al antibiótico, una formulación parenteral es, 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
- 35 formulaciones basadas en ciclodextrinas o fosfolípidos en agua estéril para inyección. Una formulación inyectable también puede obtenerse con una ciclodextrina apropiada.
- También puede usarse el complejo antibiótico 107891 en una forma farmacéutica adecuada tal como una cápsula, un comprimido o una suspensión acuosa para administración oral o con cremas o gelatinas 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, un compuesto de la invención se administra por vía oral en un pienso adecuado. 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 pienso.
- 40 La adición del principio activo de la invención al pienso animal se logra preferentemente preparando una mezcla previa de pienso apropiada que contiene el principio activo en una cantidad eficaz e incorporando la mezcla previa a la ración completa. Alternativamente, puede combinarse un concentrado intermedio o un complemento alimenticio que contenga el principio activo en el pienso. La manera en la que pueden prepararse y administrarse tales mezclas previas de pienso y raciones completas se describen en libros de referencia (tales como "Applied Animal Nutrition", W. H. Freedman and Co., San Francisco, EE. UU., 1969 o "Livestock Feeds and Feeding", O and B books, Corvallis, Oregón, EE. UU., 1977).
- 50

Características fisicoquímicas del antibiótico 107891

A) Espectrometría de masas:

- 55 en experimentos de SM sobre un instrumento Thermofinnigan LCQ deca equipado con una fuente de electroaspersión, usando una mezcla de calibración Thermofinnigan, el antibiótico 107891 da dos iones doblemente

protonados a $m/z=1124$ y a $m/z 1116$, correspondientes a la composición isotópica inferior de los Factores A1 y A2 del complejo, respectivamente. Las condiciones de electroaspersión fueron: potencial de pulverización: 4,7 kV; temperatura capilar: 220°C; potencial 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 documentan en las Figuras 1A (espectro de baja resolución de barrido completo) y 1B (espectro de alta resolución de barrido ampliado).

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

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

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 en un espectrómetro Bruker AMX 600 aplicando una secuencia de supresión de agua. Como patrón interno se consideró la señal residual de metanol- d_4 a 3,31 ppm. El espectro ^1H -RMN del antibiótico 107891 se documenta en la Fig. 4. El espectro ^1H -RMN del antibiótico 107891 disuelto en metanol- d_4 : H_2O (HCl 0,01 N) 40:10 (v/v) presenta los siguientes grupos de señales (en ppm) a 600 MHz usando $\text{MeOH}-\text{d}_4$ como patrón interno (3,31 ppm), [δ =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).

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 en un espectrómetro Bruker AMX 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) del antibiótico 107891 se documenta en la Fig. 5. El espectro ^{13}C -RMN del antibiótico 107891 disuelto en metanol- d_4 : H_2O (HCl 0,01 N) 40:10 (v/v) presenta los siguientes grupos de señales (en ppm) a 600 MHz usando $\text{MeOH}-\text{d}_4$ como patrón interno (49,15 ppm), [δ =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).

F) Se disolvió el complejo 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 volvió a titular la disolución con una disolución de hidróxido de potasio 0,01 N. La curva de titulación resultante mostró una función ionizable básica.

Composición de aminoácidos del antibiótico 107891

A) Determinación de aminoácidos "resistentes a ácidos" en el complejo antibiótico 107891

Se sometió al 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 son detectables con este enfoque. Se estudió el hidrolizado mediante análisis de HPLC-MS y GC-MS, tras una derivatización adecuada, en comparación con una mezcla de aminoácidos patrón derivatizada 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 3N en metanol anhidro y anhídrido trifluoroacético.

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

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

Temperatura de columna: 37°C

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
%B	5	5	80	95	95	5

Detección UV: 254 nm

Las condiciones de MS fueron las siguientes:

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

Temperatura capilar: 250°C

5 Potencial de la fuente: 4,70 kV

Corriente de la fuente: 80 µA

Potencial capilar: -15 V

Se llevó a cabo el análisis de GC cualitativa en un cromatógrafo de gases equipado con detección MS-EI. El procedimiento de GC tenía las siguientes condiciones:

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

Modo de inyección: sin fraccionamiento

Temperatura del inyector: 200°C

Temperatura de la línea de transferencia: 300°C

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

15 10°C/min (15 min), 15 min a 250°C

Volumen de inyección: 1 µl

Las condiciones de MS fueron las siguientes:

Espectrómetro: Finnigan TSQ700

Modo de ionización: Impacto de electrones

20 Ajuste de potencial:

Corriente del filamento: 400 mA

Multiplicador de electrones: 1400 V

Energía de los electrones: 70 eV

Modo de iones positivos

25 Condición de barrido:

Intervalo de barrido: 40-650 amu

Tiempo de barrido: 1 seg

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

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

El procedimiento de GC tenía las siguientes condiciones:

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

Gas portador: helio

Temperatura de la superficie de contacto: 250°C

Programa de temperaturas: 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 base 50°C, temperatura de transferencia 280°C, tasa de transferencia 14,5°C/min

Las condiciones de MS fueron las siguientes:

Modo de ionización: Impacto de electrones

Ajuste de potencial:

Corriente del filamento: 149 µA

10 Multiplicador de electrones: 200 V

Energía de los electrones: 70 eV

Modo de iones positivos:

Condiciones de barrido:

Intervalo de barrido: 33-500 amu

15 Tiempo de barrido: 0,6 seg

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

Se realizó la hidrólisis completa del complejo 107891 purificado según el procedimiento 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 de 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 lo tanto, permite la determinación de estos aminoácidos, incluyendo triptófano, a partir de un hidrolizado de un péptido. Se compró una muestra convencional de 5-cloro-DL-triptófano de Biosynt AG, Staad, Suiza y se confirmó su estructura mediante análisis de RMN; se compró el DL-triptófano en Merck KGaA, Darmstadt, Alemania.

25 Los patrones de triptófano y 5-clorotriptófano eluyeron con 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 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 ensayo.

30 Comparación del Factor A1 y del Factor A2 (no dentro del alcance de la presente invención) del antibiótico 107891 con los antibióticos MF-BA-1768 α_1 Y MF-BA-1768 β_1

35 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.

40 En el cromatograma dos picos mostraron señales de 1091 y 1108 $[M+2H]^{2+}$, correspondientes al $[M+2H]^{2+}$ documentado en el documento US 6.551.581 B1 para MF-BA-1768 β_1 y MF-BA-1768 α_1 , respectivamente.

45 B) En un experimento adicional, se realizó una fermentación en tanque de 30 l de la cepa NNRL 30420 (MFBA-1768) de *Microbispora* sp. y se trató 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 Luna (250 × 12,2 mm) (Torrance, California, EE. UU.) de 10 µ de tamaño de partícula eluida con una velocidad de flujo de 27 ml/min con el siguiente programa de múltiples etapas: tiempo = 0 min (un 32% de la fase B); tiempo = 8 min (un 32% de la fase B); tiempo = 20 min (un 36% de la fase B); tiempo = 32 min (un 90% de la fase B). La fase A era ácido fórmico al 0,05% (v/v) en agua, la fase B era CH₃CN.

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

5

Tabla IV

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

Las condiciones experimentales de los ensayos antimicrobianos fueron las mismas que las utilizadas para los ensayos documentados en la Tabla VI a continuación.

Los análisis de LC-MS de los antibióticos aislados MF-BA-1768 α_1 y MF-BA-1768 β_1 se realizaron en una columna Symmetry C18 (5:m) de 4,6 $\times$ 250 mm (Waters; Milford, Massachusetts, EE. UU.) equipada con una precolumna Symmetry C18 (5:m) de 3,9 $\times$ 20 mm (mantenidas ambas en un horno a 50°C de temperatura). Se realizó la elución con una velocidad de flujo de 1 ml/min con el siguiente programa de elución de múltiples etapas: tiempo = 0 min (un 30% de la fase B); tiempo = 8 min (un 30% de la fase B); tiempo = 20 min (un 45% de la fase B); tiempo = 24 min (un 90% de la fase B); y tiempo = 28 min (un 90% de la fase B). La fase A era tampón HCOONH_4 25 mM pH 4,5: CH_3CN 95:5 (v/v) y la fase B era CH_3CN . El equipo de HPLC estaba acoplado a un espectrómetro de masas de trampa iónica Finnigan LCQ (Thermoquest, Finnigan MAT, San José, California, EE.UU.). Se desviaron 100 ml/min de los efluentes de la columna hacia la superficie de contacto de ESI del espectrómetro de masas LCQ. Se realizó el análisis de MS en las siguientes condiciones: entrada de muestra: flujo del gas de impulsión (N_2) 172,37 kPa, flujo del gas auxiliar 34,47 kPa; calentador capilar: 210°C; polaridad del potencial de entrada de muestra tanto positivo como negativo; potencial de pulverización de iones: $\pm 4,75$ kV; potencial capilar: ± 12 V; condiciones de barrido: tiempo de iones máximo 50 ms; microbarrido completo 3.

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

TABLA V

	Tiempo ret. (min)	$[M+2H]^{2+}$
MF-BA-1768 β_1	12,86	1091
Antibiótico 107891 A1	16,3	1124
Antibiótico 107891 A2	16,81	1116
MF-BA-1768 α_1	18,1	1108

En el mismo sistema cromatográfico, se eluyó el factor A2 de ramoplanina (L. Gastaldo, R. Ciabatti, F. Assi, E. Restelli, J. K. Kettenring, L. F. Zerilli, G. Romanó, 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 del factor A1 y el factor A2 (no dentro del alcance de la presente invención) del antibiótico 107891

Se registraron espectros de ^1H -RMN de factor A1 y factor A2, no dentro del alcance de la presente invención, del antibiótico 107891 en la mezcla de $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (1:1) a 298 K en 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 del factor A1 (no dentro del alcance de la presente invención) del antibiótico 107891 se documenta en la Fig. 8.

B) El espectro de ^1H -RMN desacoplado de bb del factor A2 (no dentro del alcance de la presente invención) del antibiótico 107891 se documenta en la Fig. 9. Los espectros de ^{13}C -RMN del factor A1 y el factor A2 (no dentro del alcance de la presente invención) del antibiótico 107891 se registraron en la mezcla de $\text{CD}_3\text{CN}:\text{D}_2\text{O}$ (1:1) a 298 K en un espectrómetro Bruker AMX 600 usando como patrón interno la señal residual de acetonitrilo- d_3 a 1,39 ppm.

C) En la Fig. 10 se muestra el espectro de ^{13}C -RMN del factor A1 (no dentro del alcance de la presente invención) del antibiótico 107891.

D) En la Fig. 11 se muestra el espectro de ^{13}C -RMN desacoplado de bb del factor A2 (no dentro del alcance de la presente invención) del antibiótico 107891.

Espectros UV e IR del factor A1 y del factor A2 (no dentro del alcance de la presente invención) del antibiótico 107891

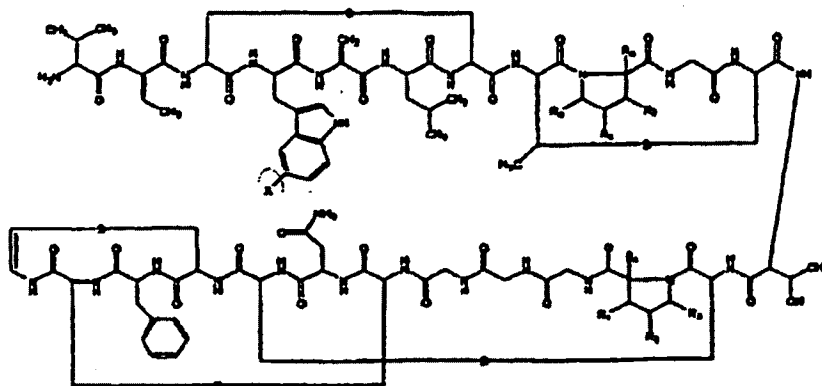
A) El espectro infrarrojo del factor A1, no dentro del alcance de la presente invención, del antibiótico 107891 registrado en KBr con un espectrofotómetro Bruker FT-IR modelo IFS 48 está documentado en la Fig. 12.

B) El espectro UV del factor A1 (no dentro del alcance de la presente invención) del antibiótico 107891 registrado en metanol:H₂O 80:20 (v/v) con un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 16 está documentado en la Fig. 13.

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

D) El espectro UV del factor A2 (no dentro del alcance de la presente invención) del antibiótico 107891 registrado en metanol:H₂O 80:20 (v/v) con un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 16 está documentado en la Fig. 15.

Con base en los datos fisicoquímicos documentados en lo que antecede, puede asignarse la siguiente fórmula estructural al antibiótico 107891: los compuestos según la reivindicación 1:



en los que X es un halógeno (F, Cl, Br, I) y en los que R₁, R₂, R₃ y R₄ están seleccionados independientemente del grupo constituido por H, OH; R₅, R₆, R₇ y R₈ están seleccionados independientemente del grupo constituido por H, OH, alquilo (ramificado o no ramificado, sustituido o no sustituido) y arilo (sustituido o no sustituido), con la condición de que cuando R₂ sea OH o R₁ y R₂ sean OH, al menos uno de R₃ a R₈ sea diferente de H o X no sea Cl. En una realización alternativa, R₁, R₂, R₃ y R₄ pueden ser H u OH.

Por lo tanto, las combinaciones posibles de R₁, R₂, R₃ y R₄ incluyen las siguientes.

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 lo tanto, las combinaciones posibles 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 del antibiótico 107891

Se determinó la actividad antimicrobiana del antibiótico 107891 mediante el procedimiento de microdisolución de caldo según las recomendaciones del Comité Nacional para las Normas de Laboratorios Clínicos (NCCLS, documento M7-A5).

- 5 Las cepas usadas fueron aislados clínicos o cepas de la Colección Estadounidense de Cultivos Tipo (ATCC). El resultado de las pruebas se documenta 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 fueron de 105 UFC/ml. El inóculo de *C. albicans* fue de 1×10^4 UFC/ml. Todos los ensayos se realizaron en presencia de albúmina de suero bovino (BSA) al 0,02%. Se incubaron los cultivos a 35°C en aire excepto las cepas de *Clostridia* y *Propionibacteria* que necesitaban 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 del 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
A333	<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

Microorganismo		CIM (µg/ml)
		107891
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 gonorrhoea</i>	0,25
47	<i>Escherichia coli</i>	> 128
145	<i>Candida albicans</i>	> 128

TABLA VII: Actividad antimicrobiana del antibiótico 107891 contra bacterias anaerobias

Microorganismo	CIM (µg/ml)
	Antibiótico 107891
ATCC 27520 <i>Propionibacterium amphophilum</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 presenta una buena actividad antibacteriana frente a bacterias gram-positivas.

El intervalo de CIM frente a *Staphylococcus* spp., incluyendo cepas resistentes a meticilina (MRSA) e intermedio de glucopeptidos (GISA), es = 0,13-4 µg/ml y frente a aislados clínicos recientes de *Enterococcus* spp., incluyendo resistentes a la 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). Algunas bacterias gram-negativas son sensibles al antibiótico 107891; las CIM son de 1-0,25 µg/ml frente a *M. catharralis*, 0,5-0,25 µg/ml frente a *Neisseria* spp. y 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 ensayo.

En los experimentos de letalidad con respecto al tiempo, el antibiótico 107891 presenta 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.

El *S. aureus* puede provocar infecciones potencialmente mortales y MRSA es de significación clínica particular porque es resistente a todas las penicilinas y las cefalosporinas y también a muchos otros antibióticos; además, se extiende fácilmente de paciente en paciente, provocando brotes 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 (NNIS) de los Centros para el Control de las Enfermedades (CDC) ha documentado que la resistencia a la meticilina en el *S. aureus* en hospitales de 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 nosocomiales por estafilococos están asociadas con una morbilidad y una mortalidad considerables, 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 más comúnmente usados, incluyendo macrólidos, aminoglucósidos, y los antibióticos de β -lactamas en uso actualmente, incluyendo la última generación de cefalosporinas.

Los patógenos adquiridos en hospitales resistentes a la vancomicina responsables de infecciones (tales como endocarditis, meningitis y septicemia) presentan un reto 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. Infect. Dis.* 7:183-7).

S. pneumoniae y *M. catarrhalis* son patógenos importantes reconocidos de seres humanos. Son causas comunes de infecciones de las vías respiratorias, particularmente otitis media en niños e infecciones de las vías respiratorias inferiores 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. McKenzie, (1997): "Moraxella (Branhamella) catarrhalis. Clinical and molecular aspect of a rediscovered pathogen", *J. Med. Microbiol.* 46:360-71).

Los *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 casi 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", *Clinic. Infect. Dis.* 15: 573-581).

Actividad biológica in vitro de los factores A1 Y A2 (no dentro del alcance de la presente invención) del antibiótico 107891

La Tabla VIII documenta las actividades antimicrobianas de los factores A1 y A2 individuales (no dentro del alcance de la presente invención) del antibiótico 107891. Se determinaron las CIM mediante un procedimiento de dilución de microcaldo tal como se ha descrito en lo que antecede.

TABLA VIII: Actividad antimicrobiana de los factores A1 y A2 del antibiótico 107891 (no dentro del alcance de la presente invención)

Microorganismo		CIM (μ g/ml)	
		Factor A1	Factor A2
819	<i>Staph. aureus</i> Met-S	$\leq 0,03$	$< 0,03$
1524	<i>Staph. aureus</i> Met-R	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$
2235	<i>Staph. aureus</i> Met-R	0,06	0,06
3894	<i>Staph. epidermidis</i> Met-R	$\leq 0,03$	0,06
3881	<i>Staph. epidermidis</i> Met-R	0,06	$\leq 0,03$
602	<i>Staph. haemolyticus</i> Met-R	0,25	0,25
3919	<i>Strept. pneumoniae</i> Pen-R	$\leq 0,0015$	$\leq 0,0015$
3915	<i>Strept. pneumoniae</i> Pen-S	$\leq 0,0015$	$\leq 0,0015$
4323	<i>Ent. faecalis</i> Van A	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$
J1	<i>Ent. faecalis</i> Van A	1	1
4341	<i>Ent. faecalis</i> Van B	0,5	0,5
4397	<i>Ent. faecalis</i> Van B	1	1
4341	<i>Ent. faecalis</i> Van B	2	2
6349	<i>Ent. faecium</i> Van A LN2-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

Microorganismo		CIM ($\mu\text{g/ml}$)	
		Factor A1	Factor A2
A8	<i>Ent. faecium</i> Van A	0,5	0,5
4339	<i>Ent. faecium</i> Van D	0,25	0,25
4174	<i>Ent. gallinarum</i>	1	1
997	<i>Neisseria gonorrhoea</i>	0,5	0,25
1613	<i>Neisseria meningitidis</i>	0,25	0,25
1016	<i>Propionibacterium acnes</i>	$\leq 0,03$	0,06

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, a los cuatro días y un día, respectivamente, antes de infectarse los ratones.

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 una cepa estándar sensible a meticilina (*Staph. aureus* Smith ATCC19636), o bien inoculando en ratones neutropénicos un aislado clínico de enterococos resistentes a glucopéptidos (*Ent. faecalis* A533). Las exposiciones bacterianas (aproximadamente 106 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% (DE_{50}) y los límites de confianza al 95% se calcularon mediante el procedimiento de Spearman-Kärber (D. J. Finney, (1952): "The Spearman-Kärber method", en: Statistical methods in biological assay. pp. 524-530, Charles Griffin & Co., Ltd., Londres) a partir del porcentaje de animales que sobrevivieron al día 7. Los resultados se documentan en la siguiente Tabla IX.

El antibiótico 107891 no es tóxico hasta la dosis máxima objeto de ensayo de 200 mg/kg.

Tabla IX DE_{50} del antibiótico 107891 en infecciones agudas letales en ratones

Formulación	Cepa	Vía	DE_{50} mg/kg	Límites de confianza al 95%
A	MSSA	iv	2,1	1,7 - 2,7
		sc	2,1	1,7 - 2,7
A	VanA	iv	3,2	2,7 - 3,9
		sc	11,1	9,2 - 13,5
B	MRSA	sc	4,2	3,5 - 5,1
C	VanA	iv	3,7	2,8 - 4,9
		sc	12,7	10,7 - 15,0

Formulaciones:

A: 10% (v/v) de DMSO, 10% (p/v) de beta hidroxipropil ciclodextrina (Sigma), 80% (v/v) de glucosa al 5% (p/v) en H_2O

B: 10% (v/v) de DMSO, 40% (v/v) de PEG 400 in CH_3COOH 0,1 M acuoso

C: 50% (v/v) de PEG 400 en H_2O

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

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

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

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

La Fig. 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 en un espectrómetro Bruker AMX 600 aplicando una secuencia de supresión de agua.

- 5 La Fig. 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 en un espectrómetro Bruker AMX 600.

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

- 10 Las Figuras 7A (espectro de baja resolución de barrido completo) y 7B (espectro de alta resolución de barrido ampliado) representan espectros de masas del factor A2 (no dentro del alcance de la presente invención) del antibiótico 107891 que muestran un ion doblemente protonado [M+2H]²⁺ a m/z 1116.

- 15 La Fig. 8 representa el espectro de ¹H-RMN del factor A1 (no dentro del alcance de la presente invención) del antibiótico 107891 registrado en la mezcla CD₃CN:D₂O (1:1) a 298 K en un espectrómetro Bruker AMX 600 aplicando una secuencia de supresión de agua.

La Fig. 9 representa el espectro de ¹H-RMN del factor A2 (no dentro del alcance de la presente invención) del antibiótico 107891 registrado en la mezcla CD₃CN:D₂O (1:1) a 298 K en un espectrómetro Bruker AMX 600 aplicando una secuencia de supresión de agua.

- 20 La Fig. 10 representa el espectro de ¹³C-RMN del factor A1 (no dentro del alcance de la presente invención) del antibiótico 107891 registrado en la mezcla CD₃CN:D₂O (1:1) a 298 K en un espectrómetro Bruker AMX 600.

La Fig. 11 representa el espectro de ¹³C-RMN del factor A2 (no dentro del alcance de la presente invención) del antibiótico 107891 registrado en la mezcla CD₃CN:D₂O (1:1) a 298 K en un espectrómetro Bruker AMX 600.

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

- 25 La Fig. 13 representa el espectro de UV del factor A1 (no dentro del alcance de la presente invención) del antibiótico 107891 disuelto en metanol:H₂O.

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

- 30 La Fig. 15 representa el espectro de UV del factor A2 (no dentro del alcance de la presente invención) del antibiótico 107891 disuelto en metanol:H₂O.

Ejemplos

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

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

- 45 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) al interior 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 hasta 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 de 180 rpm y una aireación de 0,5 vvm con una presión de descarga de 36 kPa. Se realizó la recolección del fermentador tras 98 horas de fermentación.

Se monitorizó la producción del antibiótico 107891 mediante HPLC tal como se ha descrito 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: Procedimiento de fermentación alternativo de *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024

- 5 Se inoculó *Microbispora* sp. ATCC PTA-5024 en 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 soja 8, extracto de levadura 2 y carbonato de calcio 4. Se preparó el medio en agua desionizada y se esterilizó a 120°C × 20 min. sin ajuste de pH. Se incubaron los matraces inoculados durante 120-168 horas a 28°C, con una agitación de 200 rpm hasta que se observó un buen desarrollo. Entonces se usaron los matraces para inocular (3%) un biorreactor de 4 l que contenía 3 l de medio de cultivo para siembra AF/MS, que está compuesto según se ha descrito en el Ejemplo 1.
- 10 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 de 600 rpm y aireación de 0,5 vvm, y entonces se transfirió al tanque de producción.

- 15 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 con un pH ajustado a 7,5 con NaOH, y se esterilizó a 121°C durante 20 min.

- 20 Se inocularon en el fermentador 14 l del 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 ha descrito anteriormente. Se recogió la fermentación tras aproximadamente 160 horas.

Ejemplo 3: Recuperación del antibiótico 107891

- 25 Se filtró el caldo de fermentación descrito en el Ejemplo 1 mediante un sistema de filtrado 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 antibiótico 107891 tanto en el filtrado (A) como en el micelio (B).

- 30 (A) Se agitó el caldo filtrado durante una noche a temperatura ambiente en presencia de resina de poliestireno Diaion HP-20 (4 l). A continuación, se recuperó la resina, se lavó con 10 l de metanol:agua 4:6 (v/v) y se eluyó de manera continua 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 lograr un pequeño volumen sobre 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. La capa orgánica fue concentrada a presión reducida, dando un residuo aceitoso, que se disolvió en metanol. Con la adición de éter de petróleo, se obtuvieron 5 g de preparación de antibiótico bruto mediante precipitación.

- 35 (B) Tras la adición de 25 l de metanol, se agitó la fracción retenida que contenía el micelio durante 1 hora y se filtró, obteniéndose 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). A continuación se recuperó la resina, se lavó con 2 l de metanol:agua 40:60 (v/v) y se eluyó secuencialmente en tandas con 3 l de metanol:agua 85:15 (v/v) y luego con 2 l de metanol:agua 90:10 (v/v). Las fracciones eluidas fueron monitorizadas 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 ha documentado anteriormente.
- 40

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 del antibiótico 107891

- 45 Se llevó el caldo recogido de la fermentación en tanque de 200 l descrito en el Ejemplo 2 hasta un pH de 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) en tandas durante toda la noche a temperatura ambiente con 2 l de resina Diaion HP20 (Mitsubishi Chemical) y luego se recogió la resina.

- 50 Se añadió metanol (25 l) a la fracción 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 en tandas 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 del caldo según el procedimiento descrito anteriormente. Se lavó la resina combinada dentro de una columna cromatográfica con 20 l de agua:metanol 6:4
- 55

(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 al vacío este eluato hasta un volumen final de 3 l. Entonces se cargó la disolución concentrada a pH 4,5 en 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 agua:metanol 3:7 (v/v) y luego con una mezcla 1:9 (v/v). Se completó la elución con tampón de formiato de amonio 25 mM pH 2,8:metanol con una proporción de 1:9 (v/v). Se combinaron los eluatos que contenían antibiótico 107891 y se concentraron al 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.

Ejemplo 5: Purificación del antibiótico 107891

Se purificó antibiótico 107891 bruto (3,6 g), preparado según se ha descrito 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, Reino Unido) usando un sistema de cromatografía de presión media Büchi B-680 (Büchi laboratories-technik AG, Flawil, Suiza) equipado con un formador de gradiente B-687, colector de fracciones B-684, columna de vidrio B-685 70 × 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 un gradiente lineal de 60 min desde el 20% hasta el 60% de la 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).

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

Ejemplo 6: Purificación del antibiótico 107891 mediante HPLC preparativa

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, de Merck, usando una elución en gradiente lineal de 25 minutos desde el 30% hasta el 45% de la 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.

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 trataron 300 µl por tanda cromatográfica. Típicamente, se eluyó el antibiótico 107891 a los 15-16 minutos. Se combinaron las fracciones eluidas de 5 tandas cromatográficas, que contenían antibiótico 107891, y se concentraron al vacío. Se liofilizó secuencialmente la disolución residual a partir de agua tres veces, dando 31 mg de antibiótico 107891 como un polvo blanco.

Ejemplo 7: Separación y purificación de los factores individuales A1 y A2 del antibiótico 107891

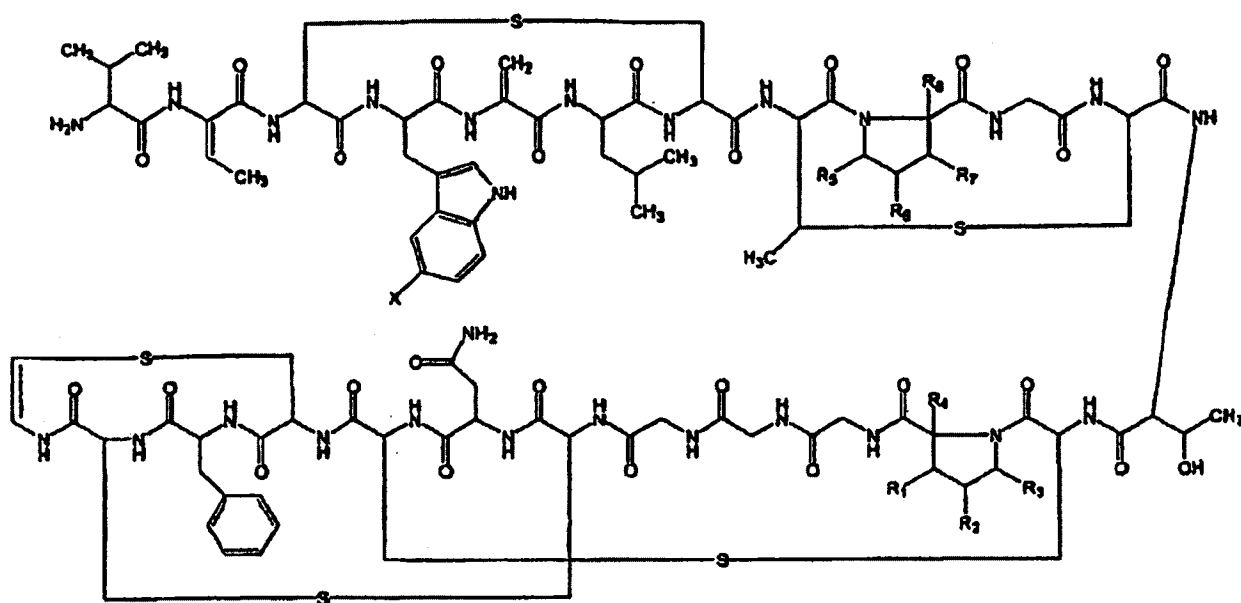
Se separaron los factores A1 y A2 (no dentro del alcance de la presente invención) y se purificaron del complejo antibiótico 107891 del Ejemplo 5 mediante HPLC preparativa en una columna Symmetry Prep C18 (7 µm de tamaño de partícula) 7,8 × 300 mm Waters (Mildford, EE. UU.) usando dos programas de elución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

A) Se purificó el factor A1 (no dentro del alcance de la presente invención) mediante una elución en gradiente lineal de 25 minutos desde el 30% hasta el 45% de la fase B, con una velocidad de flujo de 3,5 ml. 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. Se disolvió el complejo antibiótico 107891 purificado (15 mg) en 350 µl de DMSO:ácido fórmico 95:5 (v/v) y se trató por tanda cromatográfica. Los factores A1 y A2 fueron eluidos normalmente en un marco temporal de 11-13 minutos. A continuación, se analizaron las fracciones eluidas mediante HPLC en las condiciones analíticas descritas anteriormente. Se combinaron las fracciones de 14 tandas cromatográficas, que contenían factor A1 (no dentro del alcance de la presente invención) de antibiótico 107891 puro, y se concentraron al vacío. Se liofilizó secuencialmente la disolución resultante a partir de agua tres veces, dando 15 mg de factor A1 puro (no dentro del alcance de la presente invención) como un polvo blanco.

B) Se purificó el factor A2 (no dentro del alcance de la presente invención) mediante elución isocrática con una velocidad de flujo de 7 ml con tampón de formiato de amonio 100 mM pH 4:acetonitrilo 82,5:17,5 (v/v). Se disolvió el complejo antibiótico 107891 purificado (5 mg) en 250 µl de mezcla ácido acético:acetonitrilo:tampón de formiato de amonio 100 mM pH 4 50:120:80 (v/v) y se trató mediante serie cromatográfica. Típicamente, los factores A1 y A2 (no dentro del alcance de la presente invención) eluyeron en un marco temporal de 9-10 minutos. Entonces se analizaron las fracciones eluidas mediante HPLC en las condiciones analíticas descritas anteriormente. Se combinaron las fracciones de 20 tandas cromatográficas, que contenían factor A2 (no dentro del alcance de la presente invención) de antibiótico 107891 puro, y se concentraron al vacío. Se liofilizó la disolución residual dos veces a partir de agua dando 8 mg de factor A2 puro (no dentro del alcance de la presente invención) como un polvo blanco.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula



en la que X se selecciona del grupo constituido por F, Cl, Br y I;

- 5 y en la que R₁, R₂, R₃ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo constituido por H, OH y R₅, R₆, R₇, y R₈ se seleccionan del grupo constituido por H, OH, alquilo y arilo, con la condición de que cuando R₂ sea OH o R₁ y R₂ sean OH, al menos uno de R₃ a R₈ sea diferente de H o X no sea Cl.
2. El compuesto de la reivindicación 1 en el que R₁ es H, R₂ es H, y R₃ es H, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son H.
3. El compuesto de la reivindicación 1 en el que R₁ es H, R₂ es H, y R₃ es OH, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son H.
- 10 4. El compuesto de la reivindicación 1 en el que R₁ es H, R₂ es OH, y R₃ es OH, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son H.
5. El compuesto de la reivindicación 1 en el que R₁ es OH, R₂ es OH, y R₃ es OH, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son H.
6. El compuesto de la reivindicación 1 en el que R₁ es OH, R₂ es H, y R₃ es H, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son H.
7. El compuesto de la reivindicación 1 en el que R₁ es OH, R₂ es H, y R₃ es OH, R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ son H.
8. Una composición farmacéutica que comprende un antibiótico seleccionado de los compuestos según la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos con un ácido.
- 15 9. La composición farmacéutica según la reivindicación 8 que, además, comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. Los compuestos según la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos con un ácido para su uso como medicamento.
- 20 11. El uso de los compuestos según la reivindicación 1 o de una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos con un ácido para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de infecciones bacterianas.
12. El uso de los compuestos según la reivindicación 1 y de una sal no tóxica de los mismos con un ácido como promotor del crecimiento animal.



FIG.1A

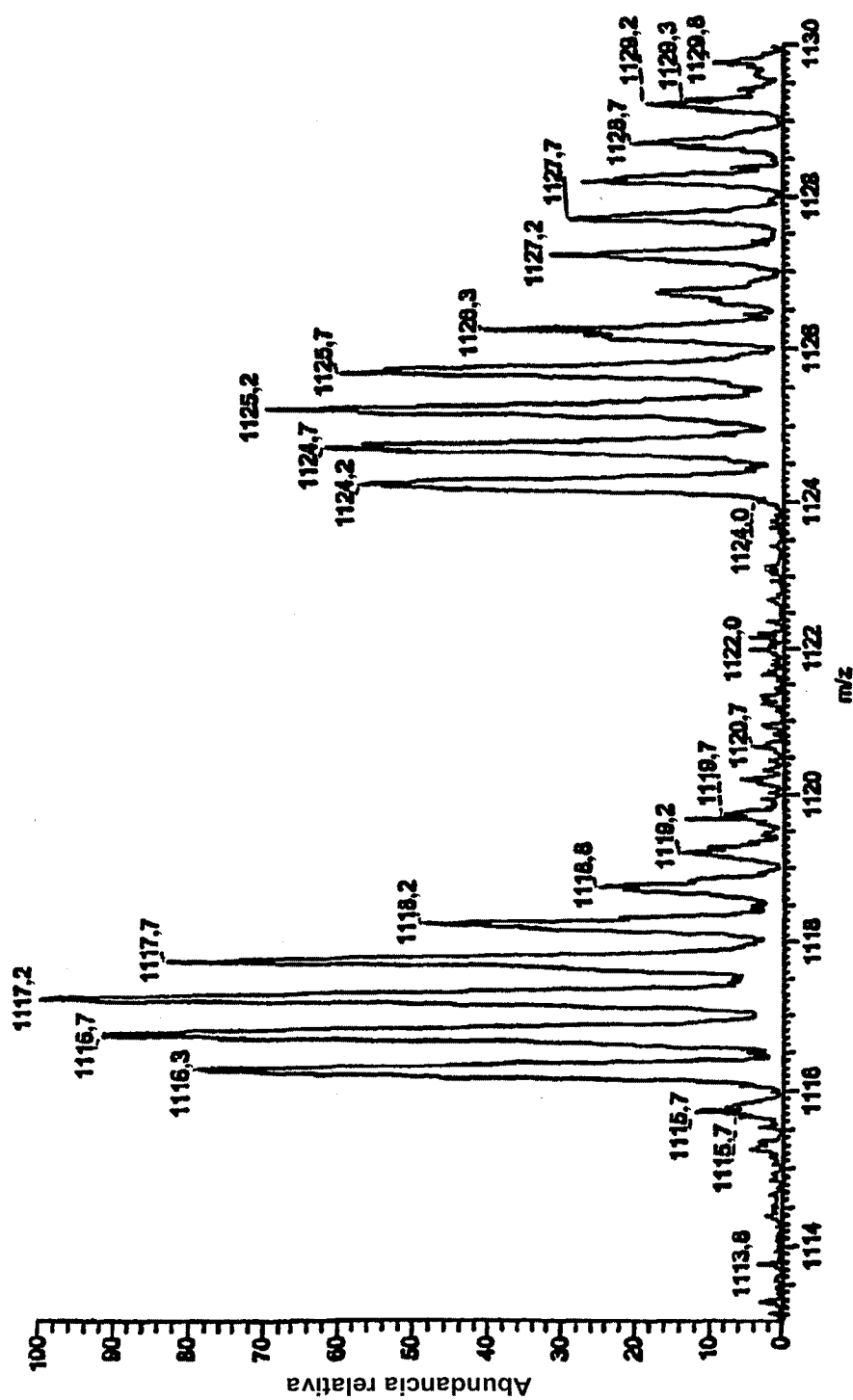


FIG. 1B

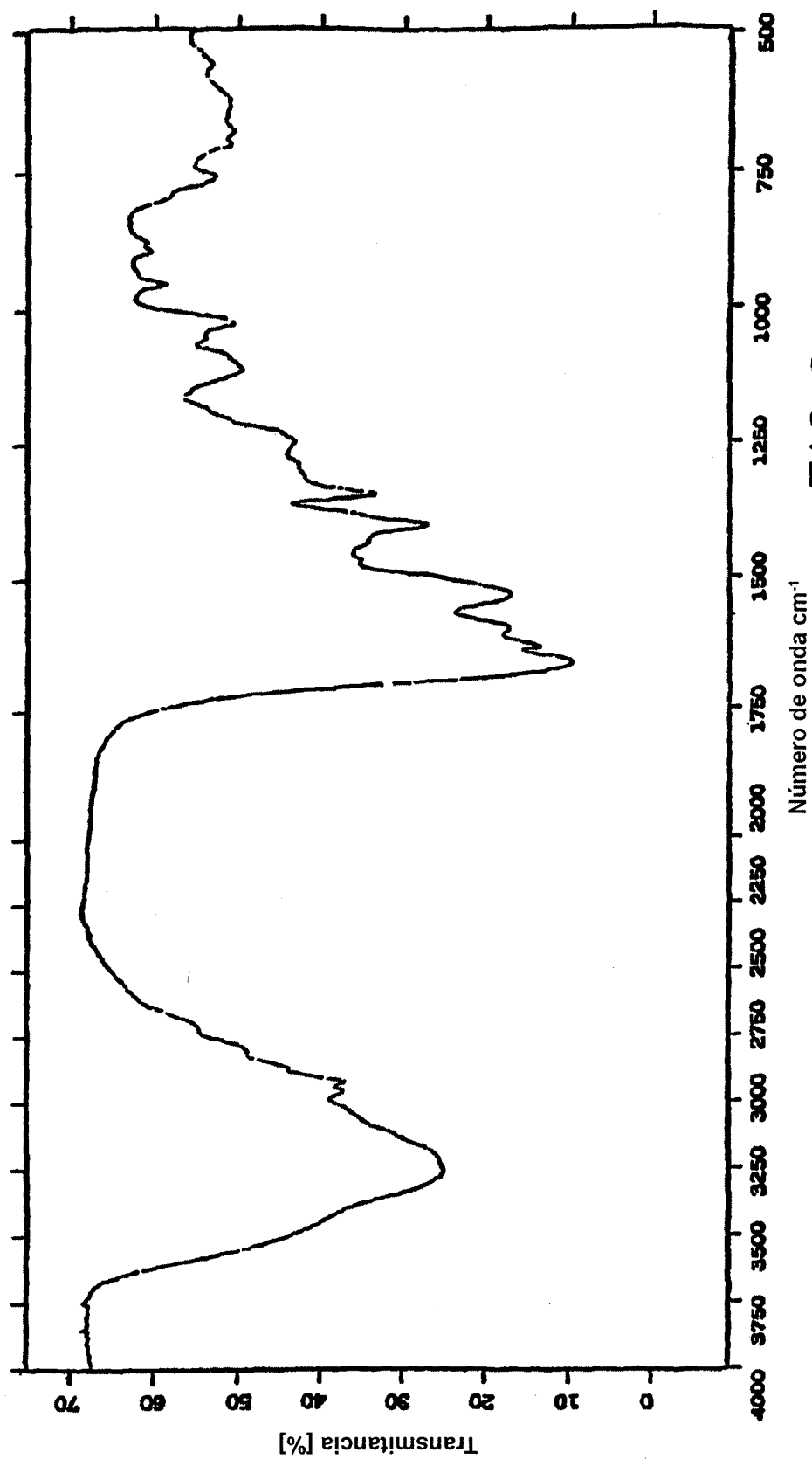


FIG. 2

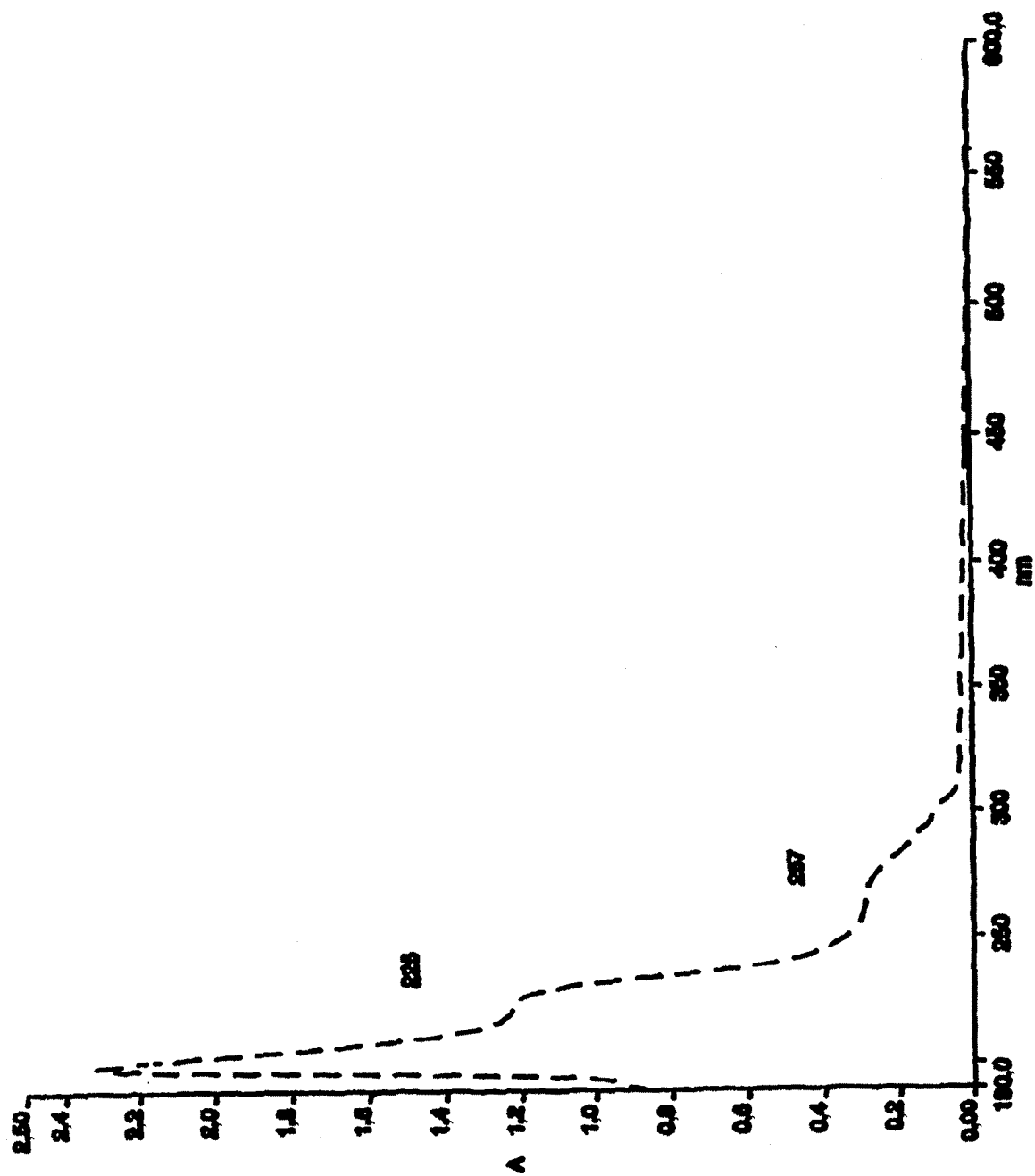
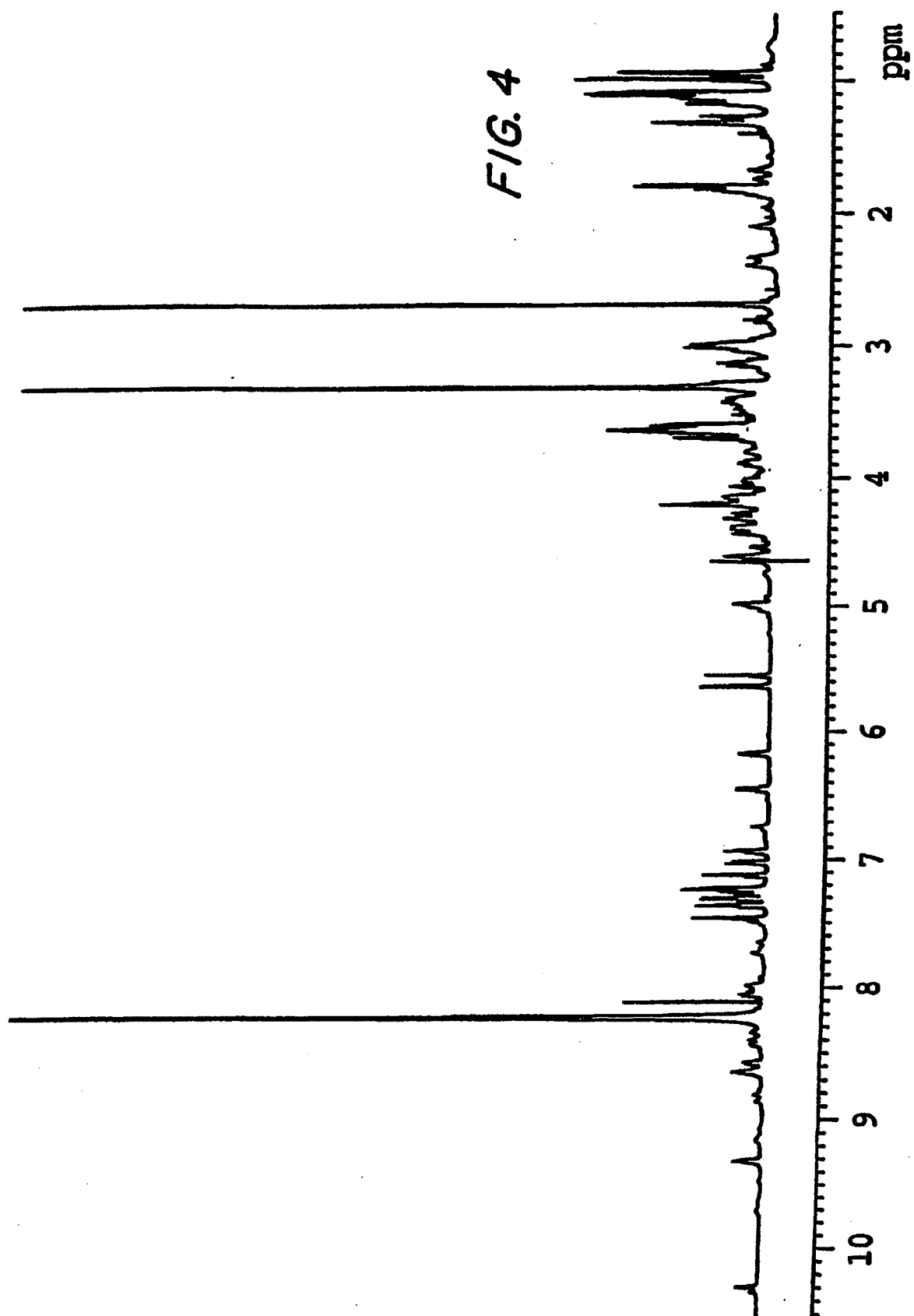


FIG. 3



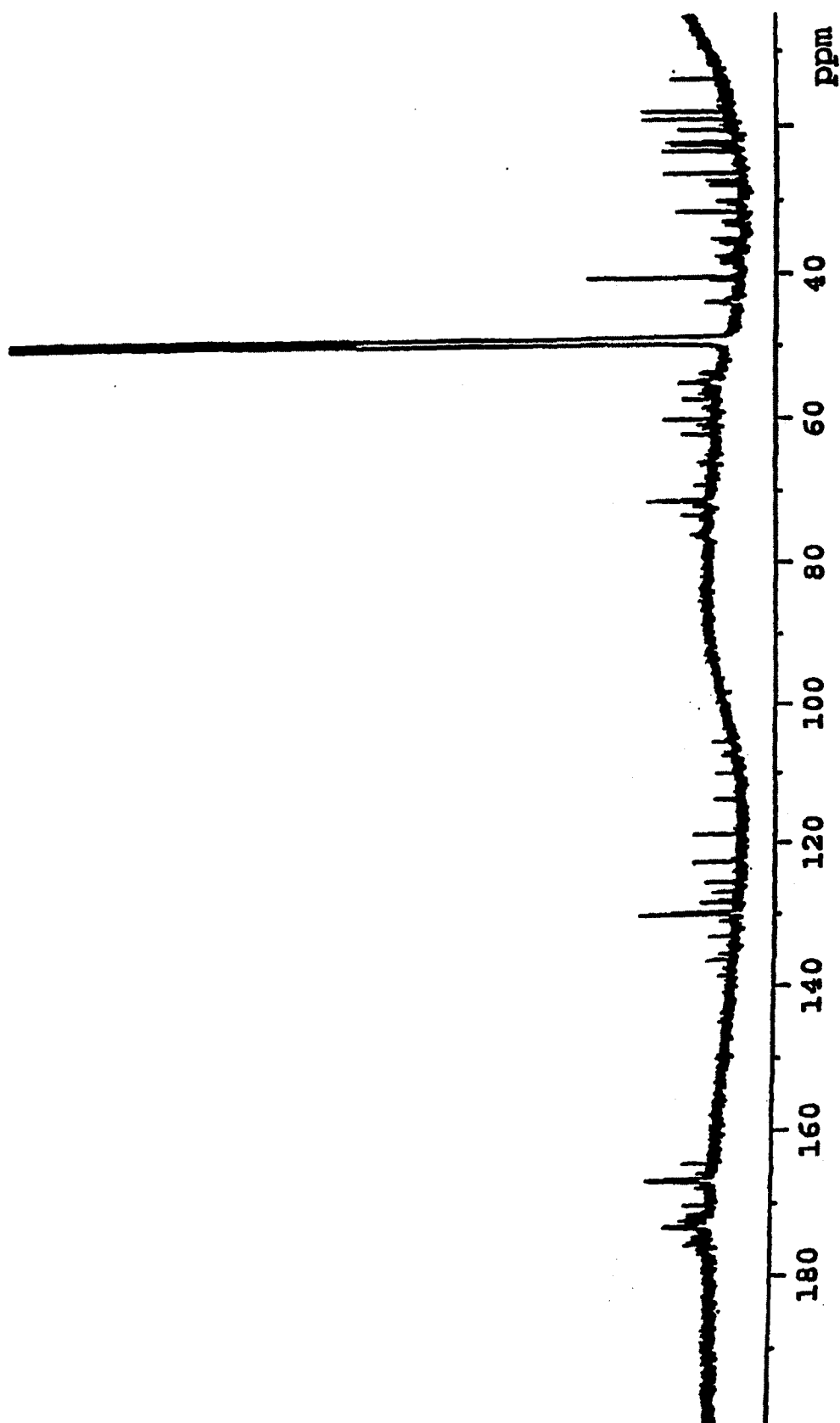


FIG. 5

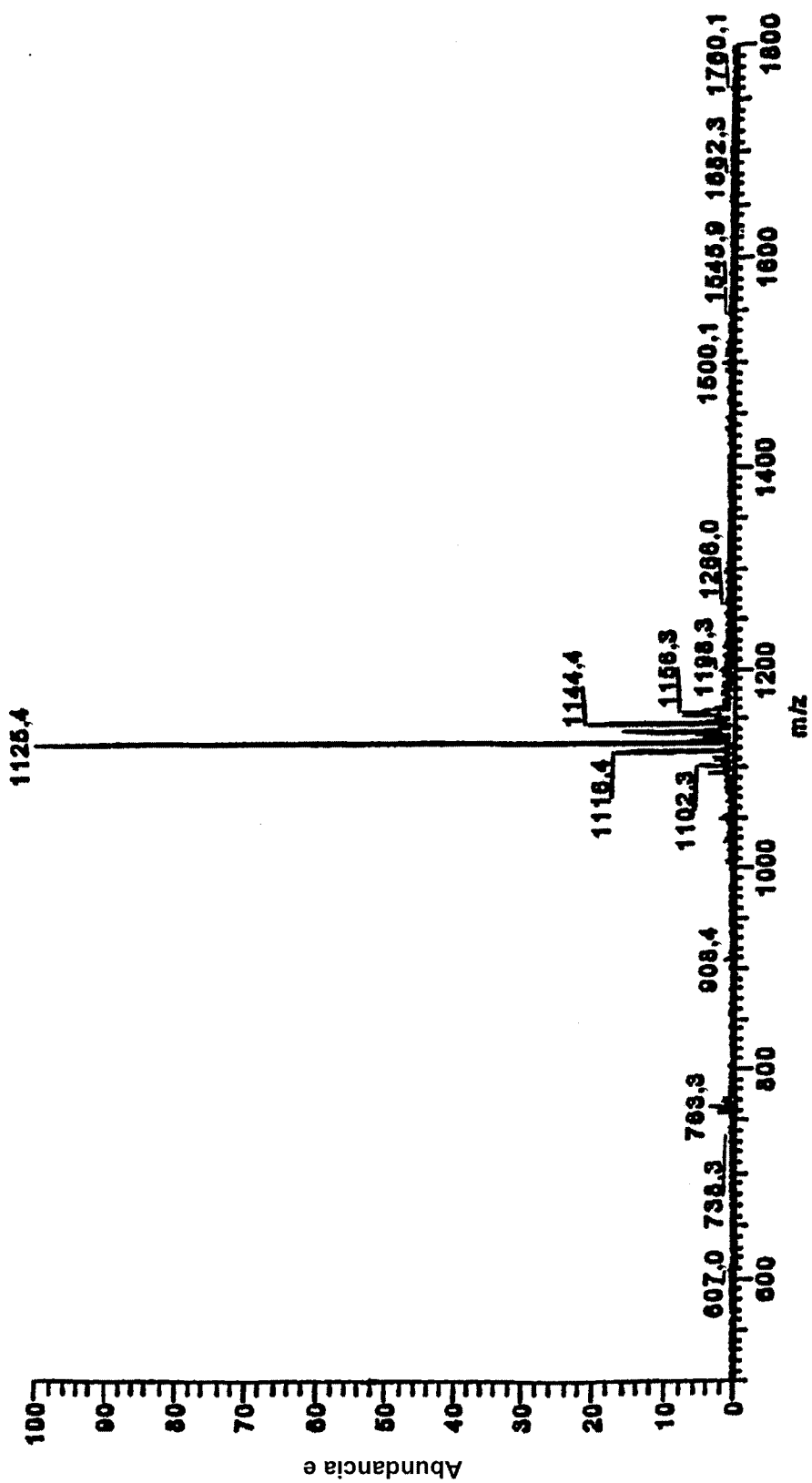


FIG. 6A

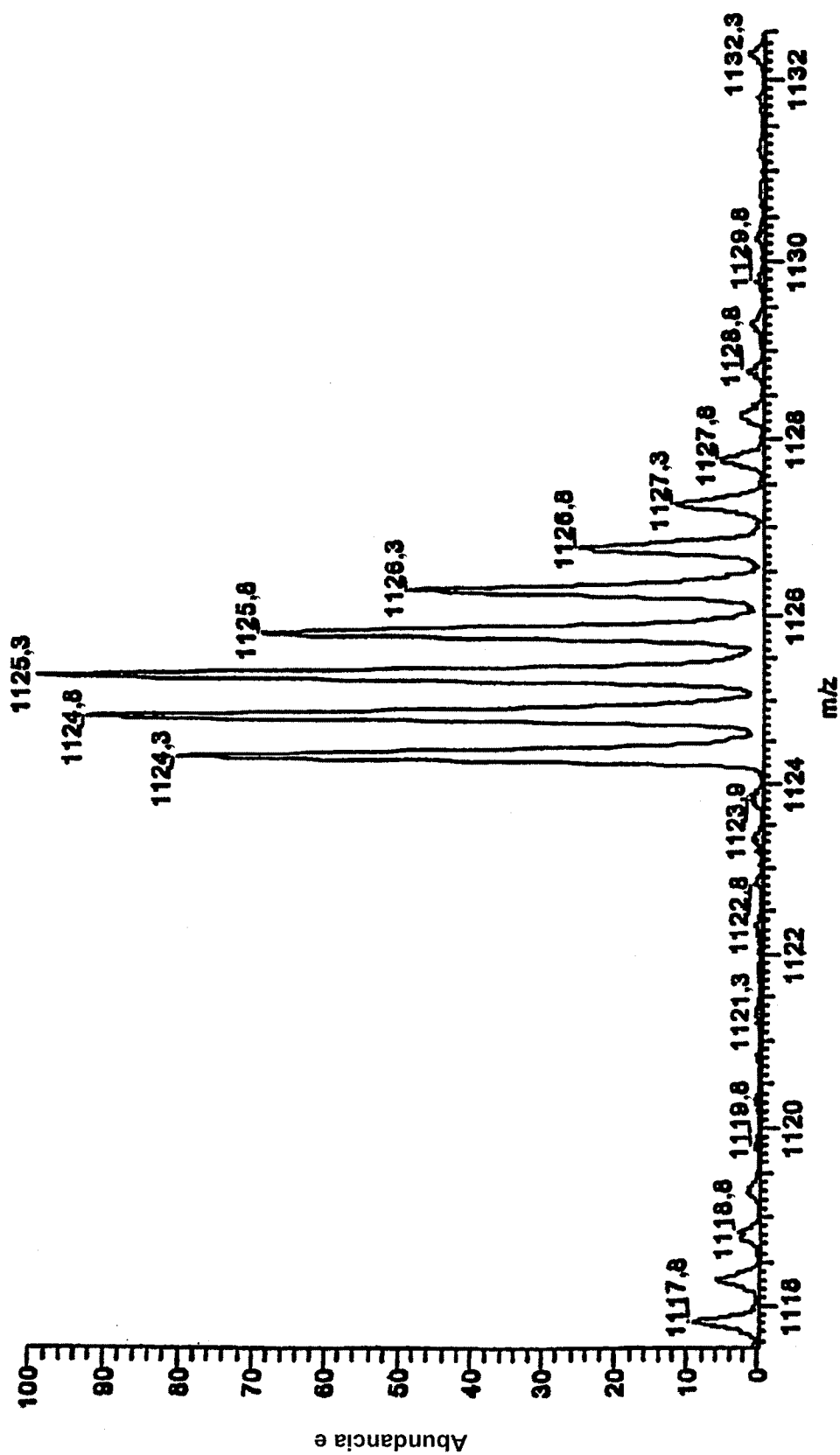


FIG. 6B

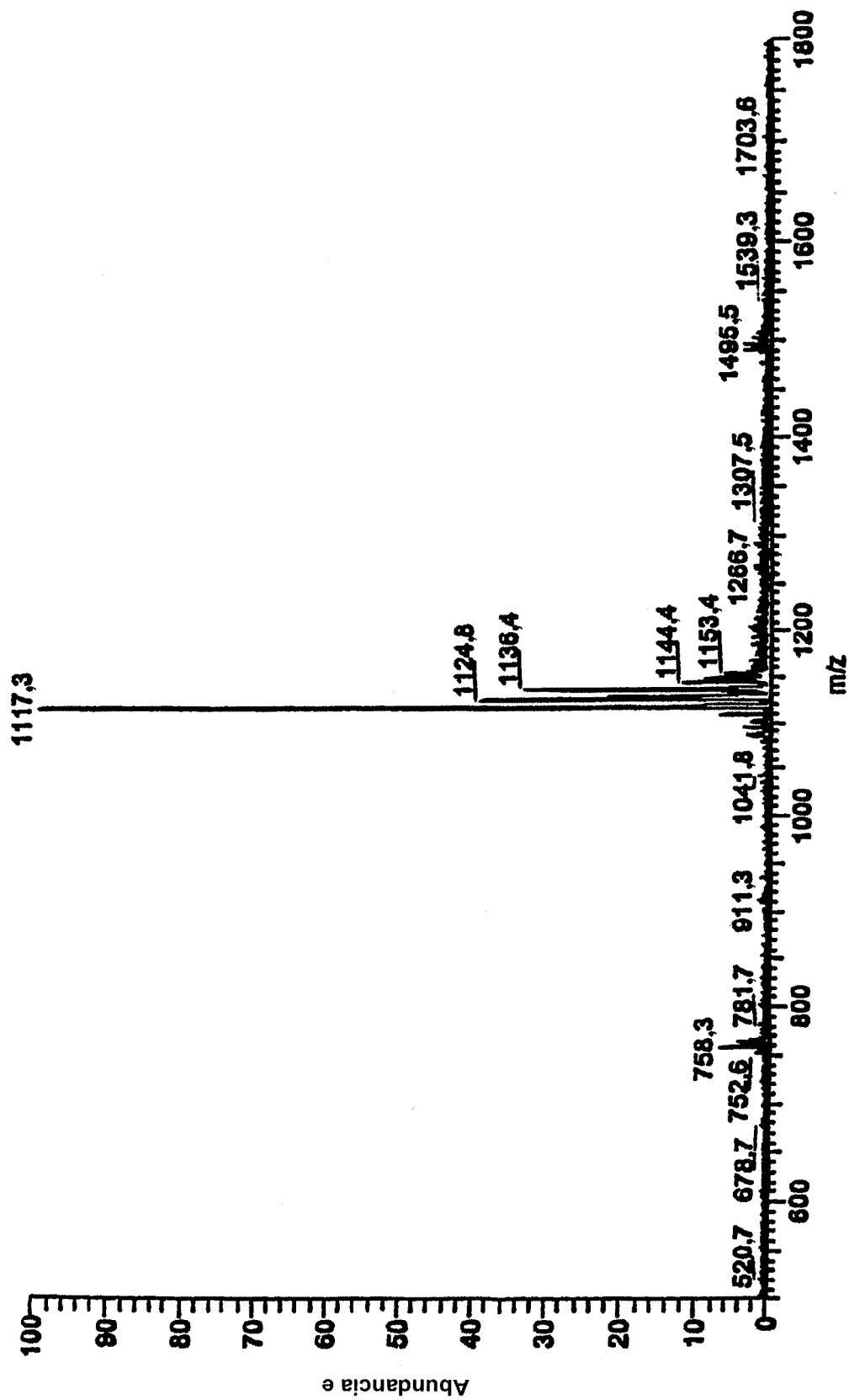


FIG. 7A

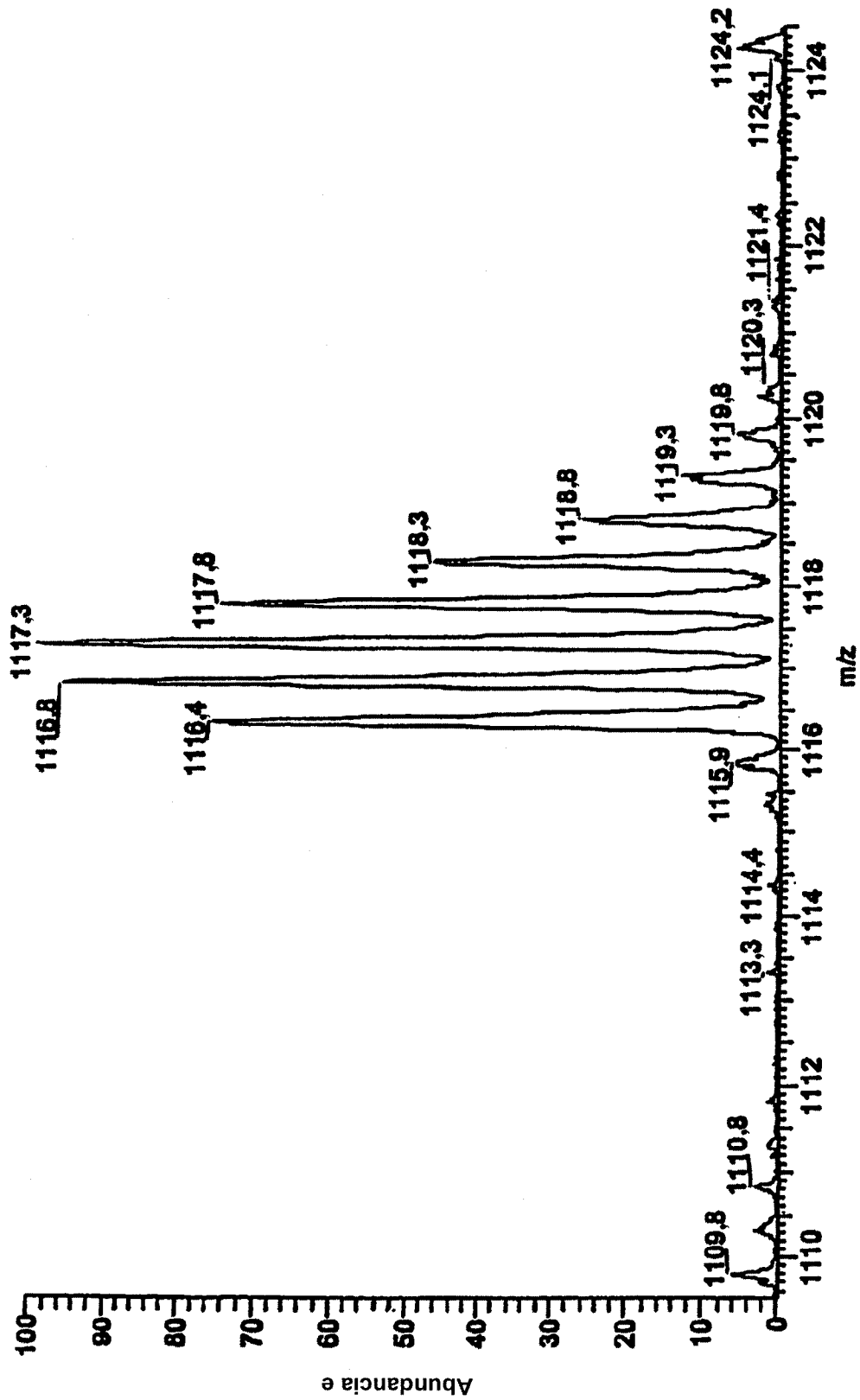
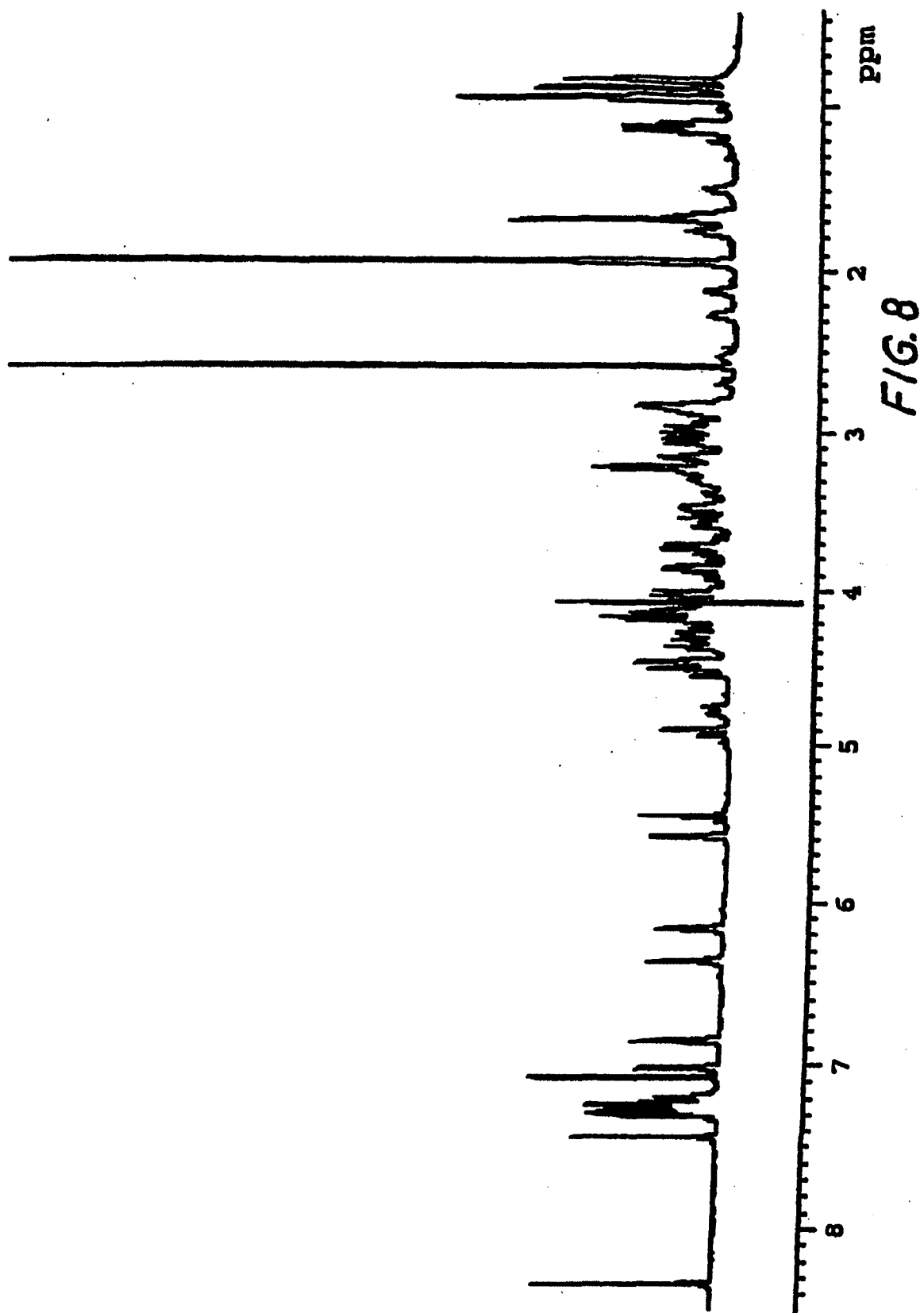
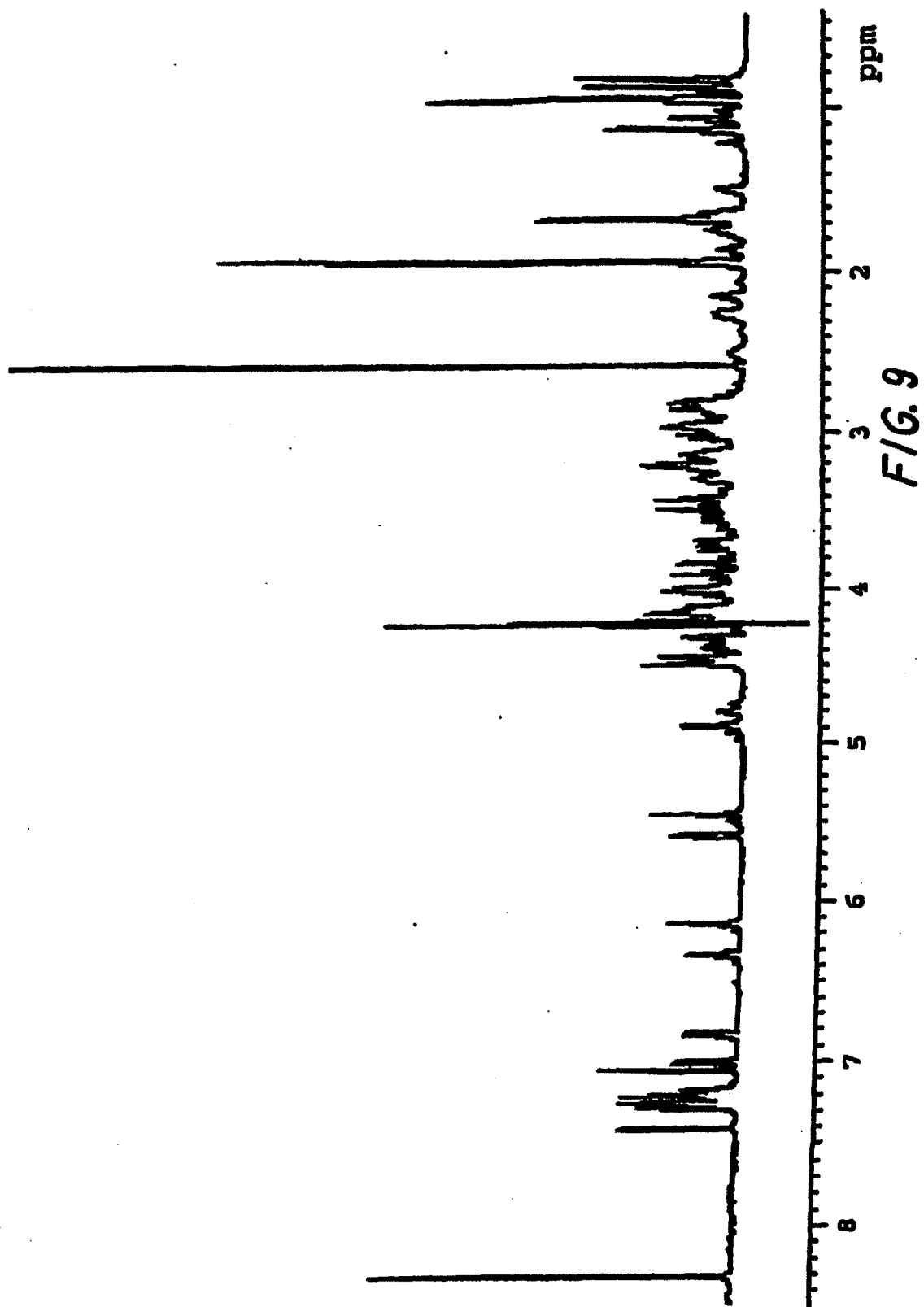


FIG. 7B





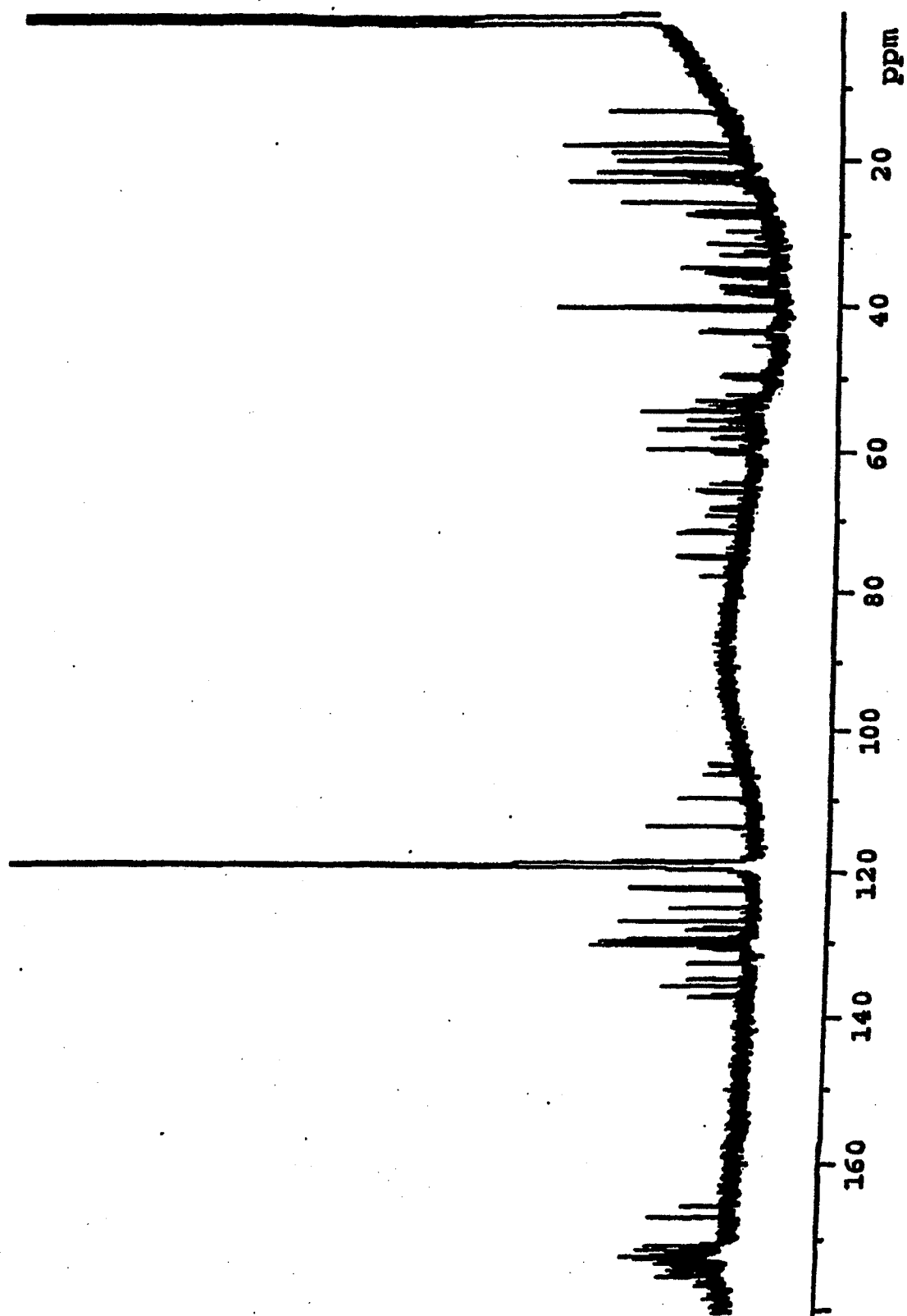


FIG. 10

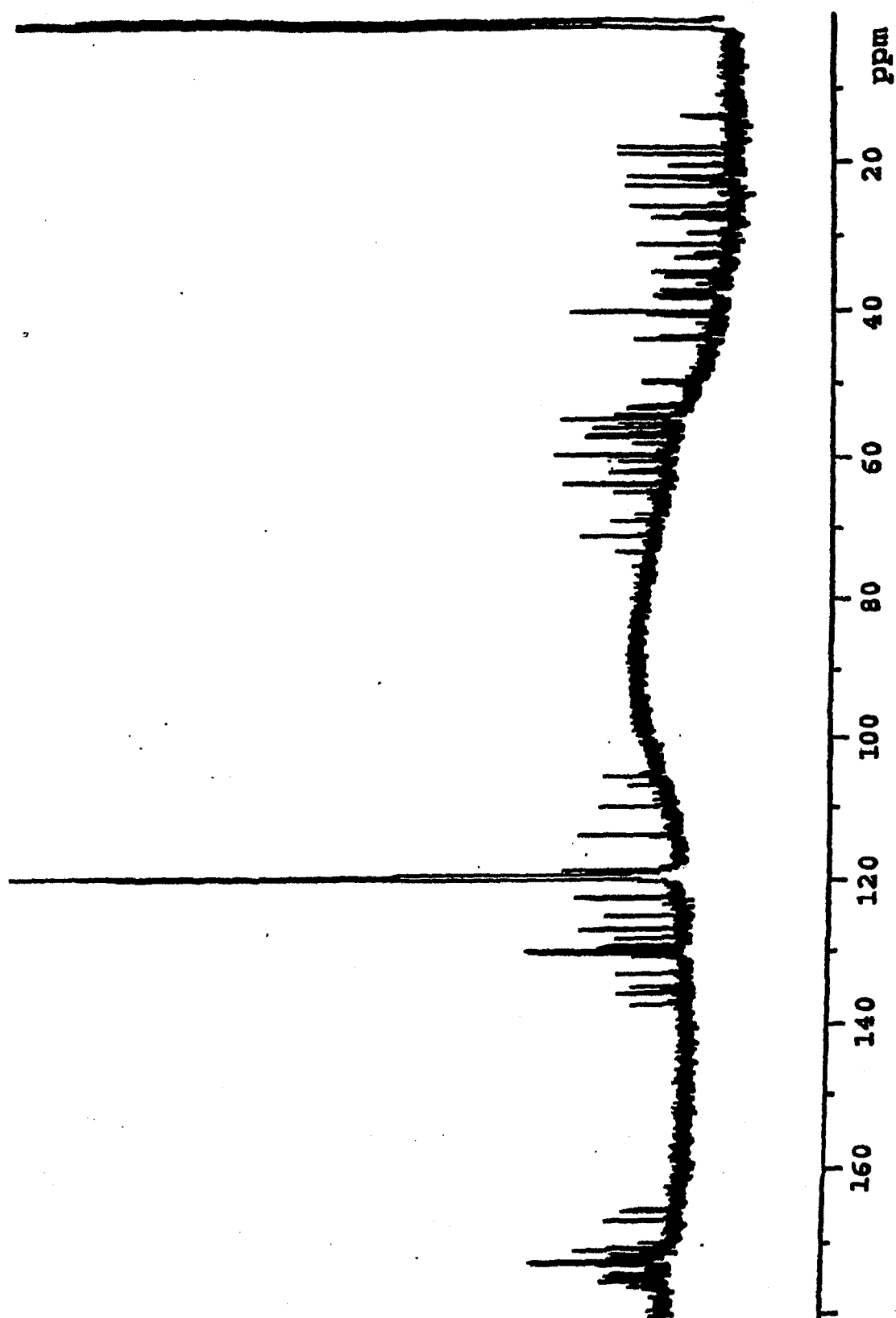


FIG. 11

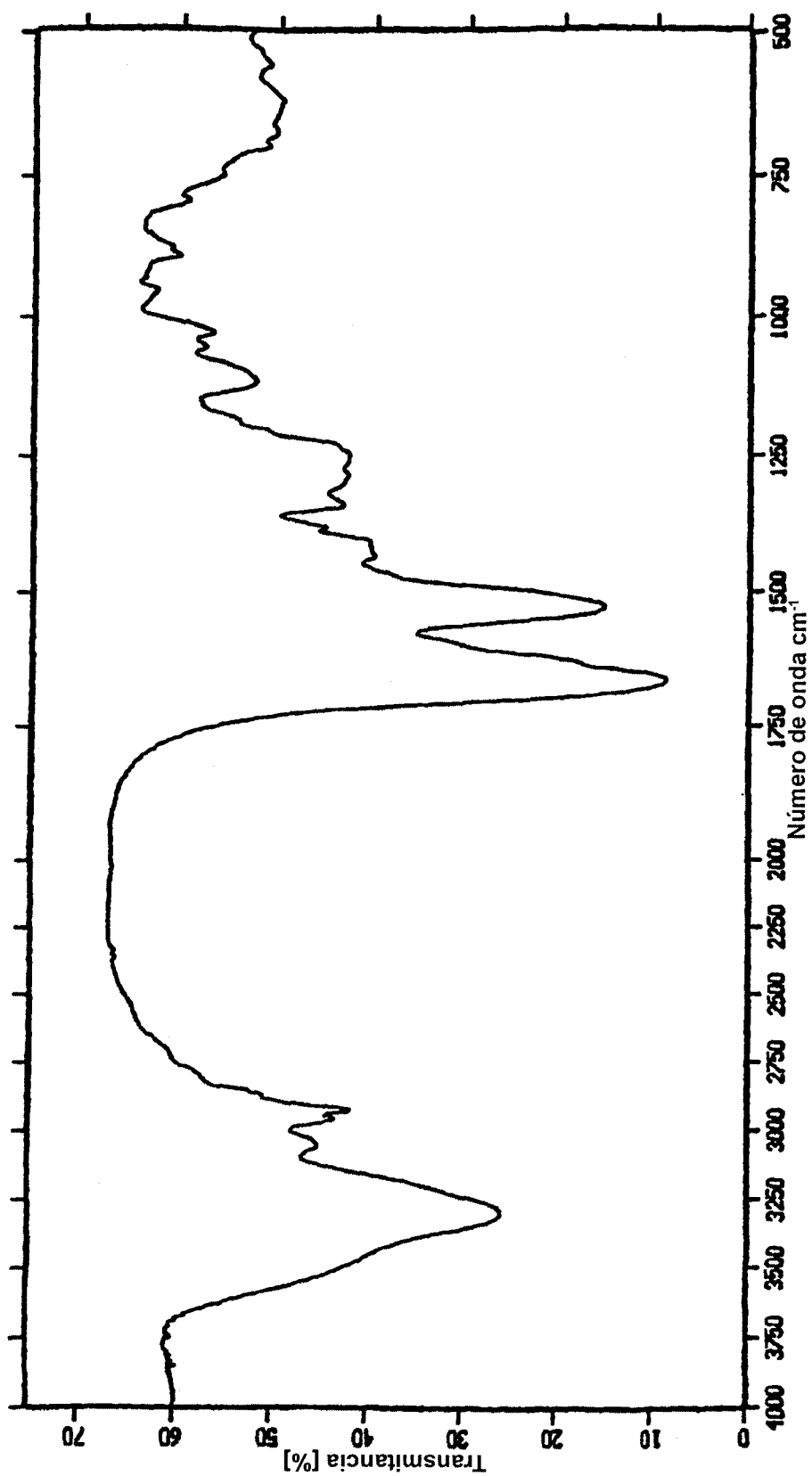


FIG. 12

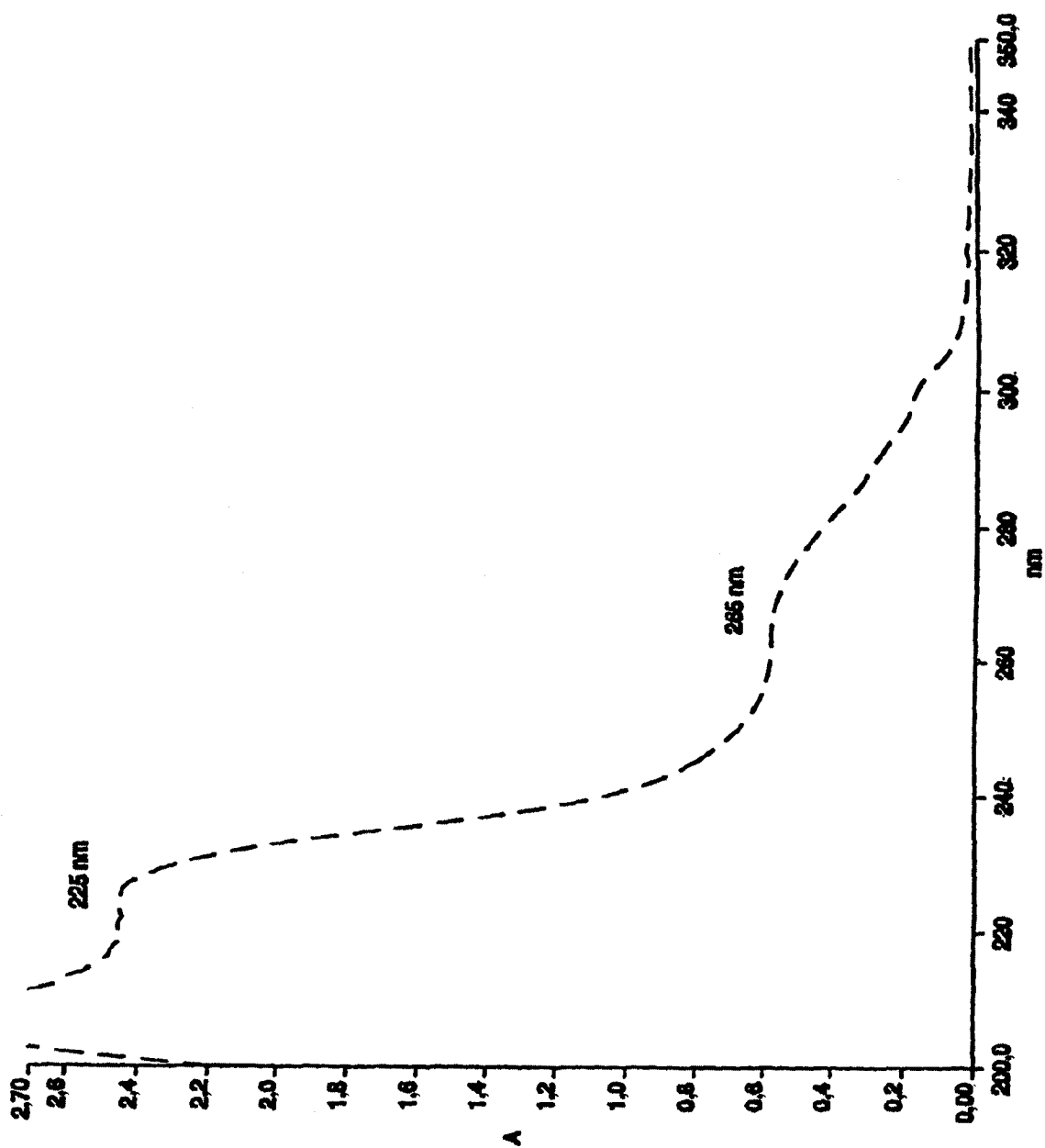


FIG. 13

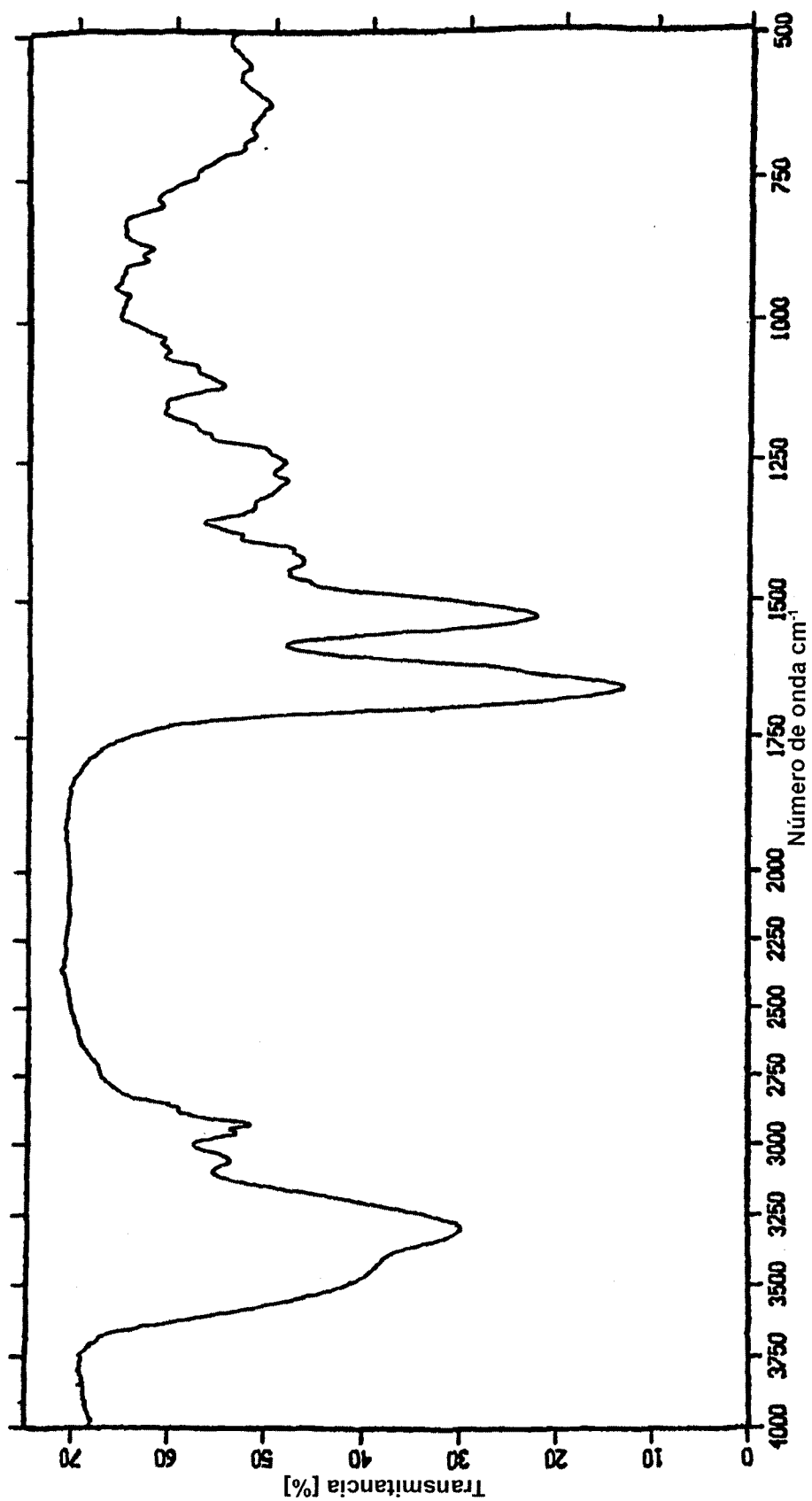


FIG. 14

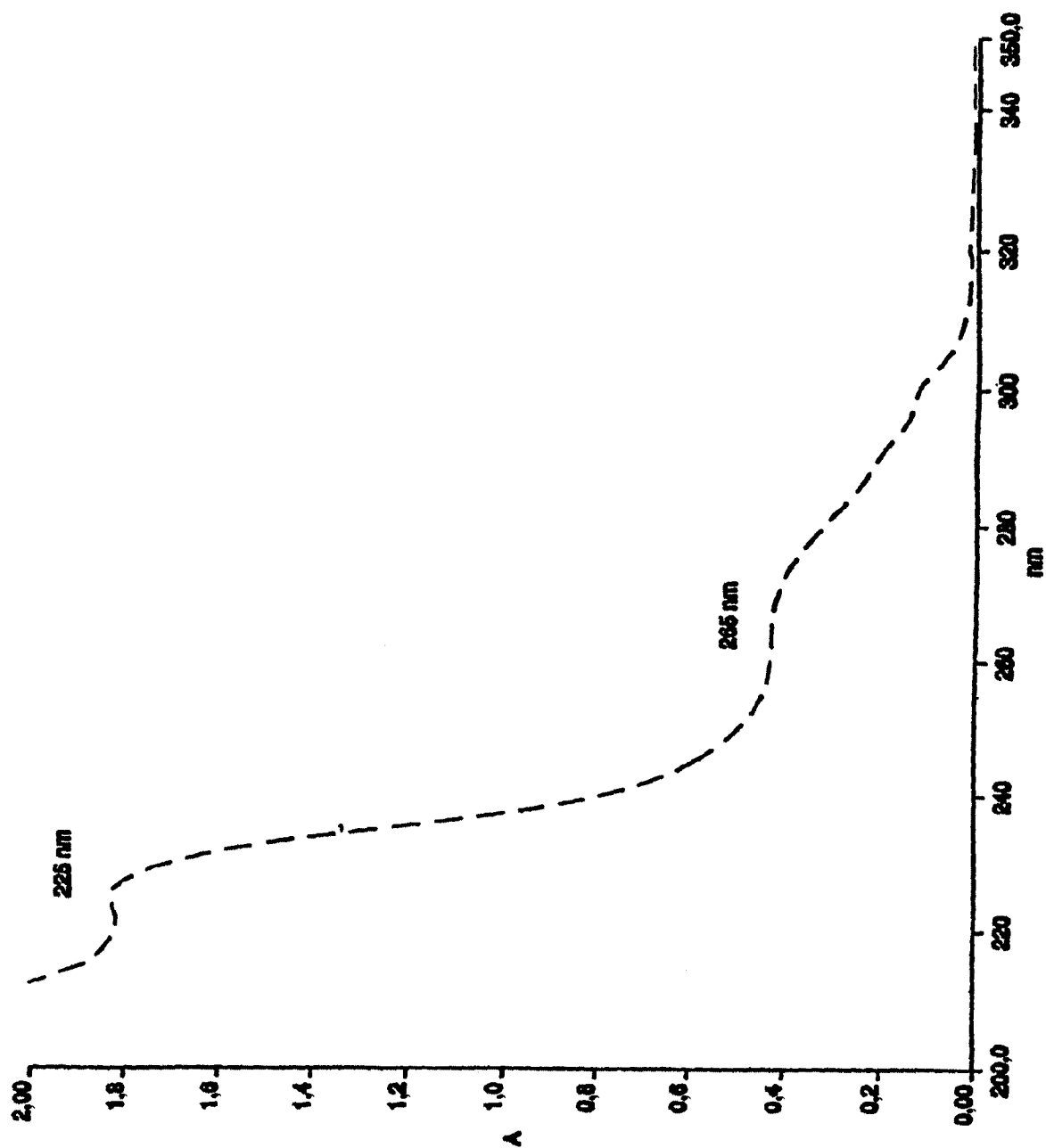


FIG. 15