



293 569

P A T E N T E
D E
I N V E N C I Ó N

por "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DE UNA NUEVA
SUBSTANCIA ANTIBIÓTICA", a favor de la firma italiana
SOCIETA FARMACEUTICI ITALIA, domiciliada en MILANO
(Italia), Largo G. Donegani 1-2.

- . -

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a un procedimiento para la preparación de una nueva sustancia antibiótica y sus derivados, particularmente útiles en terapia como antitumorales. Más particularmente, el objeto de esta

5. invencion es un procedimiento para la preparación de un nuevo antibiótico de tipo indicador, que nosotros denominamos "daunomicina", el cual se designará como antibiótico "F.I. 1762", y sus sales, los productos de su degradacion hidrolitica, realizandose el procedimiento

10. biosintético por medio de una nueva especie de Strepto-



293539

myces que nosotros denominamos Streptomyces peucetius que se designará en lo que sigue como "Streptomyces 1762".

El Streptomyces F.I. 1762 ha sido depositado en el Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, Kew Surrey (Gran Bretaña), recibiendo el número de índice I.M.I. 101,335, y en el National Collection of Industrial Bacteria, de Aberdeen (Gran Bretaña), habiendo recibido el número de índice NCIB 9475, y en el Institute of Microbiology de la Universidad de Rutgers (EE.UU.), habien-

do recibido el número de índice El microorganis-
mo productor del antibiótico F.I. 1762, aislado de una muestra de terreno recogida en la cercanía de Bari (Italia), muestra las características morfológica, macroscópica, microscópica y bioquímica siguientes:

Aspecto microscópico

El micelio vegetativo sobre los medios de cultivo usuales consta de hifa delgada (0,5-0,9 micras de espesor) más o menos larga y ramificada. Las ramificaciones llevan hifa más gruesa (1,1-1,6 micras de espesor), los conidioforos, frecuentemente fasciculadas y terminando en ganchos y lazos.

Los conidios son esféricos, cuyo diámetro varía entre 1,8-3,3 micras, dispuestos primeramente en pequeñas cadenas y luego libres.



293569

En el microscopio electrónico, los conidios son de forma casi esférica de contorno irregular, con superficie verrugosa.

Aspecto macroscópico

En la tabla I están indicadas las características culturales observadas sobre los terrenos mencionados, en los que el microorganismo se desarrolla a 28°C y las observaciones se realizan al 3º, 8º, 15º, 21º y 30º día después de la inoculación.

Propiedades bioquímicas

Gelatina: hidrólisis lenta y parcial.

Nitratos: ninguna reducción a nitritos.

Producción de H₂S: positiva.

Leche: ninguna peptonización

ninguna coagulación

Almidón : hidrólisis lenta y escasa.

Se utilizan: maltosa, xilosa, manosa, manitol, glicerina, glucosa, sacarosa, trealosa, rafinosa, fructosa.

No se utilizan: lactosa, adonitol, ramnosa, sorbitol, arabinosa y esculina.



293559

Antibióticos: produce sumergido en líquido de cultivo
 sustancias antibióticas.

Tabla I - Características de cultivo del "Streptomyces
1762"

Medio	Crecimiento	Micelio aéreo	Micelio vegetativo	Pigmentos solubles
Agar extracto de levadura de malta (de acuerdo con Hesseltine y colaboradores) (2)	Pequeñas colonias que confluyen con pliegues arrugados, duros, realzados, abundantes	Muy escaso, liso, coloreado rosa pálido. Ausencia de espirales y verticilos	Abundante, amarillento; luego amarillo rojizo	Intenso; primero amarillo-rojo y luego rojo-pardo
Agar Bennet	Pequeñas colonias, amarillentas, aisladas y escasas	Ausente	Escaso; primero blanco y luego amarillento	Ausente
Agar Emerson	Moderado en pequeñas colonias confluentes	Ausente	Moderado; primero rojo pálido y luego pardorrojizo	Rojizo a pardo pálido
Agar patata (de acuerdo con Hesseltine y colaboradores) (2)	Abundante, en patina alisada uniforme	Abundante, rosa. Hifa terminada en gancho y luego terminada en lazos	Abundante, color carne. Patina lisa, dura	Intenso; primero amarillo rojizo y luego anaranjado fuerte
Agar peptona + KNO ₃	Abundante, en pequeñas colonias confluentes	Ausente	Abundante, incoloro	Ausente
Agar Czapeck	Abundante, en pequeñas colonias confluentes	Escaso, blanco sucio, algodonoso. Hifa terminada en gancho y lazos	Abundante, colorado rosa pálido	Ausente

(2) Hesseltine y colaboradores, 1954 Ann. N.Y. Acad. Sci. 60, páginas 136-151



293539

Tabla I continuación

Media	Crecimiento	Micelio aéreo	Micelio vegetativo	Pigmentos solubles
Asparagina-glucosa	Escaso, y en pequeñas colonias aisladas	Escaso, rosa blanquecino. Micelio muy debilitado, corto, sin ganchos apicales	Incoloro	Ausente
Agar glicerin-glicina	Abundante, en patina alisada dura	Ausente	Abundante, del amarillo al anaranjado claro	Ausente
Agar-amido	Escaso, en pequeñas colonias aisladas	Ausente	Escaso, incoloro y luego amarillo rosado	Ausente
Gelatina	Moderado, en superficie	Ausente	Moderado, del incoloro al amarillo	Abundante, pero fuertemente oscuro
Leche	Escaso	Ausente	Forma de anillo en la superficie, coloreado rosasalmón	Escaso, rosa



283539

Tabla II - Comparación de Streptomyces F.I. 1762 y especies productivas de sustancias similares al antibiótico F.I. 1762.

	Streptomyces F.I. 1762 (S. peucetius)	S. purpurascens	S. bobilliae	S. cinereoruber
9. Esporóforos.	Directo o similar a gancho	Espiralmente	Espiralmente	Directos o similar a ganchos
Esporas	redondeado verrugoso 1,8-3,3 micras	oval espinoso 0,8-1 micra para 0,4-0,5 micras	/	oval, lisc 0,7-1 micra para 0,9-2 micras
10. Micelio vegetativo	amarillo-rojo	rojo	rojo ocreo	amarillo-rojo pardo
Micelio aéreo	blanco-rosa	blanco-rosa	blanco	gris-ceniza
15. Reducción de nitratos	-	/	+	/
Leche (peptonización, coagulación)	-	-	+	+
L-xilosa	+	+	+	+
L-arabinosa	-	+	+	+
L-ranosa	-	+	+	-
Fructosa	+	+	+	-
Sacarosa	+	+	+	-
Lactosa	-	+	+	+
Rafinosa	+	+	+	-
D-mannita	+	+	-	-
D-sorbita	-	-	-	-
20. Antibióticos producidos	Daunomicina o antibiótico F.I. 1762	Rodomicina	Cinerubina	Rodomicina

+ = reacción positiva
 - = reacción negativa
 / = falta el dato



293539

	<i>S. cinereo-ruber</i> , var. <i>fructo-fermentans</i>	<i>S. caespitosus</i>	<i>S. niveoruber</i>	<i>S. galilaeus</i>
Esporófitos	Directo o similar a gancho	Verticilmente	Espiralmente	Espiralmente
Esporas	oval liso 0,7-1 micra para 0,9-2 micras	oval liso 0,5-1,3 micras para 0,3-0,5 micras	liso	liso
Micelio vegetativo	amarillo-rojo pardo	del color crema al pardo al amarillo rojizo	rojo carmín	rojo carmín
Micelio aéreo	gris-ceniza	blanco amarillento gris	blancuzco	del blanco a gris ceniza
Reducción de nitratos	/	+	/	/
Leche (peptonización, coagulación)	+	+	-	+
L-xilosa	+	-	///	///
L-arabinosa	+	-	///	///
L-ramnosa	+	-	///	///
Fructosa	+	+	///	///
Sacarosa	+	+	///	///
Lactosa	+	/	///	///
Rafinosa	-	-	///	///
D-mannita	+	-	///	///
D-sorbita	+	+	///	///
Antibióticos producidos	cinerubina	Mitomicina	Cinerubina	Cinerubina

+ = reacción positiva
 - = reacción negativa
 / = falta el dato



293539

	S. antibioticus	Streptomyces A 1165 (Ashasnow y colaboradores: Antib. y Chemoth. 4, 380, 1954)	Streptomyces A 220 (Ashasnow y colaboradores: Antib. y Chemoth. 4, 380, 1954)	Streptomyces BOA 1205 (Brockmann: Chem. Ber. 92, 1880, 1959)
Esporóferos	Directo	no descrito	no descrito	espiralmente
Esporas	esférico liso	no descrito	no descrito	no descrito
Micelio vegetativo	amarillo cremoso	no descrito	no descrito	rojo-ladrillo rojo vinoso
Micelio aéreo	del blanco al gris ratón	no descrito	no descrito	rojo gris
Reducción de nitratos	/	/	/	/
Leche (peptonización, coagulación)	+	/	/	+
L-xilosa	/	/	/	/
L-arabinosa	/	/	/	/
L-ramnosa	/	/	/	/
Fructosa	/	/	/	/
Sacarosa	/	/	/	/
Lactosa	/	/	/	/
Rafinosa	/	/	/	/
D-mannita	/	/	/	/
D-sorbita	/	/	/	/
Antibióticos producidos	Cinerubina	Aklavina	Rutilantina	Pirromicina

+ = reacción positiva

- = reacción negativa

/ = falta el dato



293539

Identificación de la tensión

La descripción del microorganismo bajo examen permite referirlo al género Streptomyces Waksman y Henrici (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7ª Edición, 1957, páginas 744-745).

Por el examen de las especies puede concluirse: en el sistema de clasificación de Pridham y colaboradores (Appl. Microbiol. 6, 1958, pág. 52) el microorganismo pertenece a la sección Retinaculum apertum, serie RED.

En el sistema de clasificación del Baldacci (Giorn. di Microbiol. 6, 1958, pág. 10) el microorganismo pertenece a la serie Albosporeus; finalmente, en el sistema de Waksman (The Actinomycetes, vol. II, 1961, pág. 129) el microorganismo pertenece a la serie Ruber.

Una comparación entre las características del microorganismo y las de las especies que pertenecen a los grupos sistemáticos citados (Taxa), ha demostrado que ninguno de ellos tiene caracteres correspondientes a los del microorganismo en examen.

En la Tabla II se reportan estos datos de comparación que conciernen a la especie que produce sustancias similares a las por nosotros estudiadas.



233569

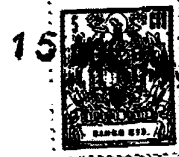
En dicha Tabla se adicionan los S. Cinereoruber,
S. cinereoruber var. fructo-fermentans, S. caespitosus
y S. antibioticus, aunque ellos no forman parte de
la Taxa arriba citada.

5. Además, se relaciona una lista de las
diferencias con las especies que no producen substan-
cias del tipo estudiado.

Nuestro microorganismo difiere del
S. albosporeus (Waksman: The Actinomycetes, vol. II,
1961, pág. 171), porque no produce pigmentos solubles,
no reduce los nitratos y no produce H₂S; del S. cinnamo-
10. mensis (Waksman, The Actinomycetes, vol. II, 1961,
pág. 195-196) y del S. fradias (Waksman: The Actinomy-
cetes, vol. II, 1961, pág. 211-212) por el color del
15. micelio vegetativo y aéreo; de la especie S. ruber
(Waksman: The Actinomycetes, vol. II, 1961, pág. 271)
porque este coagula la leche, no produce pigmentos
solubles y no produce H₂S.

Dicho microorganismo difiere del S. rubescens
20. (Waksman: The Actinomycetes, vol. II, 1961, pág. 271)
por el color del micelio aéreo y porque el S. rubescens
no produce pigmentos solubles ni sulfuros de hidrógeno;
del S. cidiosporus (Waksman: The Actinomycetes, vol. II,
1961, pág. 251) porque no reduce nitratos y no peptoniza
25. la leche.

293569



Además, el S. oidiosporus no produce pigmentos solubles.

Se concluye que el microorganismo examinado debe considerarse una especie diferente de aquellas hasta ahora conocidas y, por consiguiente, ha sido designado por la solicitante con término binomio Streptomyces peucetius n. sp.

El microorganismo Streptomyces 1762 puede conservarse por liofilización, siendo el medio de suspensión la leche o suero de leche, por recolección y mantenimiento de las esporas en un substrato estéril.

Además, también puede ser conservado por cultivos sucesivos sobre un medio sólido que contiene glucosa, u otro azúcar apropiado y sustancias complejas que contienen nitrógeno (extracto de levadura, peptona, caseína hidrolizada). El medio de cultivo también puede contener algunas sales, entre ellas el sulfato de magnesio y el fosfato potásico. La producción del antibiótico puede efectuarse de acuerdo con los métodos usuales bien conocidos y consiste en cultivar el Streptomyces 1762 o su mutante en un medio líquido nutritivo, previamente esterilizado y a temperatura entre 25^o y 37^oC, de preferencia a 28^oC, en condiciones aeróbicas durante un período de tiempo comprendido entre 3 a 7 días, de preferencia 5 días, a un pH que



293569

inicialmente es de 6,5-7,0 y al final de la fermentación es de 7,5-8,0. El medio de cultivo consta de una fuente de carbón y una fuente de nitrógeno así como de sales. La fuente de carbón puede constituirse mediante almidón, dextrina, glucosa, glicerina, mannita, maltosa, licor de maíz macerado, destilados solubles, aceite de soja, harina de soja. La fuente de nitrógeno, además de las substancias complejas antes citadas que contienen nitrógeno, puede estar constituida de levadura seca, peptona de carne, cascina.

Se obtienen buenos resultados al utilizar sales de amonio, tales como el nitrato amónico, sulfato amónico, fosfato biamónico.

Las sales minerales útiles para la producción del antibiótico pueden variar de acuerdo con el medio empleado. En un medio que contiene substancias complejas, tales como diferentes harinas y residuos de fermentación, las adiciones de carbonato cálcico y fosfato sódico o potásico resultan útiles. En un medio que contiene glucosa, levadura o sales amónicas, son necesarias algunas adiciones de sales minerales, tales como sales de potasio, magnesio, hierro, zinc, manganeso, cobre.

La fermentación puede realizarse en matraces de Erlenmeyer o en fermentadores de laboratorio o



293539

industriales de diferentes capacidades.

La cantidad de antibiótico F.I. 1762 en el caldo puede evaluarse por lectura espectrofotométrica de los extractos hidroalcohólicos del mencionado caldo a un pH de 10, a 540-580 milimicras y en comparación con una muestra que tenga un contenido conocido de F.I. 1762.

Con objeto de aislar al antibiótico F.I. 1762 se separa el micelio del líquido de cultivo por medio de un coadyuvante filtrante que contiene un material térreo silíceo absorbente y la filtración y torta y el filtrado se tratan separadamente.

La mayor parte del antibiótico se encuentra en la torta de filtración que consta del micelio, mezclado al material térreo silíceo absorbente. Dicha masa es apulpada y agitada en un disolvente orgánico, tal como metanol, etanol, butanol; en cetonas, tales como la acetona, la metiletilcetona; hidrocarburos halogenados, tales como el cloroformo, el cloruro de metilo o soluciones acuosas de ácidos orgánicos e inorgánicos, tales como el ácido acético, el ácido clorhídrico, el ácido sulfúrico. Ventajosamente se pueden utilizar mezclas de disolventes orgánicos, tales como alcoholes y cetonas hidrosolubles y soluciones acuosas de ácido inorgánico.

Cuando se emplean mezclas de disolventes orgánicos y soluciones ácidas acuosas, los extractos se



293539

neutralizan y el disolvente orgánico se elimina en vacío hasta que se obtiene una suspensión acuosa. El precipitado formado durante la concentración se separa por filtración, y el filtrado se hace alcalino a un pH entre

9.

8 y 9 y se extrae con un disolvente inmiscible con agua, tal como el alcohol butílico, el alcohol amílico; hidrocarburos halogenados, tales como el cloroformo, el cloruro de metilo; cetonas, tales como la metilpropilcetona, la metilbutilcetona; hidrocarburos, tales como el benceno, el tolueno y análogos.

10.

Cuando se emplean disolventes orgánicos inmiscibles en agua y de bajo punto de ebullición en la extracción, se mezclan con agua y se concentran en vacío para separar el disolvente orgánico.

15.

Luego se extrae la fase acuosa como se describe en el caso precedente. De la solución orgánica inmiscible en agua, se obtiene la sustancia activa bruta por concentración a un pequeño volumen y precipitación con disolventes no polares, como éteres,

20.

tales como el éter etílico, el éter dipropílico, los hidrocarburos saturados, hexano, ciclohexano, heptano o éter de petróleo. La solución resultante contiene otras sustancias pigmentadas que pueden extraerse con soluciones alcalinoacuosas que contienen álcalis in-

25.

orgánicos u orgánicos y las mencionadas sustancias pigmen-



tadas pueden obtenerse en estado sólido, por acidificación de la solución acuosa.

Es ventajoso efectuar una primera purificación del antibiótico, por extracción de la solución orgánica con ácidos orgánicos o inorgánicos diluidos acuosos, tales como el ácido acético, el ácido clorhídrico, el ácido sulfúrico, a un pH entre 2 y 5, o con una solución tampón a un valor de pH comprendido dentro de este orden. Con objeto de facilitar la transferencia del antibiótico dentro de la fase acuosa es ventajoso adicionar a la fase orgánica un pequeño volumen de un disolvente de baja polaridad, tal como el éter dietílico, el éter diisopropílico; hidrocarburos saturados, tales como el hexano, el ciclohexano, el heptano o el éter de petróleo.

En la fase orgánica permanecen otros productos pigmentados diferentes, cuya naturaleza no ha sido aún estudiada.

El pH de la fase acuosa resultante es mantenido entre 8 y 9 y se reextrae con disolventes orgánicos, tales como el alcohol butílico, el alcohol amílico; hidrocarburos halogenados, tales como el cloroformo, el cloruro de metilo; hidrocarburos, tales como el benceno y el tolueno; fenoles, tales como el fenol, el cresol.

293569



5. El extracto así obtenido se concentra entonces en vacío a un pequeño volumen y la precipitación del antibiótico bruto en forma de sal se obtiene mediante adición de un ácido orgánico o inorgánico y un disolvente de baja polaridad, tal como el éter etílico, el éter diisopropílico; hidrocarburos saturados, tales como el ciclohexano, el hexano, el heptano o el éter de petróleo.

10. Una buena purificación de los materiales brutos así obtenidos puede realizarse por distribución a contracorriente de una solución acuosa, tal como el ácido acuoso o una solución tampón y un disolvente inmiscible en agua. Asimismo, la cromatografía es útil como medio de purificación. Un método de separación del antibiótico puede consistir en tratar la solución acuosa de una de sus sales con ácido pícrico.

15. El picrato del antibiótico precipita en escamas rojo-amarillas, las cuales se recogen y se secan.

20. El picrato es soluble en alcoholes inferiores hidrocarburos halogenados: por ejemplo, el cloroformo; cetonas, por ejemplo la acetona, la metil-etilcetona.

25. Por tratamiento de las soluciones orgánicas del picrato con un ácido inorgánico, se separa

293539



la sal del antibiótico.

El antibiótico F.I. 1762 cristaliza como clorhidrato en pequeñas agujas de color rojo. El clorhidrato es soluble en agua, en metanol y en alcoholes acuoso; es insoluble en cloroformo, en acetona, en benceno y en disolventes no polares. Perfectamente seco funde a 186-187°C.

El análisis elemental da los valores siguientes:

C = 55,01%; H = 6,31%; N = 2,46%; Cl = 6,20%.

Su espectro de adsorción en los rayos ultravioleta y en el visible presenta bandas en las siguientes longitudes de onda:

en metanol absoluto: a

234 mμ	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$	= 632
251 " "	" "	= 454
290 " "	" "	= 149
480 " "	" "	= 203
495 " "	" "	= 208
532 " "	" "	= 116



293539

en H_2SO_4 concentrado: a 257, 303, 545 y 585 milimicras.

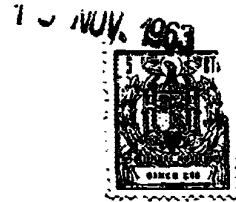
En el espectro de infrarrojos (ver Figura 1 en la tabla de dibujos anexa) son visibles bandas en las siguientes longitudes de onda:

5.	2,96 μ	7,05 μ	8,96 μ	12,20 μ
	3,42 "	7,23 "	9,27 "	12,68 "
	5,82 "	7,37 "	9,35 "	13,12 "
	6,17 "	7,78 "	10,10 "	13,77 "
	6,31 "	8,11 "	10,92 "	14,20 "
10.	6,51 "	8,24 "	11,50 "	14,60 "
	6,90 "	8,65 "	11,85 "	

Las soluciones acuosas son de color amarillo-rojo y se vuelven de color violeta por alcalinozación.

19. Con acetato magnésico muestran una coloración rojo carmesí. Por hidrólisis con ácidos minerales diluidos, el antibiótico F.I. 1762 descompone en dos azúcares reductores y en una aglicona neutra. Las agliconas forman cristales rojo brillante, que funde a 211-213°C y solamente contienen carbono, hidrógeno y oxígeno. El análisis elemental da los valores siguientes:

20. C = 61,75%; H = 4,94%; O = 33,31%.



203539

El espectro de absorción en los rayos ultravioleta y en el visible da, en los diferentes disolventes empleados; adsorción máxima en las longitudes de onda siguientes:

5. en metanol absoluto a 234 mμ $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 782$; a 480 mμ $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 258$
251 " " = 568; 496 " " = 267
288 " " = 186; 532 " " = 149

en H₂SO₄ concentrado a 257, 303, 545, 585 milimicras (punto de flexión a 390 milimicras).

10. en piperidina anhidra a 540, 570 y 610 milimicras.

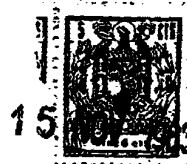
En el espectro de infrarrojos (ver Figura 2) se observan bandas en las siguientes longitudes de onda (en micras): 290, 3,42, 5,85, 6,18, 6,33, 6,90, 7,03, 7,24, 7,35, 7,75, 8,06, 8,25, 8,94, 9,37, 9,67, 10,10, 10,59, 10,91, 11,68, 11,99, 12,35, 12,63, 13,18, 14,40.

15. En estas figuras la línea superior de abcisas representa longitudes de onda en micras, la línea inferior de abcisas frecuencia (CM-1), y la línea de ordenadas, la transmisión (%).

20. La aglicona del antibiótico es soluble en metanol, etanol, cloroformo; menos soluble en butanol, acetona; escasamente soluble en benceno, ésteres alifáticos, éter etílico; insoluble en agua, éter de petróleo.

25. La aglicona está asimismo presente en el antibiótico bruto obtenido con los métodos descritos. Se puede mostrar por papel cromatográfico con desarrollo de n-butanol saturado de agua con tampón fosfatado a pH 5,2. El antibiótico 1762 tiene un Rf = 0,21, su aglicona un Rf = 0,85. El antibiotico F.I. 1762

30. pertenece al grupo de antibióticos, de los que forma



293569

parte la rodomicina A, B y gamma (H. Brockmann y colaboradores, Chem. Ber. 88, 1955, pág. 1762, Naturwissenschaften 48, 1951, pág. 716), la cinerubina (Chem. Ber. 92, 1959, pág. 1868), la pirromicina (Chem. Abstracts 54, 1960, pág. 1470) y la rutilantina (Tetrahedron Letters 16, 1959, pág. 17). No obstante, el antibiótico F.I. 1762 difiere de los productos antes mencionados en las propiedades fisicoquímicas, especialmente en espectros infrarrojos y ultravioletas y en el comportamiento cromatográfico. Las sales del antibiótico F.I. 1762 derivan de ácidos orgánicos e inorgánicos no tóxicos, tales como el ácido clorhídrico, el ácido sulfúrico, el ácido acético, el ácido propiónico, el ácido valeriánico, el ácido palmítico, el ácido oléico, el ácido cítrico, el ácido succínico, el ácido mandélico, el ácido glutámico, el ácido panto-ténico. Pueden formarse sales neutras por reacción del ácido correspondiente sobre la base libre, que puede obtenerse al ajustar a un pH de 8,6, una solución acuosa del clorhidrato y por extracción con disolventes orgánicos inmiscibles en agua, tales como el butano o el cloroformo. Por evaporación del disolvente orgánico, se obtienen el antibiótico como base libre, que funde a 208-209°C. La obtención de las sales puede efectuarse asimismo por una doble descomposición de sales: por



293539

ejemplo, del F.I. 1762 fosfato con pantotenato cálcico, se obtiene el pantotenato de F.I. 1762. El antibiótico F.I. 1762 además de tener una actividad bacteriostática notable contra diferentes microorganismos, se ha revelado particularmente útil como antitumoral.

Este antibiótico muestra un marcado efecto inhibidor sobre el desarrollo de tumores en forma ascítica, en los que se realiza un contacto inmediato del antibiótico y las células neoplásticas. Se observa asimismo un buen efecto inhibidor en tumores sólidos donde la actividad es diferente de acuerdo con la vía de administración y las dosis: los mejores resultados se obtienen por administración intravenosa de dosis entre 2 y 3 mg/kg/día.

En la tabla siguiente se muestra la toxicidad aguda de la daunomicina como LD₅₀:

Valores de toxicidad aguda - LD₅₀ (mg/kg)

Especie animal	Via	LD ₅₀ mg/KG
Ratón	i.v.	20
Ratón	i.p.	5
Rata	i.v.	13-15
Rata	i.p.	8



293569

El antibiótico F.I. 1762 y sus derivados, los productos de su degradación hidrolítica y sus mezclas pueden utilizarse como medicamentos. Estos contienen los compuestos específicos en mezcla con portadores farmacéuticos adecuados para administración oral, parentérica o local. Dichos excipientes pueden ser la gelatina, la lactosa, el almidón, el talco y otras substancias usuales empleadas para este propósito. Las preparaciones farmacéuticas pueden establecerse en forma de tabletas, grageas, polvos, ungüentos, cremas, supositorios y en forma líquida, tal como soluciones, suspensiones o emulsiones en ampollas para la administración parentérica.

Los ejemplos que siguen sirven para ilustrar la invención, pero sin limitarla.



293539

EJEMPLO 1.

Dos matraces de Erlenmeyer de 300 cc, se preparan cada uno de ellos conteniendo 60 cc del siguiente medio vegetativo:

Peptona 0,6%
Levadura seca 0,3%
Nitrate de calcio hidratado 0,05%

en agua de fuente.

El pH, después de la esterilización, es de 7,2.

La esterilización se realiza por calentamiento en autoclave a 120°C, durante 20 minutos.

Cada matraz ha sido inoculado con micelio de Streptomyces 1762, cuya cantidad corresponde a 1/5 de una suspensión en agua estéril del micelio de un cultivo de 10 días de desarrollo en tubo de ensayo que contiene el medio siguiente:

Sacarosa 2%
Levadura seca 0,1%
Fosfato potásico hidrogenado 0,2%
Nitrate sódico 0,2%
Sulfato magnésico 0,2%
Agar 2%

en agua de fuente.



293569

Los matraces se incuban a 28°C, durante 48 horas, sobre un agitador rotatorio a 220 r.p.m. con una excentricidad de 60 mm.

2 cc de un medio vegetativo así desarrollado, se utilizan para inocular matraces de Erlenmeyer de 300 cc con 60 cc del medio productivo siguiente:

5.

Glucosa	4%
Levadura seca	1,5%
Cloruro sódico	0,2%
10. Fosfato potásico hidrogenado	0,1%
Carbonato cálcico	0,1%
Sulfato magnésico	0,01%
Sulfato de hierro	0,001%
Sulfato de zinc	0,001%
15. Sulfato de cobre	0,001%
en agua de fuente	
pH	7,0.

20.

Se esteriliza a 120°C durante 20 minutos; la glucosa se esteriliza separadamente a 110°C durante 20 minutos. Se incuba a 28°C bajo las mismas condiciones descritas para el medio vegetativo. Después de 120 horas de fermentación, se alcanza la actividad máxima que corresponden a una concentración de 60 microgramos/cc.



293539

EJEMPLO 2.

La operación se realiza como en el Ejemplo 1, con la diferencia que el cultivo a inocular se desarrolla sobre el medio sólido siguiente: 200 g de patatas mondadas se hierven durante 20 minutos en 500 cc de agua; el volumen se lleva a su valor original y se filtra a través de tela metálica. Se adiciona el 2% de glucosa, 0,1% de extracto de levadura Difco y 2% de agar. Se lleva a 1000 cc y se esteriliza a 120°C durante 20 minutos; pH 6,8-7. Se alcanza el máximo de actividad, 70 microgramos/cc, después de 140 horas.

EJEMPLO 3.

La operación se realiza como en el Ejemplo 2, con la diferencia que el medio vegetativo y productivo tiene las composiciones siguientes:

<u>Medio vegetativo:</u>	Dextrina	3%
	Carbonato cálcico	0,4%
	Licor de maiz macerado	0,3%
	Sulfato amónico	0,1%
	Caseina	0,5%
	Fosfato potásico hidrogenado	0,01%
	en agua de fuente	

Después de la esterilización a 120°C durante 20 minutos en autoclave, el pH fue de 7.



293569

5.

<u>Medio productivo:</u>	Dextrina	3%
	Carbonato cálcico	0,6%
	Licor de maiz macerado	0,6%
	Caseina	0,5%
	Sulfato amónico	0,1%
	Fosfato potásico hidrogenado	0,01%
	El pH después de la esterilización fue de 7.	

10.

La esterilización se realiza como se describe para el medio vegetativo. La misma actividad, 65 microgramos/cc, se alcanza después de 130 horas.

EJEMPLO 4.

15.

Con un cultivo de Streptomyces 1762 sobre medio sólido, tal como se ha descrito en el Ejemplo 2, se inoculan 500 cc del medio líquido vegetativo descrito en el Ejemplo 1, contenido en un matraz de vidrio de 2000 cc.

20.

Se incuba a 28°C durante 48 horas, sobre un agitador rotatorio a 120 r.p.m. con una excentricidad de 70 mm; 100 cc del caldo de cultivo así obtenido sirven para inocular 3000 cc del mismo medio líquido



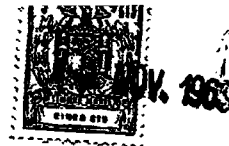
293569

5. contenido en un fermentador de 5 litros de vidrio neutro, provisto de agitador de hélice, un tubo de admisión para la inmisión del aire que termina bajo el agitador de hélice mencionado, un dispositivo rompedor del flujo, un tubo para inoculación, un tubo de salida de aire, equipo para control de temperatura y un dispositivo para adiciones intermitentes o continuas bajo condiciones estériles. El desarrollo se realiza por sacudimiento, con una relación de 400 r.p.m. a 28°C, con una relación de aireación de 3 litros por minuto.

10. Después de 24 horas, se utilizan 300 cc del caldo de cultivo así incubado para inocular 6 litros del medio productivo descrito en el Ejemplo 1, contenido en un fermentador de 10 litros de vidrio neutro similar al antes descrito. Durante la fermentación, que se realiza a una relación de agitación de 350 r.p.m. y con una relación de aireación de 5 litros por minuto, se controla el espumado por adición de pequeñas cantidades de agente de silicona antiespumante. La máxima producción obtenida en 150 horas de fermentación, corresponde a una concentración de F.I. 1762 a 60 microgramos/cc.

15.

20.



293569

EJEMPLO 5.

El procedimiento difiere del descrito en el Ejemplo 4 solamente en que el medio productivo se inoculó con 600 cc del medio de cultivo vegetativo en 300 cc del mismo.

La máxima producción del F.I. 1762 se ha obtenido a las 140 horas con 70 microgramos/cc.

EJEMPLO 6.

El líquido de cultivo resultante de la fermentación de 50 litros y obtenido de acuerdo con el Ejemplo 4, se mezcla con un material térreo absorbente silíceo y se filtra del micelio obteniendo de ello una torta y un filtrado, que se extraen separadamente.

La torta así obtenida se suspende en acetona diluida con ácido sulfúrico 0,4-n acuoso y se agita durante 2 horas. La suspensión líquida se filtra y se repite dos veces más la agitación de la torta. Los extractos así obtenidos se neutralizan y la acetona se evapora

en vacío. La suspensión resultante se filtra luego, el sólido obtenido se agita repetidamente con agua acidificada (pH 3) y se re filtra. El filtrado se ajusta a un pH de 8,6 y se extrae completamente con

n-butanol. Los extractos butánolicos se combinan y concentran a un pequeño volumen en vacío. A esta solución se adicionan 2 volúmenes de éter etílico y se



293569

reextrae el producto de la fase orgánica con ácido clorhídrico 0,1-n. La mencionada operación se realiza varias veces hasta que la fase acuosa aparece coloreada de rojo-amarillo. Los extractos acuosos combinados se regulan a un pH de 8,6 y se extraen con cloroformo por tres veces. Los extractos clorofórmicos se combinan, se secan sobre sulfato sódico anhidro, se filtran, después de lo cual se adicionan algunas gotas de ácido clorhídrico en metanol anhidro para clarificar la solución, la cual finalmente es concentrada a un pequeño volumen. Durante la concentración se separan cristales rojos en forma de agujas y se recogen de la solución por filtración. El producto así obtenido (0,3 g) resulta ser en el análisis, el clorhidrato del antibiótico.

El agua madre se concentra y la adición de algo de éter etílico ocasiona la precipitación de otros 0,13 g del producto bruto conteniendo F.I. 1762.

El filtrado anterior se ajusta a pH 8,6 y se extrae con n-butanol. La operación se realiza por dos veces. Las fases orgánicas combinadas, concentradas a un pequeño volumen y adicionadas con dos volúmenes de éter etílico, se reextraen con ácido clorhídrico 0,1-n. Las fases acuosas combinadas se



293569

regulan a un pH de 8,6 y se extraen tres veces con cloroformo. La solución cloroformica se seca sobre sulfato sódico anhidro y se trata con algunas gotas de ácido clorhídrico en metanol anhidro y se concentra a un pequeño volumen. De la solución concentrada por adición de algo de éter etílico, se separa 0,35 g de F.I. 1762 como clorhidrato bruto, que contiene asimismo la aglicona. Operando tal como se indica anteriormente, pero utilizando ácido sulfúrico en metanol en lugar de ácido clorhídrico, puede obtenerse el antibiótico F.I. 1762 como sulfato.

EJEMPLO 7.

Un caldo de cultivo de 45 litros, obtenido de acuerdo con el Ejemplo 4, se filtra del micelio con ayuda de los materiales térreos usuales absorbentes silíceos. La torta se suspende en n-butanol y se extrae con este disolvente por tres veces. Finalmente se desecha la torta y los extractos se concentran a un pequeño volumen en vacío. A la fase orgánica se adicionan tres volúmenes de éter y se extrae varias veces con agua, que contiene el 5% de ácido acético. Los extractos acuosos se ajustan a un pH de 8,6 y se reextraen con cloroformo. El extracto de cloroformo se seca sobre sulfato sódico anhidro y se concentra a



15

293569

un pequeño volumen en vacío. Se adicionan unas pocas gotas de ácido clorhídrico en metanol anhidro y se precipita el producto con éter.

Se obtiene un sólido constituido por el clorhidrato bruto del antibiótico F.I. 1762. Empleando ácido sulfúrico en lugar de ácido clorhídrico puede obtenerse el correspondiente sulfato. Las soluciones de éter-cloroforno contiene aún varios pigmentos, que pueden extraerse con solución de hidróxido sódico 1-n, pero cuya naturaleza no ha sido aun estudiada.

EJEMPLO 8.

A un caldo de cultivo de 12 litros, obtenido de acuerdo con el Ejemplo 4, se adicionan materiales silíceos absorbentes usuales y el conjunto se filtra después. La torta de micelio se agita tres veces con tres litros de una solución que consta de acetona y ácido clorhídrico 0,5-n, en la relación de 3 partes de acetona y 2 partes de ácido. El extracto resultante se neutraliza y se elimina la acetona en vacío. El sólido separado se filtra y el filtrado se ajusta a un pH de 8,6 y se extrae completamente con butanol hasta que el extracto de butanol aparece coloreado de rojo. Se concentra a un pequeño volumen en vacío, se adiciona un volumen de éter de petróleo y se extrae con ácido clorhídrico 0,1-n acuoso en pequeñas porciones.

5.

10.

15.

20.

25.



293539

Los extractos acuosos se combinan, se ajustan a un pH de 8,6 y se reextraen con cloroformo hasta que apafece coloreado de rojo. Los extractos clorofórmicos combinados se secan sobre sulfato sódico anhidro y se concentran a un pequeño volumen. Se adicionan algunas gotas de ácido clorhídrico en metanol anhidro y el producto se precipita con éter etílico. Se obtienen 1,2 g de clorhidrato bruto de F.I. 1762. Empleando ácido sulfúrico en lugar de ácido clorhídrico, puede obtenerse el sulfato correspondiente.

EJEMPLO 9.

1 g del material bruto conteniendo F.I. 1762 se somete a la distribución por contracorriente en un aparato Craig de 40 tubos, empleando el sistema constituido por n-butanol: tampón de fosfato a un pH de 5,2. Se utilizan 25 cm³ de cada fase para cada tubo.

Una vez efectuado el número necesario de transferencias, observando espectrofotométricamente a 500 milimicras los contenidos de los diferentes tubos, se delimitan dos intervalos que contienen cantidades elevadas de la sustancia. Un intervalo corresponde a los tubos 7-21, el otro corresponde a los



293559

5. tubos 32-39. Los tubos intermedios muestran asimismo la presencia de componentes que contienen sustancias coloreadas y se almacenan separadamente. Los tubos 7-21 se combinan, la fase orgánica es separada y la fase acuosa se regula a un pH de 8,5 con una solución normal de hidróxido sódico. La fase acuosa se extrae luego por dos veces con n-butanol, se combinan los extractos orgánicos y se concentran bajo presión reducida a pequeño volumen. Tres volúmenes de éter se adicionan y la solución se extrae con pequeñas porciones de ácido clorhídrico diluido hasta que las porciones resultan coloreadas. Luego se regula la fase acuosa a un pH de 8,6 y se extrae con cloroformo. El extracto clorofórmico se seca y se trata con unas pocas gotas de ácido clorhídrico en metanol anhidro hasta que la solución resulta límpida, y luego se concentra a baja temperatura ($< 35^{\circ}\text{C}$) en vacío. Concentrando F.I. 1762 precipita como clorhidrato en forma cristalina. Rendimiento: 0,125 g. Empleando ácido sulfúrico en lugar de ácido clorhídrico se obtiene el sulfato correspondiente. De los tubos 32-39, en los que las sustancias coloreadas se revelaron, cromatográficamente en el papel, que estaban constituidas por la aglicona, se observa, por combinación

10.

15.

20.



de las fases superiores, adición de volúmenes iguales de éter y extracción con una solución de sosa normal, un color que vira del rojo al azul violado y la transferencia de la coloración es lograda en la solución acuosa. La extracción con sosa se realiza dos veces. Acidificando los extractos alcalinos con ácido clorhídrico, precipita un producto rojo que, por cristalización en n-butanol, muestra ser la aglicona del antibiótico F.I. 1762 en base al análisis cromatográfico, espectrofotométrico en los ultravioletas, en el visible y en los infrarrojos y en base al punto de fusión.

EJEMPLO 10.

2 g del material bruto que contienen 10% de los pigmentos constituidos por el antibiótico F.I. 1762 y por sus agliconas, determinadas en base de la intensidad de la adsorción máxima en el visible, se disuelven en 150 cc de agua y se ajustan a un pH neutro. La porción insoluble se filtra y la solución se extrae varias veces con éter. Después de repetidas extracciones, los extractos etéreos se reúnen y concentran a pequeño volumen en vacío. Se obtienen 20 mg



293559

de un sólido rojo, que en el análisis de papel cromato-
gráfico muestra ser la aglicona del antibiótico F.I. 1762
Se adiciona a la fase acuosa 40 cc de una solución acuosa
saturada de ácido pícrico. Se forma
un precipitado rojo-amarillento, que se recoge por
centrifugación. Se seca el sólido sobre cloruro cálcio
y se disuelve en acetona. Se adicionan unas pocas
gotas de ácido clorhídrico anhidro en acetona e inme-
diatamente hay una precipitación de un producto
rojo-anaranjado. El sólido (120 mg) se recoge y se
seca. Recristalizado del n-propanol se obtienen
30 mg de producto cristalino en forma de agujitas,
que resulta ser el clorhidrato del antibiótico F.I. 1762.

E J E M P L O 11.

Tratando el sulfato del antibiótico F.I. 1762
con una solución de pantotenato cálcico, mediante doble
descomposición, se obtiene el pantotenato del antibió-
tico F.I. 1762.



293569

EJEMPLO 12.

9. Se disuelven 500 mg de F.I. clorhidrato en 10 cc de H_2SO_4 1-n y se mantiene a 100°C durante 20 minutos. Se separan escamas de color rojo. Tras enfriamiento, se extrae con n-butanol y el pigmento pasa en la fase orgánica.

10. La fase acuosa se neutraliza con hidróxido bórico, se filtra y se evapora en vacío. Los residuos contienen por lo menos dos azúcares reductores, los cuales en el papel cromatográfico con el disolvente n-butanol/ácido acético/agua (4:1:5) (fase superior) muestran el siguiente R_f % 0,245 y 0,30.

15. Los extractos de butanol coloreado de rojo se lavan con agua y se evaporan a un pequeño volumen en vacío. Por enfriamiento se separan cristales brillantes en forma de agujas coloreadas de rojo, de la aglicona del antibiótico.

Punto de fusión: 211-213°C.

20. En el papel cromatográfico, con el sistema disolvente éter de petróleo, saturado de metanol, la aglicona de F.I. 1762 muestra un R_f igual a 0,41.



293569

EJEMPLO 13.

FARMACOLOGIA

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DEL ANTIBIOTICO F.I. 1762

El estudio de la actividad antitumoral del antibiótico F.I. 1762, obtenido a partir del Streptomyces 1762, ha sido efectuado sobre un especto de tumores de ratón y rata, ambos en forma sólida y ascítica.

1) Tumores ascíticos

Se han realizado pruebas de actividad sobre ratones, portadores de carcinoma ascítica Ehrlich y sobre ratas, que están inyectadas con hepatoma AH 130 y con mieloma Oberling-Guérin-Guérin.

a) Carcinoma ascítico de Ehrlich

Ratones inyectados por vía i.p. con una suspensión de células tumorales, se han tratado con soluciones de diferentes concentraciones del antibiótico durante 5 días consecutivos, a partir del día siguiente de la implantación del tumor.

La Tabla III, en la que se especifica los resultados obtenidos, muestra que el antibiótico bajo examen, administrado en iguales dosis de 1,75 y 1,25 mg/kg/día, tiene un notable efecto inhibitor sobre



223569

el desarrollo del tumor ascítico y un incremento considerable de la sobrevivencia media de los animales tratados.

TABLA III - Carcinoma ascítico de Ehrlich

Lotes	Dosis mg/kg/día	Incremento de peso en los días			Tiempo de supervivencia media
		7º	14º	21º	
Controles	-	+9,6	+21,4	-	16,4
F.I. 1762	1,75	+1,3	+ 2,4	+4,7	36,4
F.I. 1762	1,25	+1,5	+ 3,1	+4,4	32,-
F.I. 1762	0,75	+2,9	+ 5,3	-	18,8

El resultado se ha confirmado mediante un experimento sucesivo en el que el antibiótico se ha administrado en la dosis de 1,75 mg/kg por vía intraperitoneal durante 4 días (Tabla IV)



293559

TABLA IV - Carcinoma ascítico de Ehrlich

Lotes	Dosis mg/kg/día	Incremento de peso en los días		Tiempo de supervivencia media día
		7º	12º	
Controles	-	+6,3	+14,2	12,4
F.I. 1762	1,75	+0,1	+ 2,2	35,1

b) Hepatoma AH 130

Ratas Wistar, inyectadas con hepatoma ascítico, han sido tratadas por vía i.p. durante 5 días consecutivos con dosis de antibiótico de 2 y 1 mg/kg/día. Mientras los animales de control (no tratados) tienen un tiempo de sobrevivencia media de 11,8 días después de la implantación del tumor, todas las ratas tratadas vivían aún después de 50 días del experimento; en ninguna de ellas existían trazas de tumor.

c) Mieloma ascítica

Este experimento se ha realizado sobre ratas Wistar, las cuales han sido inyectadas con una suspensión de células de tumor y luego se han tratado por vía i.p. con una solución del antibiótico de acuerdo con el siguiente esquema: un grupo por tres veces con días alternativos, con una dosis igual a 2 mg/kg/día; otro grupo durante 5 días consecutivos con una dosis de 1 mg/kg/día. En estas condiciones



293569

se ha observado un retraso en la difusión del tumor, que se traduce en el incremento de sobrevivencia media de los animales tratados en comparación con los controles (Tabla V).

TABLA V - Mieloma ascítica

Lotes	Dosis mg/kg/día	Nº tratamiento	Tiempo de supervivencia media
Controles	-	-	10,7
F.I. 1762	2	3	17,7
F.I. 1762	1	5	16,7

2) Tumores sólidos

Las pruebas de la actividad sobre tumores sólidos han sido realizadas con adenocarcinoma de Ehrlich y sarcoma 180 en el ratón y con carcinosarcoma Walker y la mieloma de Oberling-Guérin-Guérin en la rata.

a) Adenocarcinoma de Ehrlich

Ratones inyectados subcutáneamente con un fragmento de tumos durante 6 días, a partir del día siguiente de la transplatación, han sido tratados con una solución de antibiótico. Al octavo día



293559

del experimento todos los animales han sido sacrificados y el tumor se ha separado y pesado. Los resultados así alcanzados se totalizan en la Tabla VI.

TABLA VI - Adenocarcinoma de Ehrlich

Lotes	Dosis mg/kg/día	Variación del peso corporal		Mortalidad	Peso medio del tumor	% de inhibición
		bruto	neto			
Controles	-	+4,85	+2,27	0/10	2,583	-
F.I. 1762	6	+2,59	+1,07	0/10	1,522	41,1
F.I. 1762	3	+3,84	+1,59	0/10	2,253	12,-

Puede observarse que el antibiótico en la dosis de 6 mg/kg/día ha determinado una inhibición en el desarrollo del tumor igual al 41,1%.

b) Sarcoma 180

Ratones inyectados con un fragmento de tejido neoplástico, han sido tratados por día i.p. durante 7 días consecutivos, a partir del día siguiente a la implantación del tumor. El antibiótico ha sido administrado en solución en una dosis de 2 mg/kg/día. Al décimo día del experimento, todos los ratones han sido sacrificados y los tumores y bazos han sido separados.



293539

Los resultados especificados en la Tabla VII muestran que también en este experimento el tratamiento con el antibiótico ha ocasionado una marcada inhibición del desarrollo del tumor y una marcada reducción del bazo.

TABLA VII - Sarcoma 180

Lote y dosis mg/kg/día	Variación del peso corporal		Morta- lidad	Peso medio tumor bazo		% de inhi- bición	
	bruto	neto		g	mg	tumor	bazo
Controles -	+5,05	+2,83	0/10	2,225	251	-	-
F.I. 1762 2	+1,72	+3,01	0/10	1,289	93,5	42,1	62,7

c) Carcinosarcoma de Walker

Las ratas inyectadas con este tumor han sido tratadas por via intravenosa por 8 veces dentro 10 días; al 11º día del experimento han sido sacrificados los animales sobrevivientes y han sido separados los tumores.

Los resultados se totalizan en la tabla siguiente.



293589

TABLA VIII - Carcinosarcoma de Walker

Lotes y Dosis mg/kg/día	Variación del cuerpo corpo- ral		Mortali- dad	Peso medio del tumor	% de inhibi- ción	
	bruto	neto				
Controles	-	+22,9	+ 5,96	1/10	15,940	-
F.I. 1762	1	+10,2	+ 0,76	1/10	9,443	42,1
F.I. 1762	2	+27,9	+22,23	1/10	5,404	66,1

El antibiótico ha mostrado asimismo un marcado efecto inhibitor sobre este tipo de tumor, especialmente con una dosis de 2 mg/kg/día, la cual ha sido tolerada, cuando se inyectó por vía i.v. Un segundo experimento con ratas, portadoras del mismo tumor, ha sido realizado para investigar el efecto del antibiótico sobre la sobrevivencia de los animales en comparación con la actividad antitumoral.

En este caso las ratas han sido tratadas intravenosamente por 8 veces durante 12 días a la dosis de 3 mg/kg/día. Los resultados, especificados en la Tabla siguiente, confirman el efecto inhibitor del antibiótico sobre el desarrollo del tumor y muestran que por tal tratamiento la sobrevivencia media de las ratas se ha incrementado en el 50,8%.



293569

TABLA IX - Carcinosarcoma de Walker

Lotes y dosis mg/kg/día		Inhibición del desarrollo del tumor (% del control)		Tiempo medio de sobrevivencia
		9º día	29º día	
Controles	-			16,9
F.I. 1762	3	71,-	31,6	25,5

La inhibición de desarrollo del tumor es considerable durante el tratamiento, pero aún prosigue en un grado notable durante los 20 días siguientes a la suspensión de las inyecciones.

d) Mieloma de Oberling-Guérin-Guérin

Ratas Long-Evans inyectadas con un fragmento de tejido de tumor, se han tratado intravenosamente durante 10 días, iniciándose a partir del día siguiente a la implantación del tumor. Los animales sobrevivientes han sido sacrificados en el 13º día del experimento y han sido separados y pesados los tumores.



29359

TABLA X - Mieloma O.G.G.

Lotes y dosis mg/kg/dia		Variación del cuerpo corporal bruto neto		Morta- lidad	Peso medio del tumor	% de inhi- bición
Controles	-	+45,2	+28,-	3/12	17,23	-
F.I. 1762	2	+33,3	+20,-	0/12	11,30	34,5
F.I. 1762	4	+ 5,8	+ 0,8	4/12	2,98	82,8

Estos resultados han sido confirmados en una prueba sucesiva en la que los animales han sido tratados por via intravenosa, per 7 veces en 14 días, con una solución de antibiótico en la dosis de 2,5 mg/kg/dia.

TABLA XI - Mieloma O.G.G.

Lotes y dosis mg/kg/dia		Variación del peso corporal bruto neto		Morta- lidad	Peso medio tumor bazo		% de inhibición tumor bazo	
Centroles	-	+53,7	+40,22	5/15	13,486	1,303	-	-
F.I. 1762	2,5	+20,9	+16,79	5/15	4,114	0,598	69,5	54,1

Las Tablas X y XI muestran que el antibiótico es activo asimismo contra este tipo de tumor; las



- 46 -

293539

dosis de 2 mg y 2,5 mg/kg/día por vía intravenosa producen los mejores resultados con respecto a la actividad antitumoral así como también la buena tolerancia del antibiótico.



293569

NOTA

Descrito el objeto de la invención, se declara nuevas las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la demanda de patente italiana nº 22651/62 del 16 de Noviembre de 1962.

5. 1. Un procedimiento para la preparación de una nueva sustancia antibiótica, del grupo del antibiótico F.I. 1762, cuyas propiedades han sido descritas en la descripción, caracterizado por el hecho de que el Streptomyces 1762 y su mutante se cultiva bajo condiciones aeróbicas en un medio líquido nutritivo y de sales minerales a una temperatura entre 25º y 37ºC, de preferencia 28ºC, durante un período de tiempo de 3 a 7 días, de preferencia 5 días, y que el antibiótico formado se extrae del caldo de fermentación a un pH entre 8 y 9 por medio de los disolventes usuales inmiscibles en agua, y que el antibiótico F.I. 1762 se aísla y purifica en forma conocida.
10. 2. Un procedimiento según se define en la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el antibiótico F.I. 1762 se transforma de manera conocida en sus sales con ácidos inorgánicos y orgánicos.
15. 3. Un procedimiento según se define en la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el antibiótico F.I. 1762 se transforma, mediante hidrólisis ácida, en su aglicona.
- 20.
- 25.



29 3569

4. Un procedimiento para la preparación de una nueva sustancia antibiótica.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 48 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a 15 de noviembre de 1.963.

SOCIETA FARMACEUTICI ITALIA.

p. a.

PAQUE BREVETADO
P.P.
[Handwritten signature]

Mod. d. Jaime Isen
P.F.
15 NOV 1963

FIGURE 2

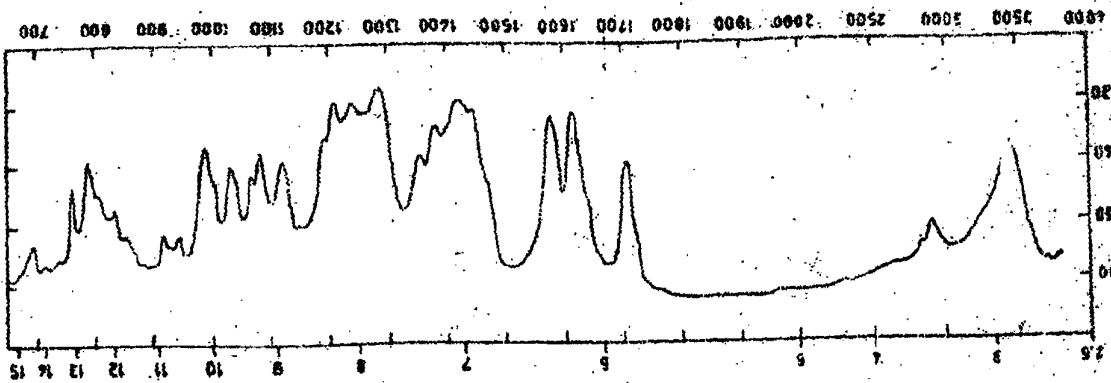
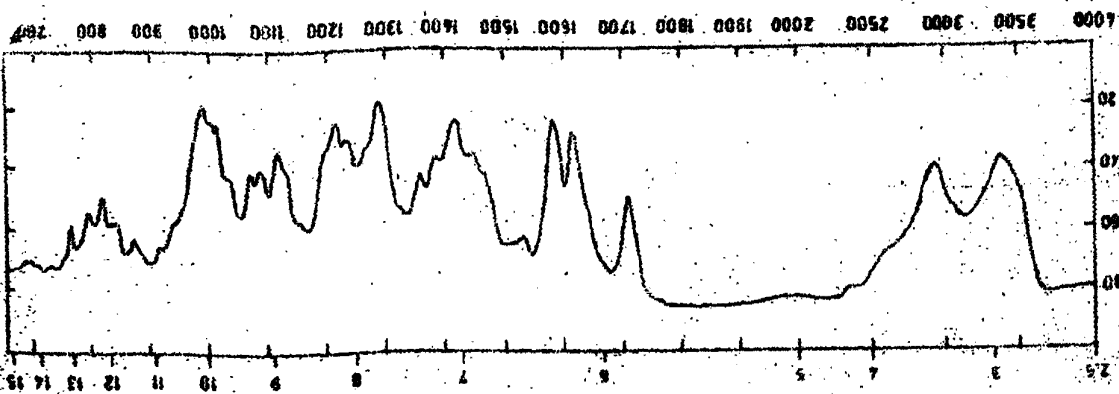


FIGURE 1



293569



Hoja Unica

SOCIETA FARMACEUTICI ITALIA