



Cas "G.251"

352842

P A T E N T E
D E
I N V E N C I O N

por "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA SUBSTANCIA ANTIBIÓTICA", a favor de la firma italiana SOCIETA FARMACEUTICI ITALIA, residente en MILAN (Italia)

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

- Este invento se refiere a un procedimiento para preparar una nueva substancia antibiótica y sus derivados, especialmente útiles en terapéutica como productos antitumorales. Más particularmente, el objeto de este invento es un procedimiento biosintético, con el uso de un nuevo microorganismo, para preparar un nuevo antibiótico del tipo indicador, designado por nosotros como "adriamicina" y que se designará también como antibiótico "B-106 F.I.", sus sales y los productos de su degradación hidrolítica.
- 5.
10. El nuevo microorganismo utilizado en el pro-

**POOR
QUALITY**



- cedimiento de este invento se ha obtenido por tratamiento mutágeno del Streptomyces peucetius, descrito en la patente inglesa Nº 1.003.383 de la peticionaria y en el Giorn. Microbiol., vol. 11, 1963, páginas 109-118. La nueva raza así obtenida se ha clasificado con la sigla F.I. 106 de la colección microbiológica de la Farmitalia y se ha designado como
5. Streptomyces peucetius var. caesius. Se ha depositado en el Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, Kew, Surrey (Gran Bretaña), recibiendo el número de índice I.M.I. 131.502; y en el Institute of Microbiology of the Rutgers University (Estados Unidos), recibiendo el número de índice I.M.R.U. 3920.
- 10.

El nuevo microorganismo presenta las características microscópicas, macroscópicas y bioquímicas siguientes:

Aspecto microscópico:

15. El micelio vegetativo, en los terrenos de cultivo usuales, presenta hifas delgadas (de 0,5 a 0,9 micras de espesor), más o menos largas, ramificadas. Las ramificaciones dan lugar a hifas más gruesas (de 1,1 a 1,6 micras de espesor) y los conidióforos se hallan con frecuencia unidos en formas fasciculadas que terminan en ganchitos. Los conidios son
20. esféricos, de diámetro variable entre 1,8 y 3,3 micras, primeramente dispuestos en cadenas y luego libres.

- Bajo el microscopio electrónico, los conidios aparecen casi esféricos, de contornos irregulares y con superficie
25. verrugosa.



Aspecto macroscópico:

5. En la Tabla 1 se exponen las características de cultivo observadas en los terrenos indicados, en los que el microorganismo se hace crecer a 28°C y se realizan observaciones a los 3, 8, 15, 21 y 30 días de la siembra.

Características bioquímicas:

- Galatina: hidrólisis lenta y parcial.
10. Nitratos: ninguna reducción a nitritos.
- Producción de sulfuro de hidrógeno: positiva.
- Leche: ninguna peptonización; ninguna coagulación.
- Almidón: hidrólisis muy lenta y escasa.
- Utiliza maltosa, xilosa, manosa, manitol, glicerol, glucosa, sacarosa, trehalosa, rafinosa y fructosa.
15. No utiliza lactosa, adonitol, ramnosa, sorbitol, arabinosa, esculina ni mesoinositol.
- Antibióticos: en cultivo líquido sumergido produce sustancias de acción antibiótica y antitumoral.

20. Clasificación del mutante F.I. 106

- El mutante F.I. 106 tiene la posición taxonómica siguiente: en el sistema clasificatorio de PRIDHAM y col. (Appl. Microbiol. 6, pág. 52, 1958) el microorganismo pertenece a la sección Retinaculum apertum, serie RED. En el sistema
25. clasificatorio de BALDACCI (Giorn. Microbiol. 6, pág. 10,



1958) el microorganismo pertenece a la serie Albosporeus; por último, en el sistema de WAKSMAN (The Actinomycetes, vol. II, pág. 129, 1961) el microorganismo pertenece a la serie Ruber.

5. Una comparación entre las características del microorganismo y las de las especies pertenecientes a los grupos sistemáticos citados (Taxa) ha demostrado que ninguna de dichas especies tiene características que correspondan a las del microorganismo en examen.
10. En la Tabla II se exponen estos datos de comparación concernientes a las especies que producen sustancias semejantes a la estudiada por nosotros. En la Tabla se han incluido el S. cinereoruber, el S. cinereoruber var. fructo-
15. -fermentans, el S. caespitosus y el S. antibioticus, aun cuando no forman parte de las Taxa citadas antes. Se expone también una lista de las diferencias con las especies que no producen sustancias del tipo estudiado.
- Nuestro microorganismo difiere de la especie
20. S. albosporeus (WAKSMAN: The Actinomycetes, vol. II, pág. 171, 1961) en que ésta no produce pigmentos solubles, reduce los nitratos y no produce H₂S; del S. cinnamomensis (WAKSMAN: The Actinomycetes, vol. II, pág. 195, 1961) y del S. fradiae (WAKSMAN: The Actinomycetes, vol. II, pág. 211, 1961), en el
25. color del micelio vegetativo y del micelio aéreo; de la especie S. ruber (WAKSMAN: The Actinomycetes, vol. II, pág. 271, 1961),



en que ésta coagula la leche, no produce pigmentos solubles y no produce H₂S. Difiere del S. rubescens (WAKSMAN: The Actinomycetes, vol. II, pág. 271, 1961) por el color del micelio aéreo y en que el S. rubescens no forma ningún pigmento soluble ni produce sulfuro de hidrógeno; del S. oidiosporus (WAKSMAN: The Actinomycetes, vol. II, pág. 251, 1961), en que este último no reduce los nitratos y no peptoniza la leche. Además, el S. oidiosporus no forma pigmentos solubles.

10. Se concluye que el mutante F.I. 106 de S. peucetius es distinto de todas las especies productas de sustancias semejantes y, más generalmente, es diferente de todas las especies pertenecientes a los grupos sistemáticos subgenéricos a que pertenece la propia raza. En particular, la raza F.I. 15. 106 difiere de la raza generatriz, S. peucetius, productora de la daunomicina (patente inglesa Nº 1.003.383), porque forma un micelio vegetativo de color rojo más intenso, un micelio aéreo que a veces asume maticos verdiazules de turquesa y, por último, a causa de que produce el antibiótico adriamicina. 20.



TABLA I - Características de cultivo del mutante F.I. 106 del S. paucetius:

MEDIO	CRECIMIENTO	MICELIO AEREO	MICELIO VEGETATIVO	PIGMENTOS SOLUBLES
Agar-malta-extracto de levadura (según Hesseltine y col., 1954). ^o	Pequeñas colonias confluente en pliegues arrugados, duros, relevados y abundantes	muy escaso, raso, de color rosado pálido; ausencia de espirales y de verticilos	abundante, amarillento y luego amarillo-rojizo	Intenso, primeramente amarillo-rojizo y luego pardo-rojizo
Agar Bennet	escaso, con pequeñas colonias aisladas y amarillentas	ausente	escaso, primeramente amarillento y luego anaranjado	ausente
Agar Emerson	moderado, con pequeñas colonias confluente	ausente	moderado, al principio rosa pálido y luego rojizo	pardo-rojizo neto
Agar-patata (según Hesseltine y col., 1954) ^o	abundante, en patina rasa uniforme	abundante al principio rosa, luego verdiazul turquesa atenuado; hifas terminadas en gancho y luego en ovillo	abundante, de color carne; patina rasa dura	intenso, al principio amarillo-rojizo y luego de anaranjado subido a rojo vivo
Agar-peptona + KNO ₃	abundante, en pequeñas colonias confluente	ausente	abundante, incoloro	ausente



MEDIO	CRECIMIENTO	MICELIO ABREO	MICELIO VEGETATIVO	PIGMENTOS SOLUBLES
Agar Czapeck	abundante, en pequeñas colonias con filamentos	escaso, al principio blanco sucio y luego verdiazul turquesa atenuado, ligeramente algodonoso; hifas terminadas en ganchito o en ovillo	abundante, de color rosa pálido	ausente
Aspargina-glucosa-agar	escaso, en pequeñas colonias aisladas	escaso, blancuzco rosado; micelio muy fragmentado, corto, sin ganchitos apicales	escaso, incoloro	ausente
Agar-glicerinaglicina	abundante, en pátina rasa y dura	ausente	abundante, de amarillo a anaranjado	ausente
Agar-almidón	escaso, con pequeñas colonias aisladas	ausente	escaso, incoloro y luego amarillento rosado	ausente
Gelatina	discreto en la superficie	ausente	discreto, de incoloro a amarillento	abundante, pardo subido-negro
Leche	escaso	ausente	escaso, en anillo en la superficie, de color rosa salmón	escaso, rosado

^o Hasseltine y col.: Ann. N.Y. Acad. N.Y. Acad. Sci., 60 pág. 136-151 (1954)



Tabla II

Comparación entre el mutante F.I. 106 del *S. paucetius* y especies productoras de sustancias semejantes al antibiótico adriamicina.

	Mutante F.I. 106	<i>S. purpu- rescans</i>	<i>S. bobi- liae</i>	<i>S. cianereo rubar</i>	<i>S. cardileo- rubidus</i>
Esporóforos	recto o en gan- chito	espiral- dos	espiral- dos	rectos o en ganchito	verticila- dos, espi- rals
Esporas	casi re- dondas, ve- rrugosas, de 1,8x3,3 micras	ovales, espinosas, de 0,8 a 1 micra por 0,4 a 0,5 micras	-----	ovales, li- sas, de 0,7 -1 micra por 0,9-2 micras	ovales, espinosas, de 0,6-0,9 x 0,6-1,2
Micelio vegetativo	de amari- llo-rojo a rojo inten- so	rojo	rojo- coral	amarillo- rojo pardo	amarillo- rojo pardo
Micelio aereo	blanco ro- sado, a veces verdi azul turque- sa atenuado	blanco rosado	blanco	gris ceniza	azul turquesa
Reducción de: Nitratos	-	/	+	/	/
Leche (pept. coag.)	-	-	+	+	/
L-xilosa	+	+	+	+	+
L-arabinosa	-	+	+	+	+
L-ramnosa	-	+	+	-	+
Fructosa	+	+	+	-	+
Sacarosa	+	+	+	-	+
Lactosa	-	+	+	+	+
Rafinosa	-	+	+	-	+
Demanita	+	+	-	-	+
D-sorbita	-	-	-	-	+
Antibióticos producidos	Adriamici- na	Rodo- micina	Cine- rubina	Rodomi- cina	Rubidomicina

+ = reacción positiva
- = reacción negativa

/ = falta el dato



Tabla II (continuación)

	<u>S.cinereo-</u> <u>ruber.var.</u> <u>fructofer-</u> <u>mentans</u>	<u>S.caespito-</u> <u>sus</u>	<u>S.niveo-</u> <u>ruber</u>	<u>S.gali-</u> <u>laeus</u>	<u>S.nogalater</u> <u>var.nogala-</u> <u>ter</u>
Esporóforos	rectos o en ganchito	verticila <u>dos</u>	espira <u>lados</u>	espira <u>lados</u>	recto o en ganchito
Esporas	ovales, lisas, de 0,7-1 micra por 0,9-2 micras	ovales, lisas, de 0,5-1,5 micras por 0,3-0,5 micras	lisas	lisas	más o menos esféricas, lisas
Micelio vegetativo	amarillo-rojo pardo	de crema a pardo y a amarillo-rojizo	rojo carmin	rojo carmin	anaranjado rojo
Micelio aereo	gris ceniza	blanco amarillento gris	blancuz <u>co</u>	de blanco a gris ceniza	gris
Reducción de:					
Nitratos	/	+	/	/	-
Leche (papt. coag.)	+	+	-	+	+
L-xilosa	+	-	//	//	+
L-arabinosa	+	-	//	//	+
L-ramnosa	+	-	//	//	+
Fructosa	+	+	//	//	+
Sacarosa	+	+	//	//	-
Lactosa	+	/	//	//	+
Rafinosa	-	-	//	//	+
D-manita	+	-	//	//	+
D-sorbita	+	+	//	//	+
Antibióticos producidos	Cineru <u>bina</u>	Mitomi <u>cina</u>	Cineru <u>bina</u>	Cineru <u>bina</u>	Nogalamicina

+ = reacción positiva
- = reacción negativa

/ = falta el dato



El mutante F.I. 106 se conserva mediante liofilización utilizando como medio suspensor leche o suero de leche, o bien mediante recogida y mantenimiento de las esporas en terreno estéril. Además, se conserva también por cultivos sucesivos en un terreno sólido que contenga glucosa, u otro azúcar apropiado, y sustancias nitrogenadas complejas (extracto de levadura, peptona, hidrolizado de caseína). El terreno puede contener además algunas sales, entre las que merecen particular importancia el sulfato de magnesio y el fosfato de potasio.

La producción del antibiótico se efectúa por los métodos normales, bien conocidos, y consiste en hacer desarrollar en un terreno de cultivo líquido, previamente esterilizado y en condiciones aeróbicas, el mutante F.I. 106, a temperatura variable entre los 25 y 37°C (de preferencia, a 28°C), por un período de tiempo variable de 3 a 7 días (de preferencia, 5 días) y con un pH de 6,5-7,0 al principio y de 7,5-8,0 al final del proceso fermentativo. El terreno de cultivo consiste en una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y una fuente de sales. La fuente de carbono puede estar constituida por almidón, dextrina, glucosa, glicerina, manita, maltosa, corn steep liquor, solubles de los destiladores, aceite de soja o harina de soja. La fuente de nitrógeno puede estar constituida, aparte las sustancias complejas que contienen nitrógeno citadas antes, por levadura seca, peptona de carne



utilizando como eluente la mezcla propanol/acetato de etilo/agua (7:1:2).

- La zona de color rojo correspondiente al Rf de la adriamicina se eluye con una mezcla de metanol/agua (9:1) y
5. se determina la cantidad de adriamicina presente en el caldo filtrado por medio de la lectura espectrofotométrica de una muestra del eluato en la longitud de onda de 495 milimicras y comparación con una muestra adriamicina de titulación conocida.
10. La cantidad de adriamicina presente en el micelio se determina a su vez del modo siguiente: se extrae el micelio con una mezcla de acetona/ácido sulfúrico 0,1-n (4:1), se neutraliza el extracto y se le concentra bajo presión reducida hasta una quinta parte del volumen original. Luego se ajusta
15. el concentrado a pH 8,6 con solución 1-n de NaOH y se le extrae en dos veces con una mezcla de cloroformo/metanol (9:1). Se lava el extracto con agua y luego se le concentra en vacío hasta sequedad. Sobre una muestra del residuo se determina el contenido de adriamicina con el mismo método que se ha
20. indicado antes.
- Para el aislamiento de la adriamicina, se puede efectuar la extracción del antibiótico con disolventes apropiados, ya sea del caldo de cultivo en conjunto, sin filtrar la masa micelilar, ya sea separando por filtración micelio y
25. caldo y extrayendo éstos por separado.



- Si la extracción se efectúa por separado, se actúa de preferencia de la manera siguiente: al final de la fermentación, se añade al caldo de cultivo un material silíceo adsorbente, como el Supercel, se filtra la mezcla y se tratan por separado la torta del filtro y el líquido filtrado. La mayor parte del antibiótico se halla en la torta de filtro constituida por el micelio mezclado con los materiales silíceos adsorbentes. Dicha torta se desmenuza y agita en un disolvente orgánico del grupo de los alcoholes, como metanol, etanol o butanol, las cetonas, como la acetona o la metiletilcetona, los hidrocarburos halogenados, como el cloroformo o el cloruro de metileno, o las soluciones acuosas de ácidos orgánicos o inorgánicos, como ácido acético, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico. Pueden usarse con ventaja mezclas de disolventes orgánicos, como alcoholes y cetonas miscibles con el agua y soluciones acuosas de ácidos inorgánicos.
- 5.
- 10.
- 15.

Generalmente se emplea una mezcla de acetona/ácido sulfúrico 0,1-n, en una relación de 7:1 a 3:1, preferentemente 4:1.

20. Del caldo filtrado, previamente alcalinizado a pH de 8,5-9,0, se puede extraer el antibiótico con disolventes orgánicos inmiscibles con el agua, del grupo de los alcoholes, las cetonas y los hidrocarburos alifáticos inferiores halogenados, como el alcohol amílico, el alcohol butílico, la metil-isobutilcetona, el cloruro de metileno, el cloroformo y las mezclas respectivas.
- 25.



Otro método de extraer el caldo filtrado consiste en pasar este caldo por columnas cromatográficas que contengan resina carboxílica cambiadora de cationes (del tipo de la Amberlite IR 50), en forma ácida, de las que se puede eluir

5. el producto con una solución hidrometanólica de cloruro sódico.

Los extractos orgánicos del caldo y del micelio se combinan, se neutralizan, se juntan con agua y luego se concentran bajo presión reducida. El concentrado acuoso se ajusta a pH 3 con ácido clorhídrico l-n y luego se extrae con cloroformo. Se desecha el extracto, que contiene diversas impurezas, mientras se ajusta la fase acuosa a pH 8,5-9,0 y se la extrae con una mezcla de cloroformo/metanol(9:1).

10.

Se lava el extracto con agua, se le seca sobre sulfato sódico anhidro y luego se le concentra hasta pequeño volumen bajo presión reducida. Del concentrado, precipitando con éter etílico, se obtiene un producto bruto que contiene como

15.

componente principal adriamicina en forma de base libre. Para purificar la adriamicina de los diversos pigmentos hidrosolubles y liposolubles, se puede recurrir a la distribución en

20.

contracorriente o bien a la cromatografía en columna. En el primer caso se puede emplear la mezcla cloroformo/metanol/tampón de fosfatos M/15 a pH 5,4 (2:2:1); pero se obtienen mejores resultados empleando la cromatografía en columna de celulosa amortiguada con fosfatos a pH 5,4 y utilizando como eluente

25.

la mezcla propanol/acetato de etilo/agua (7:1:2).

Se reúnen las fracciones que contienen adriamicina

352842

y, después de añadirles agua, se las concentra.

5. El concentrado acuoso se ajusta a pH 8,6 con carbonato sódico 1-n y luego se extrae con cloroformo. Se seca la solución clorofórmica sobre sulfato sódico anhidro y a continuación se la concentra hasta pequeño volumen. Mediante adición de metanol anhidro que contiene ácido clorhídrico, se obtiene clorhidrato de adriamicina en forma de agujas delgadas de color rojo anaranjado, que, después de recristalización en alcohol etílico anhidro, da agujas de color anaranjado rojo, fundentes a 204°-205°C (con descomposición).

Es ópticamente activo: $[\alpha]_D^{23} = +248 \pm 2$ (c = 0,1 en metanol).

15. El análisis elemental de una muestra purificada de clorhidrato de adriamicina da los valores siguientes:
 C % = 54,36 H % = 5,43 N % = 2,37 Cl % = 6,42

La fórmula empírica corresponde a $C_{27}H_{29}NO_{11} \cdot HCl$ y el peso molecular es de 579,98.

20. El clorhidrato de adriamicina es soluble en agua, en metanol y ^{en} los alcoholes acuosos, pero insoluble en acetona, benceno, cloroformo, éter etílico y éter de petróleo. Las soluciones alcohólicas del antibiótico dan coloración característica con las sales metálicas: rojo carmesí con las sales de magnesio, rojo carmesí con las sales de calcio y rojo oscuro con las sales de plomo.

25. A pH alcalino se observa el viraje al color violado

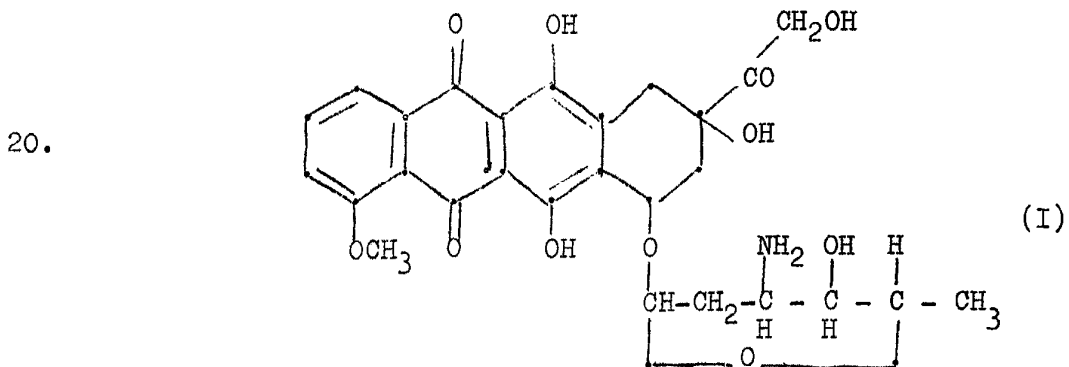


con precipitación de sustancias pigmentadas. Las soluciones acuosas del clorhidrato de adriamicina tienen color amarillo anaranjado a pH ácido, color rojo anaranjado a pH neutro y color azul violado a pH superior a 9. El espectro en la zona ultravioleta y en la zona visible en metanol se caracteriza por los máximos siguientes:

5. en 233 milimicras ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 673$) en 479 milimicras ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 219$)
en 252 milimicras ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 450$) en 496 milimicras ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 217$)
10. en 288 milimicras ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 159$) en 529 milimicras ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 118$)

En el espectro infrarrojo se observan bandas de las longitudes de onda siguientes (en micras) : 3.00, 3.44, 5.80, 6.17, 6.31, 6.55, 7.05, 7.78, 8.11, 8.24, 9.00, 9.35, 10.10, 10.98, 11.50, 12.68, 13.12, 14.60.

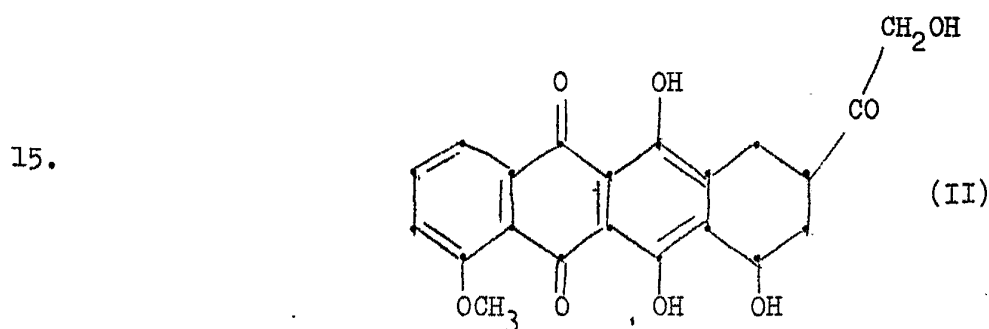
15. La adriamicina tiene la fórmula estructural I siguiente:





El antibiótico es una base capaz de formar sales con los ácidos inorgánicos y los ácidos orgánicos. El viraje que se observa del rojo al azul violado a $\text{pH} \sim 9$ se debe a la salificación de los grupos hidroxílicos fenólicos. Por adición de ácidos, se observa la disociación del enlace glucosídico. Por ejemplo, calentando a 100°C en ácidos minerales 0,5-n durante una hora, la adriamicina da origen a una aglicona de color rojo, insoluble en agua (adriamicinona) y una fracción acuoso-luble básica, reductora (daunosamina).

10. La adriamicinona tiene la fórmula estructural siguiente (II):



20. cuya formulación empírica correspondiente es $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_9$; funde a $223-224^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D = +156^\circ$ ($c = 0,1$ en dioxano),

El espectro en la zona ultravioleta y en la zona visible muestra máximos en las longitudes de ondas siguientes:



λ_{max} (milimicras)	1% E 1 cm
233	887
251	631
288	211
478	282
495	290
528	173

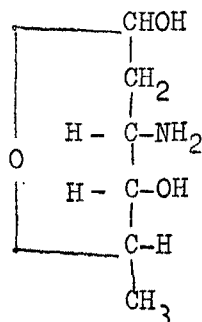
En el espectro infrarrojo se observan las siguientes bandas de absorción (en micras): 2.90, 3.42, 5.79, 6.18, 6.34, 6.92, 7.08, 7.26, 7.42, 7.80, 7.90, 8.05, 8.29, 8.43, 8.72, 8.93, 9.30, 9.88, 10.10, 10.86, 12.32, 12.75, 13.16, 13.70, 14.40.

El espectro de masa de la adriamicinona presenta los picos siguientes:

m/e 414 (M), 378 (M-2H₂O), 347 (M-2H₂O-CH₂OH).

El pentaacetato de adriamicinona (preparado por tratamiento de adriamicinona con anhídrido acético y piridina) tiene la fórmula empírica C₃₁H₂₈O₁₄, funde a 164-166°C, $[\alpha]_D = -94^\circ$ (c = 0,1 en cloroformo) y muestra el siguiente espectro de masa: m/e 624 (M), 582 (M-CH₂CO), 540 (M-2CH₂CO), 480 (M-2CH₂CO-CH₃COOH), 420 (M-2CH₂CO-2CH₃COOH), 378 (M-3CH₂CO-2CH₃COOH), 347 (M-3CH₂CO-2CH₃COOH-CH₂OH),

La fracción hidrosoluble (daunosamina) consiste en un aminoazúcar reductor de la estructura III siguiente:



III

El clorhidrato de daunosamina funde a 168°C (con descomposición), $[\alpha]_D = -54,5^{\circ}$ (en agua); el derivado N-benzoílico funde a 154-156°C.

10. Cromatografía del clorhidrato de adriamicina y de su aglicona en comparación con la daunomicina y la daunomicinona.

Cromatografía sobre papel: Papel Whatman Nº 1, amortiguado con tampón de fosfato M/15 a pH 5,4, revelado descendente por 16 horas a la temperatura ambiente.

15. Disolvente A: Butanol saturado con tamón de fosfato M/15 a pH 5,4

Disolvente B: Propanol/acetato de etilo/agua (7:1:2).

Cromatografía sobre capa delgada: Capa de Kieselgel G (Merck), amortiguado con ácido oxálico al 1% en agua; curso del cromatograma a 10 cm a la temperatura ambiente.

20.

Sistema C: Cloruro de metileno/metanol (100:15).

Sistema D: n-butanol/ácido acético/agua (4:1:5), a fase superior.



Sistema E: benceno/acetato de etilo/éter de petróleo de punto de ebullición 80-120°C (80:50:20).

Sistema F: Benceno/formiato de etilo/ácido fórmico (50:50:1).

5.	Compuesto	Cromatografía sobre					
		papel		capa delgada			
		sistema A	B	C	D	E	F
	Adriamicina Rf	0,10	0,25	0,17	0,33	0,00	0,00
10.	Clorhidrato de daunomicina Rf	0,20	0,50	0,35	0,40	0,00	0,00
	Aglicona de la adriamicina (Adriamicina) Rf	0,30	0,65	0,90	0,80	0,10	0,25
	Daunomicinona Rf	0,75	0,85	0,95	0,85	0,15	0,40

15.



- Las sales de la adriamicina se obtienen haciendo reaccionar la base con ácidos orgánicos e inorgánicos atóxicos, 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 o el ácido pantoténico. Las sales neutras se obtienen por acción del correspondiente ácido sobre la base libre, la cual se obtiene por extracción de una solución acuosa del clorhidrato a pH 8,6 con disolventes orgánicos inmiscibles en agua, tales como el butanol y el cloroformo. Por evaporación del disolvente orgánico, queda el antibiótico adriamicina en forma de la base libre. Las sales pueden obtenerse también por cambio doble de las sales: por ejemplo, a partir de sulfato de adriamicina se obtiene, con pantotenato cálcico, el pantotenato de adriamicina.

Aunque el antibiótico adriamicina tiene notable actividad bacteriostática contra diversos microorganismos (véase la Tabla 3), se ha demostrado particularmente útil como agente antitumoral.



T A B L A 3

Actividad antibiótica del clorhidrato de adriamicina

Razas	Terreno	DIM microgramos
Staph. aureus cp. 209 P	Caldo de carne	12,5
B. subtilis	"	6,25
5. S. faecalis	"	50
S. abortivo equina	"	50
S. coli B	"	3
Sh. flexneri	"	> 50
C. albicans	Sabouraud	> 50
10.		

15. Este antibiótico despliega marcado efecto inhibitor sobre el crecimiento de los tumores en forma ascítica, en los que se realice un contacto inmediato entre el antibiótico y las células neoplásicas. Se ha observado también buen efecto inhibitor en los tumores sólidos, en los cuales la actividad es diferente según la vía de administración y según la dosis. La actividad antitumoral de la adriamicina ha resultado también en estas pruebas superior, en eficacia y duración,

20. a la de la daunomicina. El antibiótico adriamicina y sus derivados, los productos de su degradación hidrolítica y las mezclas de ellos, pueden usarse como medicamentos.



Estos contienen los compuestos específicos en mezcla con vehículos farmacéuticos aptos para administración parenteral o local. Para la administración parenteral, se emplean preferentemente preparaciones liofilizadas que han de disolverse en el momento del uso.

5.

FARMACOLOGIA

Estudio de la actividad antitumoral del antibiótico adriamicina

El estudio de la actividad antitumoral del antibiótico adriamicina obtenido del Streptomyces F.I. 106 se ha efectuado sobre algunos tumores de la rata y del ratón, tanto en forma sólida como ascítica.

10.

1) Tumores ascíticos

Las pruebas de actividad se han efectuado sobre ratones portadores de carcinoma ascítico de Ehrlich y tratados intraperitoneal con soluciones del antibiótico en diversas concentraciones, por cinco días consecutivos a partir del día siguiente a la implantación del tumor.

15.

La Tabla 4, en que se resumen los resultados obtenidos, muestra que el antibiótico en examen, administrado a dosis iguales a 1,75 g 2,50 mg/kg/día, tiene notable efecto inhibitor sobre el crecimiento del tumor ascítico y ha producido un aumento considerable de la supervivencia media de los animales tratados.

20.



T A B L A 4

Carcinoma ascítico de Ehrlich

5.

Lotes de 10 animales	Dosis en mg/kg/día	Variación ponderal en gramos (días después de la implantación)		Supervivencia media (en días)
		6	12	
Controles	-	+ 7.5	+ 13.9	14
Adriamicina	1.75	- 0.5	+ 3.8	33.8
	2.50	- 1.8	+ 0.9	34.6

10.

El resultado se confirmó con una prueba sucesiva en la que el antibiótico se administró a las dosis de 1,25 y 2,50 mg/kg/día (Tabla 5).

Carcinoma ascítico de Ehrlich

15.

Lotes de 10 animales	Dosis en mg/kg/día	Variación ponderal en gramos (días después de la implantación)		Supervivencia media (en días)
		6	12	
20. Controles	-	+ 7.5	+ 13.2	17.8
Adriamicina	1.25	- 0.6	+ 4.6	31.8
	2.50	- 0.9	- 4.3	51.2



Una comparación de los resultados obtenidos, en idénticas condiciones experimentales, sobre ratones portadores de carcinoma ascítico de Ehrlich, con los antibióticos daunomicina y adriamicina respecto a los ratones de control permite determinar que el último producto es más activo, como se desprende de la Tabla 6, en la que se puede advertir que los valores de las relaciones que expresan el aumento de la supervivencia de los ratones tratados, en contraste con los ratones de control, son, a igualdad de dosis, mayores con la adriamicina.

Tabla 6

Relaciones de la supervivencia media de ratones portadores de carcinoma ascítico de Ehrlich (cada valor expresa el promedio de los resultados obtenidos en grupos de 10 animales por grupo).

Dosis en mg/kg/día	Daunomicina	Adriamicina
2.50	1.8	2.8

El efecto antimitótico del antibiótico en examen se ha puesto en evidencia en pruebas realizadas sobre ratones portadores de tumor ascítico en fase de crecimiento logarítmico (5º día). Estos animales se han tratado por vía intraperito-



neal con una administración única de adriamicina de 2 mg/kg. El examen de los frotis del exudado neoplásico tomado antes del tratamiento y a diversos intervalos de tiempo después de él (a las 2, 4, 8, 24, 32 y 48 horas) ha permitido observar que

5. el antibiótico causa una detención rapidísima y completa de la actividad multiplicativa del tumor, la cual dura hasta las 32 horas.

Cuarenta y ocho horas después del tratamiento se advierten numerosas células en mitosis, pero su morfología está constantemente alterada.

10.

2) Tumores sólidos

Las pruebas de actividad sobre tumores sólidos se efectuaron con el sarcoma 180 en el ratón y con el mieloma de Oberling-Guérin-Guérin en la rata.

15.

a) Sarcoma 180: unos ratones ingertados con un fragmento de tejido neoplásico se trataron por vía subcutánea, por 8 días, a partir del día siguiente al de la implantación del tumor. El antibiótico se administró en soluciones de diversas concentraciones, correspondientes a las dosis siguientes en mg/kg

20. por día: 7, 5, 3,5, 2,5 y 1,75.

Al undécimo día del experimento, se sacrificaron todos los animales y se extirparon y pesaron sus tumores.

Los resultados figuran en las Tablas 7 y 8 que siguen.

T A B L A 7



Lote y dosis (mg/kg/día)	Variación del peso corporal		Peso del Tumor, en g	% de inhibición	Mortalidad
	bruto	neto			
5. Controles	+ 4.78	+0.86	3.922	-	0/10
Adria- 7	- 5.98	-6.22	0.239	93.9	6/10
mi- 3,50	- 2.31	-3.01	0.696	82.3	0/10
cina 1.75	* 3.09	+1.10	1.988	49.3	0/10
10.					

T A B L A 8 (Sarcoma 180)

Lote y dosis (mg/kg/día)	Variación del peso corporal		Peso del tumor, en g	% de inhibición	Mortalidad
	bruto	neto			
15. Controles	+ 5.65	+ 3.19	2.461	-	0/10
Adriamicina 5 2.50	- 4.37	+ 4.61	0.239	90.3	0/10
	- 1.60	- 2.26	0.656	73.4	0/10
20. Daunomicina 5 2.50	+ 0.85	- 0.18	1.029	58.2	0/10
	+ 1.52	- 0.23	1.745	29.1	0/10



De ambas Tablas se desprende que el antibiótico ha causado marcada inhibición del crecimiento del tumor a todas las dosis usadas. Una sensible mortalidad de los animales tratados se ha observado únicamente con la dosificación más elevada (7 mg/kg/día).

5.

Pruebas realizadas en paralelo, en las mismas condiciones experimentales, con el antibiótico daunomicina (véase la Tabla 8), han permitido trazas las curvas de dosis-efecto de los dos productos y efectuar también una comparación de la actividad.

10.

Se desprende claramente la mayor actividad, a igualdad de condiciones experimentales, de la adriamicina respecto a la daunomicina en este tipo de tumor. El resultado es todavía más ovidento si se consideran las dosis inhibitoras 50 (DI 50) de ambos productos:

15.

Daunomicina: alrededor de 3.3 mg/kg

Adriamicina: alrededor de 1,5 mg/kg.

Pruebas de toxicidad subaguda efectuadas en ratones sanos con adriamicina administrada por vía subcutánea, por 8 días, a dosis variables de 10 a 1,25 mg/kg, han dado los resultados siguientes:

20.



T A B L A 9

Toxicidad subaguda de la adriamicina
en el ratón

Dosis (mg/kg/día)	% de mortalidad en los días	
	10 ²	15 ²
10	100	100
8.33	70	100
6.67	40	80
5	0	0
2,50	0	0
1.25	0	0

5.

10.

De los datos anteriores se obtienen, por el método gráfico, que la dosis letal 10 (DL 10) es igual a 6,4 mg/kg. De la gráfica puede concluirse que la dosis inhibidora 90 (DI 90) de la adriamicina es igual a 5 mg/kg. Con estos datos es posible calcular, según Skipper (Cancer Chemotherapy Report, 17,1, 1962) el índice terapéutico de la adriamicina, que es:

15.

$$I.T. = \frac{DL\ 10}{DI\ 90} = \frac{6.4}{5} = 1.28$$



Cabe recordar que, en las mismas condiciones experimentales, el índice terapéutico de la daunomicina es de 0,67. Conviene subrayar, además, que del trabajo de Skipper citado antes resulta que, en las mismas condiciones experimentales, el índice terapéutico de los otros antibióticos antitumorales ya en uso (actinomicina, mitomicina, actinobolina y actidiona) es inferior a 1.

5. b) Mieloma de Oberling-Guérin-Guérin: Unas ratas Wistar injertadas con un fragmento de tejido tumoral se trataron por vía intravenosa, durante 8 días, a partir del día siguiente al de la implantación del tumor. Al 129 día del experimento se sacrificaron los animales sobrevivientes y se extirparon y pesaron los tumores.

T A B L A 10

Mieloma de Oberling-Guérin-Guérin

15.	Lote y dosis (mg/kg/día)	Variación ponderal (en gramos)		Mortalidad	Peso del tumor	% de inhibición
		bruto	neto			
	Controles	+ 15.7	+ 3.3	0/10	12.447	-
	Adria- 0,625	+ 9.2	- 1.0	3/10	10.253	17.7
20.	mi- 1,25	+ 25.2	+14.6	0/10	10.649	14.5
	cina 2,50	- 1.3	- 5.6	1/10	4.295	65.5



La Tabla 10 muestra que el antibiótico resulta eficaz también para este tipo de tumor. En estas condiciones experimentales, la DI 50 de la adriamicina es de 2 mg/kg aproximadamente.

5. Los ejemplos que siguen sirven para ilustrar el invento, sin limitarlo.

EJEMPLO 1.

10. Se prepararon dos matraces de Arlenmeyer de 300 cc que contenía cada uno 60 cc del terreno de cultivo siguiente para la fase vegetativa: peptona, 0.6%; levadura seca, 0.3%; nitrato de calcio hidratado, 0,05%; y agua del grifo. Después de la esterilización, el pH era de 7.2. La esterilización se realizó por calentamiento en autoclave a 120°C durante 20 minutos.
- 15.

20. Se inoculó cada matraz con una cantidad de micelio del mutante F.I. 106 correspondiente a una quinta parte de una suspensión en agua estéril del micelio de un cultivo de 10 días de crecimiento en tubo de ensayo grande, sobre el terreno siguiente: sacarosa, 2%; levadura seca, 0,1%; fosfato dipotásico, 0,2%; nitrato sódico, 0,2%; sulfato magnésico, 0,2%; agar, 2%; y agua del grifo. Se incubaron los matraces a 28°C durante 48 horas en un sacudidor giratorio con una excentricidad de 30 mm y a 220 vueltas por minuto.



- 2 cc de un cultivo vegetativo así desarrollado se utilizaron para inocular matraces de Erlenmeyer de 300 cc con 60 cc del siguiente terreno para la fase productiva; glucosa, 6%, levadura seca, 2,5%; cloruro sódico, 0,2%; fosfato bipo-tásico, 0,1%; carbonato cálcico, 0,2%; sulfato magnésico, 0,01%; sulfato ferroso, 0,001%; sulfato de zinc, 0,001%; sulfato de cobre, 0,001%; y agua del grifo. El pH resultante era de 7. Se esterilizó este cultivo a 120°C durante 20 minutos, y la glucosa se esterilizó por separado a 110°C durante 20 minutos. Luego se incubó a 28°C en las mismas condiciones de agitación que se han descrito para el cultivo vegetativo. La concentración máxima de antibiótico se alcanzó al 6º día de fermentación. La cantidad de adriamicina producida en tal momento correspondía a una concentración de 15 microgramos/cc.

EJEMPLO 2.

15. Se procede como en el ejemplo 1, con la diferencia de que el cultivo para inocular se desarrolla sobre el terreno sólido siguiente; se hierven durante 20 minutos en 500 cc de agua 200 g de patatas mondadas, se ajusta el volumen al valor original y se filtra por una gasa. Se añaden 2% de glucosa, 0,1% de extracto de levadura Difco y 2% de agar, se ajusta el volumen a 1000 cc y se esteriliza a 120°C durante 20 minutos; pH, 6,8-7,0. La concentración máxima de adriamicina, 12 microgramos/cc, se alcanza a la 140ª hora.



EJEMPLO 3.

Se proceda como en el ejemplo 2, con la diferencia de que los terrenos para la fase vegetativa y para la fase productiva tienen las composiciones siguientes:

5. Terreno vegetativo: almidón, 3%; carbonato cálcico, 0,4%; solubles de los destiladores, 0,3%; sulfato amónico, 0,1%; caseína, 0,5%; fosfato bipotásico, 0,01%; y agua del grifo. Después de la esterilización, realizada en autoclave a 120°C durante 20 minutos, el pH es de 7.
10. Terreno productivo: almidón, 5%; carbonato cálcico, 0,8%; corn steep liquor, 0,6%; caseína, 0,5%; sulfato amónico, 0,1%; y fosfato bipotásico, 0,01%. El pH, después de la esterilización, es de 7. La esterilización se realiza de la manera que se ha descrito para la fase vegetativa. La producción máxima se alcanza al 7º día, con 6,5 microgramos/cc.
- 15.

EJEMPLO 4.

- Con un cultivo del mutante F.I. 106 en terreno sólido como el que se ha descrito en el ejemplo 2, se inocularon 500 cc del terreno líquido para la fase vegetativa que se ha descrito en el ejemplo 1, contenidos en un matraz de vidrio Pyrex de 2000 cc. Se incubó a 28°C por 48 horas en un agitador giratorio a 120 vueltas por minuto y con una excentricidad de 3,5 mm. Del caldo de cultivo así obtenido se inocularon luego 100 cc en 2000 cc del mismo terreno líquido,
- 20.



5. contenidos en un fermentador de 5 litros, de vidrio neutro, provisto de agitador de hélice, tubo de admisión para burbujeo de aire, terminante debajo del agitador de hélice; dispositivo rompedor de la corriente, tubo para inoculación, tubo de salida de aire, equipo comprobador de la temperatura y un dispositivo para adición intermitente o continua en condiciones estériles. El desarrollo se efectuó a 28°C con un caudal de aireación de 3 litros por minuto y una agitación de 400 vueltas por minuto.
10. Al cabo de 24 horas, 300 cc del caldo de cultivo así desarrollado se utilizaron para inocular 6 litros del terreno productivo que se ha descrito en el ejemplo 1, contenidos en un fermentador de 10 litros, de vidrio neutro, que tenía las características que se han descrito antes. Durante la fermentación, que se efectuó con una agitación de 350 vueltas por minuto y con una corriente de aire de 5 litros por minuto, se refrenó la espuma mediante la adición de pequeñas cantidades de un agente antiespumante de silicona. La producción máxima obtenida en 150 horas de fermentación correspondió a una concentración de adriamicina de 6 microgramos/cc.
- 15.
- 20.

EJEMPLO 5.

- Con un cultivo obtenido como se ha descrito en el ejemplo 1, se inocula un matraz de 2000 cc con 500 cc del terreno de la composición siguiente: peptona, 0,6%; levadura seca granulada, 0,3%; y nitrato de calcio en agua,
- 25.



- 0,05%. Se agita el terreno en un agitador giratorio durante 48 horas, a 28°C, y por medio del cultivo así obtenido se inocula un fermentador de 80 litros con 50 litros del terreno indicado antes. Se agita este terreno a 230 vueltas por minuto y se le airea con una corriente de aire de 0,7 litros por litro de terreno y por minuto, a la temperatura de 27°C. Al cabo de 4 a 5 horas, se utiliza el caldo de cultivo para sembrar 500 litros de terreno de cultivo en un fermentador de unos 800 litros.
- 5.
10. El terreno de fermentación tiene la composición siguiente: glucosa, 7%; harina de garbanzos, 6,65%; carbonato cálcico, 0,2%; cloruro sódico, 0,2%; fosfato bipotásico, 0,1%; heptahidrato de sulfato magnésico, 0,02%; heptahidrato de sulfato ferroso, 0,00068%; heptahidrato de sulfato de manganeso, 0,001%; sulfato de cobre, 0,002%; y agua del grifo.
15. Se esteriliza el terreno a 120°C durante 30 minutos, se le enfría hasta 27°C, y después de la inoculación, se lo agita a 250 vueltas por minuto y se le airea con una corriente de aire de 0,4 litros por litro de terreno y por minuto. Al
20. cabo de 145 horas, el caldo de cultivo contiene 6,5 microgramos/cc de adriamicina.

EJEMPLO 6.

Se filtran del micelio, con ayuda de Supercecl (marca registrada), 60 litros de líquido de cultivo proveniente de la



fermentación obtenida según el Ejemplo 4, con lo que se obtiene una torta y un filtrado que se extraen separadamente. La torta obtenida se suspende en acetona diluida con ácido sulfúrico acuoso 0,1-n (4:1) y se agita durante 2 horas. Se
5. filtra el líquido y se repite la operación de agitar la torta dos veces todavía.

Se combinan los extractos obtenidos, se neutralizan y se evapora en vacío la acetona. El concentrado, que contiene alrededor de 0,25 g de adriamicina, se acidifica hasta pH 3 con
10. ácido clorhídrico 1-n y luego se extrae con cloroformo, que separa parte de las impurezas. Se ajusta la fase acuosa a pH 8,6 con hidróxido sódico 1-n y luego se extrae con una mezcla de cloroformo/metanol (9:1); esta operación se repite hasta que la fase acuosa sale incolora. Se lavan con agua los
15. extractos de metanol/cloroformo hasta pH 8,6, se los seca sobre sulfato sódico anhidro, se los filtra y se los concentra hasta pequeño volumen, bajo presión reducida, después de lo cual se precipita con éter etílico la adriamicina en forma de base libre. Se obtienen 1,50 g de producto bruto que contiene alrededor de 0,2 g de adriamicina. Se ajusta el caldo filtrado
20. a pH 8,6 con hidróxido sódico 1-n y luego se le extrae con la mezcla de cloroformo/metanol (9:1). Se repite dos veces esta operación y luego se lavan con agua los extractos de metanol/cloroformo hasta pH 8,6, se vuelven a extraer con ácido clorhídrico 0,01-n hasta que la fase acuosa adquiere color rojo y se
25.



- elimina la fase clorofórmica. Se filtra la fase acuosa, se la ajusta a pH 8,6 con hidróxido sódico l-n y luego se la extrae con la mezcla de cloroformo/metanol (9:1). El extracto, que en este momento contiene, además de diversas impurezas,
5. 0,15 g de adriamicina, se lava con agua hasta pH 8,6, se seca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se concentra hasta pequeño volumen bajo presión reducida. Añadiendo 10 volúmenes de éter etílico, se obtiene la precipitación de 1,00 g de producto bruto que contiene 0,12 g de adriamicina.
10. Se obtienen en total 0,320 g de adriamicina en forma de base bruta.

EJEMPLO 7

- Se disuelven en 10 cc de tampón de fosfatos M/15, a pH 5,4, 0,500 g de producto bruto que contiene alrededor
15. de 15% de adriamicina. Se adsorbe la solución en 10 g de polvo de celulosa (Whatman CF 11), se seca la mezcla por una noche y en vacío sobre cloruro cálcico anhidro y luego se la deposita en una columna cromatográfica de vidrio (de 100cm de altura y 4 cm de diámetro) que contiene 225 g de polvo de
20. celulosa (Whatman CF 11) previamente amortiguado con tampón de fosfato M/15 a pH 5,4 y secado en vacío sobre cloruro cálcico anhidro. Se eluye con la mezcla propanol/acetato de etilo/agua (7:1:2) y se recogen con un colector automático fracciones de 25 cc. Se examinan las diversas fracciones por



cromatografía sobre papel Whatman Nº 1, amortiguado a pH 5,4, utilizando como eluente la misma mezcla empleada para eluir la columna. Las fracciones 40 a 60 contienen adriamicina. Se reúnen las fracciones 40 a 60 y se las concentra hasta

5. 50 cc. Se filtran las sales precipitadas, se añaden al filtrado 200 cc de agua y se ajusta el pH de la solución a 7 con hidróxido sódico l-n.

Se concentra hasta 50 cc bajo presión reducida, se ajusta el concentrado a pH 8,6 y luego se le extrae con

10. cloroformo. Se repite esta operación por tres veces y luego se combinan los extractos clorofórmicos. Se lavan éstos con agua ajustada a pH 8,6 y luego con agua, se deshidratan sobre sulfato sódico anhidro, se filtran y se concentra el filtrado hasta 5 cc bajo presión reducida. Se añaden 0,15 cc de una

15. solución l-n de ácido clorhídrico anhidro en metanol y se enfria. Al cabo de unos minutos se forma un precipitado cristalino de clorhidrato de adriamicina, que se filtra y se lava con cloroformo frío y con éter etílico anhidro. Se obtienen 50 mg del producto, que se recrystaliza en etanol.

20. De esta manera se obtienen 35 mg de un producto puro, fundente a 204-205°C. De las aguas madres se recuperan otros 15 mg de un producto amorfo de 90% de pureza.



EJEMPLO 8

Se disuelven en 4 cc de ácido clorhídrico 0,5-n
0,077 g de clorhidrato de adriamicina y se calienta la solu-
ción a 100°C durante una hora.

5. Se obtiene un precipitado amorfo de color rojo
oscuro, que se recoge por filtración después del enfriamiento.
El producto, lavado con agua hasta neutralidad de las lavazas,
se seca durante una noche y en vacío sobre hidróxido potásico
y durante 6 horas sobre anhídrido fosfórico, a 56°C.

10. Se obtienen así 47 mg de aglicona de la adriamicina,
fundente a 223°-224°C, $[\alpha]_D = +156^\circ$ (dioxano), y que tiene
la fórmula $C_{21}H_{18}O_9$.

15. Después de la precipitación de la aglicona, la
solución ácidoacuosa, casi incolora, contiene un compuesto
que reduce el líquido de Fehling y da reacción positiva con
ninhidrina. Se neutraliza la solución (pH 6) pasándola por una
resina cambiadora Dowex 1 x 8 (en forma de bicarbonato). Luego
se filtra la resina y se liofiliza el filtrado. El residuo
blanco está constituido por un aminoazúcar que tiene las
20. mismas características que el clorhidrato de daunosamina.

Mediante cromatografía en papel con los disolventes butanol/
ácido acético/agua (4:1:1) y (4:1:5) y butanol/piridina/agua
(6:4:3) y mediante cromatografía de capa delgada de Alusil,



- utilizando como disolvente la mezcla propanol/acetato de etilo/
agua/amoniaco acuoso al 25% (6:1:3:1), no se separa de la
daunosamina. El producto puede ser revelado con los reactivos
de ninhidrina y con ftalatos de anilina sobre el papel,
5. y con anisaldehido y ácido sulfúrico sobre capa delgada.



Descrito el objeto del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención, las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la solicitud de patente italiana nº 15056 A/67 del 18.4.67:

5. 1. Un procedimiento para la preparación de una nueva sustancia antibiótica, tomada del grupo constituido por el antibiótico adriamicina, su aglicona y sus sales con ácidos orgánicos o inorgánicos atóxicos y farmacéuticamente aceptables, caracterizado por cultivarse el mutante F.I. 106 del
10. Streptomyces peucetius en condiciones aeróbicas y en un medio nutriente líquido que contiene una fuente de carbono, de nitrógeno y de sales minerales, a temperatura entre 25 y 37°C (de preferencia, 28°C), por un periodo de 3 a 7 días (de preferencia, por 5 días), extraerse el antibiótico de la masa de fermentación a pH entre 8,5 y 9, por medio de los disolventes usuales inmiscibles con el agua, y, de manera conocida, aislarse
15. el antibiótico adriamicina y purificarsele como tal o transformárselo en sus sales con ácidos inorgánicos o orgánicos o convertírsele en su aglicona por medio de hidrólisis ácida.

= 43 =



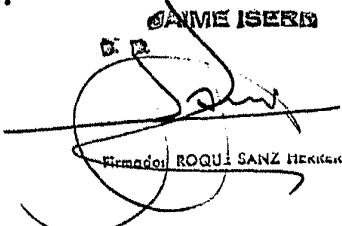
2. Un procedimiento para la preparación de una
substancia antibiótica.

Según se describe y reivindica en la presente
memoria descriptiva que consta de 43 hojas foliadas y
escritas a máquina por una sola cara.

5.

Barcelona, a 17 ABR. 1968

p.a.

CIEME ISEBB
C. E.

Remedios ROQUE SANZ HERIZERO