



373632

INVENCIÓN TÉCNICA
CLASIFICACIÓN I. P. C.
CLASE <u>C-12</u>
SUBCLASE <u>D</u>

PATENTE DE INVENCION

Ref: SO. 3439.

373632

# Memoria Descriptiva

sobre:

Procedimiento para la preparación de la dono-  
rubicina por cultivo de un streptomycetes.

=====

*Solicitante:* RHONE-POULENC S.A., entidad francesa, residente en  
22 Avenue Montaigne, Paris 8<sup>e</sup>, Francia.

=====

La presente invención se refiere a un nuevo  
procedimiento para la preparación del antibiótico  
designado por el número 13.057 R.P. que ha recibido  
el nombre de donorubicina (anteriormente: rubidomi-  
cina).

5.

**POOR  
QUALITY**

- 2 -  
373632



5. En la patente francesa nº 1.533.151 se describe el antibiótico designado por el número 9.865 R.P., sus tres constituyentes principales designados por los números 13.213 R.P., 13.057 R.P. (o donorubicina) y 13.330 R.P., la preparación del antibiótico 9.865 R.P. por cultivo en medio apropiado de *Streptomyces* 8.899 o de *Streptomyces* 31.723 y el fraccionamiento del antibiótico 9.865 R.P. en sus tres constituyentes.

10. En la patente francesa nº 1.551.195, depositada el 15 de Noviembre de 1967, se ha descrito igualmente la preparación del antibiótico 13.057 R.P. o donorubicina por cultivo de una nueva cepa de *streptomyces* designada por la denominación *Streptomyces griseus*, variedad *rubidofaciens*, cepa DS 32.041 (NRRL 3383).

15. La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de preparación de la donorubicina por cultivo, en condiciones aerobias, de un nuevo microorganismo, identificado más completamente a continuación, que pertenece al género *Streptomyces*, designado por la denominación "*Streptomyces bifurcus*, DS 23.219" (NRRL 3539) y que se ha obtenido a partir de una muestra de tierra tomada en Francia, en el departamento de Val-de-Marne.

20. Una muestra de esta cepa se ha depositado en el United Departement of Agriculture de Peoria, Illinois (Estados Unidos) bajo el número NRRL 3539. Muestras del microorganismo pueden obtenerse de este laboratorio sobre referencia a la presente patente.

30. El aislamiento de esta cepa se ha efectuado utilizando el método habitual siguiente: la muestra de tierra se suspende en agua destilada estéril, después la suspensión se diluye a diferentes concentraciones y pequeños volúmenes de cada dilución son respectivamente expuestos so-



bre la superficie de cajas de Petri que contienen un medio nutritivo gelosado conveniente. Tras una incubación de 15 días a 26°C, las colonias de microorganismos que se quieren aislar son transplantadas sobre gelosas inclinadas con el fin de obtener cultivos más abundantes.

- 5. Por razones que serán expuestas más adelante la cepa Streptomyces DS 23.219 debe ser considerada como la representante de una especie nueva, designada por la denominación Streptomyces bifurcus en razón al hecho de que se encuentra muy frecuentemente en sus cultivos una forma bastante particular de esporoforo que termina en división dicotómica y que presenta entonces dos ramas alargadas fijadas a la extremidad de un filamento principal.

- 10. Streptomyces bifurcus, cepa DS 23.219 forma esporas cilíndricas que miden 0,4 a 0,5/1,0 a 1,2 μ. Sus filamentos esporiferados, rectos o ligeramente flexuosos, están insertados sobre los filamentos aéreos que las soportan aisladamente o en racimos que comprenden un número reducido de elementos; frecuentemente el filamento principal da lugar en su parte terminal a solamente dos filamentos alargados, lo que da un aspecto bifurcado bastante particular al esporoforo.

- 20. De una manera general, sobre los medios nutritivos sintéticos, Streptomyces bifurcus, cepa DS 23.219 desarrolla un micelio vegetativo amarillento a rosa claro, rosa parduzco o pardo rojizo, y produce pigmentos solubles de color rosa anaranjado a rosa violáceo. Sobre los medios orgánicos, su micelio vegetativo es pardo amarillo a pardo anaranjado y los pigmentos solubles que produce colorean la gelosa de pardo anaranjado a pardo rojizo. No produce pigmento melánico sobre los medios orgánicos y no produce SH<sub>2</sub>. Forma nitritos a partir de los nitratos tanto sobre
- 25. los medios orgánicos como sobre los medios sintéticos, li-
- 30.



- 4 -  
373632

cúa la gelatina, peptoniza léntamente la leche y utiliza la celulosa.

- En la tabla I estan indicados los caracteres de cultivo y las propiedades bioquímicas que presenta Streptomyces bifurcus, cepa DS 23.219, sobre un cierto número de ge-  
5. losas nutritivas y de caldos nutritivos habitualmente utilizados para examinar el aspecto de las cepas de streptomycetes; salvo indicaciones precisas, estos caracteres son los presentados por cultivos de aproximadamente dos a tres se-  
10. manas a 25°C, que han llegado a un buen estado de desarrollo. Un cierto número de los medios de cultivo empleados se han preparado según las fórmulas indicadas en "The Actinomycetes" (S.A. WAKSMAN, Chronica Botanica Company, WALTHAM, MASS., U.S.A., 1950, p. 193-197); en este caso, están indicados por la letra W seguida del número que se le ha atribuido en "The Actinomycetes".  
15.

Las referencias o composiciones de los restantes medios son los siguientes:

- Ref. A. - "Hickey and Tresner's Agar" - T.G. PRIDHAM  
20. et col. - Antibiotics Annual, 1956-1957, p. 950  
- Ref. B. - K.L. JONES - Journal of Bacteriology 57, 142 (1949).  
- Ref. C. - Fórmula W23 adicionada con 2 % de gelosa.  
- Ref. D. - "Yeast Extract Agar" - T.G. PRIDHAM et col.  
25. Antibiotics Annual, 1956-1957, p. 950.  
- Ref. E. - "Tomato Paste Oatmeal Agar" - T.G. PRIDHAM et col. Antibiotics Annual, 1956-1957, p. 950.  
- Ref. F. - W.E. GRUNDY et col. - Antibiotics and Chem. 2, 401 (1952).  
30. - Ref. G. - "Inorganic Salts - Starch Agar" - T.G. PRIDHAM

- 5 373632



- et col.- Antibiotics Annual, 1956-1957, p. 951.
5. - Ref. H. - correspondiente a la fórmula W-1, en la que 30 g de sacarosa se reemplazan por 15 g de glucosa.
- Ref. I. - correspondiente a la fórmula W-1, en la que 30 g de sacarosa se reemplazan por 15 g de glicerina.
- Ref. J. - "Plain gelatin" - preparado según las indicaciones del "Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria" de la Society of American Bacteriologists, Geneva, N.Y. II 50 - 18.
10. - Ref. K. - "Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria" de la Society of American Bacteriologists, Geneva, N.Y., II 50-18
- Ref. L. - "Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria" de la Society of American Bacteriologists, Geneva, N.Y., II 50-19.
15. - Ref. M. - correspondiente a la fórmula W-18, en la que 30 g de sacarosa se reemplazan por 15 g de glucosa.
- Ref. N. - corresponde a la fórmula W-18 en la que la sacarosa es suprimida y reemplazada por pequeñas bandas de papel de filtro sumergidas parcialmente en el líquido.
20. - Ref. O. - Leche descremada en polvo comercial, reconstituida según las indicaciones del fabricante.
- Ref. P. - The Actinomycetes, vol 2, p. 333 - nº 42, S.A. WAKSMAN, The Williams and Wilkins Company, Baltimore (1961).
25. - Ref. Q. - H.D. TRESNER and F. DANGA- Journal of Bacteriology, 76, 239-244 (1958).
30. La capacidad de Streptomyces bifurcus, cepa DS 23.219, a utilizar diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno para

373632



asegurar su desarrollo se ha determinado según el principio del método de Fridham y Gottlieb (J. of Bact. 56, 107-114, 1948); el grado de desarrollo se ha observado sobre el medio de base indicado por los autores reemplazando, bien la glucosa por las diferentes fuentes de carbono respectivamente ensayadas, bien  $SO_4(NH_4)_2$  por las diferentes fuentes de nitrógeno respectivamente ensayadas. Los resultados están indicados en la tabla II.

TABLA II

Fuentes de carbono ensayadas	Utilización	Fuentes de nitrógeno ensayadas	Utilización
D-Xylosa	+	$NO_3Na$	+
L-Arabinosa	+	$NO_2Na$	+
L-Ramnosa	+	$SO_4(NH_4)_2$	+
D-Glucosa	+	$PO_4H(NH_4)_2$	+
D-Galactosa	+	Adenina	+
D-Fructosa	+	Adenosina	+
D-Mannosa	+	Uracilo	+
L-Sorbosa	-	Urea	+
Lactosa	+	L-Asparagina	+
Maltosa	+	Glicocola	+
Sacarosa	+	Sarcosina	+
Trehalosa	+ pero lenta	DL-Alanina	+
Cellobiosa	+	DL-Valina	+
Raffinosa	+	Acido DL-aspartico	+
Dextrina	+	Acido L-glutámico	+
Inulina	+	L-Arginina	+
Almidon	+	L-Lisina	+

- 7 373632



TABLA II (continuación)

Fuentes de carbo no ensayadas	Utilización	Fuentes de nitrógeno ensayadas	Utilización
Glicógeno	+	DL-Serina	+
Glicerol <sup>14</sup>	+	DL-Treonina	+
Eritritol	-	DL-Metionina	-
Adonitol	-	Taurina	-
Dulcitol	-	DL-Fenilalanina	+ pero lenta
D-Mannitol	+	L-Tirosina	+
D-Sorbitol	+	DL-Prolina	+
Inositol	+	L-Hidroxiprolina	+
Salicina	+	Betaina	+

El conjunto de los caracteres que presenta Strepto-  
myces bifurcus, cepa DS 23.219 no ha permitido identificar  
le a ninguna de las especies que ya se han descrito, y esto  
se debe a que se debe considerar como el representante de  
5. una especie nueva.

En efecto, siguiendo la clasificación de los Strep-  
tomyces indicada en el Bergey's Manual of Determinative Bac-  
teriology (7ª edición - The Williams and Wilkins Company,  
Baltimore, 1957), sus propiedades de no elaborar pigmento  
20. melánico sobre los medios orgánicos, de formar sobre pata-  
ta un pigmento soluble pardo rojizo y de desarrollar igual-  
mente sobre patata un micelio vegetativo pardo rojizo claro,  
le aproximan al Streptomyces noursei; no tiene sin embargo  
ninguna relación con este último, que produce esporoforos  
25. espirales y cuyo micelio aéreo esporulado toma un tinte ro-

373632



sa, mientras que él, no da mas que filamentos esporiferados no espirales y presenta un micelio aéreo esporulado gris azul claro.

5. En The Actinomycetes (vol. 2, S.A. WAKSMAN, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1961 -página 158), se encuentra la descripción de otras tres especies que com-  
parten con Streptomyces noursei la propiedad de no formar pigmento melánico sobre los medios orgánicos, de elaborar un pigmento soluble rojizo sobre patata y de formar sobre  
10. patata un micelio vegetativo rosa a rojizo: Streptomyces albogriseolus, Streptomyces spiralis y Streptomyces fragilis. Pero estas tres especies presentan con la cepa Streptomyces bifurcus, cepa DS 23.219 diferencias esenciales que muestran que son incontestablemente de especies que no  
15. pueden corresponderle: Streptomyces albogriseolus y Streptomyces spiralis forman esporoforos espirales, se clasifican por ello en la sección Spira de la clasificación de Pridham, mientras que Streptomyces bifurcus, cepa DS 23.219 que solamente dan filamentos esporiferados rectos o ligeramente flexosos  
20. se sitúa en la sección Rectus-Flexibilis de esta misma clasificación. En cuanto a Streptomyces fragilis, el color rosa que toma su micelio aéreo cuando llega a esporulación muestra que no tiene relación con Streptomyces bifurcus, cepa DS 23.219 cuyo micelio aéreo, como ya se ha dicho, se colorea en gris azul claro cuando esta esporulado.  
25.

Streptomyces bifurcus, cepa DS 23.219 no puede pues ser identificado a ninguna de las cepas que se aproximan mas.

30. El nuevo procedimiento de preparación de la donorubicina consiste esencialmente en cultivar Streptomyces bifur-



373632 48 NOV 1953

cepa DS 23.219 o sus mutantes productores sobre un medio y en condiciones apropiadas y separar el antibiótico formado en el transcurso del cultivo.

- 5. El cultivo por fermentación de Streptomyces bifurcus, cepa DS 23.219 produce esencialmente la donourubicina pero igualmente los restantes constituyentes del antibiótico 9.865 R.P. que son separados de la donourubicina en el transcurso de las operaciones de extracción y de purificación y que eventualmente pueden ser aislados, pero el objeto principal de la presente invención reside en la preparación de la donourubicina.

- 10. El cultivo de Streptomyces bifurcus, cepa DS 23.219 puede efectuarse por cualquier método de cultivo aerobio en superficie o en profundidad, pero este último es preferible por razones de comodidad. Se utilizan con este fin los diferentes tipos de aparatos que son de uso corriente en la industria de las fermentaciones.

En particular se puede adoptar la marcha siguiente para la conducción de las operaciones:

- 20. cepa DS, 23.219 - Stock  
                   ↓  
                   cultivo sobre gelosa  
                   ↓  
                   cultivo en frasco agitado  
                   ↓  
                   cultivo de inoculado en fermentador  
                   ↓  
                   cultivo de producción en fermentador

- 25. El medio de fermentación debe contener esencialmente una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno asimilables, elementos minerales y eventualmente factores de crecimiento, todos estos elementos pueden ser aportados en forma de productos bien definidos o por mezclas complejas,
- 30. tales como se encuentran en productos biológicos de diver-



372  
sos orígenes.

373632

Como fuentes de carbono asimilable se puede utilizar hidratos de carbono tales como glucosa, maltosa, dextrinas, almidón u otras sustancias hidrocarbonadas como los azúca-

5. res alcoholes: manitol..... o como ciertos ácidos orgánicos: ácido láctico, cítrico. Ciertos aceites animales o vegetales como el aceite de tocino o el aceite de soja pueden reemplazar ventajosamente estas diferentes fuentes hidrocarbonadas, o serles añadidas.

10. Las fuentes convenientes de nitrógeno son extremadamente variables. Pueden ser sustancias químicas muy simples como los nitratos, las sales minerales u orgánicas de amonio, la úrea, los ácidos aminados. También pueden aportarse por sustancias complejas que contengan principalmente nitrógeno
15. en forma protídica: caseína, lactalbumina, gluten y sus hidrolisatos, harinas de soja, de mani, de pescado, extractos de carne, de levadura, distillers solubles, corn-steep.

- Entre los elementos minerales adicionados, algunos pueden tener un efecto tampón o neutralizante como los fosfatos alcalinos o alcalino-térreos o los carbonatos de calcio y de magnesio.
- 20.

- Otros aportan el equilibrio iónico necesario para el desarrollo del Streptomyces bifurcus, cepa DS 23.219 y a la elaboración del antibiótico, como los cloruros y sulfatos de los metales alcalinos y alcalino-térreos. Finalmente algunos actúan mas especialmente como activadores de las reacciones metabólicas del Streptomyces DS 23.219: estas son las sales de cinc, de cobalto, de hierro, de cobre, de manganeso.
- 25.

30. El pH del medio de fermentación al comienzo del cul-



373632

tivo debe ser comprendido entre 6,0 y 7,8, de preferencia 6,5 a 7,5. La temperatura óptima para la fermentación es de 25-30°C, pero una producción satisfactoria se obtiene para temperaturas comprendidas entre 23 y 33°C. La aireación del medio de fermentación puede variar entre valores bastante amplios. Sin embargo se ha encontrado que aireaciones de 0,3 a 3 litros de aire por litro de caldo y por minuto convienen particularmente bien. El rendimiento máximo en antibiótico se obtiene tras 2 a 8 días de cultivo, este tiempo depende esencialmente del medio utilizado.

Tras lo que precede, se concibe que las condiciones generales del cultivo del Streptomyces bifurcus, cepa DS 23.219 para la producción de la donorubicina pueden variar en una amplia medida y ser adaptados a cada necesidad particular.

La donorubicina puede aislarse de los mostos de fermentación por distintos métodos.

Se puede filtrar el mosto de cultivo a un pH comprendido entre 1,5 y 9, y en estas condiciones, la mayor parte de la actividad pasa en el filtrado. Después de lavar con agua, la torta de filtración no retiene prácticamente más actividad. Es ventajoso efectuar esta operación en medio ácido, y particularmente acidificando a un pH comprendido entre 1,5 y 2 por medio de ácido oxálico. Igualmente es posible efectuar la filtración a un pH comprendido entre 2 y 7, preferentemente próximo a 2, en presencia de un alcohol alifático que contenga de 1 a 3 átomos de carbono.

En las operaciones de extracción mencionadas anteriormente la donorubicina se obtiene en solución acuosa o hidroalcohólica, y se la hace pasar a continuación en solu

972



-12-  
373632

ción orgánica por extracción por medio de un disolvente orgánico no miscible con el agua tal como el butanol, la metilisobutilcetona, el acetato de etilo o el cloroformo, a un pH comprendido entre 5,5 y 9, preferentemente próximo a 7,5. Esta extracción va precedida eventualmente por un tratamiento sobre resina cambiadora de iones. En este caso, el antibiótico la solución acuosa se ajusta a un pH próximo a 4 después se fija sobre una resina cambiadora de cationes. La donorubicina se eluye, preferentemente, con metanol que contenga 10 % de agua y 1 % de cloruro sódico. El eluato se concentra entonces para eliminar el alcohol, después se extrae como se indica anteriormente.

Iguálmente puede someterse el mosto de fermentación a una extracción con un disolvente orgánico inmisible con el agua, tal como el butanol, el acetato de etilo o el cloroformo, a un pH comprendido entre 5,5 y 9, preferentemente próximo a 7,5. En este caso toda la actividad pasa en la fase orgánica que se separa de la fase acuosa según los procedimientos clásicos.

Cualquiera que sea el método de extracción elegido, la donorubicina se obtiene finalmente en solución orgánica. Puede ser ventajoso efectuar en este estado una purificación haciendo pasar sucesivamente el antibiótico en solución acuosa después en solución orgánica, por modificación del pH. El antibiótico bruto puede aislarse a continuación de la solución orgánica obtenida el último lugar por concentración o por precipitación por medio de un mal disolvente tal como el hexano.

Para obtener la donorubicina más pura, se pueden utilizar los métodos clásicos en uso, tales como cromatografía



373632

sobre diferentes agentes adsorbentes, distribución en contra-corriente o la repartición entre diferentes disolventes.

5. La donorubicina puede transformarse igualmente en sales de adición con los ácidos, tales como el ácido clorhídrico. Estas sales pueden purificarse por aplicación de los métodos clásicos.

10. La donorubicina obtenida según este nuevo procedimiento y sus sales presentan características idénticas a las de los antibióticos 13.057 R.P. y de sus sales descritas en la patente francesa nº 1.533.151.

Los ejemplos siguientes, dados a título no limitativo, muestran como puede ponerse en práctica la invención.

EJEMPLO 1

15. En un fermentador de 170 litros se cargan:

- Peptona ..... 1.200 g
- Extracto de carne ..... 600 g
- Cerelosa ..... 1.200 g
- Gelosa ..... 240 g
- Agua de ciudad, hasta completar 110 litros.

El pH se ajusta a 7,20 con 120 cm<sup>3</sup> de sosa 10 N. Se esteriliza el medio a 122°C por borbotado de vapor durante 40 minutos. Tras refrigeración, el volumen del caldo es de 120 litros y el pH de 6,65.

20. Se siembra entonces con 200 cm<sup>3</sup> de un cultivo en erlenmeyer agitado de la Streptomyces bifurcus, cepa DS 23.219. El cultivo se desarrolla a 27°C durante 30 horas agitando y aireando con aire estéril: entonces está en condiciones para la siembra del cultivo productor.

- 14 - 373632



El cultivo productor se efectúa en un fermentador de 800 litros cargado con las sustancias siguientes:

- 5.
- Distillers' solubles ..... 4 kg
  - Judías en granos ..... 12 kg
  - Aceite de soja ..... 8 litros
  - Cloruro sódico ..... 2 kg
  - Cloruro de cobalto  $6H_2O$  ..... 8 kg
  - Agua de ciudad hasta completar 330 litros.

10. Después de haber ajustado el pH a 7,70 con  $400\text{ cm}^3$  de sosa 10 N, se esteriliza el medio a  $122^\circ\text{C}$  durante 40 minutos. Después de enfriar, el volumen del caldo es de 360 litros. Se completa a 400 litros por adición de 40 litros de una solución acuosa estéril que contiene:

- Cerelese..... 6 kg

15. El pH es entonces igual a 6,80. Se siembra con 40 litros del cultivo de inoculado en fermentador de 170 litros descrito más arriba. El cultivo se efectúa a  $27^\circ\text{C}$  durante 170 horas agitando por medio de una turbina que gire a 260 revoluciones por minuto y aireando con un caudal de aire estéril de  $30\text{ m}^3/\text{h}$ . El pH del cultivo es entonces de 7,30 y el volumen del mosto de 305 litros. La cantidad de donarubicina (13.057 R.P.) presente es de 22,5 microgramos/ $\text{cm}^3$ .

#### EJEMPLO 2

25. 200 litros de mosto de cultivo obtenido durante la fermentación descrita en el ejemplo 1 se envían a una cuba provista de un agitador y de un serpentín de calefacción de vapor. Se añaden 6 kg de ácido oxálico y se calienta la masa a  $50^\circ\text{C}$ . La agitación y la temperatura se mantienen durante 1 h. 30 minutos. Después de este tiempo la suspensión se filtra sobre filtro-prensa tras adición de 30 kg. de ad-

30.



yuvante de filtración. La torta se lava sobre el filtro con 100 litros de agua. El filtrado, cuyo volúmen es de 260 litros, se enfría a +15°C y el pH se ajusta a 4,5 por medio de lejía de sosa al 10 %.

5. El filtrado se envía sobre una columna que contiene 6 litros de Amberlite IRC-50 en ciclo ácido, de modo que atraviese el lecho de resina de arriba abajo con un caudal de 15 litros/hora. La columna se lava a continuación con 30 litros de agua que circula en el mismo sentido que el filtrado y al mismo caudal, después con 30 litros de metanol al 50 % de agua, con un caudal de 15 litros/hora que circula de abajo hacia arriba, después siempre con el mismo caudal y de abajo hacia arriba con 50 litros de metanol al 10 % de agua.

10. El efluente y los lavados se tiran y la columna se eluya con una solución que circula de arriba abajo a través de la resina y de la siguiente composición:

- Cloruro sódico ..... 10 g
- agua ..... 100 cm<sup>3</sup>
- metanol hasta completar.....1.000 cm<sup>3</sup>

15. El eluato se recoge a partir de que aparece una coloración roja-anaranjada y hasta que desaparece este color. Se obtiene así un volúmen de 50 litros que contienen la mayor parte del antibiótico.

20. El eluato se concentra bajo presión reducida (2 mm de mercurio) a 35°C hasta un volúmen de 10 litros.

El concentrado se extrae a pH 8,5 sucesivamente, 3 veces con 5 litros de cloroformo. El extracto clorofórmico se concentra a 30°C bajo presión reducida (5 mm de mercurio) hasta un volúmen de 50 cm<sup>3</sup>. El antibiótico se precipi-

30. El antibiótico se precipi-



373632

ta bajo forma de base con 500 cm<sup>3</sup> de hexano, se escurre, se lava y se seca. Se obtienen finalmente 4,9 g de base bruta que contiene 64 % de donوروبicina.

EJEMPLO 3

- 5. 6,8 g del producto obtenido en el ejemplo 2, y que tienen un contenido de 64 % de donوروبicina se suspenden en 40 cm<sup>3</sup> de agua y se disuelven por adición progresiva de 7 cm<sup>3</sup> de ácido clorhídrico normal, la solución se clarifica por filtración y el clorhidrato de donوروبicina cristaliza por adición lenta de 1 litro de acetona.

Los cristales así obtenidos se filtran, se lavan con 50 cm<sup>3</sup> de acetona y se secan a 50°C bajo presión reducida (5 mm de mercurio) durante 15 horas. Se obtienen 3,3 g de clorhidrato cristalizado, con un contenido de 90 % de donوروبicina con un rendimiento del 68 %.

15.

EJEMPLO 4

- 20. 3 g del producto obtenido en el ejemplo 3 se disuelven en 10 cm<sup>3</sup> de metanol, después se añaden progresivamente 100 cm<sup>3</sup> de cloroformo para provocar la cristalización del clorhidrato de donوروبicina. Los cristales así obtenidos se filtran, se lavan con 20 cm<sup>3</sup> de cloroformo y se secan a 50°C bajo presión reducida (5 mm de mercurio) durante 15 horas. Se obtienen 1,8 g de clorhidrato recristalizado con un contenido del 90 % en donوروبicina. La precipitación de las aguas-madres de cristalización por 200 cm<sup>3</sup> de hexano permite obtener una segunda fracción de donوروبicina. Tras filtración, lavado con 50 cm<sup>3</sup> de hexano y secado a 50°C bajo presión reducida (5 mm de mercurio), se obtiene 1 g de donوروبicina reciclable en las condiciones del ejemplo 3.
- 25.
- 30.



373632

EJEMPLO 5

5. 2,4 g del clorhidrato de donourubicina obtenido como se ha descrito en el ejemplo 4 se suspenden en 40 cm<sup>3</sup> de butanol. Tras una media hora de agitación los cristales se filtran, se lavan con 10 cm<sup>3</sup> de butanol y se secan a 60°C bajo presión reducida (0,5 mm de mercurio) durante 8 horas. Se obtienen 2,1 g de clorhidrato de donourubicina puro con un rendimiento del 88 %.

10-6-372

18



373632

T A B L A I

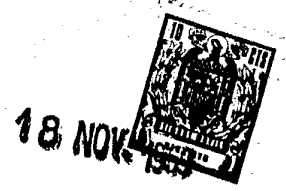
Medios de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo (M.v.) o envés del cultivo	Aparato aéreo (comprendiendo el conjunto del micelio aéreo y la esporulación)
Gelosa de Hickey y Tresner (Ref.A)	Bueno	M.v. pardo amarillento claro. Bien desarrollado	Gris claro. Muy moderadamente desarrollado
Gelosa de Bennett (Ref.B)	Bastante bueno	M.v. amarillento a pardo amarillento claro.	Nulo
Gelosa de Emerson (Ref. C)	Bastante bueno	M.v. amarillento a pardo amarillento claro	Nulo
Gelosa al extracto de levadura de Pridham (Ref. D)	Bueno	M.v. pardo anaranjado claro	Gris azul claro. Moderadamente desarrollado
Gelosa a la avena y al tomate de Pridham (Ref. E)	Bueno	M.v. pardo anaranjado claro	Gris azul. Bastante bien desarrollado
Gelosa glucosa-peptona (W-6)	Bastante bueno	M.v. anaranjado parduzco	Nulo
Gelosa nutritiva (W-5)	Muy moderado	M.v. amarillo parduzco claro	Nulo
Gelosa al malato de calcio de Krainsky (Ref.F)	Moderado	M.v. incoloro a rosa parduzco claro	Nulo

373632 18



Pigmento soluble	Observaciones y propiedades bioquímicas
Nulo	
Anaranjado rojizo claro	
Rosa anaranjado a rojo	
Pardo rosa violáceo claro	Hidrólisis del almidón: <u>positiva</u>
Pardo rojizo claro	Esporas cilíndricas que miden 0,4 a 0,5/1,0 a 1,2 $\mu$ . Filamentos esporiferados rectos o ligeramente flexuosos. Frecuentes esporoforos de forma bifurcada.
Rosa violáceo	Hidrólisis del almidón: <u>positiva</u>
Rosa pálido a anaranjado pálido	
Violeta púrpura intenso. Abundante	

BS



373632

Pigmento soluble	Observaciones y propiedades bioquímicas
Parduzco muy ligeramente rosado  Nulo	Esporas cilíndricas que miden 0,4 a 0,5 / 1,0 a 1,2 $\mu$ . Filamentos esporiferados rectos o ligeramente flexuosos. Frecuentes esporoforos de forma bifurcada
Pardo rosado débil	
Pardo anaranjado rojizo claro	
Pardo anaranjado	
Pardo anaranjado ligeramente rosado  Nulo	
Rosa grisáceo claro	Buena solubilización del malato de calcio



373632

TABLA I (continuación)

Medios de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo (M.v.) o envés del cultivo	Aparato aéreo (comprendiendo el conjunto del micelio aéreo y la esporulación)
Gelosa a la ovalbumina (W-12)	Pobre	M.v. incoloro a rosa claro	Nulo
Gelosa glucosa-asparagina (W-2)	Bastante bueno	M.v. pardo anaranjado claro a pardo rojo claro	Gris azul. Muy moderadamente desarrollado
Gelosa glicerina-asparagina (W-3)	Bastante bueno	M.v. amarillo pardo rosa a rojo	Gris rosa a gris azul. Muy pobremente desarrollado
Gelosa almidón-nitrato (W-10)	Moderado	M.v. rosa rojizo a pardo rosado claro	Grisáceo claro. Pobremente desarrollado
Gelosa al almidón de Pridham (Ref. G)	Bastante bueno	Envés pardo anaranjado rojizo	Gris azulado claro a gris rosado claro. Moderadamente desarrollado
Gelosa sintética de Czapek a la sacarosa (W-1)	Bueno	M.v. amarillento claro a rosa rojizo	Nulo
Gelosa sintética de Czapek a la glucosa (Ref. H)	Bueno	M.v. amarillento claro a pardo rosado claro	Nulo
Gelosa sintética de Czapek a la glicerina (Ref. I)	Bueno	M.v. roja violácea	Gris rosado a gris violáceo. Moderadamente desarrollado.

19 (BS)  
373632

18



Pigmento soluble	Observaciones y propiedades bioquímicas
Pardo rojizo	
Nulo	Liacuación positiva
Nulo	Reducción de los nitratos en nitritos: fuértemente positiva
Nulo	Reducción de los nitratos en nitritos: positiva
Nulo	Reducción de los nitratos en nitritos: positiva
Nulo	Reducción de los nitratos en nitritos: positiva
Nulo	Reducción de los nitratos en nitritos: positiva Utilización de la celulosa: positiva No se presenta coagulación Peptonización lenta, que comienza sólamente al cabo de un mes de cultivo. pH inmutable durante 1 mes
Rosa parduzco claro	Formación de melamina: negativa
Amarillo parduzco claro	Producción de H <sub>2</sub> S: negativa



# 373632 T A B L A I (continuación)

Medios de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo (M.v.) o envés del cultivo	Aparato aéreo (comprendiendo el conjunto del micelio aéreo y la esporulación)
Cultivo sobre patata (W-27)	Bueno	M.v. muy bien desarrollado, muy espeso y muy plegada.	Nulo
Gelatina pura al 12% (Ref.J)	Moderado	Parduzco claro a pardo rojizo claro M.v. blancuzco	Nulo
Caldo nutritivo nitrado (Ref. K)	Bastante bueno	Anillo amarillento	Nulo
Caldo glucosa-nitrato de Dimmick (Ref. L)	Moderado	Pequeñas colonias grisáceas que se aglomeran en la superficie	Nulo
Caldo de Czapek a la sacarina (W-18)	Medio	Velo rosado, espeso, bien desarrollado	Nulo
Caldo de Czapek a la glucosa (Ref.M)	Medio	Violeta rosado	Nulo
Caldo de Czapek a la celulosa (Ref.N)	Medio	Pequeñas colonias blanco rosado sobre el papel que emerge del caldo	Blanco-rosado
Leche descremada (Ref.O)	Bueno	Anillo amarillento	Nulo
Gelosa tirosina-extracto de levadura para formación de melanina (Ref.P)	Moderado	Rosa parduzco claro	Blanco-rosado a gris-rosado Moderadamente desarrollado
Gelosa de Tresner y Danga (Ref.Q)	Bueno	Amarillo parduzco claro	Nulo

20 ENE.



NOTA

373632

5. Describa suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una solicitud de Patente presentada en Francia con el nº PV.174.206 de 18 de noviembre de 1.968, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los  
10. Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita una Patente de Invención por 20 años, en España, sobre:  
PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE LA DONORUBICINA POR CULTIVO DE UN STREPTOMYCES, caracterizándose por lo siguiente:

15. 1.- Procedimiento para la preparación de la donoru bicina por cultivo de un streptomyces, más particularmente por cultivo aerobio de un streptomyces sobre un medio conveniente y en las condiciones habituales para este tipo de cultivo, caracterizado porque se cultiva Streptomyces bifurcus  
20. (NRRL 3539), y a continuación se separa la donorubicina formada en el transcurso del cultivo, se la purifica y se la transforma eventualmente en una sal.

25. 2.- Procedimiento para la preparación de la donoru bicina por cultivo de un streptomyces, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 21 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

20 ENE. 1972

RHONE-POULENC S.A.

L. GÓMEZ ACEBO Y MODEY  
E. de. Firmado: F. Hernández Ruiz