



ESPAÑA

19 ES	11 NUMERO	16 A I
	21 439.747	
	22 FECHA DE PRESENTACION	
	24-7-1975	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
Showa 49-86390	27-7-1974	Japón

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12B/A61K	

64 TITULO DE LA INVENCION

UN PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE ANTIBIOTICOS ANTITUMORALES ACLACINOMICINAS "A" y "B".

71 SOLICITANTE (S)

ZAIDANHOJIN BISEIBUTSU KAGAKU KENKYUKAI

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

23-go, 14-ban, 3-chome, Kamiosaki, Shinagawa-ku, TOKYO-TO, Japón.

72 INVENTOR (ES)

Hamao Umezawa; Tomio Takeuchi; Masa Hamada; Akira Takamatsu; Toshikazu Oki, los cuales han cedido sus derechos a la Cía. solicitante.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU



1 y después de caracterizarlos y purificarlos basándose en sus  
propiedades fisicoquímicas, confirmaron que estos antibióti-  
cos, ahora denominados aclacinomicina A y B, son nuevos com-  
puestos que presentan poca cardiotoxicidad y una potente ac-  
5 tividad antitumoral en diversos tumores animales y establecie-  
ron procedimientos y métodos para su producción y aislamien-  
to.

10 La patente estadounidense de Farmitalia sobre la  
adriamicina (B-106FI; 14-hidroxi-daunomicina; INN es  
Doxorubicina) es la 3.590.028 que reivindica el producto por  
su estructura y describe su fermentación directa por  
S. peuceticus var. caesius. Farmitalia también presentó la  
patente estadounidense 3.803.124 sobre la conversión química  
de la daunomicina en adriamicina; para la fermentación direc-  
15 ta de la daunomicina (como antibiótico FI 1762) por S.  
peuceticus véase la patente británica 1.003.383.

20 La daunomicina de Farmitalia (patente británica  
1.003.383) puede ser la misma que la 13.057 R.P. de Rhône-  
Poulenc (inicialmente rubidomicina y ahora Daunoribicin  
(patentes británicas 985.598, 1.188.262 y 1.241.750 y véase  
la patente estadounidense 3.616.242) y es "probablemente"  
idéntica a la danubomicina de Ciba (patente estadounidense  
3.092.550 y patente británica 901.830). Véase también la pa-  
tente estadounidense 3.686.163 sobre la dihidrodaunomicina.

25 La cinerubina A y la cinerubina B están descritas en  
la patente británica 846.130 y véase también la patente  
estadounidense 3.864.480 y el artículo de Keller-Schierlein  
y colaboradores en Antimicrobial Agents and Chemotherapy,  
pág. 68 (1970) y Chemical Abstracts, 54, 1466i (1960).  
30

1 Para otras descripciones ilustrativas y resumidas de  
los antibióticos de antraciclina véase el Index of Anti-  
biotics from Actinomycetes, Hamao Umezawa, Editor jefe,  
University Park Press, State College, Pennsylvania, Estados  
5 Unidos (1967) como sigue:

<u>Antibióticos</u>	<u>Número de página</u>
Aklavin	111
Cinerubina A	220
Cinerubina B	221
10 Danubomicina	242
Daunomicina	243
Pirromicina	542
Rodomicina A,B	561
Rubidomicina	574

15 El libro de texto "Antibiotics" Volumen I, Mechanism  
of Action, editado por David Gottlieb y Paul D. Shaw,  
Springer - Verlag New York, Inc., N.Y., N.Y. (1967), contie-  
ne en las páginas 190-210 una revisión realizada por A.  
DiMarco titulada "Daunomycin and Related Antibiotics".

20 El Boletín de Información nº 10, International Center  
of Information of Antibiotics, en colaboración con WHO,  
Diciembre 1972, Bélgica, revisa las antraciclinas y sus de-  
rivados.

25 Para una descripción de Streptomyces galilaeus, véase  
Arch. für Mikrobiol., 31, 356 (1958) e International Journal  
of Systematic Bacteriology, 22, 298 (1972).

30 Esta memoria, en la página 37, se refiere a las des-  
cripciones de K. Eckardt y colaboradores sobre las galiru-  
binas; véase Chemical Abstracts, 64, 3896g y 67, 90573z.

COMPENDIO DE LA INVENCION

1  
5  
10  
15  
Mediante esta invención se proveen los agentes anti-  
tumorales aclacinomicinas A y B. Estas sustancias son produ-  
cidas cultivando una cepa productora de aclacinomicina de  
Streptomyces galilaeus en una solución acuosa de hidratos  
de carbono que contiene nutrientes nitrogenados orgánicos,  
bajo condiciones aerobias sumergidas, hasta que se forma en  
dicha solución una cantidad sustancial de aclacinomicina A y  
B. La aclacinomicina A y B en los caldos cultivados así pro-  
ducidos puede ser extraída y purificada por los métodos con-  
vencionales utilizados para la extracción y purificación de  
los antibióticos insolubles en agua. Esta invención también  
comprende las aclacinomicinas A y B como sólidos crudos, co-  
mo sólidos purificados, como sus sales y como complejos con  
DNA.

Por lo tanto, mediante esta invención se proporciona  
el antibiótico antitumoral aclacinomicina A que:

20  
(a) es eficaz para inhibir el crecimiento de los ascis-  
tes y de las formas sólidas del carcinoma de Ehrlich; Sarco-  
ma 180, linfoma 6C3HED y leucemia L1210 y P388 en los rato-  
nes, hepatomas en las ratas y el virus de la vacuna en las  
células HeLa;

(b) es eficaz en la prevención del crecimiento de di-  
versas bacterias Gram-positivas y levaduras;

25  
(c) puede ser aislado como polvo microcristalino ama-  
rillo;

(d) es soluble en los disolventes orgánicos como meta-  
nol, cloroformo, etanol, acetato de etilo, acetona y benceno,  
ligeramente soluble en agua pero insoluble en éter, hexano y  
30 éter de petróleo;

1 (e) tiene un punto de fusión de 129° a 135°C y es ópticamente activo con un  $[\alpha]_D^{24} = +29^\circ$  (c: 1,0, CHCl<sub>3</sub>);

5 (f) presenta máximos de absorción ultravioleta y visible a 229,5, 258, 290 y 434 nm en metanol; 229,5, 258, 290 y 434 nm en HCl-metanol 0,1 N; 239,5, 288, 314 y 523 nm en NaOH-metanol 0,1 N;

10 (g) presenta máximos característicos en el espectro de absorción infrarrojo a 3300, 3080, 2940, 2860, 1740, 1640, 1620, 1540, 1460, 1450, 1415, 1385, 1295, 1250, 1220, 1195, 1165, 1125, 1105, 1090, 1010, 960, 930, 890, 840, 815, 760, 730, 580 y 450 cm<sup>-1</sup>;

(h) por hidrólisis ácida forma rodosamina, 2-desoxifucosa, cinerulosa A, 1-desoxipirromicina y aklavinona;

15 (i) es un glicósido de antraciclina débilmente básico, cuya fórmula empírica es C<sub>42</sub>H<sub>54</sub>NO<sub>15</sub>; y el antibiótico antitumoral aclacinomicina B que:

(a) es eficaz para inhibir el crecimiento de la leucemia L1210 y P388 en ratones y el virus de la vacuna en células HeLa;

20 (b) es eficaz para inhibir el crecimiento de las bacterias Gram-positivas y levaduras;

(c) puede ser aislado como polvo microcristalino amarillo;

25 (d) es soluble en metanol, acetato de etilo, cloroformo, etanol, acetona y benceno, ligeramente soluble en agua pero insoluble en éter, ciclohexano, hexano y éter de petróleo;

(e) tiene un punto de fusión de 135° a 145°C y es ópticamente activo con un  $[\alpha]_D^{24} = +3^\circ$  (c: 1,0, CHCl<sub>3</sub>);

30 (f) presenta máximos de absorción ultravioleta y visible a 229,5, 257,5, 290 y 433 nm en metanol, 229,5, 257,5,

1 290 y 433 nm en HCl-metanol 0,1 N, 238, 286 a 289, 315 y  
525 nm en NaOH-metanol 0,1 N;

(g) presenta máximos característicos en el espectro de  
absorción infrarrojo a 3300, 3070, 2940, 2850, 2750, 1740,  
5 1640, 1620, 1540, 1465, 1445, 1410, 1380, 1290, 1245, 1215,  
1160, 1120, 1095, 1050, 1010, 960, 920, 880, 840, 820, 805,  
750, 725, 700, 600, 580 y 450  $\text{cm}^{-1}$ ;

(h) forma aklavinona, rodosamina, 2-desoxifucosa,  
1-desoxipirromicina y el mismo disacárido metilado que la  
10 cinerubina B por hidrólisis ácida o hidrólisis parcial en  
metanol;

(i) es un glicósido de antraciclina débilmente básico  
de fórmula empírica  $\text{C}_{42}\text{H}_{52}\text{NO}_{15}$ .

Además, esta invención proporciona un procedimiento  
15 para la producción de los antibióticos antitumorales aclaci-  
nomicinas A y B, que consiste en cultivar una cepa produc-  
tora de aclacinomicina de Streptomyces galilaeus, con las ca-  
racterísticas de identificación del ATCC 31133, bajo condicio-  
nes aerobias sumergidas, en un medio nutriente que contiene  
20 fuentes de carbono y nutrientes nitrogenados, hasta que di-  
cho organismo produce en el citado medio nutriente una can-  
tidad sustancial de aclacinomicina A y B y preferiblemente  
cultivando en un medio nutriente, a una temperatura compren-  
dida entre 20 y 35°C o todavía mejor a una temperatura com-  
25 prendida entre 25 y 30°C, con un pH de 5 a 8 y después, si  
se desea, recuperando las aclacinomicinas del medio de cultivo  
mediante un procedimiento que incluye por lo menos un proce-  
so seleccionado entre el grupo formado por extracción con  
disolventes, precipitación con disolventes, concentración,  
30 filtración de gel, distribución en contracorriente, quelata-

1 ción con iones metálicos y adsorción seguida de elución en una resina cambiadora de ión, un material de tierra silíceo adsorbente o un adsorbente sintético.

5 Los procedimientos de esta invención incluyen un proceso en el que la solución que contiene las aclacinomicinas es liofilizada y un proceso en el que la solución que contiene las aclacinomicinas es liofilizada después de la adición de por lo menos una sustancia seleccionada entre el grupo formado por ácido desoxirribonucléico, glicerol, azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos e inorgánicos.

#### DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

15 La Fig. 1 muestra el espectro de absorción ultravioleta de la aclacinomicina A, donde A indica el espectro en metanol; B indica el espectro en HCl-metanol 0,1 N y C indica el espectro en NaOH-metanol 0,1 N.

La Fig. 2 es el espectro de absorción infrarrojo de la aclacinomicina A cuando está en forma de pastillas en bromuro potásico.

20 La Fig. 3 es el espectro RMN de la aclacinomicina A en  $\text{CDCl}_3$  (100 MHz, referencia interna: TMS).

La Fig. 4 es el espectro de absorción ultravioleta de la aclacinomicina B, donde A es el espectro en metanol; B es el espectro en HCl-metanol 0,1 N y C es el espectro en NaOH-metanol 0,1 N.

25 La Fig. 5 muestra el espectro de absorción infrarrojo de la aclacinomicina B en forma de pastillas en bromuro potásico.

30 La Fig. 6 es el espectro RMN de la aclacinomicina B en  $\text{CDCl}_3$  (100 MHz, referencia interna: TMS).

DESCRIPCION DETALLADA

1 Las aclacinomicinas A y B prolongan marcadamente la vida  
y mejora el estado de los ratones inoculados con leucemia  
L1210 y P388 y células de linfoma 6C3HED y presenta elevadas  
5 dosis letales ( $DL_{50}$ ) en ratas, ratones y conejos y una car-  
diotoxicidad extraordinariamente baja en los hamsters. Más  
especialmente, las sustancias produjeron un notable efecto  
inhibitorio del crecimiento de varias células tumorales en  
cultivo, resultante de la inhibición específica de la síntesis  
10 del RNA y tienen también una intensa actividad antimicrobiana  
contra las bacterias y levaduras.

Las aclacinomicinas A y B se obtienen como polvos mi-  
crocristalinos amarillos de fórmulas empíricas  $C_{42}H_{54}O_{15}N$   
y  $C_{42}H_{52}O_{15}N$ , respectivamente y forman aklavinona, rodosami-  
15 na, 2-desoxifucosa, 1-desoxipirromicina y cinerulosa A a par-  
tir de aclacinomicina A y aklavinona, rodosamina, 2-desoxi-  
fucosa, 1-desoxipirromicina y el mismo disacárido metilado  
que la cinerubina B a partir de la aclacinomicina B por hi-  
drólisis ácida o hidrólisis parcial en metanol, siendo di-  
20 chas sustancias solubles en metanol, etanol, cloroformo, ace-  
tona, acetato de etilo, benceno y similares, ligeramente so-  
lubles en agua pero insolubles en hexano, ciclohexano, éter  
y éter de petróleo, presentando máximos de absorción caracte-  
rísticos en la región infrarroja cuando se utiliza una pas-  
25 tilla con bromuro potásico y en la luz ultravioleta y visi-  
ble, como muestran las Figuras 1, 2, 4 y 5, con espectros de  
absorción RMN esencialmente como los indicados en las Figu-  
ras 3 y 6, una rotación específica en cloroformo y un punto  
de fusión respectivamente de  $+29^{\circ}$  y  $129^{\circ}$  a  $135^{\circ}C$  para la  
30 aclacinomicina A y  $+3^{\circ}$  y  $135^{\circ}$  a  $145^{\circ}C$  para la aclacinomici-

1 na B, respectivamente.

Además, de acuerdo con esta invención, se proporciona un procedimiento para la producción de los antibióticos antitumorales aclacinomicinas A y B, que consiste en cultivar una cepa de Streptomyces galilaeus en un medio acuoso que contiene fuentes de carbono y fuentes de nitrógeno, bajo condiciones aerobias, hasta que se acumula en dicha solución una cantidad sustancial de aclacinomicinas y después recuperar dichas aclacinomicinas de dicha solución utilizando los métodos de adsorción en un cambiador de ión, un material de tierra silícea adsorbente y adsorbentes sintéticos, extracción con disolventes, precipitación con disolventes, distribución en contracorriente, etc. y combinaciones de estos métodos.

Aunque son conocidos varios antibióticos del tipo de glicósido de antraciclina, v.g. adriamicina, daunomicina, carminomicina, rodomicina, pirromicina, aklavina, etc., las aclacinomicinas producidas por el procedimiento de esta invención son claramente diferentes de cualquiera de ellas en las características de fórmula molecular, productos de degradación por hidrólisis ácida, espectros de absorción ultravioleta, visible, infrarrojo RMN y similares, como ya se ha dicho. Además, su gran actividad antitumoral y cardiotoxicidad notablemente baja son características no presentadas por ninguno de los antibióticos antitumorales de glicósido de antraciclina.

El organismo productor de los antibióticos aclacinomicinas A y B de esta invención fue aislado de una muestra de tierra recogida en Osaki, Shinagawa-ku, Tokyo, Japón. Un cultivo de MA144-M1 fue depositado en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland y en el Fermentation Research

1 Institute, Japón, y agregado a sus colecciones permanentes  
de microorganismos como ATCC nº 31133 y FERM nº 2455, respec-  
tivamente.

La cepa nº MA144-M1 tiene las siguientes propiedades:

5 (1) Propiedades morfológicas:

Bajo el microscopio, se observan espirales abiertas  
que se desarrollan bien a partir de micelios de substrato ra-  
mificados. No hay vértices y la cadena de esporas madura  
es moderadamente larga con más de diez esporas. Las esporas  
10 son elipsoidales y miden 0,4 a 0,8 micras x 0,8 a 1,6 micras  
y su superficie es lisa.

(2) Propiedades en diversos medios:

La descripción entre paréntesis sigue al patrón de  
color del "Color Harmony Manual" publicado por Container  
15 Corporation of America, Estados Unidos.

(a) Sobre agar glucosa-asparagina, incubado a 27°C:  
crecimiento marrón amarillento claro (3 gc, tostado claro);  
sin micelio aéreo; sin pigmento soluble.

20 (b) Sobre agar sacarosa-asparagina, incubado a 27°C:  
crecimiento incoloro o marrón amarillento claro (3 gc, tos-  
tado claro); sin micelio aéreo; sin pigmento soluble.

(c) Sobre agar glicerol-asparagina (medio ISP nº 5),  
incubado a 27°C: crecimiento naranja amarillento (4ic, tos-  
tado solar) a marrón (5 lg, marrón cacao); micelio aéreo blan-  
co a gris claro (2fe, gris sarga); pigmento soluble marrón.  
25

(d) Sobre agar almidón-sales inorgánicas (medio ISP  
nº 4), incubado a 27°C: crecimiento naranja pálido (3ea, ama-  
rillo melón claro) a marrón amarillento pálido (3ie, camello);  
micelio aéreo gris claro (2fe, gris sarga) a gris (e, gris);  
30

1 pigmento marrón soluble.

(e) Sobre agar tirosina (medio ISP nº 7), incubado a 27°C: micelio aéreo gris parduzco (3li, castor) a marrón (4lg, tostado de pan); pigmento negro soluble.

5 (f) Sobre agar nutriente, incubado a 27°C: crecimiento incoloro a marrón grisáceo; sin micelio aéreo; pigmento marrón soluble.

(g) Sobre agar extracto de levadura-extracto de malta (medio ISP nº 2), incubado a 27°C: crecimiento marrón claro (4le, arce) a marrón (4ng, marrón claro); micelio aéreo gris claro (3fe, gris plata) a gris (3ih, gris beige); pigmento marrón soluble.

15 (h) Sobre agar harina de avena (medio ISP nº 3), incubado a 27°C: crecimiento incoloro a marrón amarillento pálido (2gc, bambú); micelio aéreo gris claro (3fe, gris plata); pigmento marrón soluble.

(i) Sobre agar glicerol-nitrato, incubado a 27°C: crecimiento incoloro a marrón amarillento pálido (3gc, tostado claro) o gris oliva claro (2db, pergamino); sin micelio aéreo; sin pigmento soluble.

20 (j) Sobre agar almidón, incubado a 27°C: crecimiento marrón amarillento pálido (3gc, tostado claro); micelio aéreo gris (e, gris); ligero pigmento soluble marrón.

25 (k) Sobre agar malato cálcico, incubado a 27°C: crecimiento incoloro; micelio aéreo blanco grisáceo (b, blanco ostra) a gris parduzco claro (3dc, natural); sin pigmento soluble.

30 (l) Sobre placa de gelatina, incubado a 20°C: crecimiento marrón pálido a marrón amarillento pálido; micelio aéreo blanco; pigmento marrón soluble.

1 (m) Sobre placa de glucosa-peptona-gelatina, incubado a 27°C: crecimiento marrón pálido a marrón; sin micelio aéreo; pigmento marrón soluble.

5 (n) Sobre leche descremada, incubado a 37°C: crecimiento marrón pálido a marrón; sin micelio aéreo; pigmento marrón soluble.

(3) Propiedades fisiológicas:

10 (a) Se examinó la temperatura de crecimiento sobre agar maltosa-extracto de levadura (maltosa 1,0 %, extracto de levadura 0,4 %, agar 3,5 %, pH 6,0) a 20, 24, 27, 30, 37 y 50°C. La temperatura óptima para el crecimiento es de 27 a 37°C y no hay crecimiento a 50°C.

15 (b) Licuefacción de la gelatina sobre placa de gelatina al 15 % a 20°C y sobre placa de glucosa-peptona-gelatina a 27°C. Sobre el primer medio, se observó débilmente la licuefacción de gelatina al cabo de 14 días de incubación pero sobre el último, se observó una licuefacción débil o moderada al cabo de 7 días.

20 (c) Hidrólisis del almidón sobre agar de almidón-sales inorgánicas a 27°C. Al cabo de 5 días de incubación se observó una hidrólisis débil.

25 (d) Peptonización y coagulación de la leche descremada a 37°C. Comenzó al cabo de 5 días de incubación una peptonización de moderada a intensa y acabó alrededor de los 17 días. Sin coagulación.

30 (e) Formación de melanina sobre agar tirosina (medio ISP nº 7), caldo de tirosina-extracto de levadura (medio ISP nº 1) y peptona-extracto de levadura-agar ferroso (medio ISP nº 6) a 27°C: positiva en todos los medios.

(f) Licuefacción del malato cálcico sobre agar malato

1 cálcico a 27°C. Fuertemente positiva.

(g) Reducción de nitrato sobre agar peptona conteniendo 1,0 % de nitrato sódico (medio ISP nº 8) a 27°C. Positiva.

5 (h) Utilización de hidratos de carbono del medio basal Pridham-Gottlieb (medio ISP nº 9), incubado a 27°C. Crecimiento abundante con L-arabinosa, D-xilosa, glucosa, D-fructosa, sacarosa, inositol, L-ramnosa y rafinosa; no se produjo crecimiento con D-manitol.

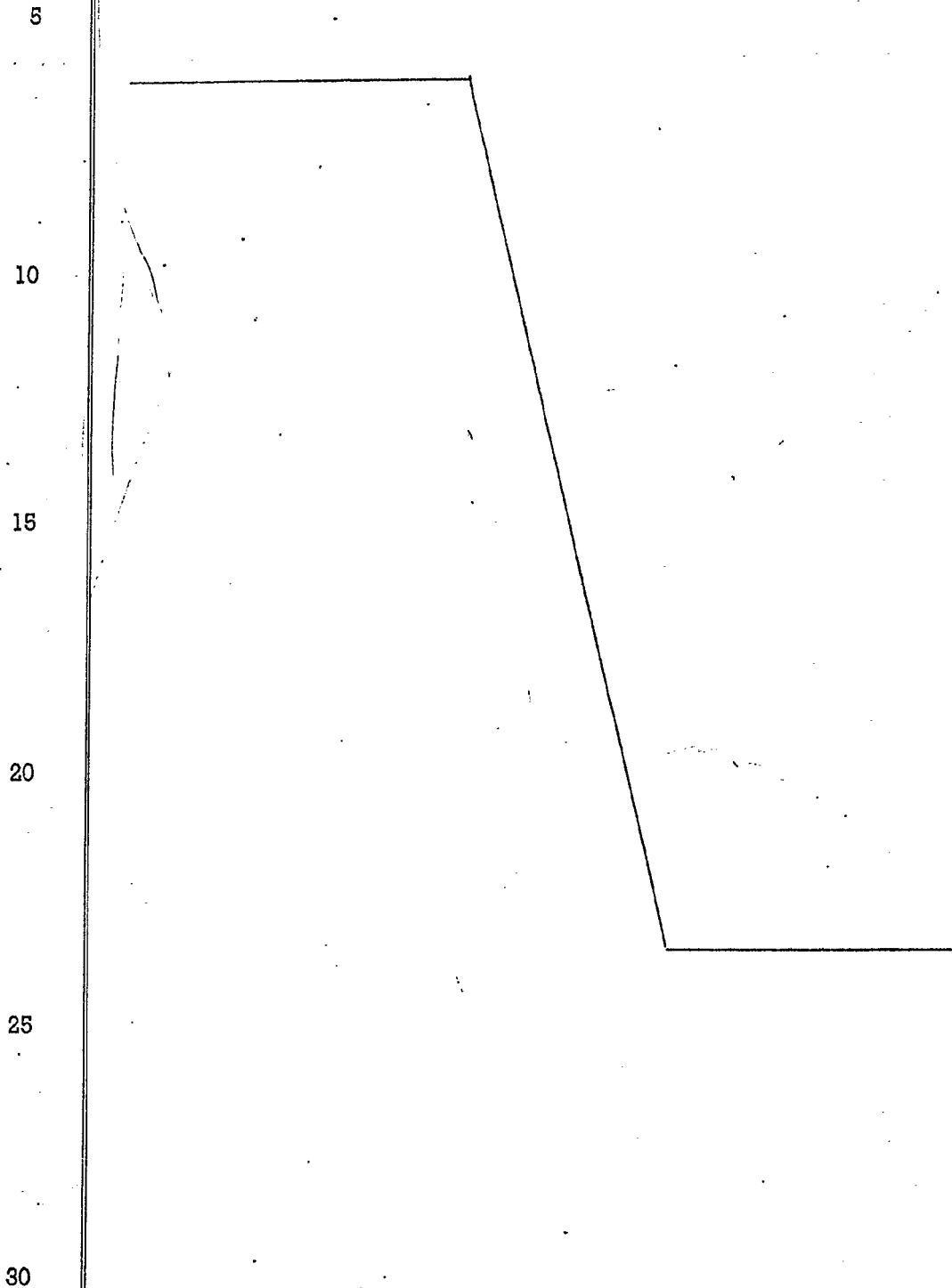
10 Resumiendo las características anteriores del número MA144-M1, la cepa pertenece al género Streptomyces y al tipo cromogénico y produce pigmento marrón soluble sobre diversos medios de agar. El micelio aéreo forma espirales abiertas pero no vórtices. La superficie de las esporas es lisa. Se  
15 ha encontrado que el crecimiento sobre diversos medios es de marrón amarillento pálido a marrón en general pero oliva en unos pocos medios y el micelio aéreo es gris claro. El nitrato es reducido a nitrito. La acción proteolítica es entre débil y moderada y la hidrólisis del almidón es relativamente débil. Se produce melanina sobre agar tirosina, caldo de tirosina-extracto de levadura y peptona-extracto de le-  
20 vadura-agar ferroso.

Entre las especies conocidas de Streptomyces, la cepa nº MA-144-M1 se parece al Streptomyces galilaeus.

25 Referencia 1: Archiv für Mikrobiologie, 31, 356, 1958.

Referencia 2: International Journal of Systematic Bacteriology, 22, 298, 1972. Prestando especial atención a la diferenciación basada en la morfología, el color del micelio aéreo y otras propiedades fisiológicas, se investigó  
30 mediante cultivos paralelos las diferencias obtenidas entre

1 esta cepa y la cepa patrón de S. galilaeus ISP 5481. Los re-  
sultados son los siguientes:



	MA144-M1	<u>Streptomyces</u> <u>galilaeus</u> ISP 5431	Referencia 1	Referencia 2
1	Superficie de las esporas	lisa	lisa	lisa
5	Cadena de esporas	espirales abiertas	espirales	espirales
	Micelio aéreo	gris claro	blanco grisáceo a gris	gris
	Crecimiento	marrón amarillento pálido a marrón, algunas veces oliváceo claro	amarillo pálido a rojo rubi intenso	amarillo grisáceo- marrón amarillento- marrón oliváceo
10	Pigmento soluble	marrón	marrón pálido	amarillo pálido
	Formación de melanina:			
	Medio ISP nº 1	positiva	positiva	positiva
	Medio ISP nº 6	positiva	probablemente positiva	positiva
	Medio ISP nº 7	positiva	positiva	positiva
15	Hidrólisis del almidón	débil	débil	×
	Liquefacción de la gelatina:			
	Placa de gelatina	débil	débil	×
	Placa de glucosa-peptona-gelatina	entre débil y moderada	entre débil y moderada	
20	Peptonización de la leche	entre moderada e intensa	moderada	×
	Coagulación de la leche	negativa	negativa	×
	Reducción de nitratos	positiva	positiva	×
	Utilización de hidratos de carbono:			
	L-Arabinosa	positiva	positiva	positiva
	D-Xilosa	positiva	positiva	positiva
	Glucosa	positiva	positiva	positiva
25	D-Fructosa	positiva	positiva	positiva
	Sacarosa	positiva	positiva	positiva
	Inositol	positiva	positiva	positiva
	L-Ramnosa	positiva	positiva	positiva
	Rafinosa	positiva	positiva	positiva
	D-Manitol	negativa	negativa	negativa

× no hay datos.

1

S

MA144-M1

Superficie de las esporas

lisa

lis

Cadena de esporas

espirales  
abiertas

esp

5

Micelio aéreo

gris claro

gri

Crecimiento

marrón amarillento pálido a marrón, algunas veces oliva claro

ma  
to  
gr  
va

10

Pigmento soluble

marrón

ma

Formación de melanina:

Medio ISP nº 1

positiva

p

Medio ISP nº 6

positiva

p  
p

Medio ISP nº 7

positiva

p

15

Hidrólisis del almidón

débil

d

Licuefacción de la gelatina:

Placa de gelatina

débil

d

Placa de glucosa-peptona-gelatina

entre débil y moderada

e  
m

20

Peptonización de la leche

entre moderada e intensa

m

Coagulación de la leche

negativa

r

Reducción de nitratos

positiva

l

Utilización de hidratos de carbono:

25

L-Arabinosa

positiva

l

D-Xilosa

positiva

l

Glucosa

positiva

l

D-Fructosa

positiva

l

Sacarosa

positiva

l

Inositol

positiva

l

L-Ramnosa

positiva

l

Rafinosa

positiva

l

D-Manitol

negativa

l

\* no hay datos.

30



1 Según estos resultados, la cepa de esta invención con-  
cuerda muy estrechamente con el S. galilaeus ISP 5481 en mor-  
fología y color del crecimiento y micelio sobre diversos me-  
5 dios y en propiedades fisiológicas. Además, existe simili-  
tud de ambas cepas en los productos de fermentación; es de-  
cir, la cinerubina que puede ser producida por S. galilaeus  
es uno de los subproductos de la cepa de esta invención. Por  
lo tanto, la cepa nº MA144-M1 puede ser identificada como  
Streptomyces galilaeus.

10 Como los Streptomyces son fácilmente mutables, natural  
o artificialmente, el S. galilaeus nº MA144-M1 en esta inven-  
ción incluye la cepa típica antes descrita y todas las varian-  
tes y mutantes naturales y artificiales de la misma. Es de-  
cir, el S. galilaeus nº MA144-M1 de esta invención incluye  
15 todas las cepas productoras de aclacinomicina. Como en el  
caso de los antibióticos conocidos, se prevé que puede conse-  
guirse una producción mayor de aclacinomicina mediante la  
selección de cepas altamente productoras después de una sim-  
ple selección de colonias, por tratamiento de una cepa pro-  
20 ductora de aclacinomicina con diversos mutágenos o por los  
procedimientos genéticos de recombinación, transformación o  
transducción.

25 Las aclacinomicinas son producidas por cultivo de  
S. galilaeus bajo condiciones adecuadas. Los procedimientos  
generales utilizados para el cultivo de otros actinomicetes  
son aplicables al cultivo de S. galilaeus. Se prepara un cal-  
do de fermentación conteniendo aclacinomicina por inocula-  
ción de esporas o micelios del organismo productor de acla-  
cinomicina en un medio adecuado y después cultivándolo en  
30

1 condiciones aerobias. Aunque es posible el cultivo en un me-  
dio sólido para la producción de aclacinomicina, es especial-  
mente ventajoso el cultivo aerobio sumergido para la produc-  
ción de grandes cantidades de los antibióticos. Son útiles  
5 los medios constituidos por clases conocidas de fuentes nu-  
tritivas de los actinomicetes. El medio contiene preferible-  
mente productos comerciales como glicerol, glucosa, almidón,  
dextrina, maltosa, melazas, aceites, grasas, lípidos y si-  
milares como fuentes de carbono en estado crudo o purificado  
10 y, como fuentes de nitrógeno, productos comerciales como ha-  
rina de soja, extracto de malta, peptona, extracto de leva-  
dura, solubles de destilería, harina de pescado, harina de  
gluten, licor de infusión de maíz, harina de semilla de al-  
godón, caseína, sustancias protéicas hidrolizadas, nitratos,  
15 sales amónicas, urea y similares y sales inorgánicas como  
cloruro sódico, cloruro potásico, fosfato potásico, sulfato  
magnésico, carbonato cálcico y cantidades traza de sales de  
metales pesados como cobre, cinc, manganeso, hierro y simi-  
lares. En el cultivo sumergido aireado, se utiliza un anti-  
20 espumante como parafina líquida, aceite de soja, grasa o si-  
licona. Puede emplearse cualquier temperatura de fermenta-  
ción dentro del intervalo de 20 a 35°C, en el que puede de-  
sarrollarse el organismo productor de aclacinomicina, aunque  
el intervalo más preferido de temperatura es de 25 a 30°C.  
25 El pH del medio de cultivo oscila entre 5 y 8,0.

Salvo indicación en contrario, el método de cultivo  
y el método de ensayo son los siguientes:

30 (1) Cultivo sacudido: 100 ml de medio en un matraz  
Sakaguchi o 50 ml de medio en un matraz Erlenmeyer de 500 ml  
se esterilizan a 120°C durante 15 minutos. Se inoculan en

1 el medio esterilizado unas esporas o micelios de un orga-  
nismo productor de aclacinomicina, procedente de un cultivo  
inclinado de agar, mediante un aro de platino y se cultiva a  
28°C durante 4 días en un sacudidor recíproco o rotatorio.

5 (2) Cultivo en tanque: Se preparan 100 litros de medio  
en un fermentador de 200 litros y se esteriliza a 120°C du-  
rante 15 minutos. El medio esterilizado se inocula con 2 li-  
tros de caldo de cultivo que previamente se ha cultivado por  
sacudida durante 2 días. La fermentación transcurre en el  
10 tanque bajo una aireación de 50 litros de aire estéril por  
minuto, agitando a 160 rpm durante 2 días. Como antiespumante  
se utilizan aceite de silicona y parafina líquida.

15 (3) Análisis de la aclacinomicina: Método de cromato-  
grafía en capa fina-cromatoexplorador: Se depositan manchas  
de las aclacinomicinas A y B extraídas del caldo de cultivo,  
micelios o filtrado del cultivo por acetona, acetato de etilo  
o una mezcla de cloroformo-metanol sobre una placa de  
gel de sílice (Kieselgel 60F<sub>254</sub>, Merck, Co.) de 5 mm de diá-  
metro. Al cabo de 15 minutos de saturación en la vasiija de  
20 desarrollo, la placa de cromatografía en capa fina se de-  
sarrolla en acetona ascendente hasta 15 cm a la temperatura  
ambiente. Se determinan las manchas correspondientes a las  
aclacinomicinas A y B por densidad óptica a 430 nm, utilizan-  
do un explorador de cromatografía en capa fina de longitud  
25 de onda doble Shimadzu, modelo CS-900, bajo ciertas condi-  
ciones, exploración en zig-zag a 430 nm-700 nm, ranura de  
1,25 x 1,25 mm, a una velocidad de la exploración y del grá-  
fico de 10 mm/minuto. Previamente se han preparado curvas  
patrón de aclacinomicinas A y B purificadas, que oscilan en-  
30 tre 0,2 y 15 mcg/mancha.

1

La cepa productora de aclacinomicina fue cultivada primero con sacudidas en el siguiente medio:

5

El medio basal estaba constituido por 1 % de glucosa, 1 % de almidón de patata, 1,5 % de "Prorich" (harina de soja, producto de Ajinomoto Co.), 0,1 % de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 % de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 % de  $\text{NaCl}$ , 0,0007 % de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,0001 % de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0008 % de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y 0,0002 % de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y se ajustó a pH 7,0.

10

El caldo de cultivo al cuarto día presentaba la acumulación de 45 mcg/ml de aclacinomicina A y 15 mcg/ml de aclacinomicina B.

15

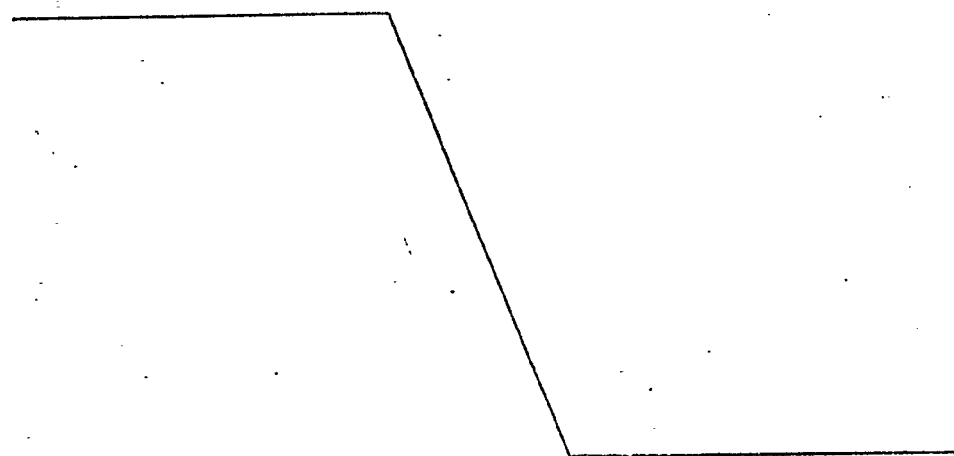
Las aclacinomicinas A y B fueron producidas en medios que contenían diversas fuentes de carbono y nitrógeno, bajo sacudidas, como indican los ejemplos descritos a continuación:

20

(1) Se agregaron diversas fuentes de carbono al medio basal constituido por 1,5 % de "Prorich" y otras sales, como sigue:

25

30



Aclacinomicina A presente en los tiempos indicados

	2 días		3 días		4 días	
	pH	mcg/ml	pH	mcg/ml	pH	mcg/ml
2 % de glucosa	7,3	27	7,4	38	8,0	41
2 % de maltosa	6,6	15	6,0	28	7,0	32
2 % de sacarosa	7,3	32	7,7	39	8,2	40
2 % de almidón soluble	7,4	35	7,4	28	7,9	33
2 % de almidón de patata	7,2	36	7,6	33	8,1	42
1 % de glucosa + 1 % de almidón de patata	6,3	32	7,7	34	8,3	43
1 % de glucosa + 1 % de maltosa	7,4	26	6,7	28	7,7	30
1 % de glucosa + 1 % de sacarosa	7,3	26	7,6	30	7,8	32
1 % de glucosa + 1 % de almidón soluble	7,1	37	7,9	37	8,4	39
1 % de glucosa + 1 % de glicerol	4,9	36	6,3	36	8,1	41

(2) Se añadieron diversas fuentes de nitrógeno al medio basal constituido por 1 % de glucosa, 1 % de almidón de patata y otras sales, como sigue:

Aclacinomicina A presente en los tiempos indicados

	2 días		3 días		4 días	
	pH	mcg/ml	pH	mcg/ml	pH	mcg/ml
1,5 % de "Frorich" (harina de soja, Ajinomoto Co.)	6,3	34	7,0	48	8,0	45
1,5 % "Meat" (harina de soja, Ajinomoto Co.)	5,8	37	7,1	54	8,1	48
1,5 % de extracto de malta	6,2	9	6,6	7	6,6	13
1,5 % de extracto de levadura	5,4	45	7,7	43	8,5	40
1,5 % de casaminoácido	6,9	18	8,0	21	8,3	22
1,5 % de extracto de buey	5,6	9	7,2	32	8,2	36
1,5 % de polipeptona	6,2	38	8,2	28	8,6	23

1

5

10

15

20

25

30

1

Aclacinomicina A pr2 díaspH

	2 % de glucosa	7,3
5	2 % de maltosa	6,6
	2 % de sacarosa	7,3
	2 % de almidón soluble	7,4
	2 % de almidón de patata	7,2
	1 % de glucosa + 1 % de almidón de patata	6,3
10	1 % de glucosa + 1 % de maltosa	7,4
	1 % de glucosa + 1 % de sacarosa	7,3
	1 % de glucosa + 1 % de almidón soluble	7,1
	1 % de glucosa + 1 % de glicerol	4,9

15

(2) Se añadieron diversas fuentes de nitrógeno, almidón de patata y otras sales, como sigue:

Aclacinomicina A pr2 díaspH

20	1,5 % de "Prorich" (harina de soja, Ajinomoto Co.)	6,3
	1,5 % "Meat" (harina de soja, Ajinomoto Co.)	5,8
	1,5 % de extracto de malta	6,2
	1,5 % de extracto de levadura	5,4
	1,5 % de casaminoácido	6,9
25	1,5 % de extracto de buey	5,6
	1,5 % de polipeptona	6,2

30

Aclacinomicina A presente en los tiempos indicados

	2 días		3 días		4 días	
	pH	mcg/ml	pH	mcg/ml	pH	mcg/ml
	7,3	27	7,4	38	8,0	41
	6,6	15	6,0	28	7,0	32
	7,3	32	7,7	39	8,2	40
	7,4	35	7,4	28	7,9	33
	7,2	36	7,6	33	8,1	42
bidón de patata	6,3	32	7,7	34	8,3	43
atosa	7,4	26	6,7	28	7,7	30
arosa	7,3	26	7,6	30	7,8	32
bidón soluble	7,1	37	7,9	37	8,4	39
icerol	4,9	36	6,3	36	8,1	41

diversas fuentes de nitrógeno al medio basal constituido por 1 % de glucosa, 1 % de sales, como sigue:

Aclacinomicina A presente en los tiempos indicados

	2 días		3 días		4 días	
	pH	mcg/ml	pH	mcg/ml	pH	mcg/ml
de soja,	6,3	34	7,0	48	8,0	45
ja, Ajino-	5,8	37	7,1	54	8,1	48
	6,2	9	6,6	7	6,6	13
ura	5,4	45	7,7	43	8,5	40
	6,9	18	8,0	21	8,3	22
	5,6	9	7,2	32	8,2	36
	6,2	38	8,2	28	8,6	23

(3) Cuando se modifican las concentraciones de fuentes de carbono y de nitrógeno en el medio basal, las aclacinomicinas A y B se acumulan como sigue:

		Fuente de carbono, %					
		1		2		3	
5	Glucosa						
	Almidón de patata						
		1		2		3	
		A	B	A	B	A	B
	"Prorich" 1,5 %	33	23	36	19	-	-
	2,5 %	31	39	39	28	51	34
	"Meat" 1,5 %	32	19	48	31	-	-
	2,5 %	17	24	43	28	58	29

\* aclacinomicina A o B: mcg/ml.

Los resultados anteriores son simples ejemplos y puede decirse que las fuentes de carbono como glucosa, almidón, maltosa y sacarosa son favorables para la producción de aclacinomicina y que las fuentes de nitrógeno como harina de soja, extracto de levadura, extracto de buey y peptona son adecuadas.

Quando la fermentación se realiza a 28°C con sacudidas, utilizando uno de los medios adecuados a pH 6,9, es decir, 2 % de glucosa, 2 % de almidón de patata, 2,5 % de "Meat", 0,1 % de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 % de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0007 % de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,0001 % de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0008 % de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y 0,0002 % de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , el pH del medio desciende a 5,25-5,10 en 20 horas y el crecimiento del micelio aumenta al cabo de 10 horas después de la inoculación.

A continuación, el pH asciende a 7,0-7,5 a los 3 días y las aclacinomicinas A y B alcanzan un máximo, es decir 46 mcg/ml de A y 23 mcg/ml de B, en el caldo. Para aislar la aclacinomicina, el antibiótico puede ser extraído con un

1 disolvente adecuado ya sea del caldo de cultivo completo,  
sin filtrar la masa de micelio o del micelio y el líquido  
de cultivo previamente separados por filtración. La mayor  
5 parte de los antibióticos se encuentran en la torta de fil-  
tración constituida por el micelio mezclado con la tierra de  
diatomeas. A continuación la torta del filtro se transforma  
en pulpa y se agita en un disolvente orgánico para extraer  
los antibióticos. Los disolventes adecuados son los alcoh-  
10 les como metanol, etanol o butanol; cetonas como acetona  
y metil-etil-cetona, hidrocarburos halogenados como cloro-  
formo, cloruro de metileno, benceno o soluciones acuosas de  
ácidos orgánicos o inorgánicos como ácido acético, ácido  
clorhídrico y ácido sulfúrico. Son preferidos la acetona,  
15 el acetato de etilo, mezclas de disolventes orgánicos como  
los alcoholes y cetonas no miscibles con agua y las solu-  
ciones acuosas de ácidos orgánicos o inorgánicos.

Para extraer los antibióticos del filtrado, es ven-  
20 tajoso añadir al filtrado débilmente ácido o neutro un volu-  
men doble de un disolvente orgánico no miscible con agua  
como butanol, cloroformo, acetato de etilo, acetato de bu-  
tilo o benceno. Entre los métodos de separación de la acla-  
cinomicina, los más eficaces pueden ser efectuados por cro-  
matografía de distribución en contracorriente, utilizando  
25 ácido silícico, alúmina, Sephadex LH20 (Pharmacia Fine  
Chemicals AB, Uppsala, Suecia) o adsorbentes sintéticos,  
adsorción sobre carbón activo y similares y la combinación  
de extracción con disolvente y estos métodos.

Los antibióticos pueden ser directamente extraídos  
30 del caldo del cultivo por los métodos antes mencionados,  
sin separar el micelio.

1            Después de concentrar a vacío, los extractos se lle-  
van a pH 5-7 y se vuelven a extraer con un disolvente no mis-  
cible con agua, por ejemplo n-butanol, alcohol amílico, ace-  
tato de etilo, cloroformo, benceno, cloruro de metileno,  
5            metil-propil-cetona y similares. La sustancia cruda activa  
se obtiene de la solución orgánica no miscible con agua en  
forma de polvo amarillo por concentración a vacío hasta volu-  
men reducido y precipitación con disolventes poco polares,  
por ejemplo hidrocarburos saturados como n-hexano, ciclohe-  
xano y éter de petróleo o éteres como éter dietílico y éter  
10            dipropílico.

            Para separar otras sustancias pigmentadas como cine-  
rubina A y B de la sustancia cruda activa y obtener las  
aclacinomicinas A y B puras, puede efectuarse una purifica-  
15            ción posterior por cromatografía de columna utilizando di-  
versos adsorbentes como ácido silícico, alúmina, Sephadex  
LH20, resinas cambiadoras de ión como resinas débilmente  
ácidas y resinas de matriz reticulada de poliestireno-  
divinilbenceno como Amberlite XAD, quelatación con diversos  
20            metales como iones cúprico, ferroso, férrico, cálcico y  
magnésico y combinaciones de por lo menos uno o más procedi-  
mientos seleccionados entre los métodos de quelatación con  
iones metálicos, precipitación con disolventes, extracción  
con disolventes, distribución en contracorriente, etc.

25            Por ejemplo, cuando las aclacinomicinas A y B crudas  
se disuelven en una pequeña cantidad de cloroformo, se some-  
ten a una columna de ácido silícico y después se eluyen con  
una mezcla de cloroformo-metanol, primero se eluye la frac-  
ción de aclacinomicina B con una mezcla 50:1 de cloroformo-  
30            metanol y después se eluye la aclacinomicina A con la mezcla

1 anterior en la proporción de 30:1 a 20:1. Los eluatos de  
aclacinomicinas A y B son concentrados a vacío independien-  
5 temente y se separan de nuevo por completo de la cinerubina  
A y B y una pequeña cantidad de sustancias pigmentadas im-  
puras mediante cromatografía en columna de adsorbente sin-  
tético, es decir, Column Lite ( $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{MgO} \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , Fuji  
Chemical Co.), Floridil (silicato magnésico activado,  
Floridin Co.), hidroxilapatita o mediante la adición de  
10  $1 \times 10^{-3}$  a  $1 \times 10^{-2}$  M de  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{FeSO}_4$  o  $\text{MgSO}_4$ , para  
formar el complejo quelatado de cinerubina A y B, seguido  
de cromatografía en columna de Sephadex LH20. Las soluciones  
resultantes de aclacinomicina A y B pura pueden ser concen-  
tradas a vacío hasta sequedad y también pueden ser liofiliz-  
15 zadas solas o con una sustancia por lo menos seleccionada  
entre albúmina de suero, globulina, gelatina, glicerol, azú-  
cares, aminoácidos, ácidos orgánicos o inorgánicos, etc.

Las aclacinomicinas A y B obtenidas por una combina-  
ción de los métodos antes mencionados y descritas en los  
ejemplos dados a continuación, resultan ser puras y unifor-  
20 mes por cromatografía de mancha única o cromatografía de ca-  
pa fina utilizando diversos sistemas disolventes, y mantie-  
nen constantes las características de punto de fusión, rota-  
ción dextrógira, análisis elemental, picos característicos  
de los espectros de absorción ultravioleta, visible, infra-  
25 rojo y RMN y poseen las siguientes propiedades:

Aclacinomicina A:

Polvo o polvo microcristalino amarillo, débilmente  
básico y lipofílico. El análisis elemental da los siguientes  
valores:

30

1

Calculado para  $C_{42}H_{54}NO_{15}$

Encontrado C	62,37 %	C	62,05 %
H	6,67 %	H	6,69 %
O	29,38 %	O	29,52 %
N	1,82 %	N	1,72 %

5

Peso molecular: 813.

El punto de fusión y el ángulo de giro dextrógiro ( $[\alpha]_D^{24}$ ) de su solución al 1 % en cloroformo son 129 a 135°C y +29°, respectivamente. Su espectro de absorción en la gama ultravioleta y visible (Fig. 1) muestra bandas a las siguientes longitudes de onda:

10

En metano: a 229,5 nm,  $\epsilon_{1\text{ cm}}^{1\%} = 540$   
258 nm " " = 301  
290 nm " " = 128  
434 nm " " = 147

15

En HCl-metanol 0,1 N:

a 229,5 nm  $\epsilon_{1\text{ cm}}^{1\%} = 578$   
258 nm " " = 329  
290 nm " " = 141  
434 nm " " = 164

20

En NaOH-metanol 0,1 N:

a 239,5 nm  $\epsilon_{1\text{ cm}}^{1\%} = 678$   
288 nm " " = 232  
314 nm " " = 156  
523 nm " " = 170

25

Cuando se forma una pastilla con bromuro potásico, presenta bandas de absorción características del espectro infrarrojo (Fig. 2) a las siguientes longitudes de onda en  $\text{cm}^{-1}$ : 3300, 3080, 2940, 2860, 2760, 1740, 1640, 1620, 1540, 1460, 1450, 1415, 1385, 1295, 1250, 1220, 1195, 1165, 1125,

30

1 1105, 1090, 1010, 960, 930, 890, 840, 815, 760, 730, 580 y 450. El espectro RMN protónico se registró en un espectrofotómetro Varian XL-100-15 que operaba en el modo de transformación Fourier a 100 MHz como indica la Fig. 3.

5 El antibiótico aclacinomicina A es soluble en metanol, etanol, cloroformo, acetato de etilo, acetona, benceno, dimetilsulfóxido (DMSO) y metilcellosolve, es ligeramente soluble en agua pero es insoluble en éter etílico, hexano, ciclohexano y éter de petróleo.

10 La solución acuosa es amarilla y se vuelve pardo rojiza en ácido sulfúrico concentrado. Con acetato magnésico alcohólico esta solución muestra una coloración roja púrpura que se convierte en púrpura rojizo por alcalinización.

Aclacinomicina B:

15 Polvo o polvo microcristalino amarillo, débilmente básico, lipofílico. El análisis elemental da los siguientes resultados:

Encontrado	Calculado para $C_{42}H_{52}NO_{15}$
C 62,21 %	C 61,87 %
H 6,46 %	H 6,29 %
O 29,60 %	O 29,80 %
N 1,73 %	N 1,89 %

Peso molecular: 811.

25 El punto de fusión es 135-145°C y el ángulo de giro dextrogiro ( $[\alpha]_D^{24}$  al 1 % en cloroformo) es +3°. El espectro de absorción ultravioleta y visible (Fig. 4) presenta bandas a las siguientes longitudes de onda:

30 En metanol: a 229,5 nm,  $\epsilon_{1\text{ cm}}^{1\%} = 452$   
257,5 nm,  $\epsilon_{1\text{ cm}}^{1\%} = 261$   
290 nm,  $\epsilon_{1\text{ cm}}^{1\%} = 120$

1 433 nm,  $\epsilon_{1\text{ cm}}^{1\%} = 120$

En HCl-metanol 0,1 N:

a 229,5 nm,  $\epsilon_{1\text{ cm}}^{1\%} = 465$

5 257,5 nm,  $\epsilon_{1\text{ cm}}^{1\%} = 261$

290 nm,  $\epsilon_{1\text{ cm}}^{1\%} = 125$

433 nm,  $\epsilon_{1\text{ cm}}^{1\%} = 134$

En NaOH-metanol 0,1 N:

a 238 nm,  $\epsilon_{1\text{ cm}}^{1\%} = 440$

10 286-289 nm,  $\epsilon_{1\text{ cm}}^{1\%} = 142$

315 nm,  $\epsilon_{1\text{ cm}}^{1\%} = 97$

525 nm,  $\epsilon_{1\text{ cm}}^{1\%} = 135$

15 Las bandas de absorción características del espectro infrarrojo (Fig. 5) se encuentran a las siguientes longitudes de onda en  $\text{cm}^{-1}$  (KBr): 3300, 3070, 2940, 2850, 2750, 1740, 1640, 1620, 1540, 1465, 1445, 1410, 1380, 1290, 1245, 1215, 1160, 1120, 1095, 1050, 1010, 960, 920, 880, 840, 820, 750, 725, 700, 600, 580 y 450. El espectro RMN de la aclacinomicina B se encuentra en la Fig. 6.

20 El antibiótico es soluble en metanol, etanol, cloroformo, acetato de etilo, acetona y agua acidulada, es ligeramente soluble en agua pero es insoluble en hexano, ciclohexano y éteres. La solución acuosa es amarilla y se  
25 vuelve púrpura rojizo intenso en ácido sulfúrico concentrado. Esta solución presenta un color rojo purpúreo en acetato magnésico alcohólico y se vuelve púrpura rojizo por alcalinización.

30 Las aclacinomicinas A y B presentan los siguientes

1 valores Rf en los cromatogramas de capa fina de gel de sílice, utilizando diversos sistemas disolventes.

Valores Rf de la aclacinomicina

	<u>A</u>	<u>B</u>
5 Cloroformo:metanol		
20:1	0'36	0'71
5:1	0'88	0'90
Acetona	0'43	0'72
Acetona:hexano		
10    1:1	0'15	0'49
Benceno:metanol		
1:1	0'86	0'93

15 Por hidrólisis parcial o metanolisis con ácido clorhídrico diluido o con metanol conteniendo 5 % de ácido clorhídrico, durante 1 a 2 horas a la temperatura ambiente, las aclacinomicinas A y B forman disacáridos metilados y 1-desoxipirromicina. Las propiedades fisicoquímicas, como espectro de absorción infrarrojo, ultravioleta, visible y RMN, el punto de fusión y el ángulo de rotación destrógiro del

20 disacárido metilado obtenido a partir de la aclacinomicina B coincide totalmente con los del disacárido metilado obtenido a partir de la cinerubina B por hidrólisis ácida parcial (Helvetica Chimica Acta, 55, 467-480, 1972) y la 1-desoxipirromicina también es identificada con los datos de la

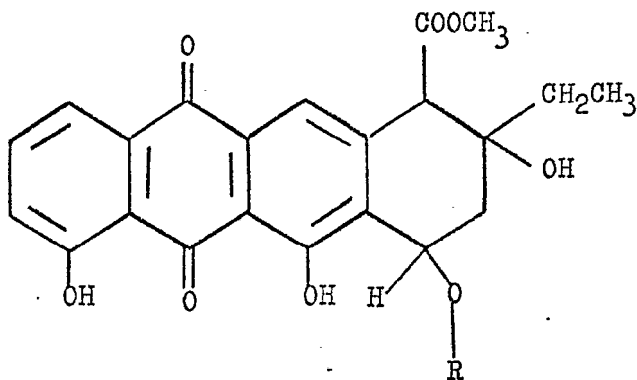
25 rodomicina (Chem. Ber. 38, 1762, 1955, Naturwiss, 48, 716, 1961), cinerubina (Chem. Ber. 92, 1868, 1959) y pirromicina (Chem. Ber. 92, 1904, 1959) sobre la base del espectro RMN, espectro de masas de la aglicona y la presencia de rodosamina en el hidrolizado ácido.

30

1 Las aclacinomicinas A y B se descomponen en una  
aglicona neutra y dos o tres azúcares reductores por hidró-  
lisis con ácido sulfúrico 0,3 N, durante 3 horas a 85°C. La  
aglicona forma cristales de color amarillo anaranjado que  
5 funden a 171-174°C y contienen oxígeno, carbono e hidrógeno.  
El análisis elemental, los espectros infrarrojo, ultravio-  
leta y RMN, los picos de los iones fragmentados del espec-  
tro de masas y otras propiedades demuestran que la aglicona  
de aclacinomicina A y B es la aklavinona (Tetrahedron  
10 Letters, 8, 28, 1960, Naturwiss., 47, 135, 1960, Naturwiss.,  
42, 154, 1955, Naturwiss., 50, 92, 1963). Además, según el  
análisis comparativo de los azúcares de los hidrolizados áci-  
dos de las aclacinomicinas A y B y las cinerubinas A y B por  
cromatografía en capa fina, la aclacinomicina A tiene la  
15 misma rodosamina, 2-desoxifucosa y cinerulosa A que la cine-  
rubina A y la aclacinomicina B tiene las mismas rodosamina  
y 2-desoxifucosa que la cinerubina B.

De los resultados antes mencionados, se deduce que  
las estructuras de las aclacinomicinas A y B de esta inven-  
20 ción son las siguientes:

Estructura de las aclacinomicinas





1 ciclina y son similares a las cinerubinas A y B, rutilantina,  
aklavina, requinomicina y galirubinas.

5 La cinerubina y la rutilantina se diferencian de los  
antibióticos de esta invención en su aglicona,  $\epsilon$ -pirromici-  
nona (Tetrahedron Letters, 16, 17, 1959). Entre los anti-  
bióticos que contienen aglicona de aklavinona, la requinomi-  
cina (J. Antibiotics, 25, 393, 1972) y la aklavina (J.  
10 Bacteriol., 72, 90, 1956) no son iguales a los antibióticos  
de esta invención en la porción azúcar y en la fórmula mole-  
cular basada en el análisis elemental. Las galirubinas que  
son producidas por Streptomyces galilaeus son las más simi-  
lares a los antibióticos de esta invención. K. Eckardt ha  
indicado que se han aislado cuatro componentes de la galiru-  
bina (galirubina D, C, B y A) del micelio de S. galilaeus  
15 y que la galirubina A era el glicósido de  $\epsilon$ -pirromicinona,  
la B era el glicósido de aklavinona, la galirubinona C era  
 $\epsilon$ -pirromicinona y la galirubinona D era 7-desoxiaklavina.  
En lo que se refiere a las propiedades fisicoquímicas de la  
galirubina B que tiene como su aglicona la aklavinona, el  
20 informe no ha presentado claramente su procedimiento de pu-  
rificación detallado, su comportamiento cromatográfico, su  
punto de fusión, su análisis elemental, sus espectros de  
absorción infrarrojo, ultravioleta, visible y RMN y solo ha  
dilucidado que se detectan dos manchas de azúcar en el hi-  
25 drolizado ácido de la galirubina B sobre el cromatograma de  
papel.

30 Por lo tanto, las aclacinomicinas A y B, que contie-  
nen aglicona de aklavinona y tres azúcares, se diferencian  
claramente de la galirubina B en las propiedades antes in-  
dicadas. Se comprueba que los antibióticos de esta inven-

1 ción son sustancias nuevas descubiertas por estos inventores.

5 Las sales no tóxicas terapéuticamente útiles y los complejos con ácido desoxiribonucleico (DNA) de los antibióticos aclacinomicinas A y B pueden ser obtenidos a partir de ácidos orgánicos e inorgánicos, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido propiónico, ácido oléico, ácido palmítico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido glutámico, ácido pantoténico y DNA obtenido del timo de ternera, células HeLa, células humanas embrionarias, E. coli y otros animales y microorganismos.

10 Las actividades biológicas de las aclacinomicinas A y B son las siguientes:

15 (1) El espectro antimicrobiano de las aclacinomicinas A y B fue determinado por el método de dilución de caldo como sigue:

Espectro antimicrobiano de las aclacinomicinas

A y B

Concentración mínima de inhibición (mcg/ml)

<u>Organismo de ensayo</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Bacillus subtilis ATCC 6633	<0,2	<0,2
B. cereus ATCC 9634	<0,2	<0,2
25 B. megaterium	<0,63	<0,2
Staph. aureus FDA 209P	<0,63	<0,2
Staph. aureus Smith	<0,2	<0,2
Sar. lutea ATCC 9341	<0,2	<0,2
Mic. flavus	<0,2	<0,2
30 Cory. bovis 1810	<0,2	<0,2

Organismo de ensayo	Concentración mínima de inhibición (mcg/ml)	
	A	B
Mycobact. smegmatis ATCC 607	2,5	5
Strept. faecalis	2,5	2,5
St. pyogenes NY 5	1,25	1,25
Diplo, pneumoniae Tipo 1	0,63	0,63
Diplo, pneumoniae Tipo 3	0,63	0,63
E. coli K12	>100	>100
Kl. pneumoniae ATCC 10031	>100	>100
Ps. aeruginosa A20229	>100	>100
Can. albicans IAM 4905	10	10
Can. tropicalis IAM 4924	20	20

(2) Efectos antitumorales: Además, los antibióticos aclacinomicina A y B presentan marcados efectos inhibitorios de los tumores animales experimentales ascíticos y los tumores sólidos. Esta acción antitumoral puede ser puesta de manifiesto muy significativamente en la leucemia de los ratones y en los hepatomas de las ratas. Por ejemplo, cuando se inoculan unos ratones BDF<sub>1</sub>, con un peso de 18 a 22 g, con  $1 \times 10^6$  células P388 o  $5 \times 10^5$  células L1210 por vía intraperitoneal y se administra una vez al día, durante 10 días consecutivos, por vía intraperitoneal, 24 horas después de la inoculación, aclacinomicina A y B y complejo aclacinomicina A-DNA, el tiempo de supervivencia de los ratones es prolongado considerablemente, en una proporción superior al 150 %, a unas dosis de 0,5 a 5 mg/kg de peso corporal y día, en comparación con los ratones de control que no reciben antibiótico, como se indica en la siguiente tabla.

1

<u>Antibiótico</u>	<u>Dosis</u> (mg/kg/día)	<u>Tiempo me</u> <u>dio de su</u> <u>perviven-</u> <u>cia (días)</u>	<u>E/C</u> (%)	<u>Supervi-</u> <u>vientes</u> <u>a los</u> <u>30 días</u>
Aclacinomicina A	4,0	21,5	215	1/4
	2,0	30,0	300	4/4
	1,0	28,0	280	3/4
	0,5	23,0	230	2/4
Aclacinomicina B	4,0	8,5	85	0/4
	2,0	17,5	175	0/4
	1,0	19,0	190	1/4
	0,5	14,7	147	0/4
Complejo de aclacinomi				
cina A-DNA	4,0	19,0	190	1/4
	2,0	30,0	300	4/4
	1,0	30,0	300	4/4
	0,5	27,3	273	3/4
Control	-	10,0	-	0/2

5

10

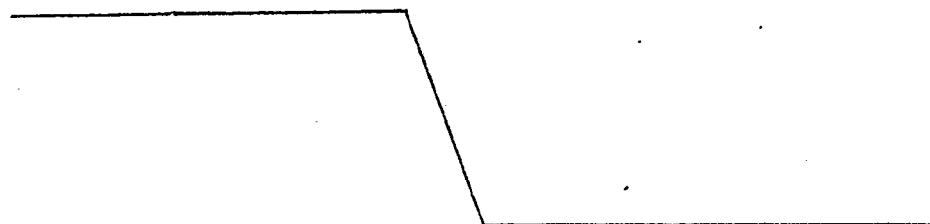
15

20

25

30

Cuando se inoculan unos ratones CH3/He, con un peso de 20 a 23 g, con  $1 \times 10^7$  células de linfoma 6C3HED/OG intraperitonealmente o con  $5 \times 10^6$  células de linfoma 6C3HED/OG subcutáneamente y se administra intraperitonealmente aclacinomicina A una vez al día durante 10 días, empezando 3 horas después de la inoculación, la aclacinomicina A presenta una marcada inhibición del crecimiento del tumor ascítico o sólido 6C3HED/OG, como indica la siguiente tabla.



1

Aclacinomicina A, Dosis: mg/kg/día

	4	2	1	0,5	Control
Tipo sólido: peso del tumor (mg)	5023	4633	2501	3695	7045
<u>peso del tumor</u> <u>peso corporal</u> (%)	19,5	15,1	9,5	12,4	29,6
Inhibición (%)	28,7	34,2	64,5	47,6	-
Supervivientes a los 21 días	0/3	3/3	3/3	3/3	7/9
Tipo ascítico: TSM (días)†	20,1	31,8	37,5	15,0	20,5
E/G (%)‡‡	98	155	183	73	-
Supervivientes a los 62 días	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3

10

† Tiempo de supervivencia medio

15

‡‡ Relación de supervivencia: ensayado/control

20

25

30

1

Ac

4

Tipo sólido: peso del tumor (mg)

5023

5

$\frac{\text{peso del tumor}}{\text{peso corporal}}$  (%)

19,5

Inhibición (%)

28,7

Supervivientes a los 21 días

0/3

Tipo ascítico: TSM (días)<sup>\*</sup>

20,1

10

E/C (%)<sup>\*\*</sup>

98

Supervivientes a los 62 días

0/3

<sup>\*</sup> Tiempo de supervivencia medio

15

<sup>\*\*</sup> Relación de supervivencia: ensayado/control

20

25

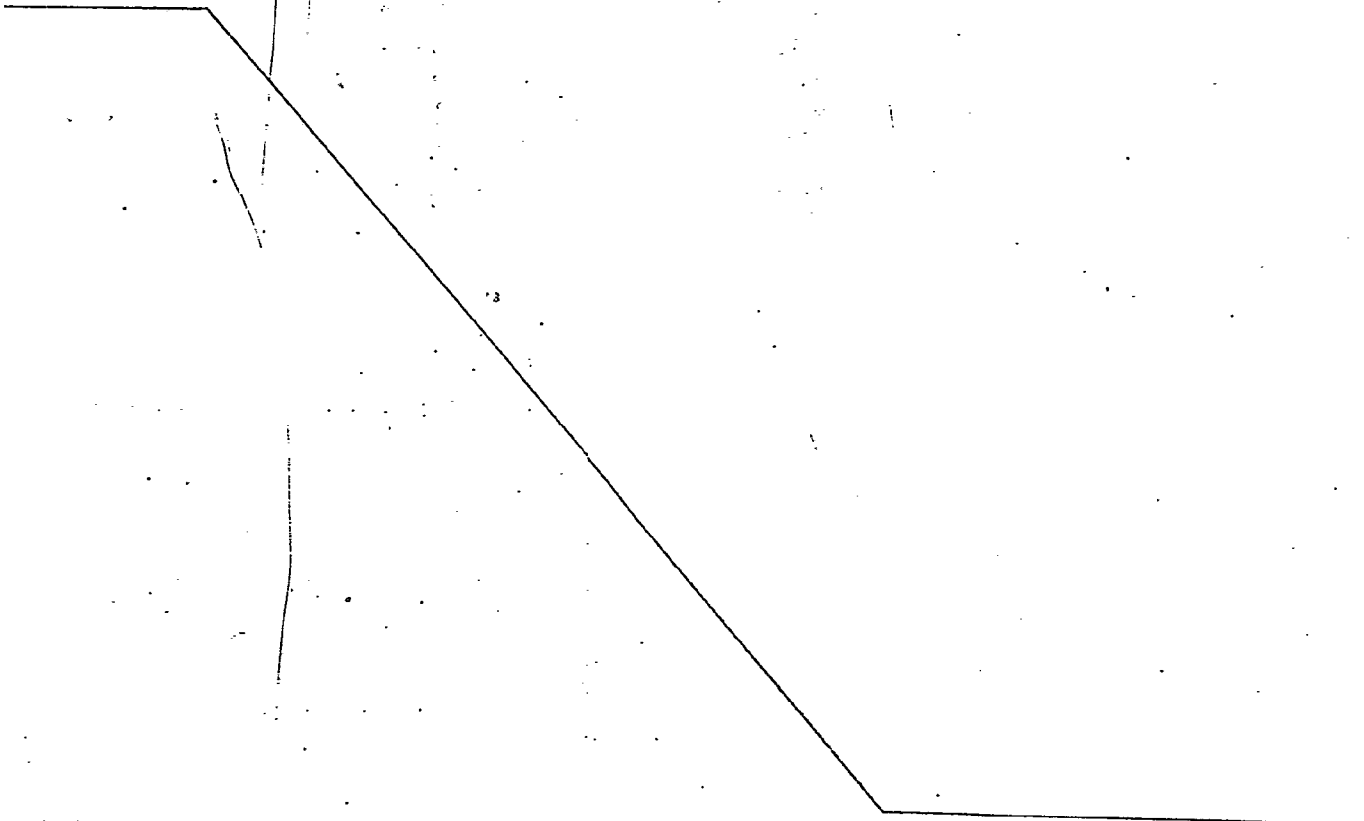
30

Aclacinomicina A, Dosis: mg/kg/día

	4	2	1	0,5	Control
g)	5023	4633	2501	3695	7045
)	19,5	15,1	9,5	12,4	29,6
	28,7	34,2	64,5	47,6	-
1 días	0/3	3/3	3/3	3/3	7/9
	20,1	31,8	37,5	15,0	20,5
	98	155	183	73	-
2 días	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3

dio

ensayado/control



Los ratones son inoculados intraperitonealmente con una suspensión de células de leucemia L1210 y tratados con soluciones de diferentes concentraciones de aclacinomicina A y 1, 5 y 9 días después de la implantación del tumor. La siguiente tabla, donde se resumen los resultados obtenidos, indica que la aclacinomicina A, administrada a dosis de 6 y 3 mg/kg/día, ha aumentado considerablemente el tiempo medio de supervivencia de los ratones tratados.

Dosis (mg/kg/día)	Tiempo de supervivencia medio (días)	Supervivientes a los 30 días
12	16,1	0/5
6	21,7	2/5
3	23,3	2/5
1,5	12,6	0/5
control	10,4	0/10

Unas ratas Donryu, injertadas con un hepatoma ascítico AH44, fueron tratadas intraperitonealmente durante 10 días consecutivos con 2 mg/kg/día de aclacinomicina A. Mientras que las ratas de control presentaron un tiempo de supervivencia medio de 14,5 días después de la implantación del tumor, todas las ratas tratadas estaban vivas al cabo de 30 días después del experimento.

(3) Toxicidad aguda: Los valores de la DL<sub>50</sub> para una sola inyección de aclacinomicina A y B se encuentran en la siguiente tabla:

Especie animal	Vía	DL <sub>50</sub> (mg/kg)	
		A	B
ratón	intravenosa	33,7	16,4
ratón	intraperitoneal	22,6	13,7
rata	intravenosa	32,5	15,0
rata	intraperitoneal	25-50	10-15

1 Una simple administración intravenosa de 25 mg/kg de  
aclacinomicina A y B no indujo alteraciones cardiacas agudas  
en los electrocardiogramas de los hamsters.

5 (4) Los antibióticos inhiben completamente el creci-  
miento de las células tumorales de los mamíferos cultivadas,  
el virus de la vacuna en las células HeLa y específicamente  
la síntesis del RNA a una concentración extraordinariamente  
baja. Cuando se inoculan células L1210 en el medio, Rosewell  
10 Memorial Park Instituté 1640, que contiene 10 % de suero de  
ternera y se añaden diversas concentraciones de aclacino-  
micina A y B y, como precursor, <sup>14</sup>C-timidina, -leucina o  
-uridina y después se incuba a 37°C durante 60 minutos en el  
experimento de incorporación de <sup>14</sup>C y 3 días en el experimen-  
to de crecimiento, la biosíntesis de ácido nucleico y el cre-  
15 cimiento de las células son inhibidos en más del 50 % por  
debajo de 1 mcg/ml de aclacinomicina en el medio, como indi-  
ca la siguiente tabla:

	DI <sub>50</sub> (mcg/ml)		
	Aclacinomici- na A	Complejo de aclacinomi- cina A-DNA <sup>*</sup>	Aclacino- micina B
Células L1210:			
Crecimiento	0,12	0,08	0,24
Síntesis de DNA	1,1	-	4
Síntesis de RNA	0,1	0'2	0'2
25 Síntesis de proteínas	6,3	-	12
Virus de la vacuna	<10	-	<10

<sup>\*</sup> Se utilizó DNA, del timo de ternera, tipo V (Sigma Co.)

1 En vista de las propiedades anteriores de las sustan-  
cias aclacinomicina A y aclacinomicina B, se ha confirmado  
que estas sustancias son nuevos antibióticos que se diferen-  
5 cian de cualquiera de los antibióticos conocidos. De acuer-  
do con un tercer aspecto de esta invención, se proporciona  
un método de tratamiento terapéutico de un animal vivo, in-  
cluido el hombre, afectado por la leucemia, que consiste en  
administrar la sustancia aclacinomicina A y/o la sustancia  
10 aclacinomicina B a dicho animal, a una dosis suficiente pa-  
ra reducir la afección de la leucemia. De acuerdo con un cuar-  
to aspecto de esta invención, se proporciona además una com-  
posición farmacéutica que comprende la sustancia aclacino-  
micina A y/o la sustancia aclacinomicina B, en cantidad sufi-  
ciente para reducir la afección por leucemia in vivo, estan-  
15 do la sustancia aclacinomicina A y/o la sustancia aclacino-  
micina B en combinación con un vehículo farmacéuticamente  
aceptable. Se observará que las cantidades actualmente pre-  
feridas de la sustancia aclacinomicina utilizadas variarán  
de acuerdo con el compuesto particular empleado, la composi-  
20 ción particular formulada, la forma de aplicación y el pun-  
to particular del organismo que se encuentra en tratamiento.  
El experto en la técnica tendrá en cuenta muchos factores  
que modifican la acción de la droga, por ejemplo edad, peso  
corporal, sexo, dieta, tiempo de administración, vía de ad-  
25 ministración, velocidad de excreción, combinaciones de dro-  
gas, sensibilidades de reacción y gravedad de la enfermedad.  
Las dosis óptimas para una serie dada de condiciones pueden  
ser determinadas por el experto en la técnica utilizando los  
30 ensayos convencionales de determinación de la dosis a la  
vista de las indicaciones anteriores.

1 A continuación describimos algunos ejemplos de producción y purificación de aclacinomicinas A y B. Los siguientes ejemplos son simplemente ilustrativos y no debe considerarse que la invención se limita a estos ejemplos.

5 DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

EJEMPLO 1

Se prepara un medio acuoso de la siguiente composición:

	<u>%</u>
10 Almidón de patata	1
Glucosa	1
"Prorich"	1,5
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,1
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,1
15 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1
NaCl	0,3
Minerales <sup>*</sup>	0,125
Silicona (KM75)	0,05
pH	7,0

20 <sup>\*</sup> Minerales:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  2,8 g;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,4 g;  
 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  3,2 g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,8 g en  
500 ml de agua.

25 Se esterilizan 100 ml de este medio a 120°C, durante 15 minutos, en un matraz sacudidor Sakaguchi de 500 ml, que se inocula con un cultivo inclinado de agar de Streptomyces galilaeus MA144-M1 mediante un aro de platino. La incubación transcurre durante 48 horas a 28°C en un sacudidor recíproco. Diez litros del medio previamente esterilizado en  
30 un fermentador de acero inoxidable de 20 litros se inoculan

1 asépticamente con 200 ml de los cultivos de siembra ante-  
riores. La fermentación se realiza a 28°C durante 32 horas  
con agitación (240 rpm) y aireación (5 litros/minuto). El  
5 caldo de cultivo obtenido se ajusta a pH 4,5, se mezcla con  
un material adsorbente de tierra silíceo y se filtra para  
separarlo del micelio. El filtrado y la torta obtenidos se  
extraen separadamente. La torta se suspende en acetona (3 li-  
tros por kg de torta húmeda), se agita durante 2 horas y se  
filtra y de nuevo se extrae la torta con acetona una vez más.  
10 Los extractos así obtenidos se evaporan hasta la décima par-  
te de su volumen a vacío. El filtrado de cultivo se ajusta  
a pH 6,8 y se extrae dos veces con un tercio de su volumen  
de acetato de etilo y los extractos en acetato de etilo se  
concentran hasta un décimo de su volumen a vacío.

15 Se mezclan 20 g de las sustancias oleosas resultan-  
tes con 20 g de ácido silícico (Mallinckrodt Chem. Co.), se  
aplican a una columna de 40 cm de longitud y 4,5 cm de diá-  
metro llena de ácido silícico y se eluye con una mezcla de  
benceno-acetona-metanol. El eluato inicial que eluye con una  
20 mezcla 1:1:0 se desprecia y las fracciones activas eluidas  
con las mezclas 1:3:0 y 1:3:0,3 se recogen y concentran a  
sequedad a vacío. Después se disuelven 11,5 g de esta sus-  
tancia cruda en una pequeña cantidad de acetato de etilo y  
se aplican a la misma columna de ácido silícico que en el  
25 caso anterior. Después de desechar los eluatos iniciales por  
las mezclas 1:1 y 2:1 de benceno-acetona, las fracciones de  
aclacinomicina B son eluidas en primer lugar con las mezclas  
anteriores en la relación 1:3 y 1:5 y después son eluidas  
las fracciones de aclacinomicina A con mezclas 1:5:0,5 y  
30 1:5:1 de benceno-acetona-metanol. Los eluatos se secan so-

1 bre sulfato sódico anhidro y se concentran a sequedad a vacío. Se obtienen 4,8 g de aclacinomicina A cruda y 3,5 g de  
2 aclacinomicina B en forma de polvo amarillo.

EJEMPLO 2

5 Se mezclan 2,0 g de la aclacinomicina B cruda obtenida en el Ejemplo 1 con 3 g de ácido silícico, se somete a  
6 una columna de 15 cm de longitud y 2 cm de diámetro llenada  
7 con 25 g de ácido silícico y la fracción de aclacinomicina B  
8 se eluye con cloroformo conteniendo 1 % de metanol y se  
9 concentra hasta volumen reducido a vacío. Mediante adición de  
10 algo de n-hexano a la solución concentrada se obtienen 40 mg  
11 de aclacinomicina B en forma de polvo amarillo.

EJEMPLO 3

15 Se disuelven 2,0 g de la aclacinomicina A cruda obtenida en el Ejemplo 1 en una pequeña cantidad de cloroformo y  
16 se aplica a una columna de 20 cm de longitud y 2.0 cm de diámetro  
17 rellena de 30 g de ácido silícico. Después de eluir los  
18 pigmentos que contienen aglicona y aclacinomicina B y otras  
19 impurezas con cloroformo y cloroformo conteniendo 1,5 % de  
20 metanol, se eluyen las fracciones de aclacinomicina A con  
21 una mezcla de cloroformo y 2 % de metanol y se concentra a  
22 sequedad a vacío. Se obtienen 53 mg de un polvo amarillo de  
23 aclacinomicina A.

EJEMPLO 4

25 Las aclacinomicinas A o B crudas obtenidas en los Ejemplos 1 y 3 todavía contienen una pequeña cantidad de  
26 cinerubina A o B que es producida en el caldo cultivado en  
27 el Ejemplo 1 y la cinerubina A o B impura puede ser separada  
28 por quelatación con diversos iones metálicos.  
29  
30

1           Se disuelven 250 mg del polvo crudo de aclacinomi-  
cina A obtenido en el Ejemplo 3 en 20 ml de cloroformo y se  
añaden 20 ml de una solución al 1 % de  $\text{CuSO}_4$ . Después la  
solución se sacude fuertemente y se mantiene en reposo du-  
5           rante 1 hora, a la fase clorofórmica separada de la fase  
acuosa se añade una solución  $10^{-3}\text{M}$  de EDTA (ácido etilen-  
diaminotetraacético) y la mezcla se sacude fuertemente duran-  
te 1 minuto y después se separa la fase clorofórmica y se  
lava con agua dos veces sacudiendo cada vez. El extracto clo-  
10           rofórmico se seca sobre sulfato sódico anhidro y se concen-  
tra a vacío y por adición de algo de n-hexano precipitan  
120 mg de aclacinomicina A pura.

EJEMPLO 5

15           Se disuelven 300 mg de aclacinomicina B cruda obteni-  
da en el Ejemplo 1 en 10 ml de metil-cellosolve y se añade  
1 ml de una solución de  $\text{CuSO}_4$  que contiene 100 mg/ml. Des-  
pués de permanecer en reposo durante la noche, el pequeño  
precipitado formado se separa por centrifugación y después  
el líquido que sobrenada se concentra hasta la mitad de su  
20           volumen a vacío y se cromatografía utilizando una columna  
de 100 cm de longitud y 4 cm de diámetro, relleno con  
Sephadex LH20 en metanol. Se desprecian las impurezas inicia-  
les y el complejo purpúreo de cinerubina B-Cu y las fraccio-  
nes amarillas siguientes se recogen, se agregan sobre una  
25           solución  $10^{-3}\text{M}$  de EDTA y se concentran hasta un tercio de su  
volumen a vacío. La aclacinomicina B se extrae del concen-  
trado con cloroformo y se concentra a sequedad a vacío. Se  
obtienen 128 mg de aclacinomicina B pura.

EJEMPLO 6

Se prepara un medio acuoso con la siguiente composición:

	<u>%</u>
5 Almidón de patata	2
Glucosa	2
"Meat"	2,5
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,1
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,1
10 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1
NaCl	0,3
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,0005
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0005
Silicona	0,05
15 pH	7,2

Se esterilizan 50 ml de este medio a 120°C durante 15 minutos, en un matraz Erlenmeyer de 500 ml que se inocula con 1 ml de caldo de cultivo congelado de Streptomyces galilaeus MA144-M1. La incubación se realiza durante 48 horas a 30°C en un sacudidor rotatorio. Diez litros del mismo medio en un fermentador vibratorio de acero inoxidable de 20 litros se inoculan asépticamente con 200 ml de los cultivos anteriores. Después de incubar a 30°C durante 18 horas con agitación (300 rpm) y aireación (5 litros/minuto), se añaden 10 litros del caldo de cultivo a 600 litros del medio esterilizado anterior en un tanque de acero inoxidable de 1000 litros y se incuba a 30°C durante 48 horas con aireación (200 litros/minuto) y agitación (180 rpm). El caldo de cultivo (570 litros) obtenido se ajusta a pH 5,0 por adición

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

1 de 250 ml de  $H_2SO_4$  al 30 %, se mezcla con un material adsor-  
bente de tierra silíceas y los 53,5 kg de torta del filtro así  
5 obtenidos se suspenden en 70 litros de acetona, se agitan  
durante 3 horas y se filtran. La torta se extrae de nuevo  
con 85 litros de acetona una vez más. Los extractos se eva-  
poran hasta 40 litros a vacío y se agregan a 25 litros de  
acetato de etilo. Se separa la fase de acetato de etilo y  
se concentra hasta 1 litro a vacío. La mezcla cruda de acla-  
cinomicina que precipita por adición de 1 litro de n-hexano  
10 al concentrado anterior se recoge y lava dos veces con una  
mezcla 50:1 de n-hexano y acetato de etilo y se obtienen  
15,5 g de un polvo amarillo anaranjado.

Este polvo crudo se disuelve en 200 ml de acetato de  
etilo y se aplica a una columna de 35 cm de longitud y  
15 7 cm de diámetro, rellena con 700 g de Column-Lite, y se  
eluye con una mezcla 1:1 de acetato de etilo-metanol. Las  
fracciones amarillas que contienen la aclacinomicina A se  
evaporan a sequedad a vacío. Se disuelven 12,4 g de aclaci-  
nomicina A cruda en 100 ml de cloroformo y se añaden a 50 ml  
20 de una solución  $10^{-3}M$  de EDTA en solución reguladora de fos-  
fato 0,01 M (pH 6,8). Después de sacudir fuertemente para  
separar los iones metálicos residuales, la fase clorofórmi-  
ca se lava dos veces sacudiendo con agua, se seca sobre sul-  
fato sódico anhidro y se evapora a sequedad a vacío. Se ob-  
25 tienen 11,1 g de aclacinomicina A en forma de polvo amarillo.

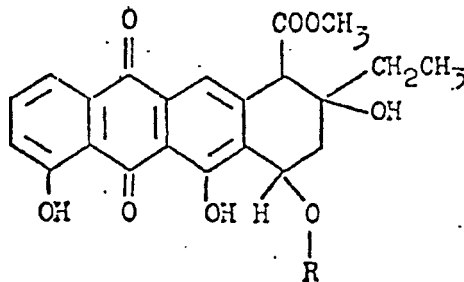
El "Sephadex LH-20" es un medio cromatográfico cons-  
tituido por un tamiz molecular insoluble lipofílico, prepa-  
rado por reticulación de dextrano y comercializado por  
Pharmacia, Uppsala, Suecia. El Sephadex LH-20 utilizado en  
30 los ejemplos anteriores puede ser sustituido por otros agen-

1 tes similares de filtración de gel, v.g. Sephadex G25 a  
G200, Sepharose 4B y 6B (Pharmacia Fine Chemicals AB, Upp-  
sala, Suecia) y bio-gel A1,5m (Bio Rad Co.). Los agentes -  
de filtración de gel preferidos son los geles de dextrano  
5 reticulado carboximetilado descritos en las columnas 3 y 4  
de la patente estadounidense 3.819.836.

En resumen, la Patente de Invención que se soli-  
cita deberá recaer sobre las siguientes:

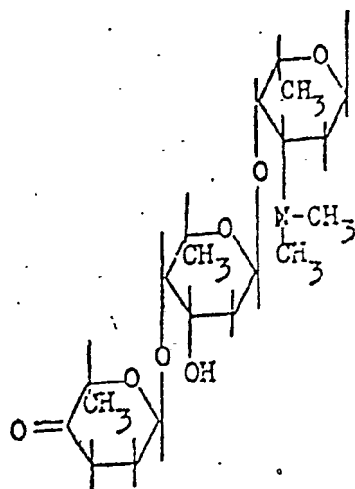
REIVINDICACIONES

10 1. Un procedimiento de producción de los antibió-  
ticos antitumorales aclacinomicinas A y B de fórmula



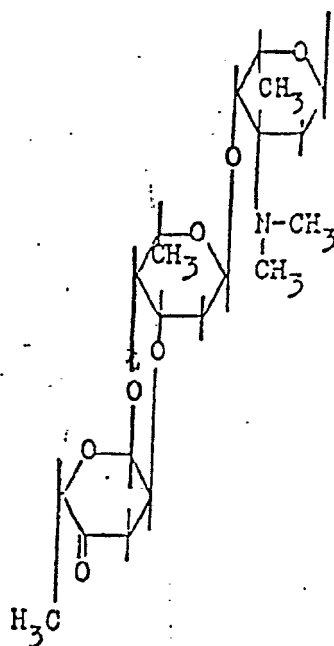
donde R representa

20



25

or



30

1 o una sal de adición de ácido no tóxico de los mismos o un  
complejo de los mismos con ácido desoxiribonucleico, cuyo -  
proceso comprende las etapas de cultivar una cepa productora  
5 de aclacinomicina de Streptomyces galilaeus, cuyas características de identificación son las del ATCC 31133, o un -  
mutante del mismo, bajo condiciones aerobias sumergidas, en  
un medio nutriente que contiene una fuente de carbono y un -  
nutriente nitrogenado, hasta que dicho organismo produce una  
cantidad sustancial de aclacinomicina en el citado medio nu  
10 triente, y recuperar la aclacinomicina A y B o una sal de -  
la misma del medio de cultivo.

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, -  
donde se cultiva Streptomyces galilaeus ATCC 31133 o un mu-  
tante del mismo en un medio nutriente a una temperatura com  
15 prendida entre 20°C y 35°C.

3. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en  
el que se cultiva Streptomyces galilaeus ATCC 31133 o un mu  
tante del mismo en un medio nutriente a una temperatura com  
20 prendida entre 25°C y 30°C y un pH entre 5 y 8.

4. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en  
el que la aclacinomicina A y B producida en el caldo de cul  
tivo es extraída y purificada por un procedimiento que com  
prende por lo menos un proceso seleccionado entre el grupo -  
25 formado por extracción con disolventes, precipitación con -  
disolventes, concentración, distribución en contracorrien-  
te, quelatación con iones metálicos, adsorción en un adsor-  
bente y adsorción seguida de elución en una resina cambiado  
ra de ión, una tierra silícea adsorbente o un adsorbente -  
30 sintético.

5. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en

1 en que la solución que contiene aclacinomicina es concentra-  
da a sequedad o liofilizada.

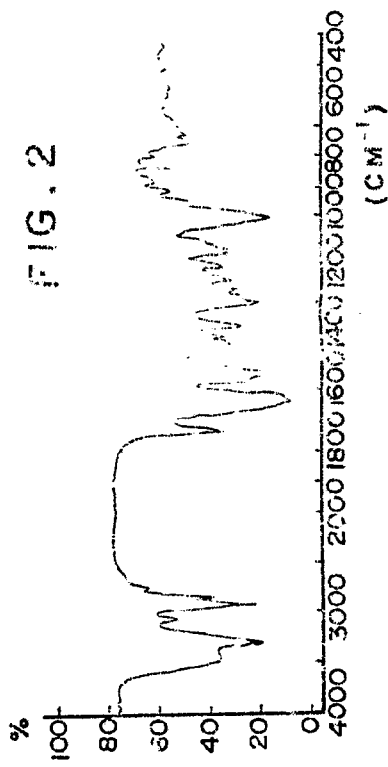
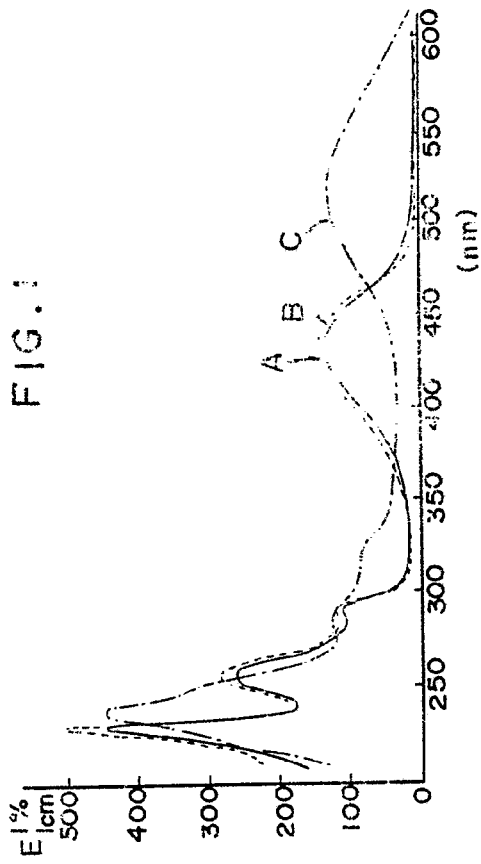
5 6. Un procedimiento según la Reivindicación 1, -  
en el que la solución que contiene aclacinomicina es con-  
centrada a sequedad o liofilizada después de añadir por lo  
menos una sustancia seleccionada entre el grupo formado por  
suero, albúmina de suero, globulina de suero, glicerol, ge-  
latina, azúcares, aminoácidos, ácido desoxiribonucléico y  
10 ácidos orgánicos e inorgánicos como ácido clorhídrico, áci-  
do fosfórico, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido propi-  
ónico, ácido oléico, ácido palmítico, ácido cítrico, ácido  
succínico y ácido pantoténico.

15 7. Un procedimiento según la reivindicación 1, -  
en el que la aclacinomicina A o una sal de la misma es pro-  
ducida sustancialmente en el medio nutriente y recuperada  
de dicho medio.

20 8. Un procedimiento según la reivindicación 1, -  
en el que la aclacinomicina B o una sal de la misma es pro-  
ducida sustancialmente en el medio nutriente y recuperada  
de dicho medio.

25 9. Se reivindica por último como objeto sobre el  
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:  
UN PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE ANTIBIOTICOS ANTITUMORA-  
LES ACLACINOMICINAS "A" y "B".





ESCALA VARIABLE  
Madrid, 24 de Julio de 1.975  
BERNARDO UNGRIA  
P.P.

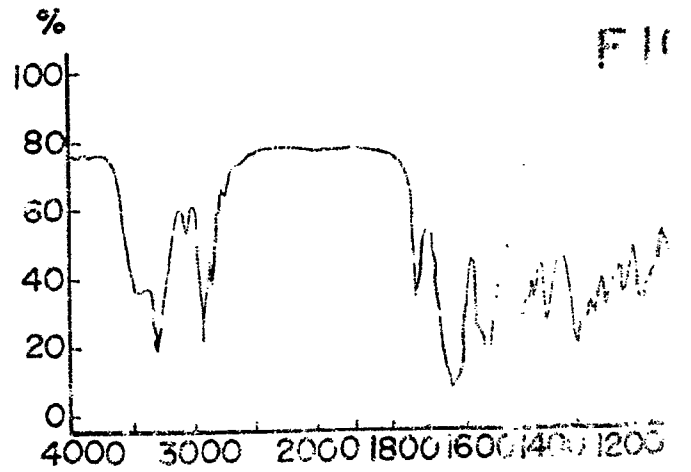
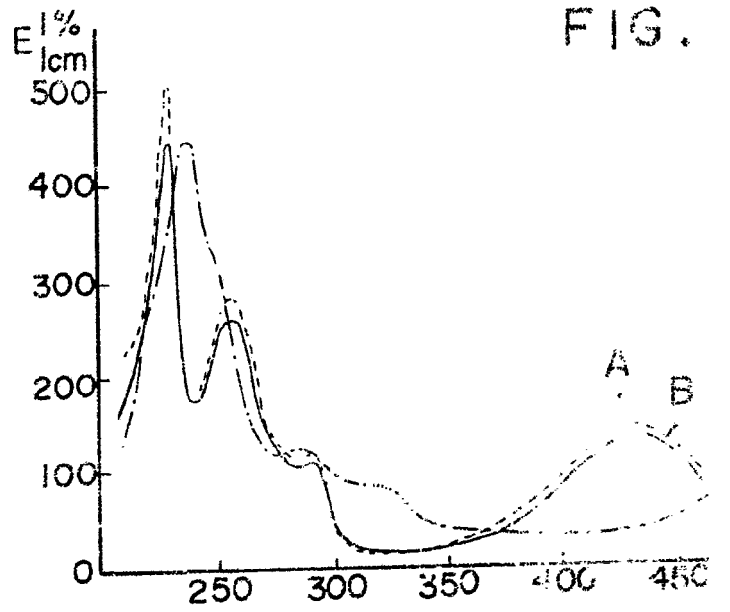


FIG. 1

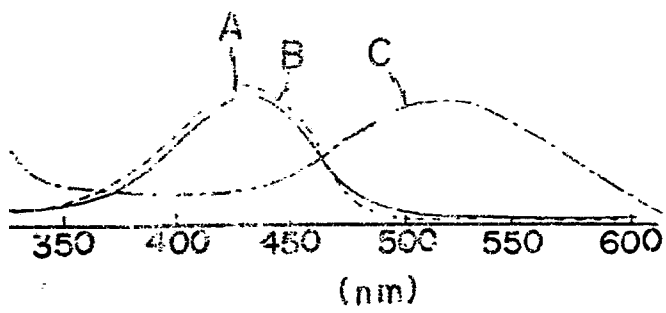
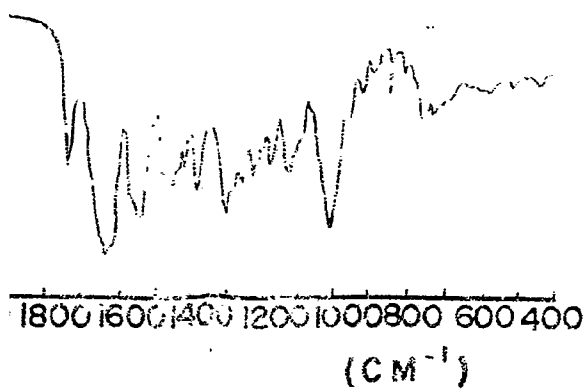


FIG. 2



ESCALA VARIABLE  
Madrid, 24 de Julio de 1.975  
BERNARDO UNGRÍA  
p.p.



FIG. 3

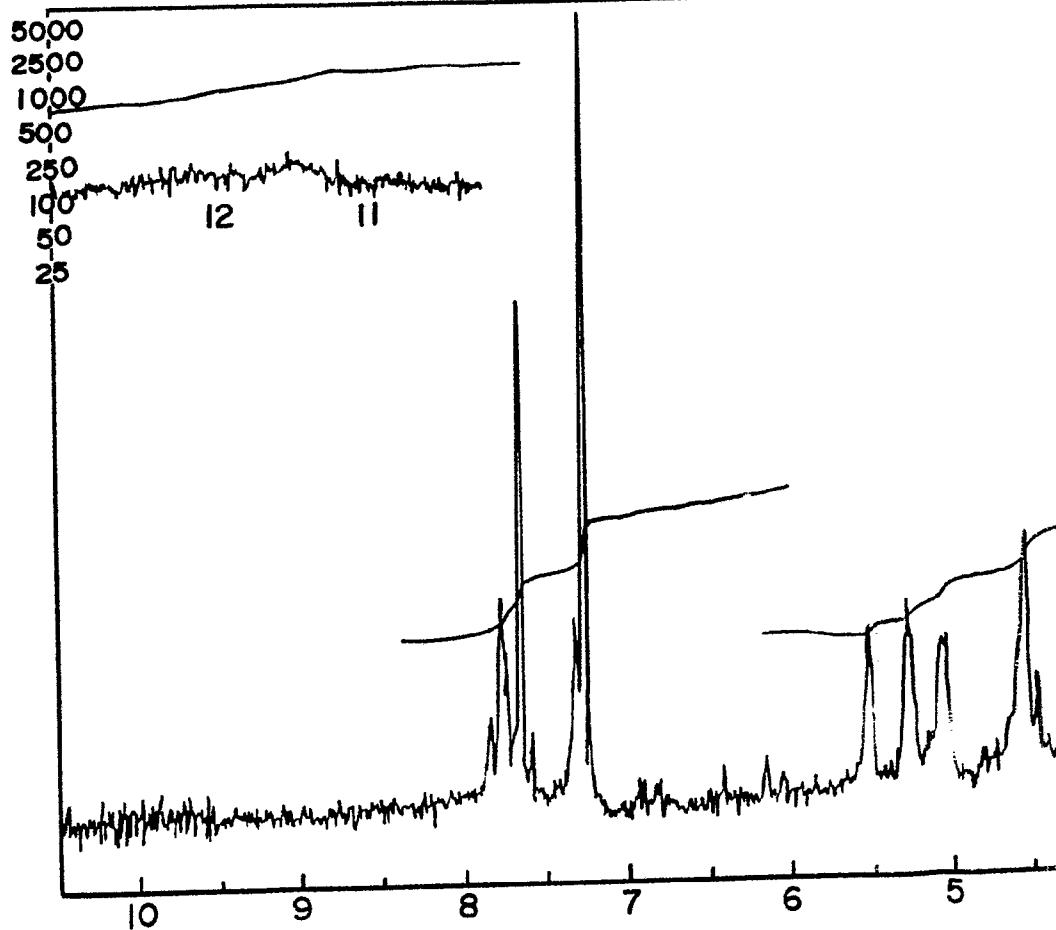
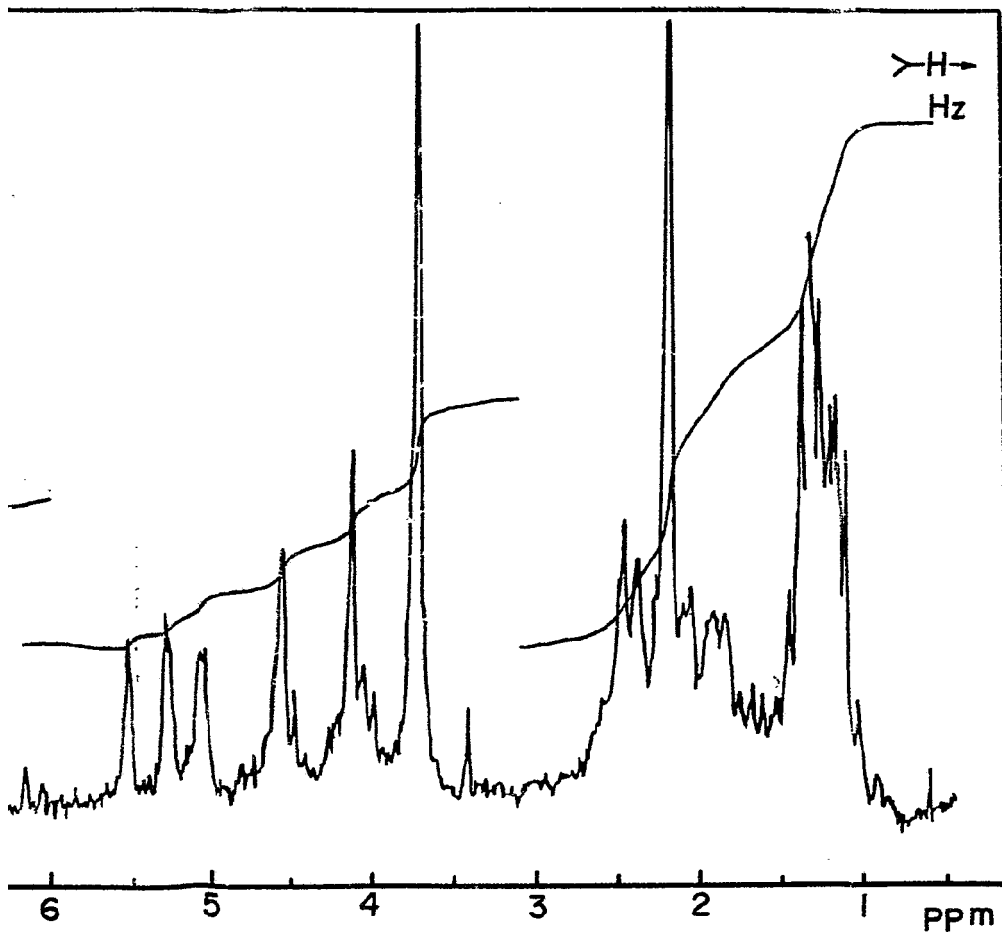


FIG. 3



ESCALA VARIABLE  
Madrid, 24 de Julio de 1.975  
BERNARDO UNGRIA  
P.P.

FIG. 5

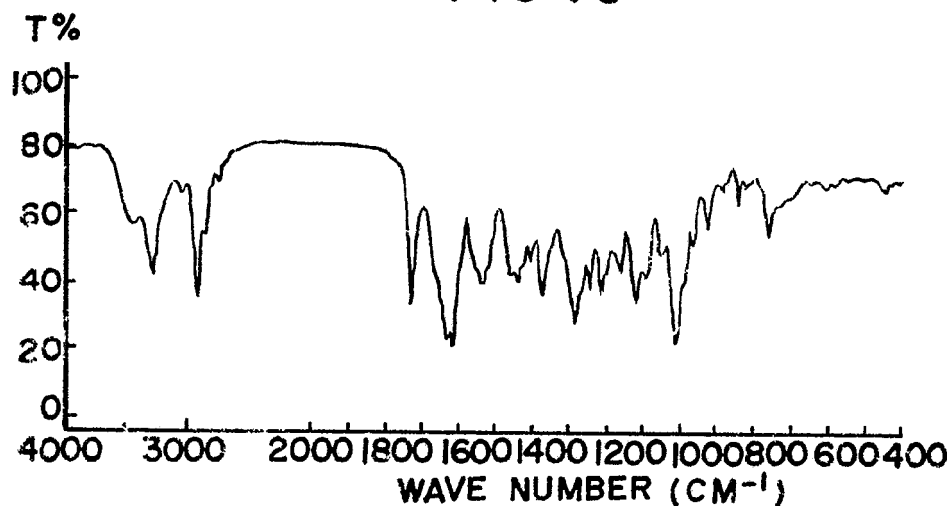
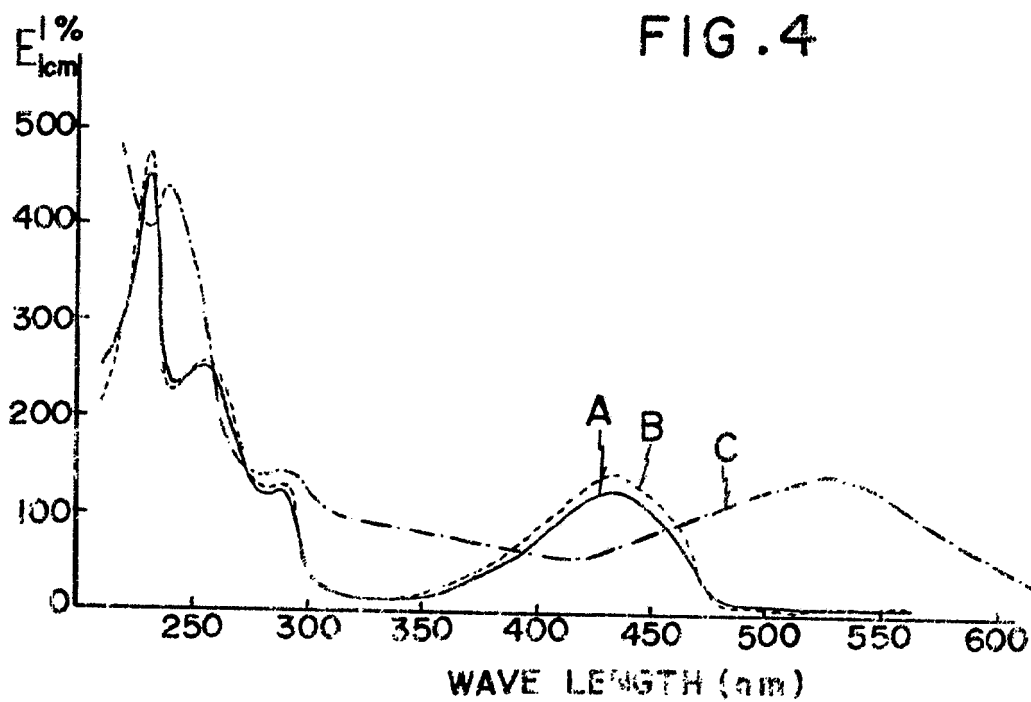
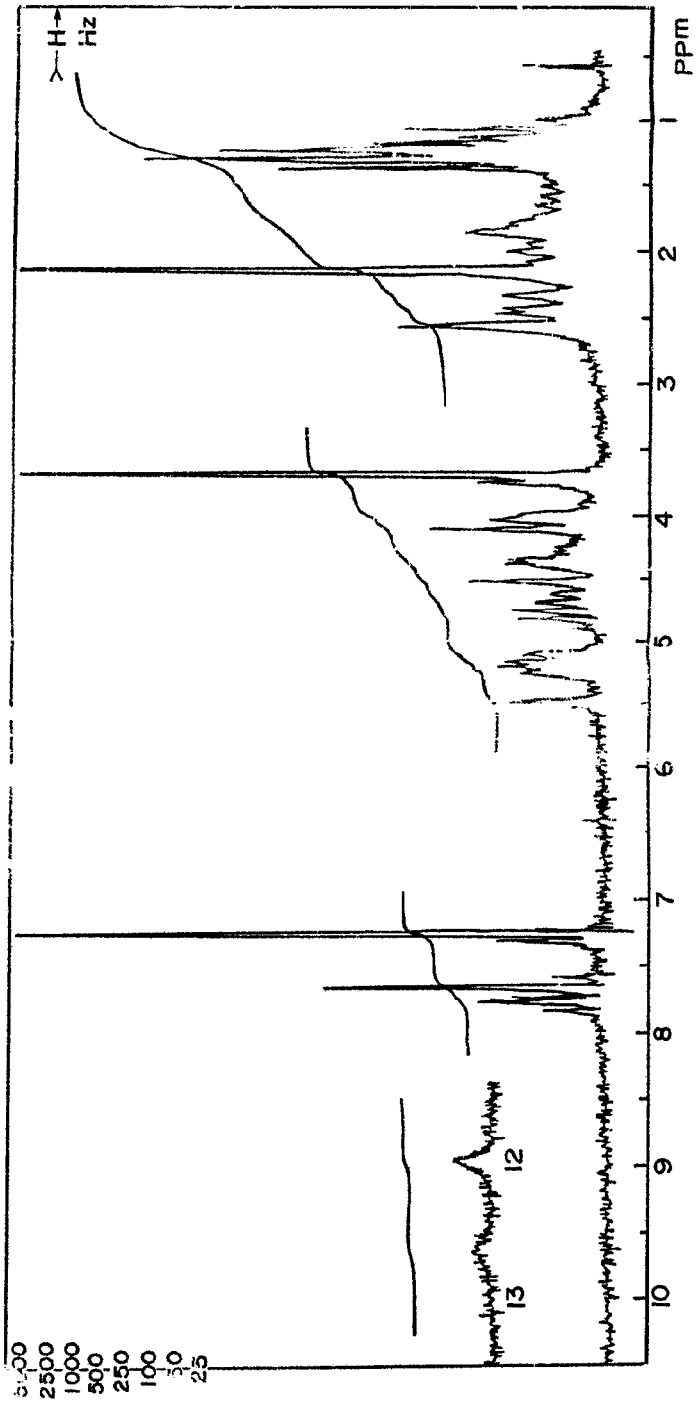


FIG. 4



REVISI VALUABLE  
pada 21 Desember 1975  
P.P.  
*[Signature]*

FIG. 6



ESCALA VARIABLE  
 Madrid, 24 de Julio de 1.975  
 BERNARDO UNGRIA  
 P.P.

*[Handwritten signature]*

FIG.

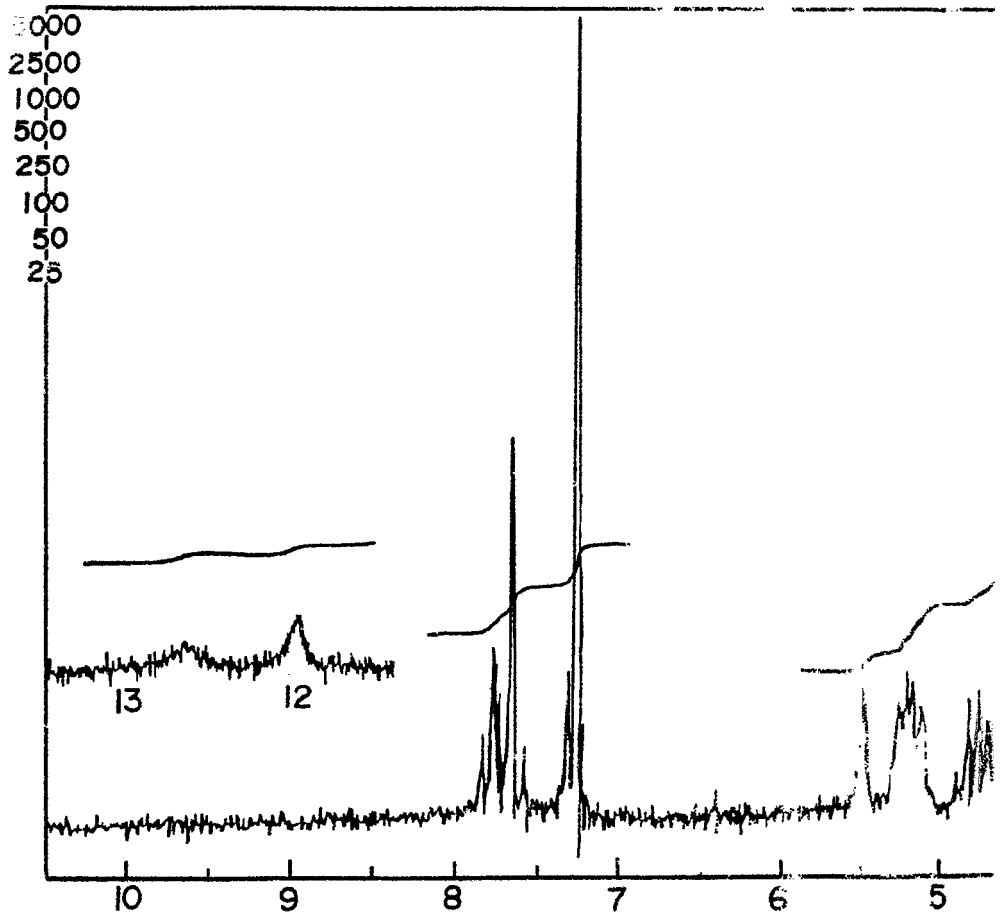
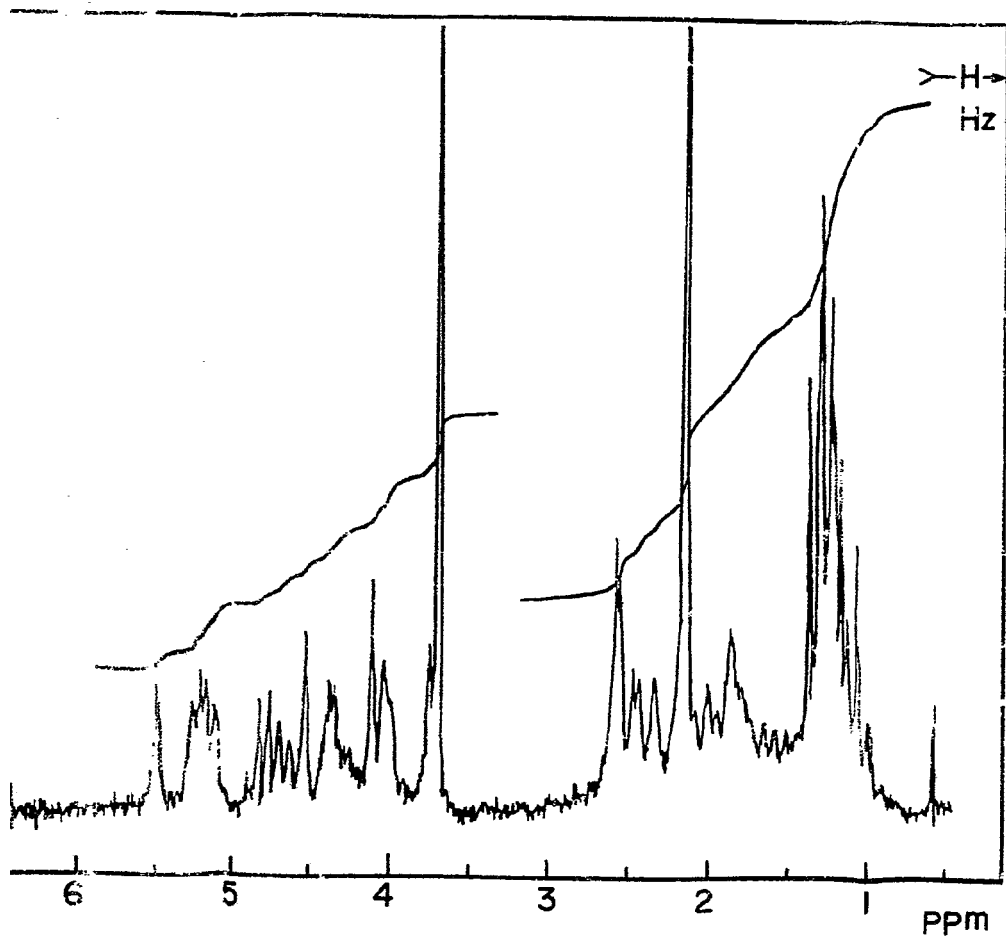


FIG. 6



ESCALA VARIABLE  
Madrid, 24 de Julio de 1.975  
BERNARDO UNGRIA  
P.P.