



1649100

ES A1

FECHA DE PRESENTACION
23-6-76

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
590,994	27-6-1975	Estados Unidos

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	----------------------------------------	--------------------------------------

64 TITULO DE LA INVENCION

UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DEL COMPLEJO ANTIBIOTICO DENOMINADO COMPLEJO DE ACIDO FIGAROICO.

71 SOLICITANTE (S)

BRISTOL-MYERS COMPANY

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

345 Park Avenue, New York 10022 Estados Unidos.

72 INVENTOR (ES)

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

1

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a un nuevo complejo antibiótico de antraciclina y a su producción y recuperación.

COMPENDIO DE LA INVENCION

5

10

15

Mediante esta invención se proporciona un nuevo complejo antibiótico de antraciclina denominado aquí complejo de ácido figaroico, que se prepara cultivando una nueva cepa de Streptosporangium denominada cepa C-31.751, ATCC número 31.129 de Streptosporangium sp., en un medio nutriente acuoso que contiene fuentes asimilables de nitrógeno y carbono, en condiciones aerobias sumergidas, hasta que dicho organismo produce una cantidad sustancial de complejo de ácido figaroico en dicho medio de cultivo y opcionalmente recuperar el complejo de ácido figaroico del medio de cultivo. La invención abarca la mezcla no resuelta de antibióticos de antraciclina denominada complejo de ácido figaroico en solución diluída así como los concentrados crudos o la forma sólida.

20

La Fig. 1 muestra el espectro de absorción infrarrojo del complejo de ácido figaroico (pístillla de KBr).

La Fig. 2 muestra el espectro de absorción ultravioleta del complejo de ácido figaroico en HCl 0,1 N en metanol (línea continua) y en NaOH 0,1 N en metanol (línea de puntos).

25

1 La nueva cepa de Streptosporangium denominada cepa
C-31.751 de Streptosporangium sp. se obtuvo de una mues-
tra de tierra tomada en Seelyville, Indiana, Estados Uni-
dos. Un cultivo del organismo ha sido depositado en la
5 American Type Culture Collection, Washington, D.C. y aña-
dida a su colección permanente de microorganismos como
ATCC 31.129.

 El complejo de ácido figaroico inhibe el crecimien-
to de diversas bacterias Gram-positivas, por ejemplo
10 Staphylococcus aureus y Mycobacterium tuberculosis y di-
versos protozoos y levaduras, por ejemplo Candida albicans,
Histoplasma capsulatum, Trichomonas vaginalis y Trichomonas
faetus. La sustancia presenta propiedades inductoras de
fagós e inhibe el crecimiento de diversos sistemas tumora-
15 les sólidos y linfáticos en roedores, entre los que se
encuentran el Sarcoma 180, leucemia linfática L-1210, car-
cinosarcoma de Walker 256, leucemia linfática P-388 y mela-
noma B-16. El complejo de ácido figaroico puede ser utili-
zado sólo o en combinación con otros agentes antibacteria-
20 nos para evitar el crecimiento o reducir el número de las
bacterias Gram-positivas, levaduras y protozoos sensibles
antes mencionados. Es útil en soluciones de lavado para
fines de esterilización, v.g. para lavar las manos y de-
sinfectar diversos equipos de laboratorio, dentales y mé-
25 dicos u otros materiales contaminados y como enjuagado

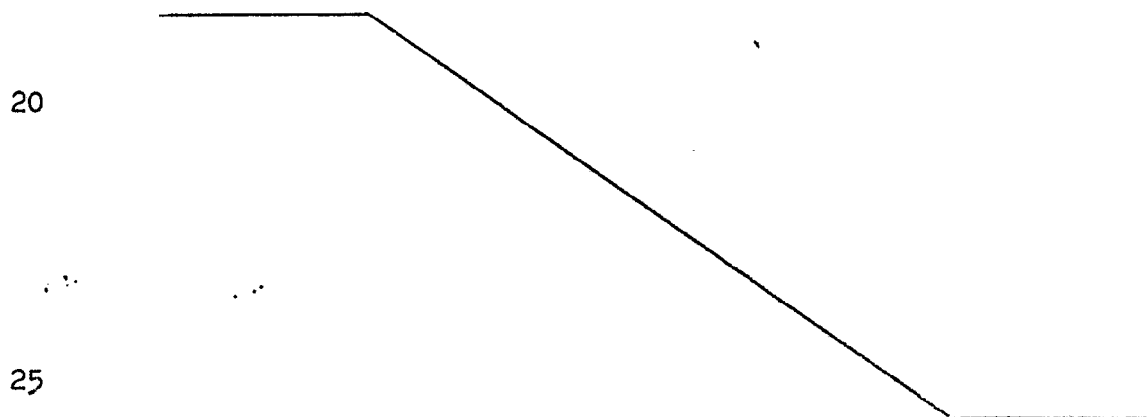
1 bacteriostático de las ropas lavadas. También es útil en el
tratamiento de los sistemas tumorales antes mencionados en
ratas y ratones.

5 La cepa C-31,751 presenta las siguientes característi-
cas morfológicas: Se forma un micelio aéreo
escaso. Durante la fase temprana de crecimiento, aparece
en la punta del esporoforo una cadena de esporas que es cor-
ta, compacta e irregularmente arrollada. La cadena de espo-
ras arrollada se desarrolla en un esporangio real que es de
10 forma esférica y tiene un diámetro de 4-12 micras. La ma-
yor parte de los esporangioforos miden 5-10 micras de lon-
gitud. Con los esporangios se producen ocasionalmente cade-
nas de esporas rizadas o flexuosas cortas. El micelio de
substrato es ramificado, con frecuencia curvado y probable-
15 mente no septado. El esporangiosporo no es móvil, es de for-
ma entre esférica y oval y tiene un tamaño de 0,7-0,9 mi-
cras. La estructura superficial de las esporas todavía no
ha sido determinada.

20 La Tabla I contiene las propiedades de cultivo obte-
nidas en diferentes medios, habiéndose realizado las obser-
vaciones al cabo de 1 a 2 meses de cultivo a 28°C. El or-
ganismo forma lentamente un micelio aéreo sobre agar saca-
rosa-nitrato, agar sales inorgánicas-almidón, agar extracto
de levadura-extracto de malta y agar harina de avena. El
25 color de la masa del micelio aéreo es de rosa blanquecino

1 a rosa. El micelio aéreo no se forma sobre agar de aspara-
gina, agar tirosina, agar nutriente y agar peptona-extracto
de levadura-hierro.

5 El esporangio se forma sobre agar de sales inorgáni-
cas-almidón, agar extracto de levadura-extracto de malta y
agar harina de avena. Se han observado numerosos esporan-
gios en los dos últimos medios después de incubar durante
siete semanas a 28^oC. La masa de micelio substrato presen-
ta forma granulada por observación macroscópica y micros-
10 cópica. El color principal del micelio substrato es naran-
ja rojizo y púrpura rojizo sobre agar glucosa-asparagina y
agar extracto de levadura-extracto de malta, respectivamen-
te. En agar glucosa-asparagina y en agar extracto de leva-
dura-extracto de malta se produce un pigmento difusible
15 amarillento pálido. En agar tirosina y en agar peptona-
extracto de levadura-hierro se producen cantidades trazas
de pigmento melanoideo o no se produce nada en absoluto.



1

TABLA I

Características de cultivo de la zapa C-31.751*

	Crecimiento	Color del reverso**	Micelio aéreo	Pigmento difusible
Agar sacarosa-nitrato	Escaso, granular fino	Rosa	Muy escaso, blanco rosáceo	Ninguno
Agar glucosa-asparagina	Moderado, granular	Naranja rojizo intenso	Ninguno	Ninguno o amarillo rojizo pálido
Agar glicerol-asparagina	Escaso, granular fino	Naranja intenso	Ninguno	Ninguno
Agar sales inorgánicas-almidón	Moderado, granular	Naranja amarillento vivo	Escaso, blanquecino	Ninguno
Agar tirosina	Escaso, granular fino	Pardo amarillento pálido	Ninguno	Ninguno
Agar nutriente	Moderado, granular	Púrpura rojizo apagado a vino oscuro	Ninguno	Ninguno
Agar extracto de levadura-extracto de malta	Bueno crenado	Rosa oscuro a púrpura rojizo intenso	Escaso, rosa púrpuro	Amarillo rojizo pálido
Agar harina de avena	Moderado, granular	Rosa púrpuro a púrpura brillante	Escaso, rosa blanquecino pálido	Rosa púrpuro
Agar peptona-extracto de levadura-hierro	Moderado	Violeta oscuro	Ninguno	Oro

20

* Observaciones al cabo de 1-2 meses de cultivo a 28°C.

** El pigmento es soluble en metanol y presenta propiedades indicadoras del pH: naranja amarillento a pH ácido y violeta a pH alcalino.

25

1

5

TABLA

Características de cult

Crecimiento

	Agar sacarosa-nitrato	Escaso, granular fino
	Agar glucosa-asparagina	Moderado, granular
10	Agar glicerol-asparagina	Escaso, granular fino
	Agar sales inorgánicas-almidón	Moderado, granular
	Agar tirosina	Escaso, granular fino
	Agar nutriente	Moderado, granular
15	Agar extracto de levadura-extracto de malta	Bueno crenado
	Agar harina de avena	Moderado, granular
	Agar peptona-extracto de levadura-hierro	Moderado

20

★ Observaciones al cabo de 1-2 meses de cultivo

★★ El pigmento es soluble en metanol y presenta pH ácido y violeta a pH alcalino.

25

TABLA I

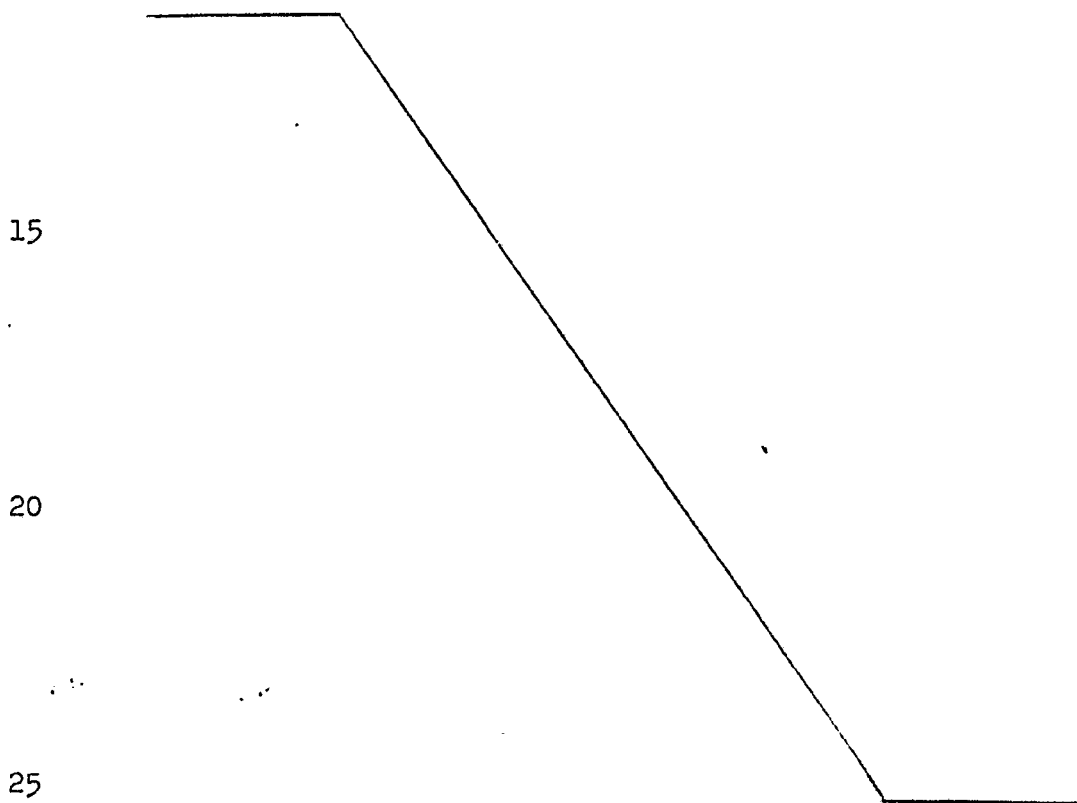
Características de cultivo de la cepa C-31.751*

	<u>Crecimiento</u>	<u>Color del reverso^{uA}</u>	<u>Micelio aéreo</u>	<u>Pigmento difusible</u>
	Escaso, granular fino	Rosa	Muy escaso, blanco rosáceo	Ninguno
	Moderado, granular	Naranja rojizo intenso	Ninguno	Ninguno o amarillo rojizo pálido
	Escaso, granular fino	Naranja intenso	Ninguno	Ninguno
midón	Moderado, granular	Naranja amarillento vívido	Escaso, blanquecino	Ninguno
	Escaso, granular fino	Pardo amarillento pálido	Ninguno	Ninguno
	Moderado, granular	Púrpura rojizo apagado a vino oscuro	Ninguno	Ninguno
	Bueno crenado	Rosa oscuro a púrpura rojizo intenso	Escaso, rosa purpúreo	Amarillo rojizo pálido
	Moderado, granular	Rosa purpúreo a púrpura brillante	Escaso, rosa blanquecino a pálido	Rosa purpúreo
le-	Moderado	Violeta oscuro	Ninguno	Oro

de 1-2 meses de cultivo a 28°C.

se en metanol y presenta propiedades indicadoras del pH: naranja amarillento a pH alcalino.

1 Las características fisiológicas y la utilización de
hidratos de carbono de la cepa C-31.751 se encuentran en
las Tablas II y III, respectivamente. El organismo reduce
los nitratos a nitritos en un medio orgánico natural pero
5 no en un medio inorgánico. Como la mayoría de las especies
de Micromonospora es considerablemente sensible al cloruro
sódico. Es un organismo mesofílico. Ciertos hidratos de car
bono como la sacarosa, la rafinosa, el almidón soluble y
el D-manitol son utilizados después de un largo periodo de
10 retraso.



1

5

TABLA II

Características fisiológicas del G-31.751

	<u>Ensayos</u>	<u>Respuestas</u>	<u>Materiales y métodos</u>
	Reducción de nitratos en medios inorgánicos	Negativa	Caldo de sacarosa-nitrato de Czapek
10	Reducción de nitratos en medios orgánicos Licuefacción de gelatina	Puertemente positiva Completamente licuada	El medio orgánico recomendado por Leudemann ¹ Medio basal: Extracto de levadura 0,4 %, extracto de malta 1,0 % y glucosa 0,4 % Agar almidón de Hayward Medio de Leudemann ¹
15	Hidrólisis del almidón Agar leche descremada Solución de leche descremada al 10 % Formación de melanina	Débilmente positiva Crecimiento escaso, hidrólisis débil Intensa coagulación y lenta peptonización No se produce	Agar tirosina y agar peptona-extracto de levadura-hierro Medio basal: Agar extracto de levadura-almidón de Leudemann ¹
20	Efecto del NaCl en medios orgánicos Temperatura de crecimiento	Crecimiento moderado a 0 y 0,5% de NaCl. Restringido a 1 y 1,5%. No se desarrolla a 2,5% Crecimiento máximo a 37°C. Crecimiento mediano a 28°C y 30°C. No se desarrolla a 15°C y 43°C.	Agar extracto de levadura-extracto de malta: medio ISP nº 2.

1) Leudemann, G.H.: Micromonospora purpureochromogenes (Waksman y Curtis 1916) comb. nov. (Subjective)
 Synonym: Micromonospora fusca Jensen 1932). Intl. J. Syst. Bacteriol. 21: 240-247, 1971.

25

1

5

TAF

Características fisi

	<u>Ensayos</u>	<u>Respuestas</u>
	Reducción de nitratos en medios inorgánicos	Negativa
10	Reducción de nitratos en medios orgánicos	Fuertemente positivo
	Licuefaccion de gelatina	Completamente licua
	Hidrólisis del almidón	Débilmente positiva
	Agar leche descremada	Crecimiento escaso, débil
15	Solución de leche descremada al 10 %	Intensa coagulación peptonización
	Formación de melanina	No se produce
	Efecto del NaCl en medios orgánicos	Crecimiento moderado de NaCl. Restringido No se desarrolla a
20	Temperatura de crecimiento	Crecimiento máximo miento mediano a 28 se desarrolla a 15°

1) Leudemann, G.H.: Micromonospora purpureochromogera
Synonym: Micromonospora fusca Jensen 1932). Intl.

25

TABLA II

Características fisiológicas del C-31.751

	<u>Respuestas</u>	<u>Materiales y métodos</u>
me-	Negativa	Caldo de sacarosa-nitrato de Czapek
me-	Fuertemente positiva	El medio orgánico recomendado por Leudemann ¹
	Completamente licuada	Medio basal: Extracto de levadura 0,4 %, extracto de malta 1,0 % y glucosa 0,4 %
	Débilmente positiva	Agar almidón de Hayward
	Crecimiento escaso, hidrólisis débil	Medio de Leudemann ¹
emada	Intensa coagulación y lenta peptonización	
	No se produce	Agar tirosina y agar peptona-extracto de levadura-hierro
os or	Crecimiento moderado a 0 y 0,5% de NaCl. Restringido a 1 y 1,5%. No se desarrolla a 2,5%	Medio basal: Agar extracto de levadura-almidón de Leudemann ¹
nto	Crecimiento máximo a 37°C. Crecimiento mediano a 28°C y 43°C. No se desarrolla a 15°C y 48°C.	Agar extracto de levadura-extracto de malta: medio ISP nº 2.

romonospora purpureochromogenes (Waksman y Curtis 1916) comb. nov. (Subjective pora fusca Jensen 1932). Intl. J. Syst. Bacteriol. 21: 240-247, 1971.

1

TABLA III

Utilización de hidratos de carbono de la cepa C-31.751^{*}

	I ^{**}			II		
	I	II		I	II	
	D(-)-arabinosa	+	-	D(-)-melibiosa	++ ^A	+ ^A
5	L(+)-arabinosa	++	++	Trehalosa	++	++
	D-xilosa	++ ^A	++	Rafinosa	+ ^A	-
	D-ribosa	++	++	D(-)melezitosa	-	-
	L-ramnosa	++	++	Almidón soluble	+	±
	D-glucosa	++	++	Celulosa	+	±
10	D(+)-galactosa	++ ^A	++	Glicerol	++	++
	D-fructosa	+	++	Inositol	++ ^A	++
	D-manosa	++	++	D-manitol	+ ^A	+ ^A
	L(-)sorbose	+	-	D-sorbitol	-	-
	Sacarosa	+ ^A	+ ^A	Dulcitol	-	-
15	Lactosa	+	+	Salicilina	±	-
	Celobiosa	++	++	Ningún azúcar	-	-

^{*} Observaciones al cabo de 1-2 meses de cultivo a 28°C.

20 ^{**} Medio basal I: Medio de Fridham-Gottlieb más 0,1 % de extracto de levadura Difco.

II: Medio orgánico de Leudemann, constituido por 0,5 % de extracto de levadura, 0,1 % de CaCO₃ y 1,5 % de agar en agua destilada.

A. Se forma un escaso micelio aéreo. No se observa micelio aéreo en los otros medios de azúcares.

25

1 La cepa C-31.751 contiene ácido meso-diaminopimélico
(meso-DAP) como componente aminoácido característico en la
pared celular. No hay presente ningún hidrato de carbono de
diagnóstico.

5 Resumiendo las características anteriores, la cepa
C-31.751 forma un micelio aéreo de color rosa blanquecino
(rosa de concha) y un esporangio esférico. El esporangios-
poro no es móvil. El esporangioesporo es corto, habitualmen
te con una longitud inferior a 10 micras. El color de la
10 masa del micelio substrato es de naranjaavioleta. No se
produce pigmento difusible distinto (ni siquiera melanina).
Casi todos los hidratos de carbono habituales son utiliza-
dos para el crecimiento. La pared celular de la cepa con-
tiene meso-DAP pero ningún componente de azúcar de diagnós-
15 tico.

Estas características principales indican que la cepa
C-31.751 es una especie del género Streptosporangium. De
acuerdo con la clasificación taxonómica de las especies de
Streptosporangium por H. Nonomura e Y. Ohara (J. Ferment.
20 Technol. 47 (11): 701-709, 1969 y 52 (2): 71-77 (1974), es-
tán descritas dieciseis especies. Entre ellas, ocho espe-
cies tienen un micelio aéreo rosáceo y esporangioforo cor-
to; son el Streptosporangium rubrum Potekhina 1965,
S. longisporum Schaffer 1969, S. roseum Couch 1955,
25 S. amethystogenes Nonomura y Ohara 1960, S. amethystogenes

1 var. nonreducens Prauser y Eckerdt 1967, S. vulgare Nonomura
y Ohara 1960, S. pseudovulgare Nonomura y Ohara 1969 y
S. nondiastaticum Nonomura y Ohara 1969. Posteriormente fue agrega-
do al mismo grupo de especies el S. violaceochromogenes
5 MK-49 (patente japonesa 49-42.896 de 4 de Abril de 1974).

La cepa C-31.751 difiere de Streptosporangium
amethystogenes, S. roseum y S. vulgare en su crecimiento po-
sitivo a 42°C; de S. longisporum en su espora globosa; de
S. nondiastaticum en su utilización positiva de la ramnosa,
10 el inositol y el almidón y del S. pseudovulgare en su uti-
lización positiva de la ramnosa y del inositol y en su mico-
lio substrato naranja o púrpura rojizo. El S. violaceochromo-
genes se diferencia de la cepa C-31.751 en su micelio subs-
trato incoloro o dorado y su utilización negativa o dudosa
15 de inositol y ramnosa. La cepa C-31.751 comparte varias ca-
racterísticas en común con el Streptosporangium rubrum des-
crito por L.L. Potekhina en Mikrobiologiya, 34, 292 (1965),
tales como el color de la masa aérea, el color del micelio
substrato, el pigmento soluble y la forma de las esporas.
20 Sin embargo, las descripciones de S. rubrum actualmente exis-
tentes no son suficientes para llegar a una conclusión de-
finitiva sobre la identidad de los dos organismos y, por lo
tanto, la cepa C-31.751 será considerada una especie inde-
terminada de Streptosporangium hasta que se disponga de
25 nuevos datos.

1 Preparación del complejo

 El complejo de ácido figaroico se produce cultivando una cepa productora de ácido figaroico de Streptosporangium, con las características del ATCC 31.129 o un mutante de la misma, en condiciones aerobias sumergidas en un medio nutriente acuoso. El organismo se cultiva en un medio nutriente que contiene una fuente asimilable de carbono, por ejemplo un hidrato de carbono asimilable. Son ejemplos de fuentes preferidas de carbono la lactosa, glicerol, sacarosa, almidón de maíz, glucosa, manosa y fructosa. Cuando se utiliza el almidón como fuente de carbono en el medio nutriente, puede agregarse amilasa al caldo antes de la cosecha para reducir cualquier problema de emulsión que pudiera plantearse. El medio nutriente también debe contener una fuente asimilable de nitrógeno como, por ejemplo, harina de pescado, peptona, harina de soja, harina de cacahuet, harina de semilla de algodón y licor de infusión de maíz. También pueden incorporarse sales inorgánicas nutrientes al medio y estas sales pueden ser cualquiera de las sales habituales capaces de proporcionar iones sodio, potasio, amonio, calcio, fosfato, sulfato, cloruro, bromuro, nitrato, carbonato o similares.

 La producción del complejo de ácido figaroico puede realizarse a cualquier temperatura que conduzca a un desarrollo satisfactorio del organismo, es decir desde la tem-

1 peratura ambiente hasta unos 43^oC y convenientemente se lle
va a cabo a una temperatura del orden de 27^oC. Normalmente
se consigue una producción óptima después de unos periodos
de incubación de unas 170-210 horas. Normalmente el medio es
5 ligeramente alcalino pero el pH exacto puede variar de acuer-
do con el medio particular utilizado. La fermentación puede
llevarse a cabo en matraces Erlenmeyer y en fermentadores de
laboratorio o industriales de diversas capacidades. Cuando
ha de realizarse la fermentación en un tanque, es conveniente
10 producir un inoculum vegetativo en un caldo nutriente por
inoculación del caldo de cultivo con un cultivo inclinado o
de tierra o un cultivo liofilizado del organismo. Después de
obtener un inoculum activo en esta forma, se transfiere asép-
ticamente al medio del tanque de fermentación para la produc-
15 ción a gran escala del complejo antibiótico. El medio en el
que es producido el inoculum vegetativo puede ser el mismo o
diferente al utilizado en el tanque para la producción del
nuevo complejo, siempre que se obtenga un buen crecimiento
del microorganismo.

20 Cuando la fermentación es completa, el complejo anti-
biótico se extrae del caldo completo con un disolvente or-
gánico adecuado, no miscible con agua, se concentra el ex-
tracto orgánico y el complejo sólido se precipita por di-
lución del extracto concentrado con un antidisolvente ade-
25 cuado. La extracción puede llevarse a cabo con disolventes

1 orgánicos no miscibles con agua cuya polaridad varía entre
la del cloruro de metileno y la del n-butanol y a un pH
comprendido aproximadamente entre 3,5 y 8,5. Se prefieren
los disolventes de polaridad intermedia como las cetonas
5 y los ésteres ya que se ha encontrado que son más selecti-
vos que los alcoholes pero suficientemente polares para ob-
tener unas buenas características de distribución. Son ejem-
plos de disolventes de extracción especialmente preferidos
la metilisobutilcetona y el acetato de etilo. El disolven-
10 te más preferido es la metilisobutilcetona. La extracción
se realiza convenientemente en condiciones débilmente áci-
das, es decir un pH de 4,0-5,0 por adición de un ácido mi-
neral tal como HCl o H₂SO₄ o en condiciones de pH del caldo
débilmente alcalino, es decir, pH de 8-8,5. Los rendimien-
15 tos máximos se obtienen a un pH de 4,5-5,0 con metilisobu-
tilcetona. Es preferible agregar un auxiliar de filtración
a la mezcla de extracción y después filtrar la mezcla. Se
concentra la fase orgánica y después se diluye con un anti-
disolvente apropiado, v.g. éter, para precipitar el comple-
20 jo de ácido figaroico. Si se recupera en condiciones alcali-
nas, el complejo púrpura de ácido figaroico puede ser con-
vertido en el ácido libre de color rojo anaranjado disol-
viendo el complejo en agua y acidulando la solución para
precipitar el complejo ácido que después puede ser recupe-
25 rado por filtración o extraído en disolventes orgánicos.

1 Propiedades del complejo de ácido figaroico

El complejo antibiótico denominado aquí complejo de ácido figaroico es un sólido amorfo rojo anaranjado en el estado de ácido libre. Es insoluble en los disolventes relativamente no polares como éter, benceno e hidrocarburos alifáticos, v.g. n-hexano, soluble en su mayor parte en alcoholes inferiores (metanol, etanol, n-butanol y 2-propanol), acetona, tetrahidrofurano y dioxano y totalmente soluble solo en disolventes muy polares como dimetilformamida y dimetilacetamida. Por recuperación en condiciones alcalinas, el complejo es de color púrpura intenso lo que indica la conversión de la forma ácida en un estado aniónico.

El complejo de ácido figaroico forma fácilmente sales con las bases y las sales farmacéuticamente aceptables del complejo, por ejemplo las sales alcalinas y alcalino-térreas farmacéuticamente aceptables, están incluidas dentro de esta invención.

El complejo contiene aproximadamente 2,5 % de nitrógeno por análisis. Es soluble en bicarbonato sódico acuoso y en hidróxido bórico acuoso formando respectivamente soluciones de color violeta rojizo y azul. Forma una solución de color rojo intenso con fluorescencia roja con acetato magnésico alcohólico y una solución negra (pardo anaranjada con fluorescencia violeta por dilución) con cloruro férrico alcohólico. El complejo da ensayo de Tollens positivo

1 pero los ensayos con carbazol y ninhidrina son enmascara-
dos por el color del pigmento. No experimenta ningún cam-
bio de color con una mezcla de ácido y cinc en polvo, con
5 bisulfito sódico ni con peróxido de hidrógeno. Se produce
una ligera reducción del color de violeta a rojo con una
solución alcalina de cinc en polvo y un cambio rápido a
rojo con una solución alcalina de bisulfito sódico. El pe-
roxido de hidrógeno alcalino no ejerce ningún efecto salvo
10 cuando se emplea en gran exceso, que produce una disminu-
ción del color desde violeta a rosa.

Los espectros de absorción infrarrojo y ultravioleta
del complejo de ácido figaroico indican que el complejo
es una mezcla de componentes de antraciclina. El espectro
infrarrojo (pastilla de KBr) de la Fig. 1 presenta bandas
15 principales a 2,94 (ancha), 3,4, 6,04-6,13, 6,18, 6,3,
6,95 (ancha), 7,1 (ancha), 8,1, 9,3, 9,5 y 9,7 micras. El
espectro de absorción ultravioleta del complejo en condi-
ciones ácidas y básicas se encuentra en la Fig. 2. La adsor-
tividad de la Fig. 2 viene definida por la ecuación

20
$$a = \frac{A}{bc}$$

donde A es la adsorbancia, b es la anchura de la célula
en cm y c es la concentración de la muestra en g/l. A una
concentración de 50 µg/ml en HCl 0,1 N en metanol, el com-
plejo de ácido figaroico presenta picos de absorción (lí-
25 nea continua) a 233, 253, 287-288 (hombro), 467 (hombro),

1 480 (hombro), 490, 511 (hombro) y 524 (hombro) mμ. En NaOH 0,1 N en metanol, el complejo presenta picos de absorción (línea de puntos) a 238, 266-268 (hombro) y 553 mμ.

5 Datos de la actividad biológica

Las concentraciones mínimas de inhibición in vitro (CMI) del complejo de ácido figaroico fueron determinadas para diversos microorganismos utilizando el procedimiento habitual de dilución en tubo. Los resultados indicados en la Tabla IV indican que diversos organismos Gram-positivos, levaduras y tres protozoos son sensibles al antibiótico. Los organismos Gram-negativos son insensibles.

TABLA IV

Espectro antimicrobiano del complejo de ácido figaroico

15	<u>Organismo de ensayo</u>		<u>CMI, μg/ml</u>
	<u>Bacteria:</u>		
	Staphylococcus aureus	A9537	1,6
	Mycobacterium tuberculosis BCG	A9579	25
	Escherichia coli	A15119	50
20	Pseudomonas aeruginosa	A9843	> 50
	Proteus mirabilis	A9900	> 50
	Salmonella enteritidis	A9531	> 50

25

1

TABLA IV (continuación)

<u>Organismo de ensayo</u>		<u>GMI, µg/ml</u>
<u>Levaduras:</u>		
Candida albicans	A9540	50
5 Trychophyton mentagrophytes	A9870	< 50
Microsporum canis	A9872	> < 50
<u>Protozoos:</u>		
Histoplasma capsulatum	A15056	6,3
Trichomonas vaginalis	A20074	1,25
10 Trichomonas faetus	A20075	0,31

15

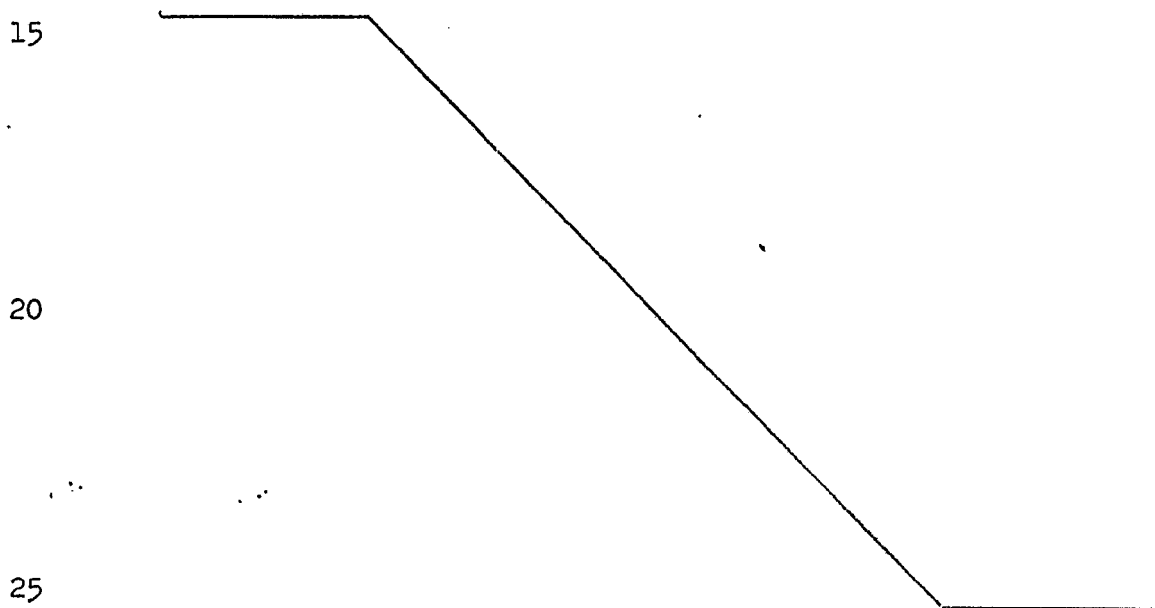
20

25

Se determina la capacidad del complejo de ácido figaroico para inducir la producción de bacteriofagos en la cepa lisogénica de Escherichia coli W 1709. Se observa una inducción significativa hasta 0,8 µg/ml. Los ensayos con proteína por dilución en tubo para determinar los efectos citotóxicos sobre células He La en un cultivo tisular dan un punto final al 50 % (DE₅₀) de 0,004 µg/ml (método descrito en la obra Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 1966: 613-618, 1967).

El efecto del complejo de ácido figaroico sobre varios sistemas tumorales en roedores también ha sido estudiado. Los detalles de los métodos utilizados han sido descritos en Cancer Research 22: 167-173, 1962 y Cancer Chemoth. Reports 3: 1-87 (Parte 3), 1972. El tratamiento de ratones con un Sarcoma 180 implantado subcutáneamente como tumor

1 sólido con el caldo de fermentación del complejo de ácido
figaroico produjo una inhibición del 37 % del aumento del
diámetro del tumor (una inhibición estimada del 75 % del
aumento del peso del tumor). El tratamiento con el mismo
5 caldo también aumentó la vida de ratones con leucemia
L-1210 en un 29 % sobre la de los animales de control. Se
ha encontrado que el caldo de complejo de ácido figaroico
es activo contra el carcinosarcoma de Walker 256 (intra-
muscular), la leucemia linfática P-388 y el melanoma B-16
10 en roedores. También se analizó el complejo de ácido figa-
roico sólido y se encontró que era activo sobre diversos
sistemas tumorales. Los resultados sobre la leucemia L-1210
y el melanoma B-16 en ratones se encuentran en la Tabla V.



1

5

TABLA V

Efecto del complejo de ácido figaroico sobre tumores transplantados en ratón

Dosis ng/kg/día	Leucemia L-1210			Melanoma B-16		
	Diferencia de pesos promedios (T-C, g)	T/C porcentaje TSM	Supervivientes al 5º día	Diferencia de pesos promedios (T-C, g)	T/C porcentaje TSM	Supervivientes al 5º día
128	-5,2	Tox	1/6	-3,4	Tox	6/6
64				0	Tox	6/6
32	-2,8	150	6/6	-3,4	254 (1)	6/6
16				-3,7	>400 (2)	6/6
8	-2,6	129	6/6	-0,9	206	6/6
4				+3,6	160	6/6
2	-0,7	114	6/6	+0,9	126	6/6
1				-1,7	129	6/6

Tratamiento: Una vez al día durante 9 días, intraperitonealmente.

Evaluación: T/C porcentaje TSM = tiempo de supervivencia medio en días: TSM tratados/TS: control x 100.

Criterios: T/C > 125 se considera una inhibición significativa del tumor (prolongación de la supervivencia del huésped).

20

(1) 2/6 supervivientes al cabo de 60 días.

(2) 4/6 supervivientes al cabo de 60 días.

25

1

5

TABLA V

Efecto del complejo de ácido figaroico sobre
Leucemia L-1210

	<u>Dosis</u> <u>ug/kg/día</u>	<u>Diferencia de</u> <u>pesos promedios</u> <u>(T-C, g)</u>	<u>T/C</u> <u>porcentaje</u> <u>TSM</u>	<u>Supervivi-</u> <u>tes a</u> <u>5º día</u>
10	128	-5,2	tox	1/6
	64			
	32	-2,8	150	6/6
	16			
	8	-2,6	129	6/6
15	4			
	2	-0,7	114	6/6
	1			

Tratamiento: Una vez al día durante 9 días, intraper

Evaluación: T/C porcentaje TSM = tiempo de supervivencia

Criterios: T/C > 125 se considera una inhibición significativa (supervivencia del huésped).

20

(1) 2/6 supervivientes al cabo de 60 días.

(2) 4/6 supervivientes al cabo de 60 días.

25

TABLA V

lejo de ácido figaroico sobre tumores transplantados en ratón

<u>Leucemia L-1210</u>			<u>Melanoma B-16</u>		
<u>de</u> <u>ios</u>	<u>T/C</u> <u>porcentaje</u> <u>TSM</u>	<u>Supervivien</u> <u>tes al</u> <u>5º día</u>	<u>Diferencia de</u> <u>pesos promedios</u> <u>(T-C,g)</u>	<u>T/C</u> <u>porcentaje</u> <u>TSM</u>	<u>Supervivien</u> <u>tes al</u> <u>5º día</u>
	Tox	1/6	-3,4	Tox	6/6
			0	Tox	6/6
	150	6/6	-3,4	254 ⁽¹⁾	6/6
			-3,7	> 400 ⁽²⁾	6/6
	129	6/6	-0,9	206	6/6
			+3,6	160	6/6
	114	6/6	+0,9	126	6/6
			-1,7	129	6/6

día durante 9 días, intraperitonealmente.

índice TSM = tiempo de supervivencia medio en días: TSM tratados/TSM control x 100.
 se considera una inhibición significativa del tumor (prolongación de la supervivencia).
 al cabo de 60 días.
 al cabo de 60 días.

1 ras. En este momento se encuentra actividad antibiótica
constituída por el complejo de ácido figaroico en el fil-
trado de cultivo y en el micelio.

EJEMPLO 2

5 Fermentación en tanque

Un tanque fermentador con 37,8 litros de medio de
producción estéril (como el del Ejemplo 1) se inocula con
1,89 litros de cultivo vegetativo preparado de acuerdo con
el Ejemplo 1, se agita a una velocidad de 375 rpm, se airea
10 a un caudal de 76,5 litros/minuto y se incuba a 27°C. Al
cabo de 190 horas se aísla el complejo antibiótico.

EJEMPLO 3

Fermentación en tanque

15 Un tanque fermentador con 3030 litros de medio de pro-
ducción (como el del Ejemplo 1), se inocula con 152 litros
de cultivo vegetativo (preparado como en el Ejemplo 1), se
agita a una velocidad de 155 rpm, se airea a un caudal de
1420 litros/minuto y se incuba a 27°C. El complejo de áci-
do figaroico se aísla al cabo de 210 horas.

EJEMPLO 4

Extracción de caldo y micelio a un pH del caldo ligeramen- te alcalino con n-butanol

25 Filtrando un caldo de una fermentación en matraz sa-
cudido, empleando un total de 5 litros de medio de partida,
se obtienen 2,5 litros de filtrado a pH 8,5. De ellos, se

1 extraen dos veces 1,5 litros con lotes de 1 litro de n-bu-
tanol, se separan las fases y se concentran las fases or-
gánicas combinadas. Por dilución del concentrado con éter
se obtienen 1,4 g de un sólido púrpura amorfo, activo
5 frente a la leucemia L-1210 en ratones a 2 mg/kg/día. La
torta micelial de la filtración del caldo se agita durante
30 minutos con metanol suficiente para obtener una suspen-
sión fluída y después se filtra. El filtrado se concentra
hasta que se ha separado la mayor parte del alcohol y el
10 residuo acuoso se extrae como antes para dar 6,35 g de com-
plejo de ácido figaroico. Se encuentra que el producto,
que es un sólido púrpura amorfo, es activo frente a la leu-
cemia L-1210 en ratones a una concentración de 8 mg/kg/día.

EJEMPLO 5

15 Extracción de caldo completo a un pH alcalino con n-butanol

Se agitan 1,5 litros de caldo completo a pH 8,6 con
un volumen aproximadamente igual de n-butanol. La masa espe-
sa se filtra a través de una torta de Celite (marca regis-
trada de la tierra de diatomeas producida por Johns-Manville
20 Products Co.), se separan las fases y la fase orgánica se
concentra hasta pequeño volumen. Este se diluye con un ex-
ceso de éter para precipitar 621 mg de complejo de ácido
figaroico. Se encuentra que el sólido púrpura amorfo es
activo contra la leucemia L-1210 en ratones a una dosis de
25 0,2 mg/kg/día. El sólido no funde sino que se descompone

1 por encima de 200°C.

EJEMPLO 6

Extracción de caldo completo a un pH ácido con n-butanol

5 Se repite el procedimiento general del Ejemplo 5 a excepción de que el pH del caldo completo se ajusta a 4,0 con HCl y se mantiene en ese valor durante la extracción. Cuatro litros de caldo completo dan 1,7 g de complejo de ácido figaroico en forma de ácido libre como sólido rojo anaranjado. El sólido es tóxico para los ratones a una
10 concentración de 0,25 mg/kg/día y presenta propiedades de inducción de fagos hasta una dilución de 1,5 µg/ml.

EJEMPLO 7

Extracción de caldo completo (ligeramente alcalino) con n-butanol a gran escala

15 Se agitan 2788 litros de caldo completo a pH 8,6 con 1357 litros de n-butanol. Se separa la fase orgánica para dar 783 litros de extracto rico que se concentra hasta 13 litros. Por adición de 80 litros de Skellysolve.B se obtienen 728 g del complejo de ácido figaroico crudo
20 de color púrpura.

EJEMPLO 8

Extracción ácida de caldo completo con metil-isobutilcetona (MIBK)

25 Se descongelan 10 litros de caldo completo que se han mantenido congelados y se agitan con 10 litros de MIBK

1 durante 20 minutos después de ajustar el pH a 4,5. Se agi-
ta con la mezcla un auxiliar de filtración y aquélla se
filtra después sobre una capa de auxiliar de filtración.
Se separan las fases del filtrado y la fase orgánica se
5 concentra hasta pequeño volumen. Por dilución con un ex-
ceso de Skellysolve B se obtienen 4 g del complejo de áci-
do figaroico de color rojo anaranjado, en forma de ácido
libre, con actividad inductora de fagos a una dilución de
6,2 µg/ml.

10

EJEMPLO 9

Extracción ácida de caldo completo con metilisobutilceto- na a gran escala (MIBK)

Se ajustan 3095 litros de caldo completo desde pH
8,35 hasta pH 3,35 a 10°C por adición de 49 litros de
15 H₂SO₄ al 30 %, con agitación y enfriamiento. Se agitan
dos volúmenes (6412 litros) de MIBK con el caldo, seguido
de la adición de un exceso de auxiliar de filtración (tie-
rra de diatomeas). La mezcla se filtra a través de un fil-
tro de vacío previamente recubierto, empleando 2554 li-
20 tros adicionales de MIBK como lavado. Se separan 7555 li-
tros de extracto rico en MIBK y se concentra hasta 10 li-
tros. Durante la concentración precipitan 1,285 kg de só-
lido húmedo que se recoge. Por adición de 100 litros de
25 Skellysolve B al concentrado se obtienen 365 g adiciona-
les de un material oleoso crudo. La primera cosecha de só-

1 No se seca hasta 858 g y se divide en tres lotes. Cada uno
de ellos se agita con 4 litros de acetona y se filtra la
materia insoluble. Esta última es el auxiliar de filtra-
ción que, cuando se combina y seca, pesa 367 g. La solu-
5 ción acetónica se concentra y diluye con un exceso de éter
para dar 294,5 g de complejo crudo de ácido figaroico.
Por evaporación del éter se obtienen 19,2 g de material
inactivo. El precipitado oleoso de Skellysolve B se trata
también con éter pero resulta inactivo.

10

EJEMPLO 10

Conversión de la sal de complejo de ácido figaroico en la forma de ácido libre

Se agitan 25 g del sólido púrpura crudo obtenido por
extracción alcalina en n-butanol como se ha descrito en
15 el Ejemplo 7 con 1 litro de agua a 25° hasta que se disuel-
ve. El pH de la solución púrpura se ajusta desde 8,3 has-
ta 1,1 mediante la adición gota a gota de HCl concentrado
con agitación. Se forma el ácido libre del complejo de
ácido figaroico como precipitado rojo ladrillo fino como
20 un lodo, que se recoge por centrifugación. Después de se-
carlo, pesa 13,6 g y es activo contra el sistema tumoral
L-1210 en ratones hasta 0,2 mg/kg/día. El líquido que so-
brenada se liofiliza para dar 10,0 g de un sólido amorfo
totalmente inactivo que contiene 7,8 % de cenizas por
25 combustión. Los resultados del análisis de combustión in-

1 dican que el material catiónico combinado al complejo de
ácido figaroico aniónico púrpura es en gran parte orgáni
co.

5 Habiendo descrito la invención, se considera como
una novedad y, por lo tanto, reclamamos como de nuestra
propiedad lo contenido en las siguientes:

REIVINDICACIONES

10 1. Un procedimiento para la producción del comple
jo antibiótico denominado complejo de ácido figaroico -
que consiste en cultivar una cepa de Streptosporangium -
productora de ácido figaroico, con las características de
la cepa ATCC 31.129, en un medio nutriente acuoso que con
tiene fuentes asimilables de nitrógeno y carbono, en con
diciones aerobias sumergidas, hasta que dicho organismo -
15 produce una cantidad sustancial del complejo de ácido fi
garoico en el citado medio de cultivo.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde
la cepa es ATCC 31.129 o un mutante de la misma.

20 3. Un procedimiento según la reivindicación 1, que -
comprende la operación adicional de recuperar el complejo
de ácido figaroico del medio de cultivo.

25 4. Un procedimiento según la reivindicación 3, don
de el caldo de cultivo completo se extrae con un disolven
te orgánico no miscible con agua, se concentra la fase or
gánica y se precipita el complejo de ácido figaroico sóli

1 do por dilución del extracto orgánico concentrado con un
antidisolvente.

5. Un procedimiento según la reivindicación 4, don
de el caldo completo se extrae con n-butanol y el comple
5 jo sólido se precipita del extracto orgánico concentrado
con un éter.

6. Un procedimiento según la reivindicación 3, don
de el caldo completo se ajusta con un ácido a un pH de -
4,5-5,0 aproximadamente, se extrae el caldo con un disol
10 vente orgánico no miscible con agua, se concentra la fa-
se orgánica y el complejo de ácido figaroico sólido se -
precipita por dilución del extracto orgánico concentrado
con un antidisolvente.

7. Un procedimiento según la reivindicación 6, don
15 de el caldo acidulado se extrae con metil-isobutil-cetona
y el complejo sólido se precipita del extracto orgánico -
concentrado con un éter.

8. Se reivindica por último como objeto sobre el -
que ha de recaer la patente de invención que se solicita:
20 UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DEL COMPLEJO ANTIBIO-
TICO DENOMINADO COMPLEJO DE ACIDO FIGAROICO.

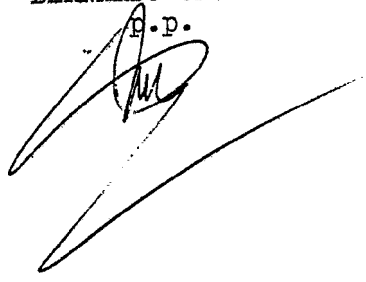
25

1 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente memoria descriptiva que consta de veintinueve
páginas mecanografiadas.

Madrid, 23 Junio 1.976

BERNARDO UNGRIA

P.D.

A large, stylized handwritten signature in black ink, appearing to be 'B. Ungria', is written over the typed name and the 'P.D.' initials.

5

10

15

20

25

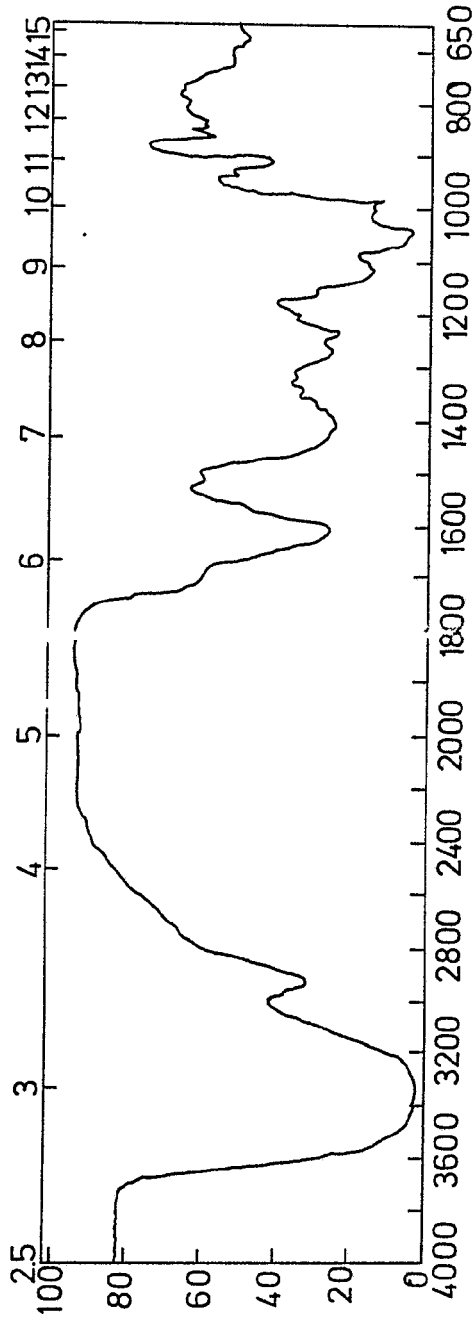


FIG.-1

ESCALA VARIABLE
de ... de 197.
Madrid, BERNARDO UNGRÍA
P. P.

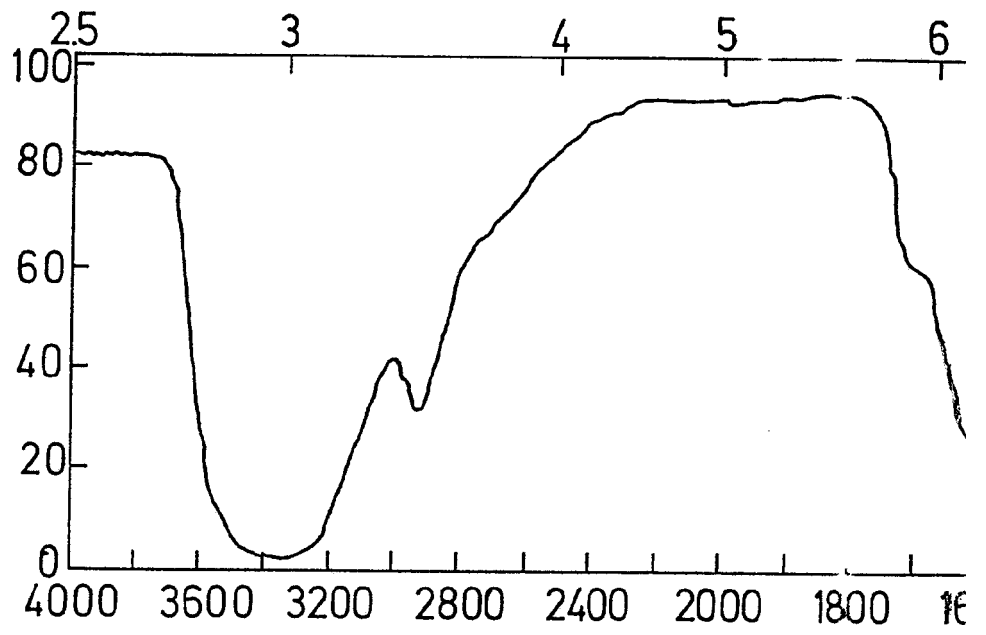
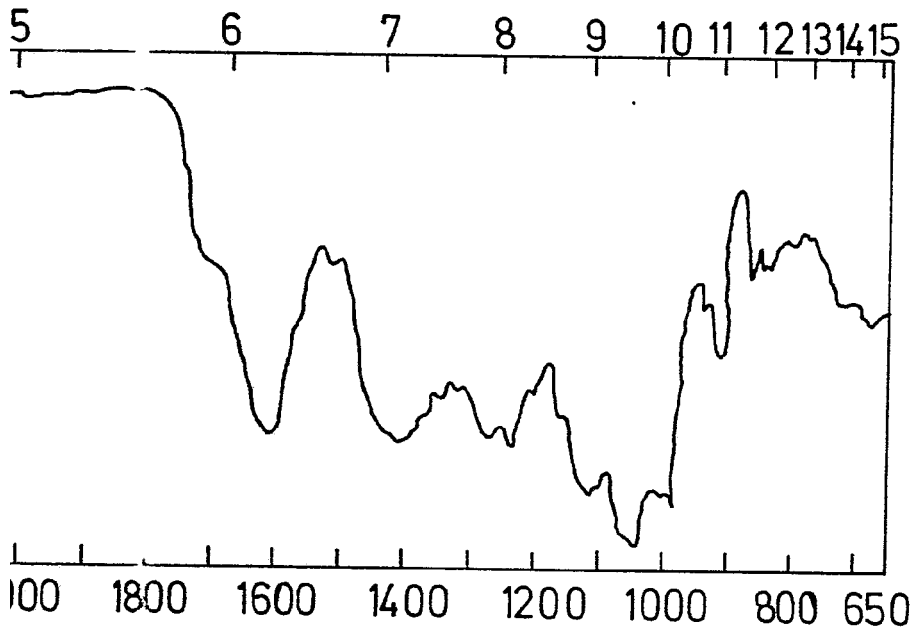


FIG.-1



ESCALA VARIABLE

Madrid, ⁰⁷ de ¹¹ de 1976

BERNARDO UNGRIA

p. p.

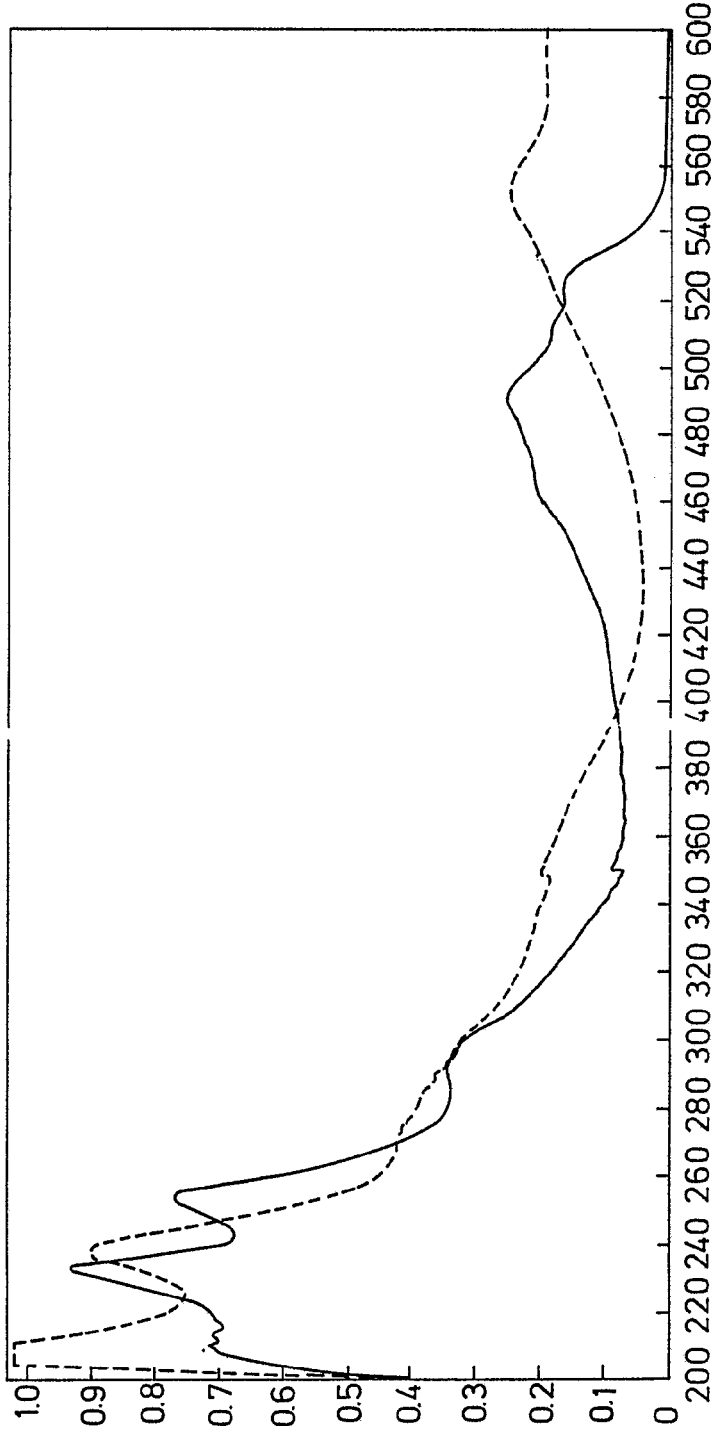


FIG:2

ESCALA VARIABLE
Madrid, 2 de Mayo de 1976
BERNARDO UNGRIA
P.P.

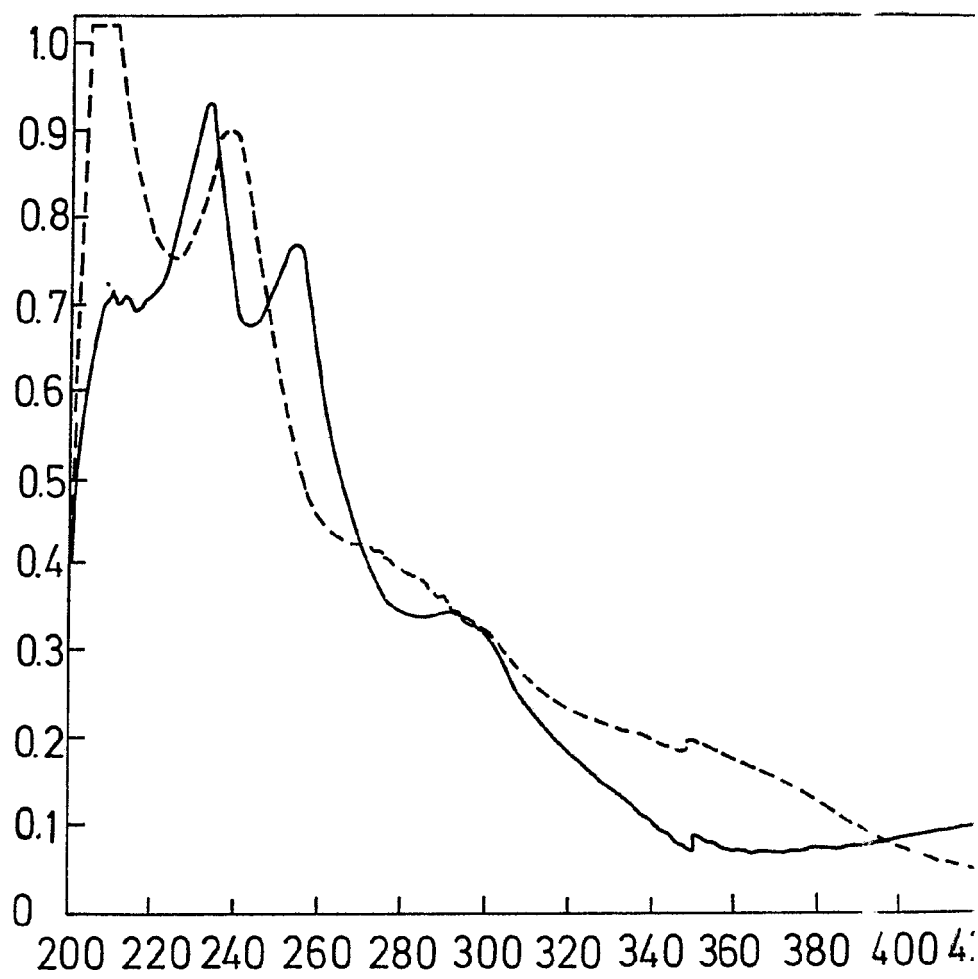
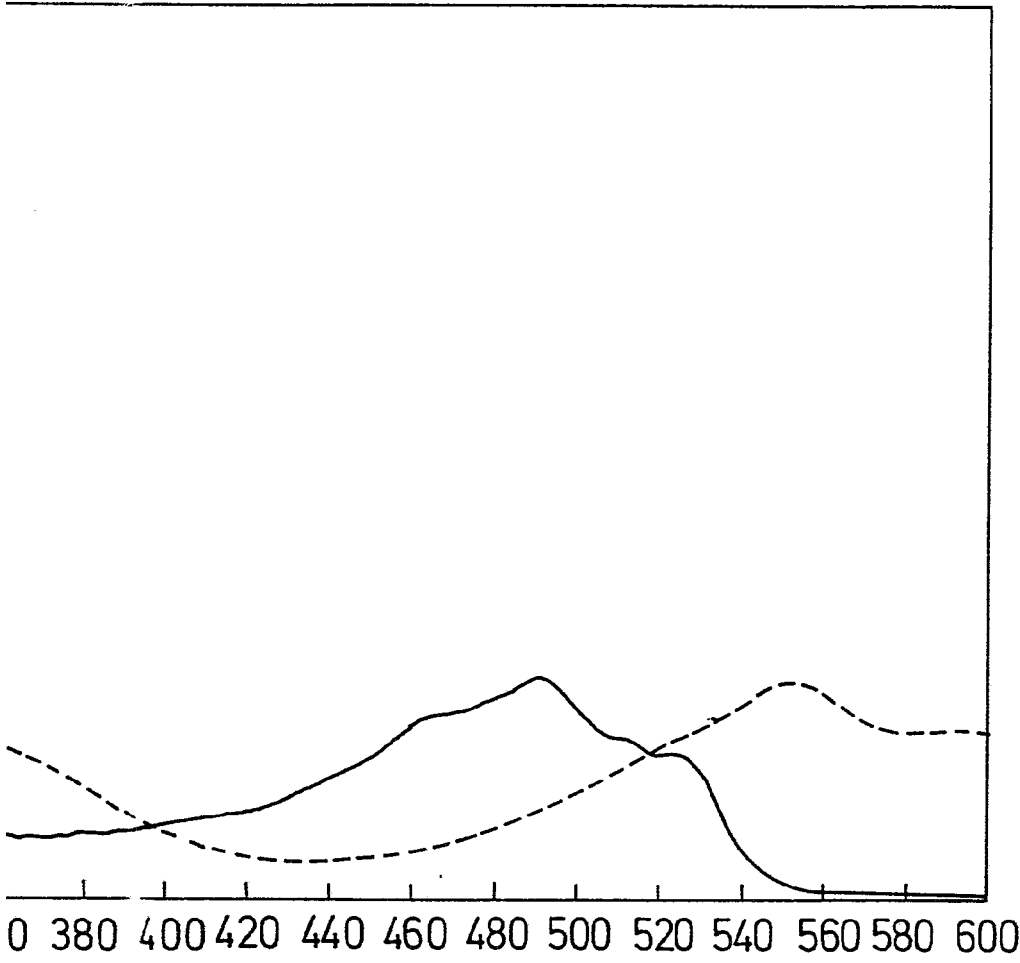


FIG: 2



ESCALA VARIABLE

Madrid, 22 de Mayo de 1976
BERNARDO UNGRIA
D. P.