

ES " 449770 (60) A1
1976

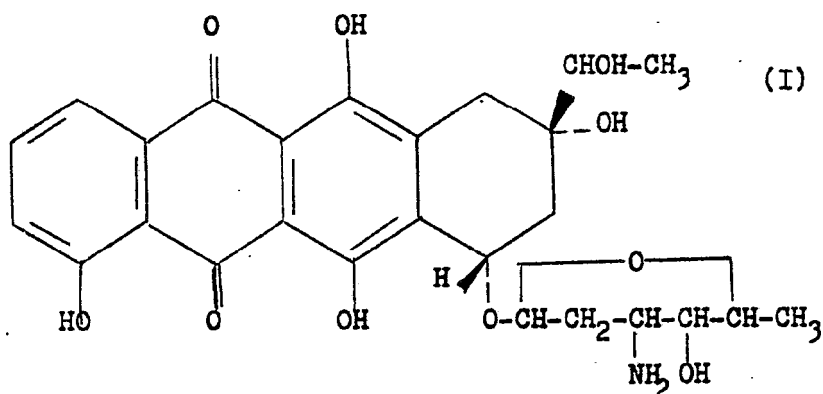


ESPAÑA

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES		
(31) NUMERO 75 20604	(32) FECHA 1 de julio de 1975	(33) PAIS Francia
(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D; AGAK	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
(64) TITULO DE LA INVENCION PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UNA NUEVA SUSTANCIA ANTI-TUMORAL BASICA, DESIGNADA POR EL NUMERO 32.999 RP.		
(71) SOLICITANTE (S) RHONE-POULENC INDUSTRIES. 20 DIC. 1977		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE 22, avenue Montaigne, Paris 8e, Francia		
(72) INVENTOR (ES) Jean FLORENT, Ing. Jean LUNEL, Ing. Jacques RENAUT, Ing.		
(73) TITULAR (ES)		
(74) REPRESENTANTE D. JAIME GOMEZ-ACEBO Y MODET		

La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de un nuevo derivado del naftaceno de fórmula:



5 El producto de fórmula I, que será designado por el número 32.999 RP, presenta un interés particular como consecuencia de su actividad antitumoral.

El 32.999 RP es un compuesto básico de color rojo oscuro que forma sales con los ácidos.

10 El clorhidrato del 32.999 RP es soluble a razón de 100 mg/cm³ aproximadamente en el metanol, piridina, dimetilformamida y agua, de 10 mg/cm³ aproximadamente en el n.butanol saturado de agua a 20°C, de 5 mg/cm³ aproximadamente en el etanol, y prácticamente insoluble (menos del 0,1 mg/cm³)
15 en la acetona, el cloroformo, el cloruro de metileno, el acetato de etilo, el benceno, la metilisobutilcetona, el dioxano y el hexano.

El clorhidrato del 32.999 RP contiene carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y cloro. Su composición elemental
20 es próxima de:

C% = 56,6 H% = 5,7 O% = 29,41 N% = 2,39 Cl% = 6,0

Además se caracteriza por las propiedades físicoquímicas.

- aspecto: polvo microcristalino, rojo anaranjado
- punto de fusión: hacia 200°C (con descomposición)
- 5 - poder rotatorio: (determinado en solución al 0,09 % en el etanol al 0,1% de HCl 1N)

$$[\alpha]_D^{20} = + 208^\circ \pm 32^\circ$$

- espectro ultra-violeta: determinación a partir de una solución a 10,65 mg/l en el etanol al 0,1% de HCl 1N.

10

Máximo de absorción a :	E 1 % 1 cm
233 nm	620
254 nm	495
292 nm	140

Este espectro se representa por la figura 1.

- 15
- espectro visible: determinación a partir de una solución a 10,65 mg/l en el etanol a 0,1% de HCl 1N.

20

Máximo de absorción a:	E 1 % 1 cm
493 nm	272
512 nm	189
527 nm	190

Este espectro se representa por la figura 2.

- espectro infrarrojo: (determinación a partir de comprimidos en mezcla con KBr)

Este espectro se representa por la figura 3 en la que

se ha llevado en abscisas, por una parte las longitudes de onda expresadas en micrones (escala superior) y, por otra, los números de ondas en cm^{-1} (escala inferior) y en ordenadas las densidades ópticas.

5 En el cuadro I se indican las principales bandas de absorción infrarroja para este producto expresadas en número de ondas (cm^{-1}).

	3410 F	2680 ep.	1580 ep.	1195 F	915 ep	725 m	530 f
	3250 ep	2600 ep	1510 ep	1165 F	885 m	708 m	485 m
10	3220 ep	1980 tf	1460 F	1115 F	875 m	695 ep	475 ep
						665 ep	
	3050 ep	1930 ep	1440 F	1062 F	845 ep	640 ep	465 f
	2970 F	1900 tf	1405 F	1050 ep	840 ep	625 ep	450 ep
	2930 F	1800 tf	1370 ep	1030 ep	820 F	600 m	438 m
15	2900 ep	1735 ep	1315 ep	1010 F	810 ep	580 f	415 tf
	2860 ep	1690 ep	1285 F	985 F	780 m	565 f	390 m
	2820 ep	1635 ep	1255 m	960 ep	762 m	540 f	320 f
		1600 tF	1235 F	930 m	750 m		

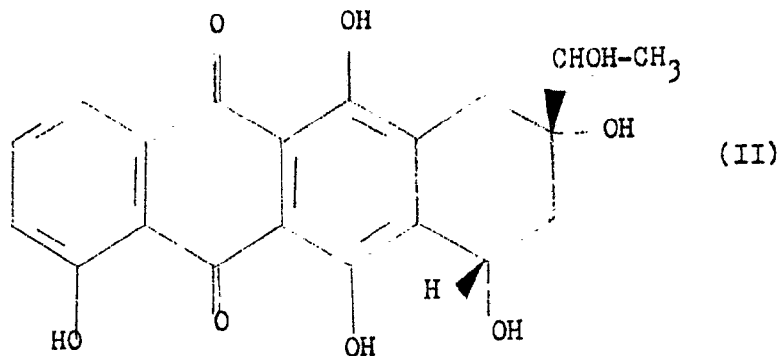
tF = muy fuerte f = débil

20 F = fuerte tf = muy débil

 m = media ep = hombro

25 El 32.999 RP puede caracterizarse por cromatografía sobre capa delgada de gel de sílice utilizando como disolvente de desarrollo la mezcla cloruro de metileno - ácido fórmico - metanol (80-17-3 en volumen) a una temperatura de 24° C. En este sistema el clorhidrato del 32.999 RP tiene un Rf próximo de 0,2.

La hidrólisis ácida del 32.999 RP o de una de sus sales permite obtener el producto de fórmula:



que es la aglicona del 32.999 RP.

5 La aglicona del 32.999 RP es soluble a razón de 20 mg/cm³ en la piridina, 5 mg/cm³ en el metanol, el dioxano, el cloroformo y el cloruro de metileno y a menos de 0,1 mg/cm³ en la acetona, acetato de etilo, hexano y agua.

Este producto presenta además las propiedades físico-químicas siguientes:

- aspecto: polvo microcristalino rojo anaranjado
- 10 - punto de fusión: hacia 185°C (con descomposición)
- análisis elemental: es próximo de:

$$C\% = 61,57 \quad H\% = 5,31 \quad O\% = 30,16$$

- poder rotatorio: (determinado en solución al 0,1% en el dioxano)

15
$$[\alpha]_D^{20} = + 249^\circ \pm 32^\circ$$

- espectro ultra-violeta: determinación a partir de soluciones a 50 y 5 mg/l en el etanol al 0,1 % de HCl 1N

Máximo de absorción a:	E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$
234 nm	770
254 nm	640
293 nm	190

5 Este espectro se representa por la figura 4 en la que las curvas I y II corresponden a soluciones a 50 y 5 mg/l.
- espectro visible: determinado a partir de una solución a 10 mg/l en el etanol al 0,1 % de HCl 1N

Máximo de absorción a:	E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$
493 nm	370
515 nm	255
528 nm	270

10

Este espectro se representa en la figura 5.

15

- espectro infrarrojo: determinación a partir de comprimidos en mezcla con KBr)

20

Este espectro se representa por la figura 6 en la que se ha llevado en abscisas, por una parte las longitudes de onda expresadas en micrones (escala superior) y, por otra, los números de onda expresados en cm^{-1} (escala inferior) y en ordenadas las densidades ópticas.

En el cuadro II se indican las principales bandas de absorción infrarroja para este producto expresadas en número de ondas (cm^{-1}).

	3500 ep	2680 ep	1412 F	1095 f	910 m	740 m	530 tf
	3420 F	1980 tf	1370 F	1070 ep	885 m	710 m	505 ep
	3360 ep	1705 f	1315 ep	1062 F	875 m	700 ep	485 m
	3080 ep	1640 ep	1285 tF	1050 ep	865 f	680 tf	465 m
5	2975 m	1600 tF	1255 tF	1030 m	840 m	665 tf	450 m
	2925 m	1580 ep	1240 ep	1020 m	815 F	625 ep	435 m
	2910 ep	1540 ep	1195 F	1005 m	805 ep	595 f	385 tf
	2890 ep	1458 F	1165 F	975 m	785 ep	585 f	360 tf
	2860 ep	1448 F	1130 m	950 m	775 ep	570 f	320 tf
10				925 m	765 m	545 f	

tF = muy fuerte F = fuerte m = media

f = débil tf = muy débil ep. = hombro

La aglicona del 32.999 RP puede ser caracterizada por cromatografía sobre capa delgada de gel de sílice utilizando como disolvente de desarrollo la mezcla cloruro de metileno-ácido fórmico - metanol (80-17-3 en volúmen) a una temperatura de 24°C. En este sistema la aglicona tiene un Rf próximo de 0,7.

Según la presente invención, el 32.999 RP puede obtenerse por cultivo aerobio de microorganismos que pertenecen al género estroptomiceto y elegido entre *Streptomyces coeruleorubidus* DS 8899 (NRRL 3046), *Streptomyces coeruleorubidus* DS 31.723 (NRRL 3045), *Streptomyces coeruleorubidus* DS 7126 (NRRL 8098), y *Streptomyces bifurcus* DS 23.219 (NRRL 3539) en medios nutritivos que convienen a los estroptomicetos, en presencia de adyuvantes elegidos entre la ametofterina, la sulfanilamida, el sulfatiazol, la sulfapiridázina, el barbital, el fenobarbital, el butobarbital, y el pentiobarbital.

La cantidad de antibiótico 32.999 RP formada durante el cultivo puede variar en función de la composición del me-

dio de cultivo, de la cantidad de adyuvante añadido y del momento de su adición, como se indicará más tarde.

Los microorganismos *Streptomyces coeruleorubidus* DS 8899 (NRRL 3046) y *Streptomyces coeruleorubidus* DS 31.723 (NRRL 3045) son ya descritos en la patente francesa 1.380.810 y sus derivados correspondientes, y el *Streptomyces bifureus* DS 23.219 (NRRL 3539) se describen en la patente francesa 1.593.235 y sus diversos correspondientes.

Streptomyces coeruleorubidus DS 7126 es una cepa nueva, que ha sido aislada a partir de una parcela de tierra. Una muestra ha sido depositada en Northern Regional Research Laboratory de l'U.S. Departament of Agriculture en Peoria, III. (U.S.A.), donde ha sido registrada bajo la referencia NRRL 8098. Muestras de este microorganismo pueden obtenerse de este laboratorio con referencia al presente documento.

El aislamiento de esta cepa ha sido efectuado siguiendo el método general que consiste en poner una pequeña cantidad de tierra en suspensión en agua destilada estéril, en diluir la suspensión a diferentes concentraciones, y en extender un pequeño volumen de cada dilución sobre la superficie de cajas de Pétri que contienen un medio nutritivo geloso. Después de una incubación de algunos días a 26°C, que permite a los microorganismos desarrollarse, las colonias que se desean aislar para continuar así el estudio son tomadas y transplantadas sobre gelosas nutritivas inclinadas a fin de obtener así cultivos más abundantes.

El *streptomyces* DS 7126 se liga a la especie *Streptomyces coeruleorubidus*, descrita por G.F. GAUZE et col. (Problems in the classification of Antagonistic Antinomycetes The American Institute of Biological Sciences, Washington,

1959, p. 100), de la que posee los principales caracteres. Presenta en efecto un micelio aéreo esporulado azul a azul verdoso claro; sobre el medio mineral I de Gauze, desarrolla un micelio vegetativo que toma una coloración rojiza y elabora un pigmento soluble de igual color que difunde en la gelosa, siendo todas estas propiedades características de la especie *Streptomyces coeruleorubidus*. Es por esta razón por la que se la denomina *Streptomyces coeruleorubidus*, cepa DS 7126.

Streptomyces coeruleorubidus DS 7126 forma esporas esféricas de óvalos cortos, que miden 0,7 a 0,9 μ /0,8 a 1,1 μ . Desarrolla esporoforos simples o en racimos; sus cadenas de esporas, que son bastante largas y pueden comprender hasta varias decenas de esporas, se enrollan formando espirales más o menos abiertas que cuentan a menudo de 2 a 5 ó 6 vueltas en espiral. Por su forma de esporulación, *Streptomyces coeruleorubidus* DS 7126 se sitúa en la Section Spira de la clasificación de Pridham.

Streptomyces coeruleorubidus DS 7126 se desarrolla perfectamente a 25°C, un poco menos a 37°C y nada a 50°C. En sus cultivos, efectuados a 26°C, presenta las características bioquímicas siguientes:

- producción de melanina : positiva
- producción de H₂S : positiva
- tirosinasis : positiva
- licuación de la gelatina : positiva, lenta.
- utilización de la celulosa : positiva
- producción de nitritos a partir de los nitratos : negativa sobre caldo nutritivo nitrado, positiva sobre medios sintéticos

- hidrólisis del almidón : positiva, moderada
- cultivo sobre leche desnatada : ni coagulación ni per-tonización.

5 En el cuadro siguiente se recogen los caracteres de cultivo que presenta Streptomyces coeruleorubidus DS 7126 sobre un cierto número de medios habitualmente utilizados para determinar los caracteres morfológicos de las cepas de estreptómicos, siendo efectuados los cultivos sobre medios gelosados sobre gelosas inclinadas. Estos caracteres son
10 los de cultivos llegados a un perfecto estado de desarrollo, es decir 3 semanas aproximadamente a 26°C salvo indicaciones contrarias. Las referencias de los medios de cultivo utilizados son las siguientes:

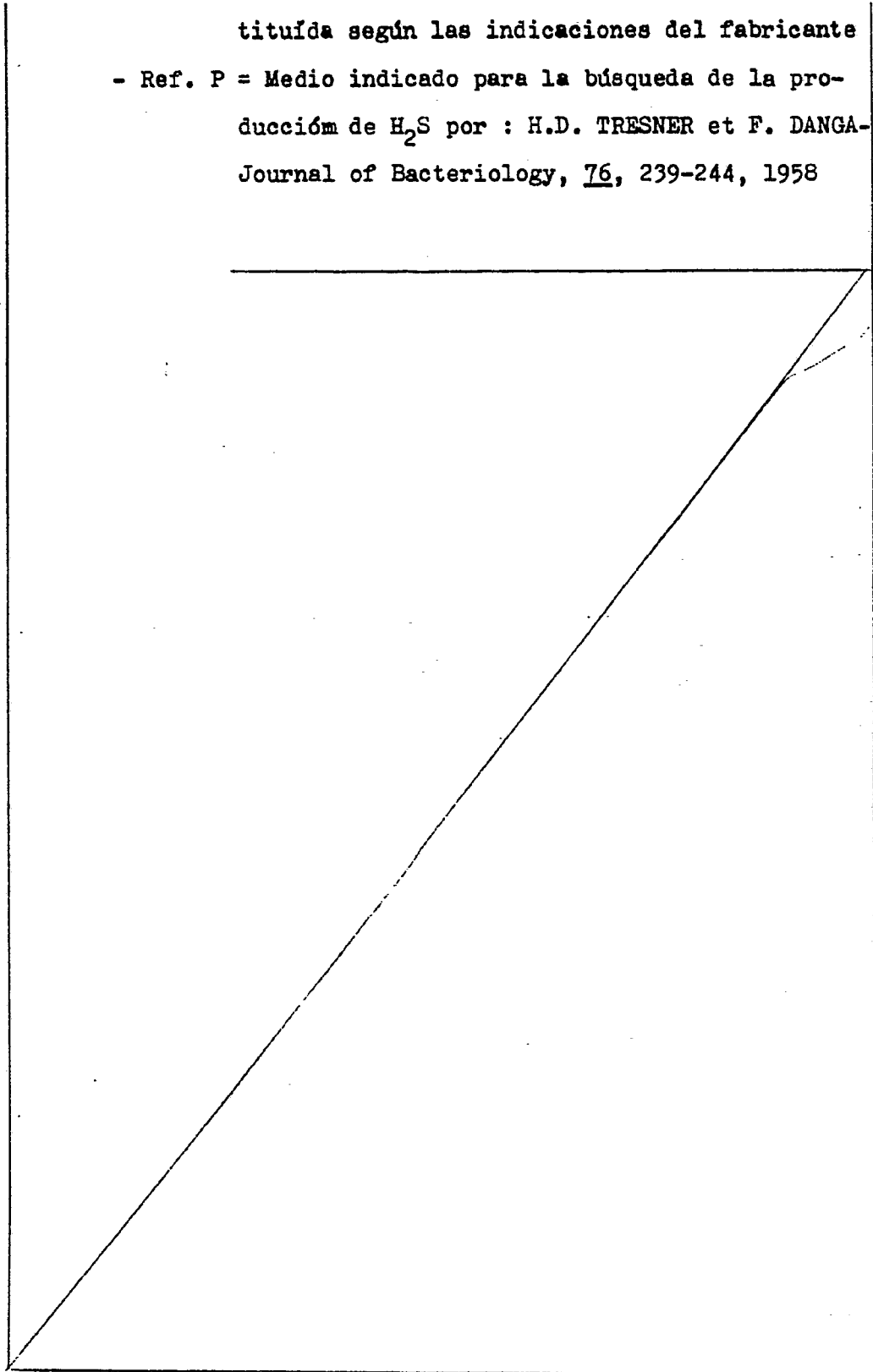
- 15 - Ref. A - "Medium 1 with a mineral source of nitrogen" - G.F. GAUZE et col. - Problems in the classification of Antagonistic Actinomycetes - p. 13 - The American Institute of Biological Sciences, Washington 6, D.C., 1959
- 20 - Ref. B - The Actinomycetes - S.A. WAKSMAN, Chronica Botanica Company, Waltham, Mass., U.S.A., 1950 - p. 194 - nº 10
- Ref. C - "Inorganic Salts - Starch Agar" - T.G. PRIDHAM et col. - Antibiotics Annual, 1956-1957 - p. 951
- 25 - Ref. D - The Actinomycetes - S.A. WAKSMAN, Chronica Botanica Company, Waltham, Mass, U.S.A., 1950 - p. 193 - nº 3
- Ref. E - The Actinomycetes - S.A. WAKSMAN, Chronica Botanica Company, Waltham, Mass., U.S.A.,
30 1950 - p. 193 - nº 1

- 5
- Ref. F - Corresponde a la ref. E - donde 3 % de sacarosa son sustituidas por 1,5 % de glucosa
- Ref. G - The Actinomycetes - S.A. WAKSMAN, Chronica Botanica Company, Waltham, Mass., U.S.A., 1950 - p. 195 - n° 18
- Ref. H - Corresponde a la ref. G - donde 3 % de sacarosa son sustituidas por 1,5 % de glucosa
- 10
- Ref. I - Corresponde a la Ref. G - donde la sacarosa es suprimida y sustituida por pequeñas bandas de papel filtro sumergidas parcialmente en el líquido
- Ref. J - Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria - Society of American Bacteriologists - Geneva, N.Y. II 50 - 18
- 15
- Ref. K - "Bennett's Agar" - S.A. WAKSMAN - The Actinomycetes, vol. 2, p. 331 - n° 30 - The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1961
- Ref. L - "Melanin formation medium" - S.A. WAKSMAN - The Actinomycetes, vol. 2, p. 333 - n° 42 - The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1961
- 20
- Ref. M - The Actinomycetes - S.A. WAKSMAN, Chronica Botanica Company, Waltham, Mass., U.S.A., 1950 - p. 197 - n° 27
- 25
- Ref. N - "Plain Gelatin" - preparado según las indicaciones del "Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria" - Society of American Bacteriologists, Geneva, N.Y, II 50 -
- 30
- 18

Ref. O - Leche desnatada en polvo comercial, reconstituida según las indicaciones del fabricante

- Ref. P = Medio indicado para la búsqueda de la producción de H_2S por : H.D. TRESNER et F. DANGA-
Journal of Bacteriology, 76, 239-244, 1958

5



Medio de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo (M.v.) o Aspecto del cultivo
Gelosa con fuente de nitrógeno mineral de Gauze (ref A)	Bastante bueno	M.v. rojizo
Gelosa almidón-nitrato (ref.B)	Bastante bueno	M.v. rojizo
Gelosa almidón-sales minerales de Pridham (ref. C)	Bastante bueno	Aspecto rojo anaranjado pardusco débil
Gelosa glicerina-aspargina (Ref. D)	Bastante bueno	Aspecto rojo anaranjado
Gelosa sintética de Czapek en sacarosa (Ref. E)	Bastante bueno	Rosa amarillento a rojo pardusco. Aspecto rojizo
Gelosa sintética de Czapek en glucosa (Ref. F)	Bastante bueno	M.v. rosa amarillento a rojo pardusco. Aspecto rosa rojizo
Caldo de Czapek en sacarosa (Ref. G)	Muy moderado	Velo rosa pardusco débil
Caldo de Czapek en glucosa (Ref. H)	Muy moderado	velo gris rosa pardusco débil

Aparato aéreo (que comprende el conjunto del micelio aéreo y de la esporulación)	Pigmento soluble	Observaciones y propiedad bioquímicas
Azul verdoso claro	rojo carmineo pardusco	
Blanquecino a azulado. Muy moderadamente desarrollado	rojo carmineo	- Hidrólisis del almidón: positiva, moderada
Azul verdoso claro	Anaranjado pardusco débil	- Hidrólisis del almidón: positiva, moderada - Esporas esféricas en óvalos cortos, que miden 0,7 a 0,9 μ /0,8 a 1,1 μ . Cadenas de esporas en espirales más o menos abiertas que cuentan 2 a 5 ó 6 vueltas
Blanquecino a azulado. Muy moderadamente desarrollado	Rosa anaranjado	
Blanquecino o muy pobremente desarrollado	rojo carmineo	
Blanquecino. En estado de trazas	Rojo carmineo pardusco	
Ninguno	Ninguno	Producción de nitritos: positiva al comienzo de los cultivos
Ninguno	Ninguno	Producción de nitritos: positiva al comienzo de los cultivos

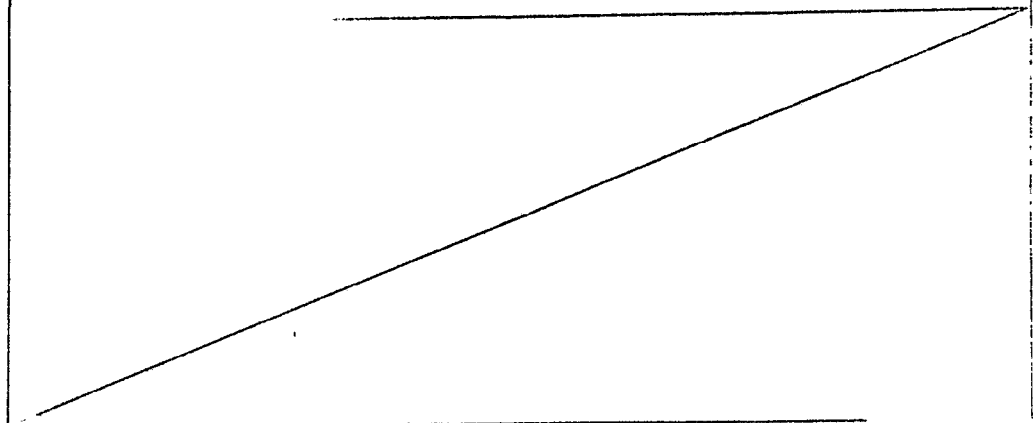
Medio de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo (M.v.) o Aspecto del cultivo
Caldo de Czapek en la celulosa (Ref. I)	Muy moderado	velo blanquecino
Caldo nutritivo nitrado (Ref. J)	Moderado	anillo pardo rojizo claro
Gelosa de Bennett (Ref. K)	bueno	pardo rojizo
Gelosa tirosina-extracto de levadura para formación de melamina (Ref. L)	Moderado	Pardo negruzco
Cultivo sobre patata (Ref. M)	Bueno	Pardo oscuro a pardo anaranjado rojizo
Gelatina pura al 12% (Ref. N)	Bastante bueno	Pardo negruzco
Leche desnatada (Ref. O)	Bueno	Anillo anaranjado pardusco a pardo rojizo
Gelosa de Tresner y Danga (Ref. P)	Moderado	Gris negruzco

Aparato aéreo (que comprende el conjunto del micelio aéreo y de la esporulación)	Pigmento soluble	Observaciones y propiedad bioquímicas
Ninguno .	Ninguno	Utilización de la celulosa: positiva, moderada
Ninguno .	Pardo	Producción de nitritos: negativa
Azul verdoso claro a azul grisáceo	Pardo rojizo	
Grisáceo.- Pobremente desarrollado	Pardo negruzco	Producción de melanina: positiva (lecturas efectuadas según las recomendaciones del autor)
Blanco-grisáceo a blanco rosado y azul grisáceo o claro. Bastante pobremente desarrollado	Pardo anaranjado a pardo negruzco	
Ninguno .	Pardo negruzco	Licuación positiva, lenta
Ninguno .	Nada o grisáceo débil	Ni coagulación ni peptonización. Muy ligera acidificación del pH que pasa de 6,2-6,3 a 6,0-6,1 en 1 mes
Ninguno .	Negro	Producción de H ₂ S: positiva (lecturas efectuadas según las recomendaciones de los autores)

El Streptomyces DS 7126, por la coloración azul a azul verdoso de su micelio aéreo esporulado, pertenece a la serie "Coerulescens" descrita por Gauze et col. Entre las copas descritas en esta serie, presenta un micelio vegetativo que se colorea de rojo como S. coeruleorubidus y S. bicolor. Sin embargo, se diferencia de S. bicolor por el hecho de que contrariamente a este último, utiliza la celulosa, no coagula la leche, y sobre todo es susceptible de formar pigmento soluble rojo que difunde en la gelosa sobre medio sintético, propiedad que no comparte más que con la especie S. coeruleorubidus. Esta última propiedad unida al conjunto de sus caracteres muestra que se liga a la especie S. coeruleorubidus.

La capacidad de Streptomyces coeruleorubidus DS 7126 para utilizar diversas cepas de carbono o de nitrógeno para asegurar su desarrollo ha sido determinada según el principio del método de Pridham et Cottlieb (J. of Bact. 56, 107-114, 1948); el grado de desarrollo ha sido observado sobre el medio de base indicado por los autores sustituyendo ya sea la glucosa por las diversas fuentes de carbono respectivamente ensayadas, o bien $SO_4(NH_4)_2$ por las diversas fuentes de nitrógeno respectivamente ensayadas.

Los resultados se indican en el cuadro siguiente:



Fuentes de carbono ensayadas	Utilización	Fuentes de nitró- geno ensayadas	Utilización
D-Xilosa	positiva	NO ₃ Na	positiva
L-Arabinosa	positiva	NO ₂ Na	positiva
L-Ramnosa	positiva	SO ₄ (NH ₄) ₂	positiva
D-Glucosa	positiva	PO ₄ H(NH ₄) ₂	positiva
D-Galactosa	positiva	Urée	positiva
D-Fructosa	positiva	L-Asparagina	positiva
D-Mannosa	positiva	Glicocola	positiva
Lactosa	positiva	Sarcosina	negativa
Maltosa	positiva	DL-Alanina	positiva
Sacarosa	positiva	DL-Valina	positiva
Tréhalosa	positiva	L-Lisina	positiva
Cellobiosa	positiva	DL-Metionina	positiva, lenta
Dextrina	positiva	Taurina	negativa
Inulina	negativa	L-Tirosina	positiva
Almidón	positiva		
Glicerol	positiva		
Eritritol	negativa		
Dulcitol	negativa		
D-Mannitol	positiva		
D-Sorbitol	positiva		
Inositol	positiva		
Salicina	positiva		

les o vegetales como el aceite de sebo o el aceite de soja pueden sustituir ventajosamente estas diferentes fuentes carbonadas o serle añadidas.

5 Las fuentes convenientes de nitrógeno asimilable son extremadamente variadas. Pueden ser sustancias químicas muy simples como las sales minerales y orgánicas de amonio, urea algunos ácidos aminados. Pueden también ser aportadas por sustancias complejas que contienen principalmente el nitrógeno en forma protídica: caseína, lactalbumina, gluten y
10 sus hidrolisatos, harina de soja, de cacahuete, de pescado, extractos de carne, de levadura, distiller's solubles, corn-steep.

Entre los elementos minerales añadidos, algunos pueden tener un efecto tampón o neutralizantes como los fosfatos
15 alcalinos o alcalino-térreo o los carbonatos de calcio y de magnesio. Otros aportan el equilibrio iónico necesario para el desarrollo de los microorganismos y para la elaboración del 32.999 RP como los cloruros y sulfatos de metales alcalinos y alcalino-térreos. Por último algunos actúan más
20 especialmente como activadores de las reacciones metabólicas de los microorganismos y son las sales de zinc, de cobalto, de hierro, de cobre, de manganeso.

Los factores de crecimiento son generalmente productos de naturaleza vitamínica tales como la tiamina, la riboflavina, el ácido pantoténico.
25

Los adyuvantes pueden ser añadidos durante diferentes estadios del cultivo: cultivo inculo en ampolla agitada, cultivo de producción en fermentador.

Sin embargo los mejores resultados se obtienen cuando
30 estos adyuvantes son añadidos ya sea al comienzo de la fase

de producción o bien durante ésta.

Entre los adyuvantes que convienen particularmente bien pueden ser citados la sulfanilamida, el sulfatiazol, y la sulfapiridazina.

5 La concentración del adyuvante en el medio de fermentación puede variar entre amplios límites según la composición del medio de cultivo y según la naturaleza del adyuvante. Generalmente concentraciones comprendidas entre 0,01 y 1 g por litro de caldo convienen en particular.

10 El pH del medio de fermentación en el arranque del cultivo debe estar comprendido entre 5,6 y 7,4 y preferentemente entre 5,8 y 7,2. La temperatura óptima para la fermentación está comprendida entre 25 y 30°C, pero una producción satisfactoria se obtiene para temperaturas comprendidas entre 15 23 y 33°C. La aireación de la fermentación puede variar entre valores bastante amplios. Sin embargo se han encontrado que aireaciones de 0,3 a 3 litros de aire por litro de caldo y por minuto son particularmente convenientes.

El rendimiento máximo entre 32.999 RP se obtiene después de 2 a 10 días de cultivo, dependiendo este tiempo esencialmente del medio utilizado.

Según lo que antecede, se concibe que las condiciones generales del cultivo de los microorganismos en presencia de adyuvantes puedan variar entre una amplia medida y adaptarse a cada necesidad particular.

25 El 32.999 RP puede ser separado de su medio de obtención según los métodos habituales de aislamiento de los antibióticos que pertenecen a esta familia.

30 Por ejemplo, el 32.999 RP puede ser extraído del medio de fermentación a un pH próximo de 9 por medio de un disol-

vente orgánico tal como el cloroformo, el cloruro de metileno, el n.butanol o una mezcla de éstos disolventes en proporciones convenientes.

5 El mosto de fermentación puede también ser filtrado en presencia de un adyuvante de filtración a un pH comprendido entre 1,5 y 9. Resulta ventajoso efectuar esta operación en medio ácido, y en particular acidificando a un pH comprendido entre 1,5 y 2 por medio de ácido oxálico. Igualmente es posible efectuar la filtración a un pH comprendido entre 10 2 y 8 en presencia de un alcohol alifático que contiene 1 a 3 átomos de carbono. El 32.999 RP puede ser extraído del filtrado, después de la concentración, por medio de un disolvente orgánico tal como el cloroformo, el cloruro de metileno, el n.butanol o una mezcla de estos disolventes en proporciones convenientes.

15 El 32.999 RP puede ser aislado de los extractos orgánicos, después de lavados y extracciones sucesivas, por precipitación tras concentración de los extractos a un pequeño volúmen o por adición en un disolvente miscible en el que 20 el 32.999 RP es prácticamente insoluble, tal como hexano, tras la transformación eventual del antibiótico en una sal de adición con un ácido tal como el clorhidrato.

El 32.999 RP puede ser eventualmente purificado por las diversas operaciones clásicas de purificación tales como 25 la cristalización o la cromatografía sobre diversos adsorbentes.

El 32.999 RP y sus sales no tóxicas, es decir aceptables farmacéuticamente, se muestran particularmente activos sobre los tumores inyectables del ratón a dosis comprendidas entre 0,125 y 0,250 mg/kg i.p. sobre la leucemia L 1210,

30

la leucemia P 388 y la leucosarcomatosis.

La toxicidad del clorhidrato del 32.999 RP ha sido estudiada principalmente en el ratón. Su dosis letal 50 % (DL₅₀) ha sido determinada (tratamiento durante 4 días consecutivos) por vía intra-peritoneal y es próxima de 0,4 mg/kg.

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

En lo que sigue:

- 10 a) La identificación del 32.999 RP es efectuada por cromatografía sobre capa delgada de gel de sílice comparando los Rf de los productos obtenidos al de la carminomicina o del 32.999 RP en el mismo sistema de disolvente.
- 15 b) La producción del 32.999 RP es determinada a partir de los cromatogramas sobre capa delgada, ya sea según las intensidades comparadas de las manchas correspondientes del extracto y de la del 32.999 RP puro tomado como referencia o bien por comparación de las superficies de los picos registrados en el lector de placa "Chromoscan" e incluso por último dosificando colorimetricamente el 32.999 RP elegido del soporte cromatográfico a nivel de la mancha del producto buscado.

20

Ejemplo 1

Se prepara un medio de cultivo A que tiene la composición siguiente:

25	-harina de soja	8 g
	-levadura de panadería en pan	40 g
	-lactosa pura	58 g
	-cloruro de sodio	2 g
	-fosfato monopotásico	1 g
30	-sulfato de magnesio heptahidratado	0,1 g

- sulfato ferroso heptahidratado 0,1 g
- sulfato de zinc heptahidratado 0,1 g
- agua destilada a 75°C 800 cm³

5 El pH de la suspensión es ajustado a 6,5 por adición de 1 cm³ de sosa 10 N, y después se añade:

- glicerina (d = 1,26) 19 g
- carbonato de calcio 2 g
- agua destilada complemento a 1000 cm³

10 Este medio es repartido en ampollas de 300 cm³ a razón de 50 cm³ por ampolla. Las ampollas son esterilizadas a 122°C durante 20 minutos. Después del enfriamiento el pH del medio es de 5,9. Se prepara, además, una solución esteril de sulfanilamida a 10 mg/cm³ y a un pH de 9,0 por disolución de sulfanilamida en una mezcla de sosa 5 N y de agua
15 destilada y después filtración sobre membrana "Millipore 0,45 µ".

Las ampollas que contienen el medio esteril A se reparten en 6 lotes de 2 ampollas cada uno.

20 Las ampollas del lote A₁ no reciben adición complementaria.

Las ampollas de los otros 5 lotes reciben las adiciones complementarias siguientes:

- lote A₂ : 1 cm³ de la solución de sulfanilamida (0,2 g/l)
- lote A₃ : 2 cm³ de la solución de sulfanilamida (0,4 g/l)
- 25 -lote A₄ : 3 cm³ de la solución de sulfanilamida (0,6 g/l)
- lote A₅ : 4 cm³ de la solución de sulfanilamida (0,8 g/l)
- lote A₆ : 1 cm³ de la solución de sulfanilamida (0,2 g/l)

30 Las ampollas del lote A₁ y las ampollas que han recibido una adición de sulfanilamida son sembradas, a razón de 2,5 cm³ por ampollas, con un cultivo inóculo de Streptomyces

coeruleoerubidus DS 7.126 (NRRL 8098) de 72 horas de edad.

Los cultivos son desarrollados en una mesa agitada a 220 r.p.m. en un recinto a 26°C. Las ampollas del lote A₆ reciben después de 48 y 72 horas de incubación 2 nuevas adiciones de la solución de sulfanilamida (concentración total en sulfanilamida 0,6 g/l). Después de cada una de estas adiciones la incubación de las ampollas es reanudada en las mismas condiciones de agitación y de temperatura.

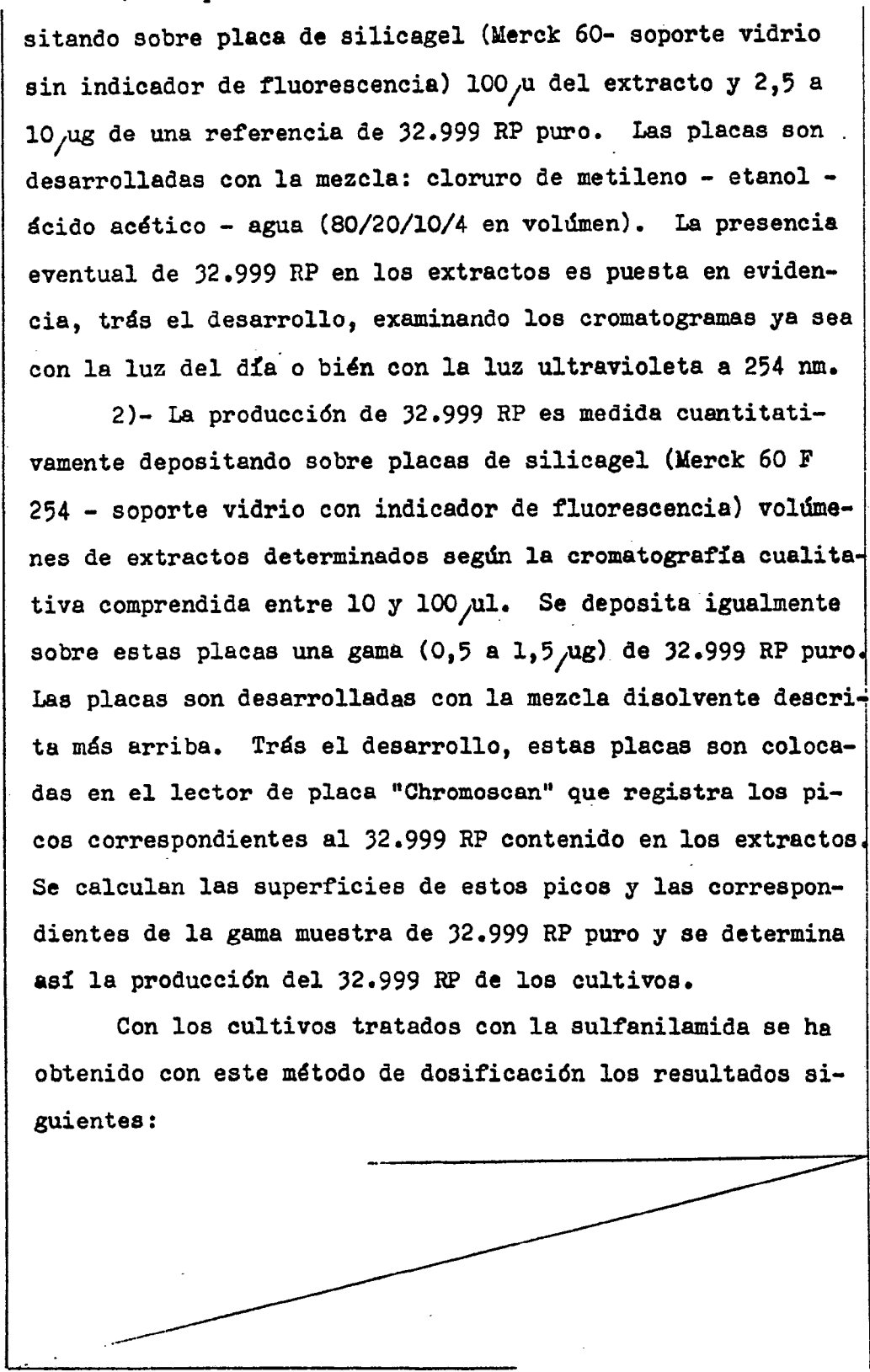
Después de 7 días de incubación en las condiciones indicadas más arriba, se trata cada vez una ampolla de cada uno de los lotes para dosificar el 32.999 RP. Este tratamiento se efectúa añadiendo en cada ampolla 4 g de ácido oxálico (lo que lleva el pH del mosto a 1,5) y 50 cm³ de etanol absoluto. La ampolla que contiene esta mezcla es cerrada herméticamente y colocada durante 1 hora en una mesa agitada a 220 r.p.m. La mezcla a continuación es filtrada sobre papel y el filtrado destilado a presión reducida a 50°C hasta la mitad de su volumen inicial (50 cm³). El concentrado es ajustado a un pH de 4,5 por adición de sosa 5 N y después se añade sucesivamente 50 cm³ de la mezcla cloruro de metileno n-butanol (80-20 en volumen) y 25 cm³ de tampón borato 0,5 M a pH 9,0. Después de agitación en ampolla, se recoge por decantación la fase disolvente coloreada y se repite el tratamiento sobre las aguas madre acuosas que son consumidas por 50 cm³ de la misma mezcla disolvente, Las fases orgánicas son reunidas y secadas sobre sulfato de sodio anhidro. El volumen de la fase orgánica es finalmente ajustado a 100 cm³ por adición de la misma mezcla disolvente.

Para determinar la producción de 32.999 RP se cromatografía estos extractos sobre capa delgada.

1)- La producción es evaluada cualitativamente depositando sobre placa de silicagel (Merck 60- soporte vidrio sin indicador de fluorescencia) 100 μ del extracto y 2,5 a 10 μ g de una referencia de 32.999 RP puro. Las placas son desarrolladas con la mezcla: cloruro de metileno - etanol - ácido acético - agua (80/20/10/4 en volumen). La presencia eventual de 32.999 RP en los extractos es puesta en evidencia, tras el desarrollo, examinando los cromatogramas ya sea con la luz del día o bien con la luz ultravioleta a 254 nm.

2)- La producción de 32.999 RP es medida cuantitativamente depositando sobre placas de silicagel (Merck 60 F 254 - soporte vidrio con indicador de fluorescencia) volúmenes de extractos determinados según la cromatografía cualitativa comprendida entre 10 y 100 μ l. Se deposita igualmente sobre estas placas una gama (0,5 a 1,5 μ g) de 32.999 RP puro. Las placas son desarrolladas con la mezcla disolvente descrita más arriba. Trás el desarrollo, estas placas son colocadas en el lector de placa "Chromoscan" que registra los picos correspondientes al 32.999 RP contenido en los extractos. Se calculan las superficies de estos picos y las correspondientes de la gama muestra de 32.999 RP puro y se determina así la producción del 32.999 RP de los cultivos.

Con los cultivos tratados con la sulfanilamida se ha obtenido con este método de dosificación los resultados siguientes:



Lotes	Sulfanilamida (g/l)	32.999 RP (mg/l)
A ₁	0	0
A ₂	0,2	0
A ₃	0,4	26
A ₄	0,6	42
A ₅	0,8	33
A ₆	0,6 (0,2 x 3)	50

Ejemplo 2

10 Se reparte en ampollas de 300 cm³ a razón de 50 cm³ por ampolla un medio A idéntico al descrito en el ejemplo 1.

Igualmente se prepara una solución de sulfanilamida a 10 mg/cm³ en las condiciones descritas en el ejemplo 1.

15 Las ampollas que contienen el medio estéril A se reparten en 4 lotes A₁, A₁' , A₅ y A₅' de 2 ampollas cada uno y se añade en cada ampolla:

-lotes A₅ y A₅' : 4 cm³ de la solución de sulfanilamida (0,8 g/l) no experimentando las ampollas de los lotes A₁ y A₁' adición alguna.

A continuación se siembran todas las ampollas:

20 -lotes A₁ y A₅ con 2,5 cm³ por ampolla de un cultivo inóculo de Streptomyces coeruleorubidus DS 8899 (NRRL 3046) de 72 horas de edad,

25 -lotes A₁' y A₅' con 2,5 cm³ por ampolla de un cultivo inóculo de Streptomyces coeruleorubidus DS 31.723 (NRRL 3045) de 72 horas de edad.

Los cultivos son desarrollados sobre mesa agitada a 220 r.p.m. en un recinto a 26°C. Las ampollas encubadas 7

días en estas condiciones son tratadas para dosificar el 32.999 RP como se describe en el ejemplo 1.

Las producciones siguientes han sido obtenidas:

Lotes	Sulfanilamida (g/l)	Producción de 32.999 RP en mg/l	
		Streptomyces DS 8.899	Streptomyces DS 31.723
5 A ₁ A' ₁	0	0	0
A ₅ A' ₅	0,8	17	25

Ejemplo 3

Se reparte en ampollas de 300 cm³ a razón de 50 cm³ por ampolla un medio A idéntico al descrito en el ejemplo 1.

10 Igualmente se prepara una solución de sulfanilamida a 10 mg/cm³ en las condiciones descritas en el ejemplo 1.

Las ampollas que contienen el medio estéril A se reparten en 4 lotes de 2 ampollas cada una y se añade en cada ampolla:

15 -lote A₂ : 1 cm³ de la solución de sulfanilamida (0,2 g/l)

-lote A₃ : 2 cm³ de la solución de sulfanilamida (0,4 g/l)

-lote A₄ : 3 cm³ de la solución de sulfanilamida (0,6 g/l)

las ampollas del lote A₁ no experimentan adición alguna.

20 Después de estas adiciones se siembran todas las ampollas de los lotes A₁, A₂, A₃ y A₄ con 2,5 cm³ por ampolla de un cultivo inóculo de Streptomyces bifurcus DS 23.219 (NRRL 3539) de 72 horas de edad.

25 Los cultivos son desarrollados sobre una mesa agitada a 220 r.p.m. en un recinto a 26°C. Las ampollas incubadas 7 días en estas condiciones son tratadas para dosificar el 32.999 RP como se describe en el ejemplo 1. Las producciones siguientes han sido obtenidas:

Lotes	Sulfanilamida(g/l)	32.999 RP (mg/l)
A ₁	0	0
A ₂	0,2	36
A ₃	0,4	28
A ₄	0,6	13

Ejemplo 4

Se prepara un medio de cultivo B que tiene la composición siguiente:

10	-harina de soja	30 g
	-distillats solubles	5 g
	-almidón parcialmente hidrolizado "Fox head"	5 g
	-aceite de soja (d = 0,92)	27,5 g
	-cloruro de sodio	10 g
15	-agua destilada	1000 cm ³

Este medio, cuyo pH se ajusta a 7,20 por adición de sosa N se reparte en ampollas de 300 cm³ a razón de 50 cm³ por ampolla y se esteriliza a 122°C durante 20 minutos. Después del enfriamiento el pH es de 6,60.

20 Se prepara una solución acuosa de sulfanilamida idéntica a la descrita en el ejemplo 1.

Las ampollas que contienen el medio estéril B se reparten en 2 lotes B₁ y B₂ de 2 ampollas cada uno. Las ampollas del lote B₁ no reciben ninguna otra adición complementaria. Se añade en cada ampolla:

25 -lote B₂ : 2 cm³ de la solución de sulfanilamida (0,4 g/l)

Después de estas adiciones se siembran todas las ampo-

5 llas de los lotes B₁ y B₂ con 2,5 cm³ de un cultivo inóculo de Streptomyces coeruleorubidus DS 31.723. (NRRL 3045) de 72 horas de edad. Los cultivos son desarrollados sobre una mesa agitada a 220 r.p.m. en un recinto a 26°C. Las ampollas incubadas 7 días en estas condiciones son tratadas para dosificar el 32.999 RP como se describe en el ejemplo 1.

Las producciones siguientes han sido obtenidas:

Lotes	Sulfanilamida (g/l)	32.999 RP (mg/l)
B ₁	0	0
B ₂	0,4	7

Ejemplo 5

Se reparte en ampollas de 300 cm³ a razón de 50 cm³ por ampolla un medio A idéntico al descrito en el ejemplo 1.

15 Igualmente se prepara una solución de sulfatiazol a 10 mg/cm³ en las condiciones descritas en el ejemplo 1.

Las ampollas que contienen el medio estéril A se reparten en 4 lotes de 2 ampollas cada uno y se efectúa en cada ampolla las adiciones siguientes:

20 -lote A₇ : 0,25 cm³ de la solución de sulfatiazol (0,05 g/l)

-lote A₈ : 1 cm³ de la solución de sulfatiazol (0,2 g/l)

-lote A₉ : 0,5 cm³ de la solución de sulfatiazol (0,1 g/l)

las ampollas del lote A₁ no experimentan adición alguna.

25 Se siembra a continuación cada ampolla de los lotes A₁, A₇, A₈, A₉, con 2,5 cm³ de un cultivo inóculo de Streptomyces coeruleorubidus DS 7.126 (NRRL 8098) de 72 horas de edad. Los cultivos son desarrollados sobre una mesa agitada a 220 r.p.m. en un recinto a 26°C. Las ampollas del lote

5 A₉ reciben después de 48 y 72 horas de incubación 2 nuevas adiciones de 0,5 cm³ de la solución de sulfatiazol (concentración total en sulfatiazol 0,3 g/l). Después de cada una de estas adiciones la incubación de las ampollas es reanudada en las mismas condiciones de agitación y de temperatura.

Las ampollas son incubadas 7 días y tratadas para dosificar el 32.999 RP como se describe en el ejemplo 1. Las producciones siguientes han sido obtenidas:

Lotes	Sulfatiazol (g/l)	32.999 RP (mg/l)
10 A ₁	0	0
A ₇	0,05	0
A ₈	0,2	51
A ₉	0,3 (0,1 x 3)	64

Ejemplo 6

15 Se reparte en ampollas de 300 cm³ a razón de 50 cm³ por ampolla un medio A idéntico al descrito en el ejemplo 1.

Se prepara igualmente una solución de sulfatiazol a 10 mg/cm³ en las condiciones descritas en el ejemplo 5.

20 Las ampollas que contienen el medio estéril A son repartidas en 4 lotes de 2 ampollas cada uno. Las ampollas del lote A₁ no reciben ninguna otra adición complementaria. Se efectúa en cada una de las otras ampollas las adiciones siguientes:

- lote A₁₀ : 0,5 cm³ de la solución de sulfatiazol (0,1 g/l)
- 25 -lote A₁₁ : 2 cm³ de la solución de sulfatiazol (0,4 g/l)
- lote A₁₂ : 2,5 cm³ de la solución de sulfatiazol (0,5 g/l)

Después de estas adiciones, se siembra todas las ampo-

llas de los lotes A_1 , A_{10} , A_{11} y A_{12} con 25 cm^3 de un cultivo inóculo de *Streptomyces coeruleorubidus* DS 31.723 (NRRL 3045) de 72 horas de edad. Los cultivos son desarrollados sobre mesa agitada a 220 r.p.m. en un recinto a 26°C .

5 Las ampollas incubadas 7 días en estas condiciones son tratadas para dosificar el 32.999 RP como se describe en el ejemplo 1. Las producciones siguientes han sido obtenidas:

Lotes	Sulfatiazol (g/l)	32.999 RP(mg/l)
A_1	0	0
A_{10}	0,1	0
A_{11}	0,4	9
A_{12}	0,5	13

10

Ejemplo 7

15 Se reparte en ampollas de 300 cm^3 a razón de 50 cm^3 por ampolla un medio A idéntico al descrito en el ejemplo 1.

Igualmente se prepara una solución de sulfatiazol a 10 mg/cm^3 en las condiciones descritas en el ejemplo 5.

20 Las ampollas que contienen el medio estéril A se reparten en 4 lotes de 2 ampollas cada uno y se efectúa en cada ampolla las adiciones siguientes:

-lote A_{10} : $0,5 \text{ cm}^3$ de la solución de sulfatiazol (0,1 g/l)

-lote A_8 : 1 cm^3 de la solución de sulfatiazol (0,2 g/l)

-lote A_{11} : 2 cm^3 de la solución de sulfatiazol (0,4 g/l)

las ampollas del lote A_1 no experimentan ninguna adición.

25 Después de estas adiciones, se siembra cada ampolla de los lotes A_1 , A_{10} , A_8 y A_{11} con $2,5 \text{ cm}^3$ de un cultivo inóculo de *Streptomyces bifurcus* DS 23.219 (NRRL 3539) de

72 horas de edad. Los cultivos son desarrollados sobre mesa agitada a 220 r.p.m. en un recinto a 26°C.

5 Las ampollas incubadas 7 días en estas condiciones son tratadas para dosificar el 32.999 RP como se describe en el ejemplo 1. Las producciones siguientes han sido obtenidas:

Lotes	Sulfatiazol (g/l)	32.999 RP (mg/l)
A ₁	0	0
A ₁₀	0,1	18
A ₈	0,2	22
10 A ₁₁	0,4	5

Ejemplo 8

Se prepara un medio de cultivo C que contiene:

-judías desgranadas	40 g
-distiller's solubles	10 g
15 -glucosa	15 g
-aceite de soja (d = 0,92)	18,5 g
-cloruro de cobalto hexahidratado	0,02 g

que es obtenido de la manera siguiente:

20 Las judías después de la cocción en autoclave con 500 cm³ de agua destilada durante 45 minutos a 122°C son reducidas a puré.

A continuación se añaden los distillers' solubles, el aceite de soja, el cloruro de cobalto y el agua destilada para obtener un volumen de 900 cm³.

25 El pH se ajusta a 7,2 por adición de sosa 5 N. La mezcla se reparte en ampollas de 300 cm³ a razón de 45 cm³ por ampolla. Las ampollas son esterilizadas a 122°C duran-

te 20 minutos. Después del enfriamiento, se añade estérilmente en cada ampolla 5 cm³ de una solución estéril de glucosa al 15 %. El pH de este medio estéril presto para la siembra es de 6,70. Se prepara igualmente una solución acuosa de sulfatiazol idéntica a la que se describe en el ejemplo 5.

Las ampollas que contienen el medio estéril C se reparten en 2 lotes C₁ y C₂ de 2 ampollas cada uno. Las ampollas del lote C₁ no reciben adición alguna complementaria. Se añade en cada ampolla del lote C₂ 0,5 cm³ de la solución de sulfatiazol (0,1 g/l).

Después de esta adición se siembra cada ampolla de los lotes C₁ y C₂ con 2,5 cm³ de un cultivo inóculo de *Streptomyces bifurcus* DS 23.219 (NRRL 3539) de 72 horas de edad. Los cultivos son desarrollados sobre una mesa agitada a 220 r.p.m. en un recinto a 26°C. Las ampollas incubadas 10 días en estas condiciones son tratadas para dosificar el 32.999 RP como se describe en el ejemplo 1.

Las producciones siguientes han sido obtenidas:

Lotes	Sulfatiazol (g/l)	32.999 RP (mg/l)
C ₁	0	0
C ₂	0,1	16

Ejemplo 9

Se reparte en ampollas de 300 cm³ a razón de 50 cm³ por ampolla un medio A idéntico al descrito en el ejemplo 1.

Se prepara además una solución de sulfapiridazina a 10 mg/cm³ disolviendo el producto en una mezcla de agua destilada y de ácido clorhídrico 5 N. La solución cuyo pH es

2,0 es esterilizada por filtración sobre membrana "Millipore 0,45 μ ".

Las ampollas que contienen el medio estéril A se reparten en 3 lotes de 2 ampollas cada uno y se efectúa estérilmente en cada una de las ampollas las adiciones siguientes:

-lote A₁₃ : 0,5 cm³ de la solución de sulfapiridazina (0,1 g/l)

-lote A₁₄ : 1 cm³ de la solución de sulfapiridazina (0,2 g/l)

las ampollas del lote A₁ no experimentan adición alguna.

A continuación se siembra cada ampolla de los lotes A₁, A₁₃, A₁₄ con 2,5 cm³ de un cultivo inóculo de Streptomyces coeruleorubidus DS 7.126 (NRRL 8098) de 72 horas de edad.

Los cultivos son incubados durante 7 días con agitación en las condiciones descritas en el ejemplo 1. Los resultados de las dosificaciones efectuadas en las condiciones descritas en el ejemplo 1 son las siguientes:

Lotes	Sulfapiridazina (g/l)	32.999 RP (mg/l)
A ₁	0	0
A ₁₃	0,1	38
A ₁₄	0,2	32

Ejemplo 10

Se reparte en ampollas de 300 cm³ a razón de 50 cm³ por ampolla un medio A idéntico al descrito en el ejemplo 1.

Se prepara además una solución de ametofterina a 20 mg/cm³ disolviendo el producto en una mezcla de agua destilada y de sosa 5 N. La solución cuyo pH es de 10,0 es este-

rilizada por filtración sobre membrana "Millipore 0,45/μ".

Las ampollas que contienen el medio estéril A se reparten en 4 lotes A₁, A₁₅, A₁₆ y A₁₇ de 2 ampollas cada uno. Las ampollas del lote A₁ no reciben ninguna adición complementaria.

En cada una de las ampollas de los otros 3 lotes se efectúan las adiciones siguientes:

-lote A₁₅ : 0,25 cm³ de la solución de ametofterina (0,1 g/l)

-lote A₁₆ : 0,6 cm³ de la solución de ametofterina (0,24 g/l)

-lote A₁₇ : 1 cm³ de la solución de ametofterina (0,4 g/l)

Después de estas adiciones se siembran cada ampolla de los lotes A₁, A₁₅, A₁₆ y A₁₇ con 2,5 cm³ de un cultivo inóculo de *Streptomyces coeruleorubidus* DS 7.126 (NRRL 8098) de 72 horas de edad. Los cultivos son incubados durante 7 días con agitación en las condiciones descritas en el ejemplo 1.

Los resultados de la dosificación del 32.999 RP efectuada en las condiciones habituales son los siguientes:

Lotes	Ametofterina (g/l)	32.999 RP (mg/l)
A ₁	0	0
A ₁₅	0,1	7,0
A ₁₆	0,24	11
A ₁₇	0,4	1

Ejemplo 11

Se reparte ampollas de 300 cm³ a razón de 50 cm³ por ampolla un medio A idéntico al descrito en el ejemplo 1.

Se prepara además una solución de barbital a 50 mg/cm³

disolviendo el producto en una mezcla de agua destilada y de sosa 5 N. La solución cuyo pH es de 11,0 se esteriliza por filtración sobre membrana "Millipore 0,45 μ ".

5 Las ampollas que contienen el medio estéril A se repar-
ten en 4 lotes A₁, A₁₈, A₁₉ y A₂₀ de 2 ampollas cada uno y
se efectúa en cada ampolla de los lotes A₁₈ y A₁₉ las adic-
ciones siguientes:

-lote A₁₈ : 0,5 cm³ de la solución de barbital (0,5 g/l)

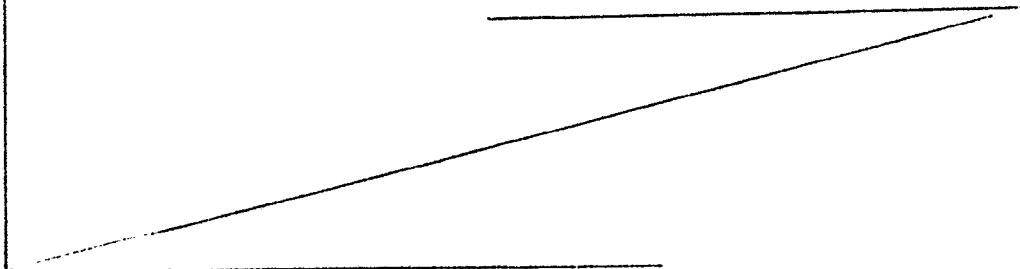
-lote A₁₉ : 2 cm³ de la solución de barbital (2 g/l)

10 no experimentando las ampollas del lote A₁ ninguna adición
y recibiendo las ampollas del lote A₂₀, en las condiciones
indicadas a continuación, una adición durante el cultivo.

15 A continuación se siembra cada ampolla de los lotes
A₁, A₁₈, A₁₉ y A₂₀ con 2,5 cm³ de un cultivo inóculo de *Streptomyces coerulecrubidus* DS 7.126 (NRRL 8098) de 72 horas de
edad.

20 Las ampollas son incubadas en un recinto a 26°C sobre
mesa agitada a 220 r.p.m. Después de 24 horas de incubación
se añade en cada ampolla del lote A₂₀, 1,5 cm³ de la solu-
ción de barbital (1,5 g/l) y la incubación de estas ampollas
es continuada en las mismas condiciones de agitación y de
temperatura.

25 Después de 7 días de incubación, las ampollas son tra-
tadas en las condiciones descritas en el ejemplo 1. Los re-
sultados siguientes han sido obtenidos:



Lotes	Barbital (g/l)	32.999 RP (mg/l)
A ₁	0	0
A ₁₈	0,5	11
A ₁₉	2	23
A ₂₀	1,5	50

Operando como anteriormente, utilizando un medio de cultivo A repartido en lotes A₁, A₂₁, A₂₂, A₂₃ y A₂₄ de dos ampollas cada uno, recibiendo los lotes A₂₁, A₂₂, A₂₃ y A₂₄ adiciones respectivas de 0,5 g/l de fenobarbital sódico, 0,5 g/l de butobarbital sódico (sal de sodio del ácido butil-5 etil-5 barbitúrico), 0,5 g/l y 2 g/l de pentiobarbital (ácido etil-5 (metil-1 butil)-5 tiobarbitúrico), y continuando la incubación durante 9 días, se obtienen los resultados siguientes:

Lotes	Adyuvantes (g/l)	32.999 RP (mg/l)
A ₁	0	0
A ₂₁	fenobarbital 0,5	9
A ₂₂	butobarbital 0,5	12
A ₂₃	pentiobarbital 0,5	12
A ₂₄	pentiobarbital 2	22

Ejemplo 12

a) fermentación

Se carga en un fermentador de 75 litros:

-harina de soja 1500 g

	-distillers' solubles	250 g
	-almidón parcialmente hidrolizado	1750 g
	-aceite de soja	750 g
	-cloruro de sodio	500 g
5	-agua de ciudad q.s.p.	45 litros

El pH se ajusta a 7,50 por adición de 40 cm³ de sosa 10 N. Se esteriliza el medio por burbujeo de vapor a 122°C durante 40 minutos.

Después del enfriamiento y en virtud de la condensación del vapor durante la esterilización, el volúmen del caldo es de 50 litros; el pH es de 6,70. Se siembra entonces con 200 cm³ de un cultivo en erlenmeyer agitado de *Streptomyces coeruleorubidus* DS. 7.126 (NRRL 8098). El cultivo es desarrollado a 30°C durante 25 horas agitando y aireando con aire estéril; resulta entonces conveniente para la siembra del cultivo productos:

El cultivo productor es efectuado en un fermentador de 800 litros cargado con las sustancias siguientes:

	-harina de soja	3,2 kg
20	-crema de levadura de panadería	24 kg
	-lactosa	23,2 kg
	-cloruro de sodio	0,8 kg
	-fosfato monopotásico	0,4 kg
	-sulfato de magnesio heptahidratado	0,04 kg
25	-sulfato ferroso heptahidratado	0,04 kg
	-sulfato de zinc heptahidratado	0,04 kg
	-antiespuma	30 cm ³
	-agua de ciudad complemento a	200 litros

Después de haber ajustado el pH a 6,50 por adición de 210 cm³ de sosa 10 N, se añade:

-glicerina	7,6 kg
-carbonato de calcio	0,800 kg
-agua de ciudad complemento a	360 litros

5 El pH del medio es entonces igual a 6,45. Se esteriliza el caldo por burbujeo de vapor a 122°C durante 40 minutos; después del enfriamiento, y en virtud de la condensación del vapor durante la esterilización, el volumen del caldo es de 400 litros; el pH del medio es de 6,25.

10 Se añade entonces 10 litros de una solución acuosa estéril que contiene

-sulfanilamida	308 g
----------------	-------

15 El pH del caldo resulta igual a 6,80. Se siembra con 40 litros del cultivo inóculo en fermentador de 75 litros descrito anteriormente. El cultivo es mantenido a 27°C agitando con una turbina que gira a 205 r.p.m. y aireando con un volumen de aire de 20 m³/h. Al cabo de 24 horas de cultivo se añaden 3 litros de solución acuosa estéril que contienen:

-sulfanilamida	44 g
----------------	------

20 y se continúa la fermentación. Después de 140 horas de cultivo, el pH del caldo es de 6,75 y su volumen de 350 litros; la proporción del mosto en 32.999 RP es de 35 mg/l.

b) Extracción

25 A 350 litros de mosto obtenido anteriormente se añaden 350 litros de metanol y de sosa 6 N para llevar el pH a 7,5. Se agita durante una hora. Después de la adición de 25 kg de adyuvante de filtración, la suspensión es filtrada sobre filtro prensa. Se recoge el filtrado. La torta es lavada por 100 litros de metanol acuoso al 50 %. El filtra-
30 do y el lavado son reunidos y concentrados a presión reduci-

da hasta un volúmen de 250 litros. Después de la alcalinización por adición de 220 cm³ de sosa 6 N el antibiótico contenido en este concentrado es extraído por 2 veces 150 litros de la mezcla cloruro de metileno-butanol (80-20 en volúmen).

5 Los 238 litros de extractos orgánicos reunidos son concentrados a presión reducida hasta un volúmen de 30 litros. Se añade entonces al concentrado 100 cm³ de n-butanol saturado en ácido clorhídrico 11N. Después de la concentración hasta un volúmen de 3 litros, se añade lentamente la solución en
10 21 litros de hexano. El precipitado obtenido es escurrido, lavado y secado. Se obtienen así 137 g de clorhidrato de 32.999 RP bruto.

c) Purificación

15 1) 112 g de clorhidrato bruto de 32.999 RP obtenidos como se ha indicado anteriormente son puestos en solución en un litro de agua a 50°C. La solución, cuyo pH es de 2,9, se filtra sobre vidrio calcinado. Las impurezas coloreadas contenidas en este filtrado son extraídas por 2 veces 500 cm³ y después 1 vez 1 litro de cloroformo. Después de la adición de 75 g de cloruro de sodio a la fase acuosa se extrae
20 el antibiótico por 2 veces 0,5 litros de n-butanol. El pH de la fase acuosa se ajusta a 9,5 por adición de sosa concentrada y el antibiótico que permanece es extraído por 0,5 litros de n-butanol.

25 Los extractos butanólicos que contienen el antibiótico son reunidos y concentrados a presión reducida hasta un volúmen de un litro. Se añade entonces 1 litro de cloroformo a este concentrado. La solución es lavada por 2 veces 500 cm³ de agua alcalinizada a pH 9,5. Las aguas de lavado
30 son extraídas por 2 veces 500 cm³ de la mezcla cloroformo

- n-butanol (80-20 en volúmen) a pH 9,5. Los extractos orgánicos son reunidos y después concentrados a presión reducida. Durante la concentración se añaden 300 cm³ de la mezcla n-butanol - agua - ácido clorhídrico 11 N (94-5-1 en volúmen).
- 5 La concentración es continuada hasta la obtención de un volúmen de 150 cm³ y después la solución es añadida lentamente a 2 litros de hexano. El precipitado obtenido es escurrido, lavado y secado. Se obtienen así 30 g de un producto que contiene clorhidrato de 32.999 RP.
- 10 2) 13 g de producto así obtenido son puestos en solución en 26 cm³ de la mezcla agua - dioxano (20-80 en volúmen) a 35°C. El antibiótico cristaliza por adición lenta de 624 cm³ de dioxano. Después de 3 horas de agitación, los cristales son escurridos, lavados y secados. Se obtienen así 2 g de un
- 15 producto cristalizado que contienen clorhidrato de 32.999 RP.
- 3) 4,47 g de un producto cristalizado obtenido como se ha indicado anteriormente son puestos en solución en 40 cm³ de agua. La solución es filtrada. El clorhidrato del antibiótico 32.999 RP contenido en el filtrado cristaliza por adición de 405 cm³ de acetona agitando. Los cristales obtenidos son escurridos, lavados y secados. Se obtienen así 2,47
- 20 g de un producto que contiene clorhidrato de 32.999 RP cristalizado.
- 4) 2,84 g de producto obtenido como se ha indicado anteriormente son puestos en solución en 28,4 cm³ de la mezcla metanol-acetona (50-50 en volúmen). Se añade a la solución 16,9 cm³ de la mezcla acetona - agua (84-16 en volúmen). Por calentamiento a 30°C y después enfriamiento el clorhidrato del 32.999 RP cristaliza. Los cristales obtenidos son escurridos, lavados y secados. Se obtienen así 2,23 g de clorhidra-

to semipurificado de 32.999 RP cristalizado.

5) 1,85 g. de clorhidrato semi-purificado obtenidos como se ha indicado anteriormente son puestos en solución en 400 cm³ de agua a un pH de 5,5. Impurezas coloreadas son extraídas de esta solución por 10 veces 400 cm³ de la mezcla n.butanol - cloroformo (20 - 80 en volumen). Por concentración de la fase acuosa durante la cual se añade n-butanol se obtiene una fase butanólica de 75 cm³ que es añadida lentamente en 1,5 litros de hexano. El precipitado obtenido es escurrido, lavado y secado. Se obtienen así 1,4 g. de clorhidrato de 32.999 RP puro.

Las Figuras 1 a 6 llevan la siguiente leyenda:

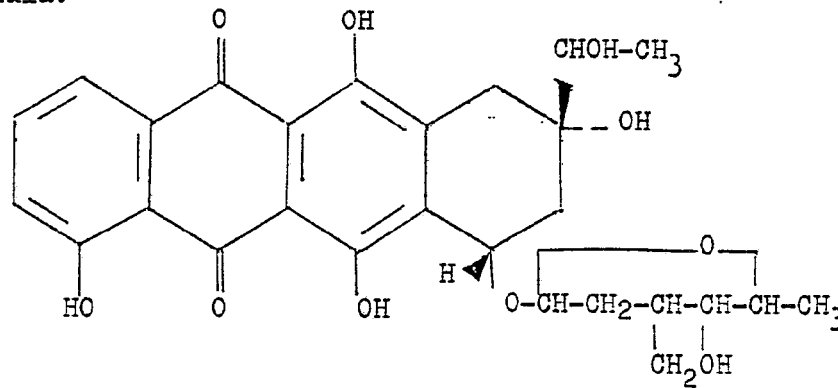
A - Densidad óptica; B - Nanómetro; C - Longitud de ondas (micrones); y D - Número de ondas (cm⁻¹).

15 Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento de preparación de una nueva sustancia antitumoral básica, designada por el número 32.999 RP, de fórmula:

5.



10.

en forma de base libre o de sal de adición con un ácido, caracterizado porque se cultiva un Streptomyces elegido entre S. ceoruleorubidus (NRRL 8098, 3045 ó 3046) o S. bifurcus (NRRL 3539) en un medio nutritivo nireado que contiene fuentes de carbono y de nitrógeno asimilables y sales minerales en presencia de activadores elegidos de entre ametofterina, barbital, fenobarbital, butobarbital, pentiobarbital, sulfanilamida, sulfapiridacina y sulfatiazol, y después extrae el antibiótico del medio de cultivo por un disolvente orgánico, se purifica por cromatografía o cristalización y eventualmente se transforma la base en sal de adición con un ácido.-

15.

20.

25.

2.- Procedimiento de preparación de una nueva sustancia antitumoral básica, designada por el número 32.999 RP, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria e ilustrado en los adjuntos dibujos.

Esta Memoria consta de 44 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

RHONE-POULENC INDUSTRIES.

[Handwritten signature]

FIG.1

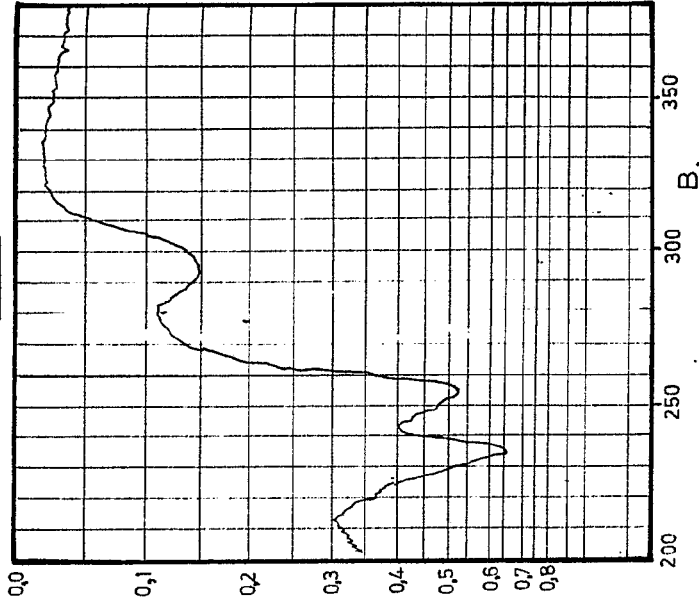


FIG.2

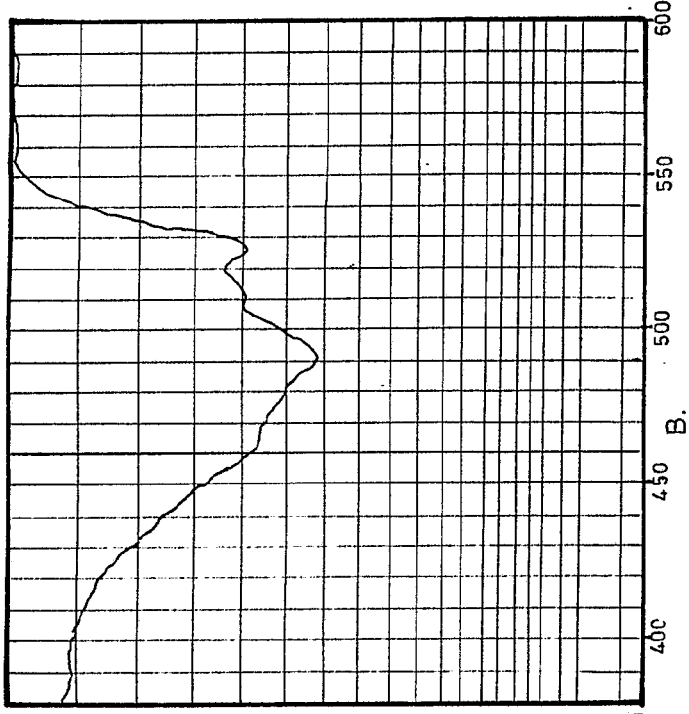
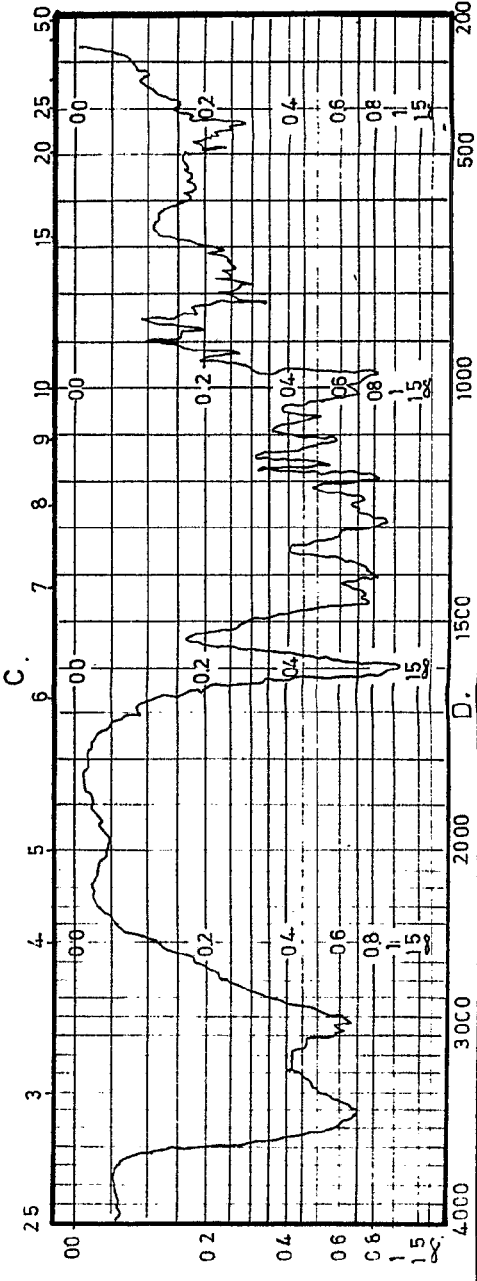


FIG.3



ESCALA
VARIABLE

Madrid

1966

[Handwritten signature]

FIG. 1

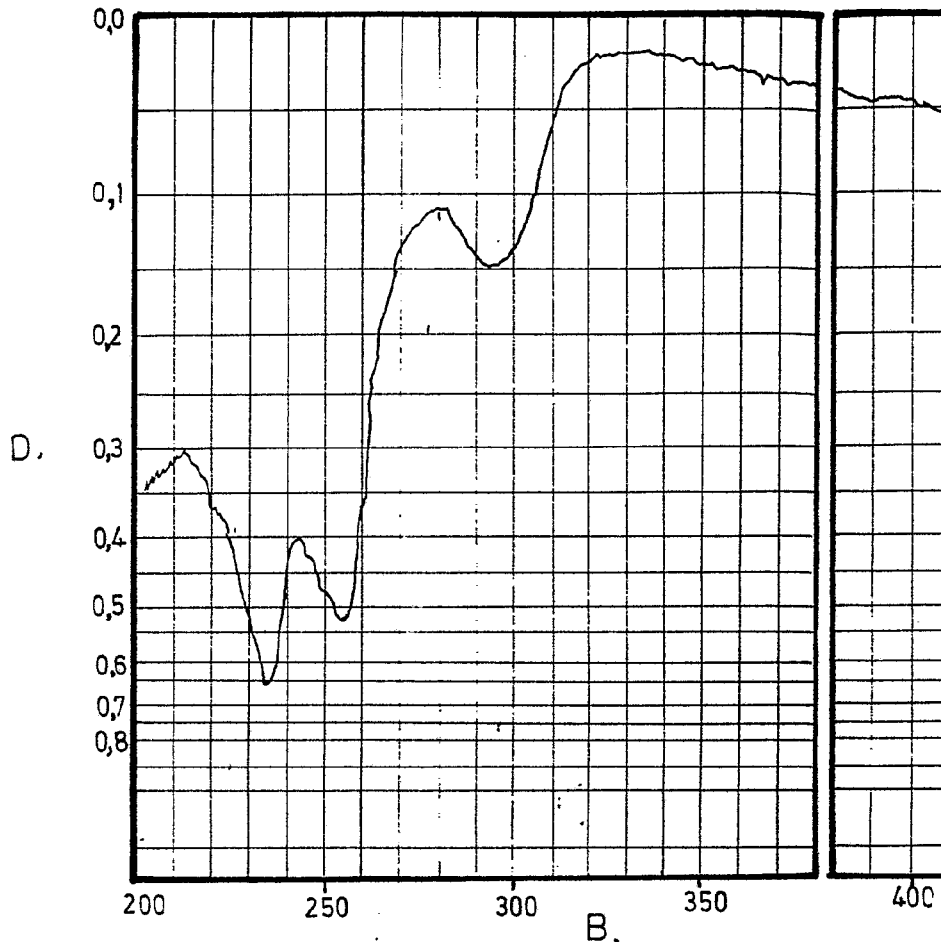


FIG. 3

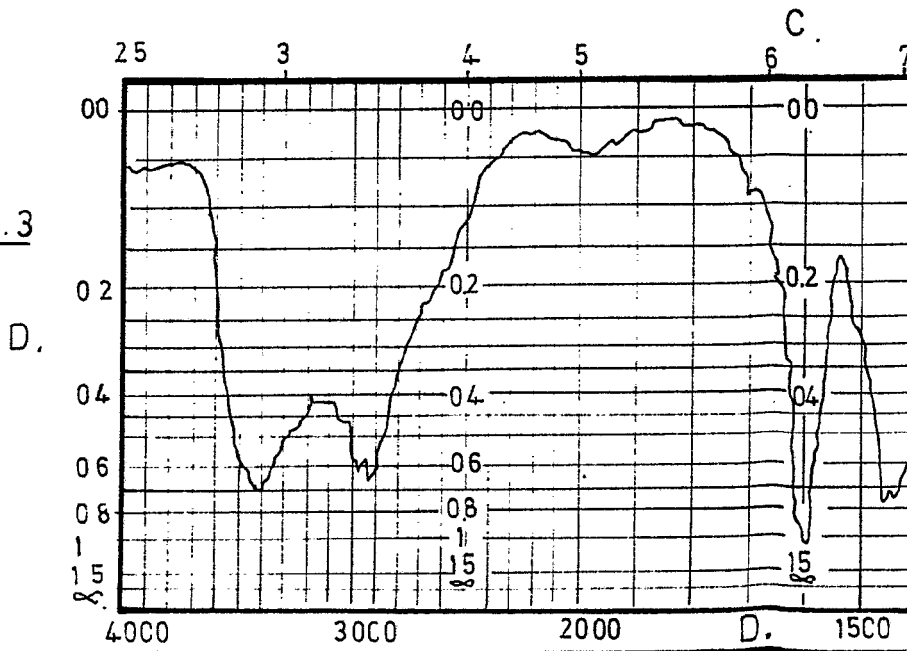
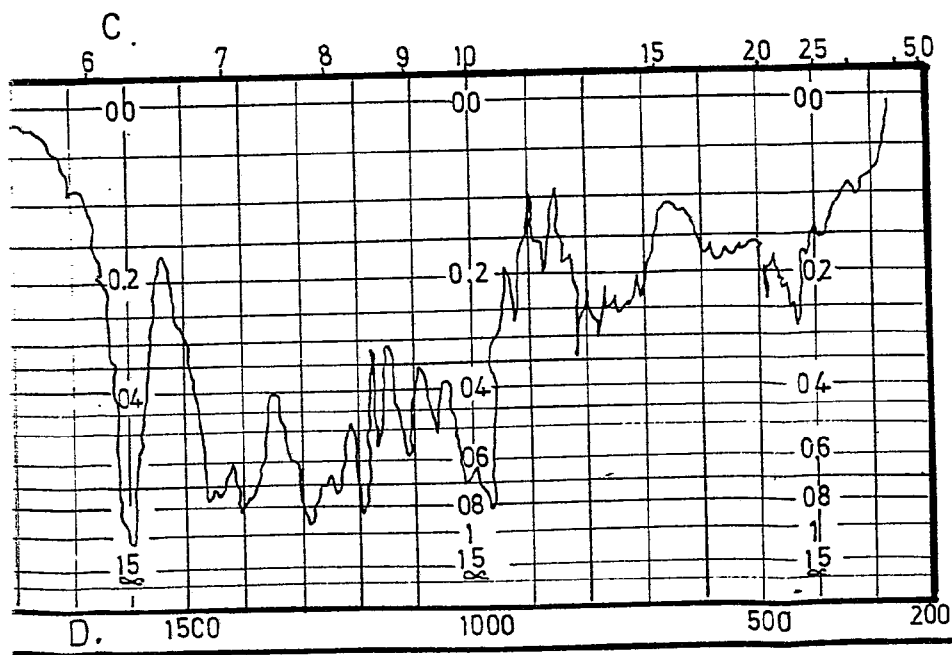
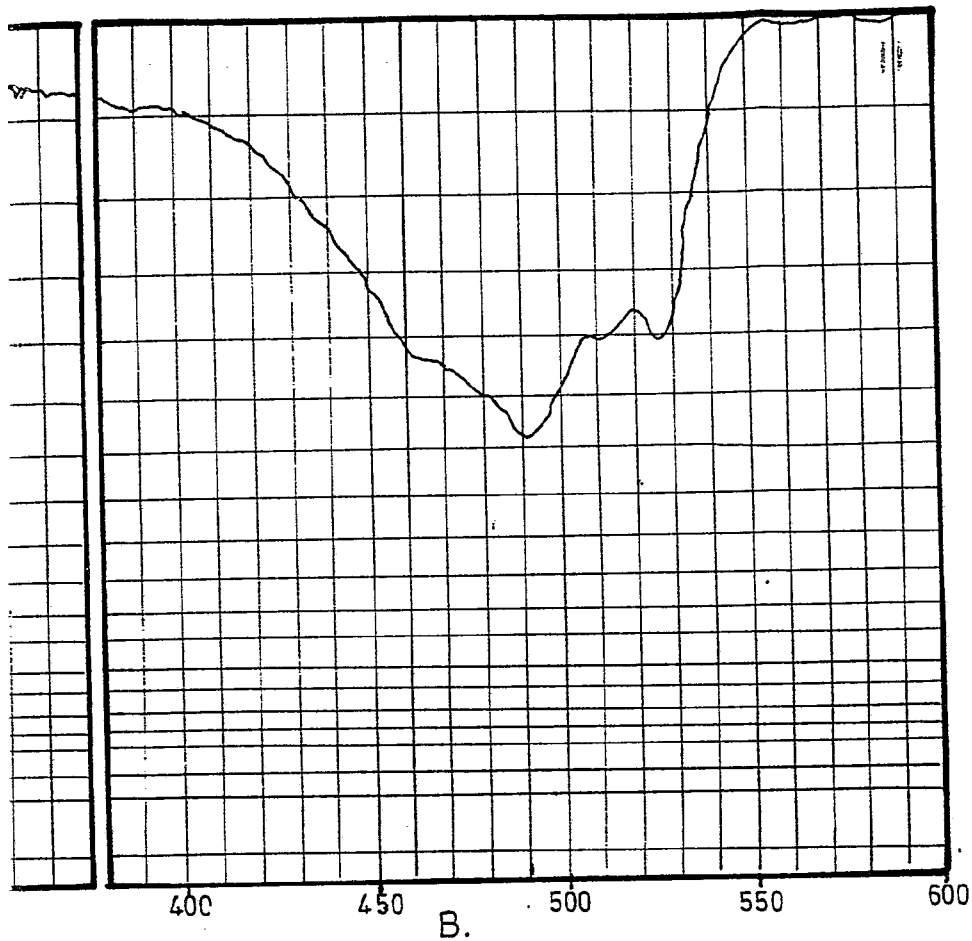


FIG.2



ESCALA
VARIABLE

Madrid

578
[Signature]

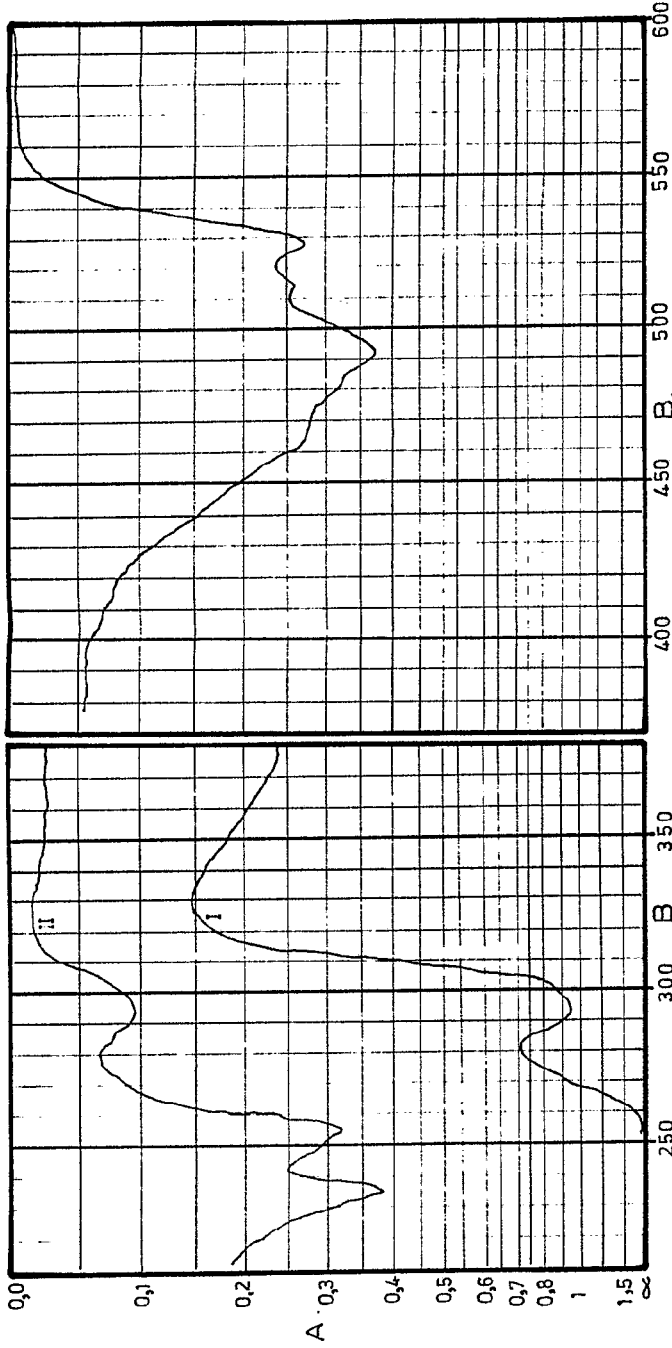


FIG. 4

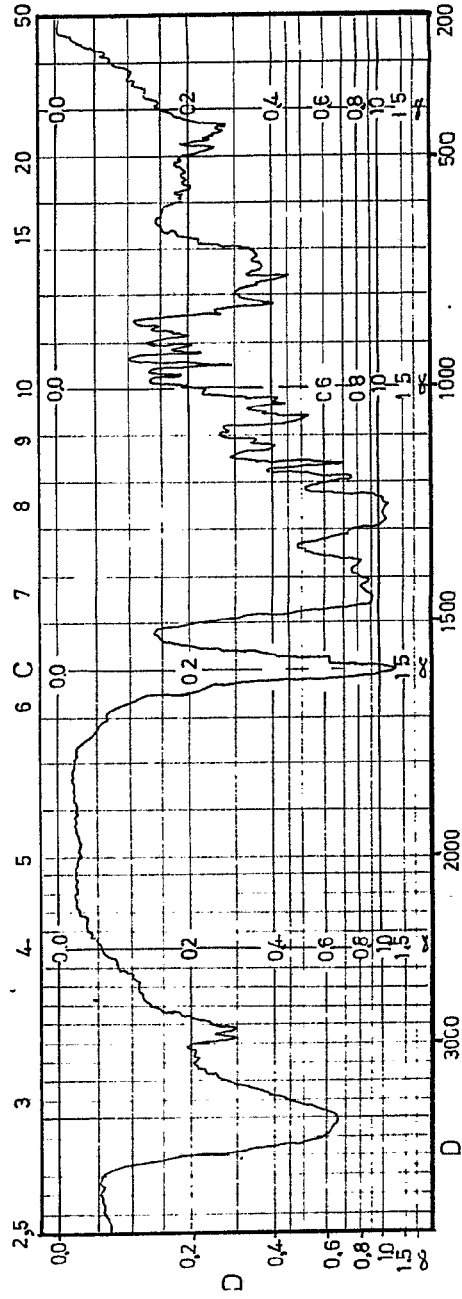


FIG. 6

LABORATOIRE
A. GUILLET
15, rue de la République
69001 LYON
1976

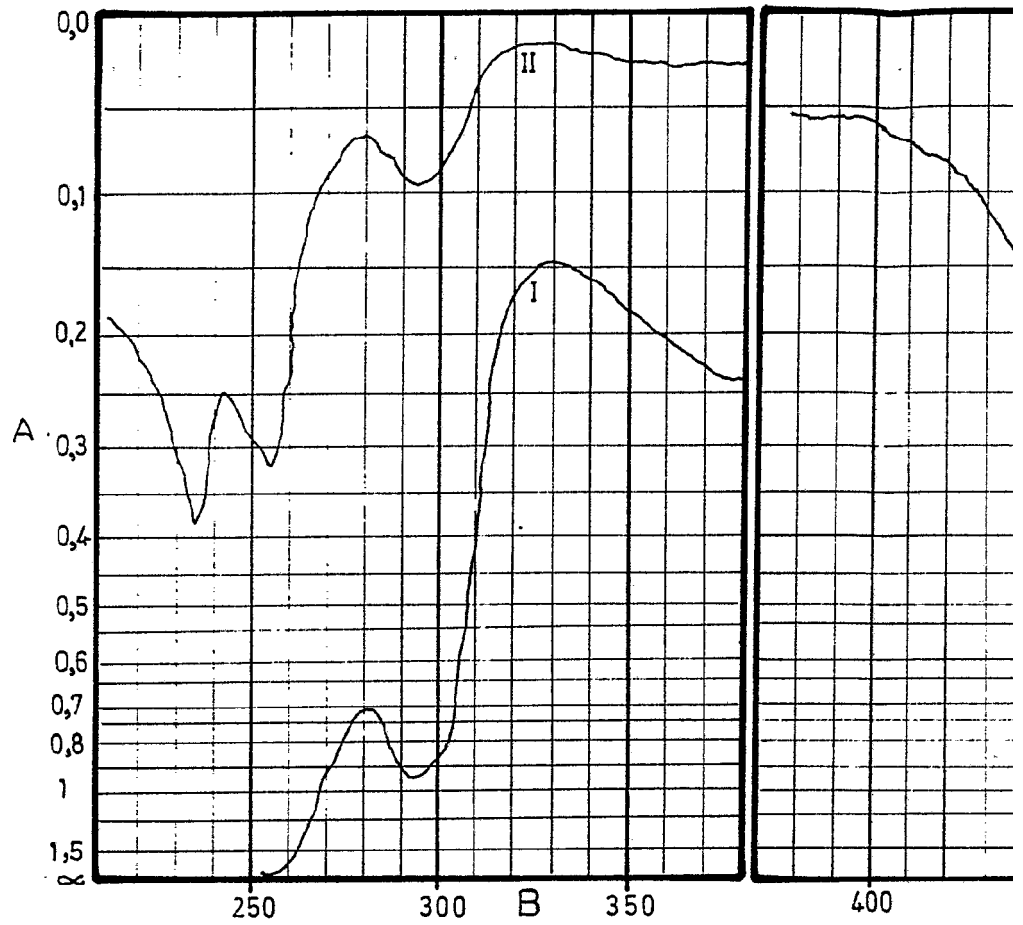


FIG. 6

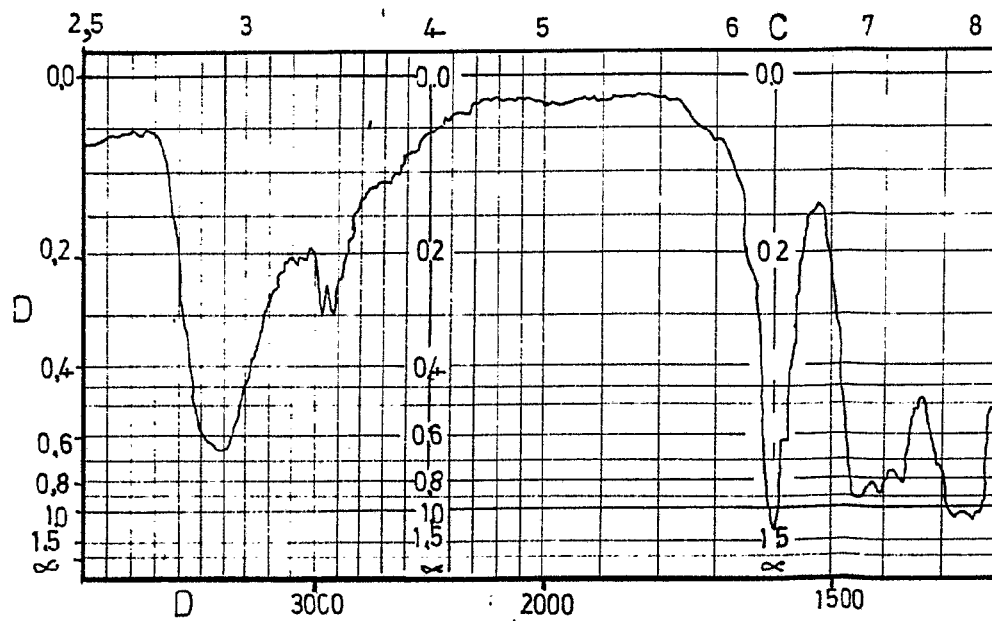
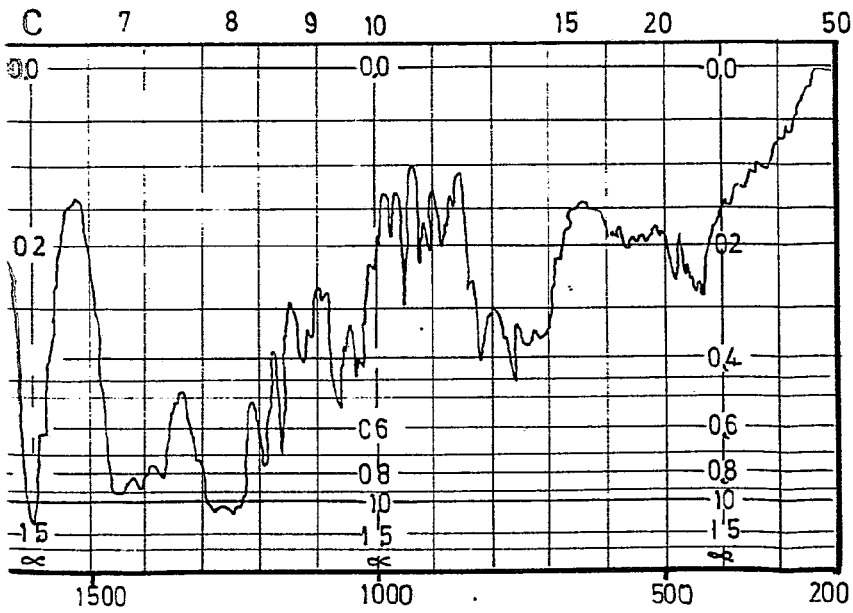




FIG.5



REPUBLICA
VENEZUELA
5 OCT. 1976

LA COMISIÓN NACIONAL DE ESTUDIOS DE LA GRAN FAMILIA

[Handwritten signature]