



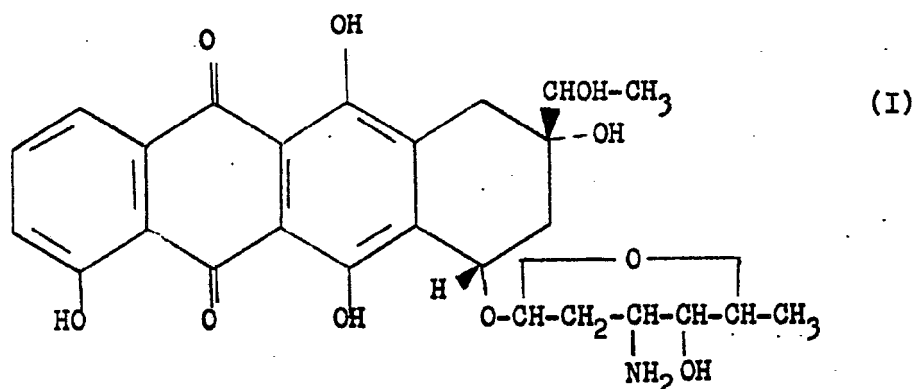
ESPAÑA

ES 449771 (A1)
FECHA DE PRESENTACION
12 JUL. 1976

PATENTE DE INVENCION

① PRIORIDADES ③ NUMERO 76 02912		② FECHA 3 de febrero de 1976	④ PAIS Francia 20 DIC. 1977
④ FECHA DE PUBLICIDAD	⑤ CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D; A61K	⑥ PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA	
⑦ TITULO DE LA INVENCION PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UNA NUEVA SUSTANCIA ANTITUMORAL BASICA, DESIGNADA POR EL NUMERO 32.999 RP.			
⑧ SOLICITANTE (S) RHONE-POULENC INDUSTRIES,			
DOMICILIO DEL SOLICITANTE 22, avenue Montaigne, Paris 8e.			
⑨ INVENTOR (ES) Jean FLORENT, Ing. Jean LUNEL, Ing. Jacques RENAULT, Ing.			
⑩ TITULAR (ES)			
⑪ 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 fisicoquímicas.

- 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)

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

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

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

15 Este espectro se representa por la figura 1.

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

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

20 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.

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

10	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
	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
15	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
	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
20		1600 tF.	1235 F	930 m	750 m		

tF = muy fuerte f = débil

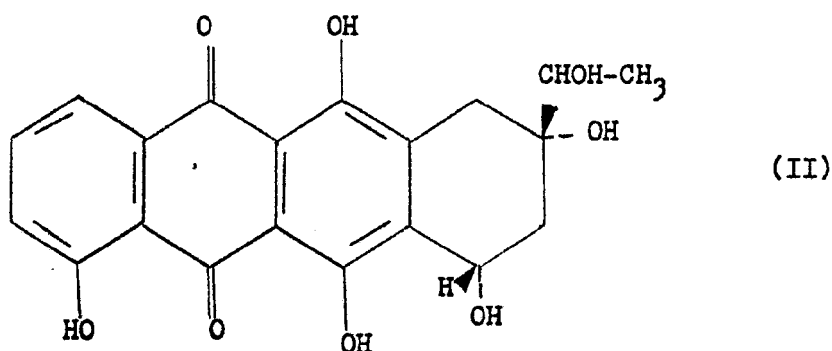
F = fuerte tf = muy débil

m = media ep. = hombro

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 volúmen) a una temperatura de 24° C. En este sistema el clorhidrato del 32.999 RP tiene un R_f próximo de 0,2.

La hidrólisis ácida del 32.999 RP o de una de sus sa-

les 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 dioxanno, 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:

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

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

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

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

- 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 1 % 1 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 1 % 1 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 ép.	2680 ép.	1412 F	1095 f	910 m	740 m	530 tf
	3420 F	1980 tf	1370 F	1070 ép.	885 m	710 m	505 ép.
	3360 ép.	1705 f	1315 ép	1062 F	875 m	700 ép.	485 m
	3080 ép.	1640 ép	1285 tF	1050 ép	865 f	680 tf	465 m
5	2975 m	1600 tF	1255 tF	1030 m	840 m	665 tf	450 m
	2925 m	1580 ép	1240 ép	1020 m	815 F	625 ép	435 m
	2910 ép.	1540 ép.	1195 F	1005 m	805 ép	595 f	385 tf
	2890 ép	1458 F	1165 F	975 m	785 ép.	585 f	360 tf
	2860 ép.	1448 F	1130 m	950 m	775 ép.	570 f	320 tf
10				925 m	765 m	545 f	

tF = muy fuerte F = fuerte m = media

f = débil tf = muy débil ép. = 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 a partir de los medios de cultivo de un nuevo microorganismo, identificado completamente a continuación, que pertenece al género estreptómices y designado por la denominación *Streptomyces atroviolaceus* DS 8938. Una muestra de esta cepa ha sido depositada en U.S. Department of Agriculture en Peoria, Illinois, bajo el número NRRL 8148. Muestras de este microorganismo pueden obtenerse de este laboratorio con referencia al presente documento.

Este organismo, que ha sido aislado a partir de una muestra de tierra, presenta caracteres que no han permitido identificarlo con una especie ya descrita. Debe por tanto

ser considerado como una especie nueva.

5 El aislamiento 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 sus-
pensión a diferentes concentraciones, y en extender un pe-
queño volumen de cada dilución sobre la superficie de cajas
de Petri que contienen un medio nutritivo gelosado. Después
de una incubación de algunos días a 26°C, que permite a los
microorganismos desarrollarse, las colonias que se desean
10 aislar para continuar así el estudio son tomadas y transplan-
tadas sobre gelosas nutritivas a fin de obtener así cultivos
más abundantes.

15 *Streptomyces atroviolaceus* DS 8938 forma esporas ova-
les que miden 0,4 a 0,6 μ /0,6 a 0,9 μ . Desarrolla esporo-
foros no ramificados que toman origen en el micelio aéreo.
Sus cadenas de esporas son largas, que cuentan en general va-
rias decenas de esporas, y se enrollan describiendo varias
vueltas en espiral generalmente cerradas, Por su forma de
esporulación, esta cepa se clasifica en la Section Spira de
20 la clasificación de Pridham.

25 *Streptomyces atroviolaceus* DS 8938 se desarrolla per-
fectamente a 25°C y a 30°C, menos a 37°C y nada a 50°C. For-
ma a menudo sobre sus medios de cultivo un micelio vegetati-
vo en primer lugar pardo amarillo a pardo rojo que rápidamen-
te toma un tinte oscuro que va de pardo muy oscuro a pardo
violeta o pardo negruzco. La esporulación no se desarrolla
más que sobre un número de medios limitado, donde aparece
difícil y tardíamente, haciendo tomar entonces al micelio
aéreo una coloración gris muy clara; es preciso hacer notar
30 por otra parte que en un cierto número de medios el micelio

aéreo es susceptible de tefirse de rosa pálido cuando el pigmento soluble violeta oscuro se produce en abundancia por el cultivo.

5 Streptomyces atrovioleaceus DS 8938 no produce pigmento soluble melánico negro sobre la gelosa especial tirosina-extracto de levadura de Waksmsn (Melanin formation medium); sin embargo es susceptible de elaborar sobre numerosos medios, tanto sintéticos como orgánicos, pigmentos solubles que en-
10 sombrecen la gelosa coloreándola en pardo violáceo, violeta negro, pardo negruzco o negro.

En sus cultivos efectuados a 26°C, presenta los caracteres bioquímicos siguientes:

- | | | |
|----|---|---|
| | - producción de melanina | : negativa |
| | - producción de H ₂ S | : negativa |
| 15 | - tirosinasa | : negativa |
| | - licuación de la gelatina | : positiva |
| | - utilización de la celulosa | : negativa |
| | - producción de nitritos a partir de los nitratos | : débilmente positiva sobre medios sintéticos al comienzo de los cultivos |
| 20 | - hidrólisis del almidón | : positiva |
| | - cultivo sobre lecho | : ni coagulación ni peptonización pH sin cambio apreciable en 1 mes. |

Los caracteres de cultivo de Streptomyces atrovioleaceus DS 8938 son reseñados en el cuadro siguiente. Son estos cultivos llegados a un buen estado de desarrollo, es decir aproximadamente de tres semanas a 26°C, salvo indicaciones con-
25 trarias. Estos caracteres han sido observados sobre gelosas nutritivas y caldo habitualmente utilizado para determinar

los caracteres morfológicos de las cepas de estreptomices, siendo efectuados los cultivos sobre medios gelosados, sobre gelosas inclinadas. Un cierto número de los medios de cultivo empleados han sido preparados según las fórmulas indicadas en "The Actinomycetes", S.A. WAKSMAN, p. 193-197, Chronica Botánica Company, Waltham Mass., U.S.A., 1950; en este caso se indican por la letra W seguida del número que les ha sido atribuido en "The Actinomycetes". Las referencias o constituciones de los demás medios son las siguientes:

- 10 - Ref. A. - "Yeast Extract Agar" - T.G. PRIDHAM et col. - Antibiotics Annual, 1956-1957, p. 950
- Ref. B - "Bennett's Agar"- S.A. WAKSMAN - The Actinomycetes, vol. 2, p. 331 - nº 30 - The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1961
- 15 - Ref. C- Fórmula W-23, adicionada de 2% de gelosa
- Ref. D - "Hickey and Tresners' Agar" - T.G. PRIDHAM et col. - Antibiotics annual, 1956-1957, p. 950
- Ref. E - "Tomato Paste Catmeal Agar" - T.G. PRIDHAM et col. - Antibiotics Annual, 1956-1957, p. 950
- 20 - Ref. F - "Melanin formation medium" - S.A. WAKSMAN The Actinomycetes, vol. 2 p. 333, nº 42 - The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1961
- Ref. G - W.E. GRUNDY et col. - Antibiotics and Chem. 2, 401, 1952
- 25 - Ref. H - "Inorganic Salts - Starch Agar" - T.G. PRIDHAM et col. - Antibiotics Annual 1956-1957, p. 951
- Ref. I - Corresponde a la fórmula W-1, donde 3% de sacarosa son sustituidos por 1,5% de glucosa
- Ref. J - Corresponde a la fórmula W-1, donde 3% de sacarosa son sustituidos por 1,5% de glicerol
- 30

△ Ref. K - Corresponde a la fórmula W-18, donde 3% de sacarosa es sustituida por 1,5% de glucosa

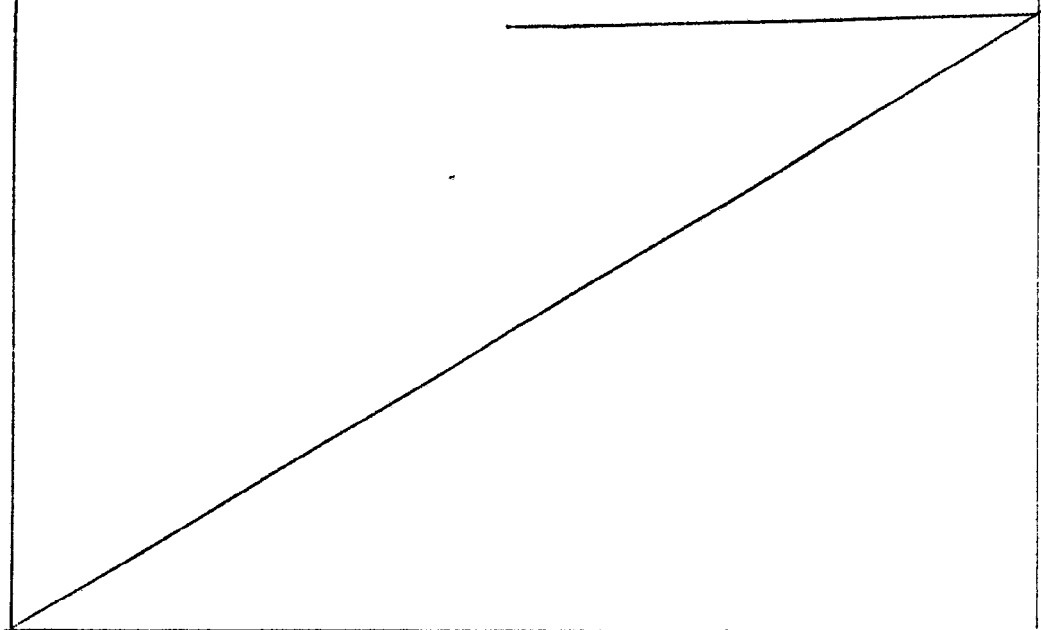
5 - Ref. L - Corresponde a la fórmula W-18, donde la sacarosa es suprimida y sustituida por pequeñas bandas de papel filtro sumergidas parcialmente en el liquido

- Ref. M - "Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria" - Society of American Bacteriologists Geneva, N.Y. II₅₀ - 18

10 - 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 - 18

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

15 - Ref. Q - Medio indicado para la búsqueda de la producción de H₂S por : H.D. TRESNER et F. DANGA = Journal of Bacteriology, 76, 239 - 244, 1958.



Medio de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo (M.v.) o Aspecto del cultivo
Gelosa en extracto de levadura de Pridham (Ref. A)	Bueno	Aspecto pardo negruzco
Gelosa de Bennett (Ref. B)	Bueno	Aspecto pardo oscuro
Gelosa de Emerson (Ref. C)	Bastante bueno	M.v. pardo anaranjado oscuro a pardo violeta
Gelosa de Hickey y Tresner (Ref. D)	Bastante bueno	M.v. Pardo violaceo oscuro
Gelosa en harina de avena y en extracto de tomate de Pridham (Ref. E)	Bastante bueno	M.v. Pardo muy oscuro
Gelosa glucosa peptonada (W-6)	Medio	M.v. pardo anaranjado a pardo violeta oscuro
Gelosa nutritiva (W-5)	Moderado	M.v. violeta rosa pardusco
Gelosa tirosina-extracto de levadura para formación de melanina (Ref. F)	Moderado	M.v. violeta oscuro

Aparato aéreo (que comprende el conjunto del micelio aéreo y de la esporulación)	Pigmento soluble	Observaciones y propiedades bioquímicas
Blanco-grisáceo moderadamente desarrollado	Negro	Esporas que miden 0,4 a 0,6 μ /0,6 a 0,9 μ . Esporoforos no ramificados; cadenas de esporas que se enrollan formando varias vueltas de espirales cerradas.
Blanquecino a rosa grisáceo violáceo muy claro. Moderadamente desarrollado	Pardo negro	
Blanquecino a rosa grisáceo violáceo muy claro. Pobremente desarrollado	Pardo anaranjado muy obscuro que va hacia pardo negruzco	
Blanco-grisáceo a violeta rosa más pálido. Bastante pobremente desarrollado	Pardo negruzco violáceo	
Blanco-grisáceo. Moderadamente desarrollado	Pardo negro	
Blanco-grisáceo. En estado de trazas	Pardo anaranjado	
Ninguno	Pardo anaranjado	
Ninguno	Violeta pardusco	Producción de melanina: negativa (lecturas efectuadas según las recomendaciones del autor)

Medio de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo (M.v.) o Aspecto del cultivo
Gelosa en malato de calcio de Krainsky (Ref. G)	Moderado	aspecto pardo amarillo grisáceo
Gelosa en ovalbumina (W-12)	Muy pobre	M.v. incoloro a amarillento. Muy pobremente desarrollado
Gelosa glucosa-asparagina (W-2)	Moderado	M.v. pardo amarillo obscuro
Gelosa glicerina-asparagina (W-3)	Bastante bueno	M.v. pardo negruzco
Gelosa almidon-sales minerales de Pridham (ref. H)	Bastante bueno	M.v. pardo muy obscuro
Gelosa almidon-nitrato (W-10)	Moderado	M.v. violeta obscuro
Gelosa sintética de Czapek en sacarosa (W-1)	Bueno	M.v. pardo negruzco
Gelosa sintética de Czapek en glucosa (ref. I)	Bastante bueno	M.v. pardo violeta obscuro

Aparato aéreo (que comprende el conjunto del micelio aéreo y de la esporulación)	Pigmento soluble	Observaciones y propiedades bioquímicas
Blanco-grisáceo. Muy moderadamente desarrollado	Gris pardo	Solubilización del malato: positiva pero no completa
Ninguno	Ninguno - o pardusco extremadamente débil	
Blanco-grisáceo en estado de trazas	Pardo negro	
Blanquecino. Muy moderadamente desarrollado	Pardo negro	
Blanco amarillento a blanco-grisáceo. Muy moderadamente desarrollado	Pardo negruzco	<ul style="list-style-type: none"> - Hidrolisis del almidón: positiva - Esporas ovals, que miden 0,4 a 0,6 μ/0,6 a 0,9 μ. Esporóforos no ramificados. Cadenas de esporas que se enrollan formando varias vueltas de espirales cerradas.
Blanco-grisáceo a violeta rosa débil. Muy moderadamente desarrollado	Violeta rosa pardusco	Hidrolisis del almidón: positiva
Blanco-grisáceo a gris rosa pálido. Bastante pobremente desarrollado	Negro	
Blanco-grisáceo. En estado de trazas	Pardo anaranjado violáceo	

Medio de cultivo	Grado de desarrollo	Micelio vegetativo (M.v.) o Aspecto del cultivo
Gelosa sintética de Czapek en glicerina (Ref. J)	Bastante bueno	M.v. pardo oscuro a violeta pardusco
Caldo almidón-nitrato (W-19)	Muy pobre	Cultivo coposo blanquecino
Caldo sintético de Czapek en sacarosa (W-18)	Muy pobre	Cultivo coposo blanquecino a pardusco
Caldo sintético de Czapek en glucosa (Ref. K)	Muy pobre	Cultivo coposo blanquecino
Caldo sintético de Czapek en celulosa (Ref. L)	Ninguno	
Caldo nutritivo nitrato (Ref. M)	Muy pobre	Cultivo coposo blanquecino a amarillento
Gelatina pura al 12% (Ref. N)	Moderado	M.v. pardusco a violáceo. Pobremente desarrollado
Cultivo sobre patata (W-27)	Bastante bueno	M.v. pardo rojizo a violeta pardusco
Leche desnatada (Ref. P)	Moderado	Anillo pardo amarillento a pardo violáceo
Gelosa de Tresner y Danga (Ref. Q)	Moderado	M.v. gris amarillento claro

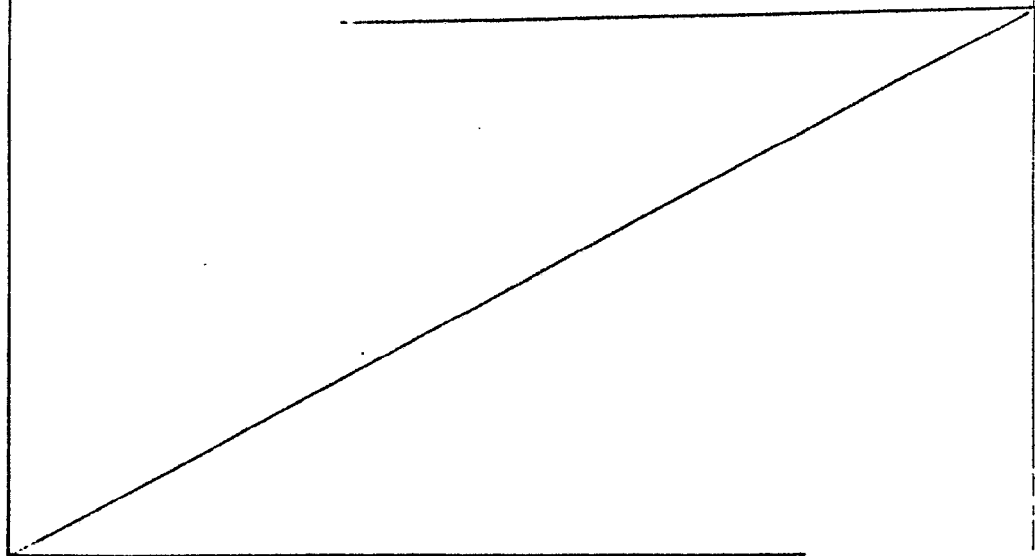
Aparato aéreo (que comprende el conjunto del micelio aéreo y de la esporulación)	Pigmento soluble	Observaciones y propiedades bioquímicas
Ninguno	Pardo anaranjado oscuro, que va hacia pardo negrozco	
Ninguno	Ninguno	Producción de nitritos: positiva al comienzo de los cultivos
Ninguno	Ninguno	Producción de nitritos: débilmente positiva al comienzo de los cultivos
Ninguno	Ninguno	Producción de nitritos: positiva al comienzo de los cultivos Utilización de la celulosa: negativa
Ninguno	Ninguno	Producción de nitritos: negativa
Ninguno	Ninguno	Licuación de la gelatina: positiva bastante lenta.
Blanquecino a rosa grisáceo claro. En estado de trazas	Pardo a pardo violáceo oscuro	
Ninguno		Ni coagulación ni peptonización apreciable del pH en 1 mes
Ninguno	Pardo amarillo	Producción de H ₂ S: negativa (lecturas efectuadas según las recomendaciones de los autores).

Streptomyces atroviolaceus DS 8938 presenta un conjunto de caracteres que no coincide exactamente con ninguno de los de las cepas ya descritas, y es por esta razón que se la debe considerar como una especie nueva.

5 Considerando las especies cuya descripción es dada en "The Actinomycetes" (vol. 2, S.A. WAKSMAN, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1961) así como en Bergeys' Manual of Determinative Bacteriology (7ª edición, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1957) la especie a la que se puede más gustosamente comparar es *Streptomyces violaceoniger*,
10 dado que como esta última no produce pigmento soluble melánico negro, sino dá por el contrario sobre gelosa sintética de Czapek en sacarosa (sucrose nitrate agar) un pigmento soluble pardo violeto que se vuelve negro muy rápidamente; *S. atroviolaceus* DS 8938 forma por lo demás sobre numerosos medios pigmentos solubles pardo violáceo a violeta negro, que va incluso hasta el negro en un cierto número de casos. Además, como *S. violaceoniger*, *S. atroviolaceus* DS 8938 presenta un micelio aéreo esporulado de tinte gris y sus cadenas
15 de esporas se enrollan en espirales. Sin embargo, *S. atroviolaceus* DS 8938 y *S. violaceoniger* deben ser consideradas como dos especies diferentes. En efecto, a pesar de las analogías que acaban de ser citadas, es preciso hacer notar que *S. violaceoniger* no da pigmento soluble sobre patata, desarrolla un micelio vegetativo gris sobre gelatina, y sobre todo muestra por envejecimiento un ennegrecimiento de su micelio aéreo que la hace incluirse en el grupo de *S. hygroscopicus*, mientras que *S. atroviolaceus* DS 8938 da sobre patata un pigmento soluble pardo a pardo violáceo oscuro, desarrolla sobre gelatina un micelio vegetativo pardusco a violáceo,
20
25
30

e incluso en sus cultivos muy avanzados en edad no presenta jamás ennegrecimiento de su micelio aéreo que permite hacerla al grupo de *S. hydroscopicus*. Es preciso también hacer notar que, en particular sobre gelosa sintética de Czapek en sacarosa (sucrose nitrate agar), el pigmento soluble elaborado por *S. violacenoniger*, toma al comienzo del cultivo un tono azulado que no presenta el pigmento soluble elaborado por *S. atroviolaceus* DS 8938 que, por su parte, muestra antes de oscurecerse una coloración violeta purpúreo y no violeta azulado.

La capacidad de *S. atroviolaceus* DS 8938 para utilizar diversas fuentes de carbono o de nitrógeno para asegurar su desarrollo ha sido determinada según el principio del método de Pridham y Gottlieb (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 $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ por las diversas fuentes de nitrógeno respectivamente ensayadas. Los resultados se indican en el cuadro siguiente:

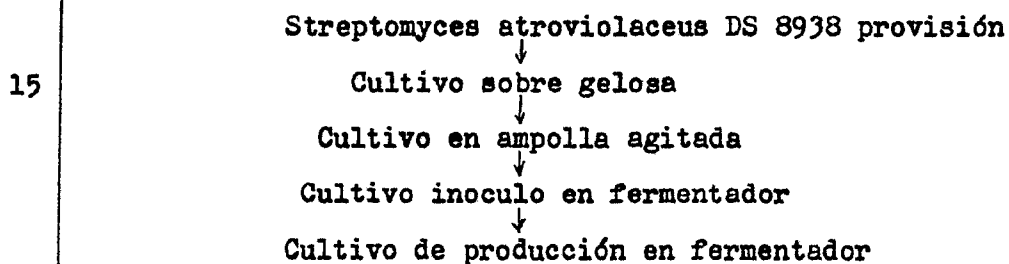


Fuentes de car- bón ensayadas	Utilización	Fuentes de nitró geno ensayadas	Utilización
D-Ribosa	negativa	NO ₃ Na	positiva
D-Xilosa	negativa	NO ₂ Na	positiva
L-arabinosa	negativa	SO ₄ (NH ₄) ₂	positiva
L-Ramnosa	negativa	PO ₄ H(NH ₄) ₂	positiva
D-Glucosa	positiva	Adenina	positiva
D-Galactosa	positiva	Adenosina	positiva
D-Fructosa	positiva, lenta	Uracilo	negativa
D-Mannosa	positiva	Urea	positiva
L-Sorbosa	negativa	L-Asparagina	positiva
Lactosa	positiva	Glicocola	positiva
Maltosa	positiva	Sarcosina	positiva, lenta
Sacarosa	positiva	DL-Alanina	positiva
Trehalosa	positiva	DL-Valina	positiva
Cellobiosa	positiva	Acido DL-aspartico	positiva
Rafinosa	positiva	Acido DL-glutamico	positiva
Dextrina	positiva	L-Arginina	positiva
Inulina	negativa	L-Lisina	positiva
Almidon	positiva	DL-Serina	positiva
Glicogeno	positiva	DL-Treonina	positiva
Glicerol	positiva	DL-Metionina	positiva
Eritritol	positiva	Taurina	negativa
Adonitol	positiva	DL-Fenilalanina	positiva
Dulcitol	negativa	L-Tirosina	positiva
D-Mannitol	positiva	DL-Prolina	positiva
D-Sorbitol	negativa	L-Histidina	positiva
Inositol	positiva	L-Triptofano	positiva, lenta
Salicina	negativa	Betaina	negativa

El procedimiento de preparación del 32.999 RP consiste esencialmente en cultivar *Streptomyces atroviolaceus* DS 8938 o sus mutantes productores sobre un medio y en condiciones apropiadas y en separar el producto formado durante el cultivo.

El cultivo de *Streptomyces atroviolaceus* DS 8938 puede ser efectuado por cualquier métodos de cultivo aerobio en superficie o en profundidad, pero este último suele ser preferido por razones de comodidad. A este efecto se utilizan los diferentes tipos de aparatos que son de un uso corriente en la industria de las fermentaciones.

Se puede en particular adoptar la marcha siguiente para la conducción de las operaciones:



El medio de fermentación debe contener esencialmente una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno asimilables, elementos minerales, en particular cloruros o carbonatos, y eventualmente factores de crecimiento, pudiendo ser aportados todos estos elementos en forma de productos perfectamente definidos o por mezclas complejas, tales como se encuentren en los productos biológicos de orígenes diversos.

Como fuentes de carbono asimilable, se pueden utilizar hidratos de carbono tales como la glucosa, lactosa, dextrinas, almidón u otras sustancias carbonadas como azúcares alcohólicos, (glicerol) o como algunos ácidos orgánicos: ácidos láctico, cítrico. Algunos aceites animales o vegetales

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

5 Las fuentes de nitrógeno asimilable son extremadamente variadas. Pueden ser sustancias químicas muy simples como las sales minerales u orgánicas de amonio, urea, algunos ácidos aminados. Pueden ser también aportadas por sustancias complejas que contienen principalmente nitrógeno en forma protidica, caseina, lactalbumina, gluten y sus hidrolisatos, 10 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 neutralizante, como los fosfatos alcalinos o alcalino-térreo o los carbonatos de calcio y de 15 magnesio. Otros aportan el equilibrio iónico necesario para el desarrollo de *Streptomyces atroviolaceus* DS 8938 y para la elaboración del 32.999 RP, como los cloruros y sulfatos alcalinos o alcalino-térreo. Algunos actúan más especialmente como activadores de las reacciones metabólicas de *Streptomyces atroviolaceus* DS 8938, son las sales de zinc, de cobalto, de hierro, de manganeso. 20

Los factores de crecimiento son productos de naturaleza vitamínica tales como la riboflavina, ácido fólico, ácido pantoténico o la tiamina.

25 El pH de fermentación en el arranque del cultivo debe estar comprendido entre 5,8 y 7,8. La temperatura óptima para la fermentación está comprendida entre 25 y 30°C, pero una producción satisfactoria se obtiene para temperaturas comprendidas entre 23 y 33°C. La aireación de la fermentación puede variar entre valores bastante amplios. Sin embar 30

go se ha encontrado que aireaciones de 0,3 a 3 litros de aire por litro de caldo y por minuto resultan en particular convenientes. El rendimiento máximo en 32.999 RP se obtiene después de 2 a 8 días de cultivo, dependiendo este tiempo esencialmente del medio utilizado.

Según lo que antecede, se concibe que las condiciones generales del cultivo de *Streptomyces atroviolaceus* DS 8938 para la producción del 32.999 RP pueden variar entre una amplia medida y ser adaptadas a cada necesidad particular.

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.

Por ejemplo, el 32.999 RP puede ser extraído del medio de fermentación a un pH próximo de 9 por medio de un disolvente orgánico tal como el cloroformo, el cloruro de metileno, el n.butanol o una mezcla de éstos disolventes en proporciones convenientes.

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 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.

El 32.999 RP puede ser aislado de los extractos orgá-

nicos, después de lavados y extracciones sucesivas, por precipitación tras concentración de los extractos a un pequeño volumen o por adición en un disolvente miscible en el que el 32.999 RP es prácticamente insoluble, tal como hexano, tras
5 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 la cristalización o la cromatografía sobre diversos absorbentes.

10 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, la leucemia P 388 y la leucosarcomatosis.

15 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.

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

En lo que sigue:

a) La identificación del 32.999 RP es efectuada por cromatografía sobre capa delgada de gel de sílice comparando los
25 Rf de los productos obtenidos al de la carminomicina o del 32.999 RP en el mismo sistema de disolvente.

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
30 extracto y de la del 32.999 RP puro tomado como referencia

o bién por comparación de las superficies de los picos registrados en el lector de placa "Chromoscan" e incluso por último dosificado colorimétricamente el 32.999 RP elegido del soporte cromatográfico a nivel de la mancha del producto buscado.

Ejemplo 1

A - Fermentación

Se carga en un fermentador de 170 litros:

	-corn-stepp (a 5% de extracto seco)	2400 g
10	-sacarosa	3600 g
	-sulfato de amonio	240 g
	-carbonato de calcio	900 g
	-agua de ciudad q.sp.	110 litros

El medio cuyo pH es igual a 6,0 es esterilizado por burbujeo de vapor a 122°C durante 40 minutos. Después del enfriamiento y en virtud de la condensación de vapor durante la esterilización, el volúmen del caldo es de 120 litros; el pH es igual a 6,65. Se siembra con 250 cm³ de un cultivo en erlenmeyer agitado de *Streptomyces atroviolaceus* DS 8938.

El cultivo es desarrollado a 26°C durante 33 horas agitando y aireando con aire esteril; resulta entonces conveniente para la siembra del cultivo productor.

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

25	-harina de soja	22 kg
	-distillers' soluble	2,750 kg
	-almidón (parcialmente hidrolizado)	16,500 kg
	-aceite de soja	2,750 lit.
	-cloruro de sodio	5,500 kg
30	-agua de ciudad q.s.p.	510 litros

El pH del medio es ajustado a 7,5 por adición de 500 cm³ de sosa 10 N, y después se esteriliza el medio por burbujeo de vapor a 122°C durante 40 minutos. Después del enfriamiento y en virtud de la condensación de vapor durante la esterilización, el volúmen del caldo es de 550 litros. El pH del medio es de 6,60. Se siembra con 55 litros del cultivo inóculo en fermentador de 170 litros descrito más arriba. El cultivo es desarrollado durante 117 horas a 26°C agitando con una turbina que gira a 205 r.p.m. y aireando con un volúmen de aire estéril de 15 m³/hora. El pH, al final del cultivo, es igual a 7,60.

B - Extracción

A 560 litros de mosto obtenido como se ha descrito se añade 28 kg de ácido oxálico. Después de la agitación durante 1 hora a 40°C y adición de 25 kg de adyuvante de filtración, el mosto acidificado es filtrado sobre filtro-prensa. La torta miceliana es lavada por 120 litros de agua a 50°C que contiene 3 kg de ácido oxálico. El filtrado y el lavado reunidos, cuyo pH es igual a 1, son enfriados a 10°C, El pH es ajustado al 4,5 por adición de 50 litros de sosa 6N. El antibiótico presente en esta solución se fija por paso sobre una columna que contiene 25 litros de AMBERLITE IRC 50 en forma H⁺. La resina es lavada sucesivamente por agua, hasta que el efluente sale incoloro y después por 100 litros de una mezcla metanol-agua (50-50 en volúmen) y por 100 litros de una mezcla metanol-agua (90-10 en volúmen). Por último el antibiótico es diluido por 250 litros de una mezcla metanol-agua (90-10 en volúmen) que contiene 1% (peso/volúmen) de cloruro de sodio. El eluyente es concentrado a presión reducida (5 a 10 mm de mercurio) a 40°C hasta

un volúmen de 20 litros. El concentrado cuyo pH se ajusta a 9 por adición de sosa 11 N, es extraído por una vez 20 litros y después 2 veces 10 litros de cloroformo. En total se obtienen 35 litros de extractos que son concentrados a presión reducida (5 a 10 mm de mercurio) a 40°C hasta un volúmen de 2 litros. La solución restante es acidificada por adición de 50 cm³ de n.butanol saturado en ácido clorhídrico 11 N y concentrada de nuevo hasta un volúmen de 1 litro. La solución es vertida lentamente en 7 litros de hexano. El precipitado que se forma, es escurrido, lavado y secado. Se obtienen así 13 g de clorhidrato bruto del antibiótico 32.999 RP.

C - Purificación

a) El antibiótico es purificado por distribución a contracorriente en 3 ampollas de 2 litros A, B, C.

Se prepara una mezcla cloruro de metileno- n.butanol- tampón fosfato M/15 a pH 7,38 (8-2-10 en volúmen). Cuando la mezcla está en equilibrio se separan las dos fases.

En la ampolla A, se vierten 500 cm³ de una mezcla ácido fosfórico (a 85% en peso) - agua (1-125 en volúmen) y 500 cm³ de fase orgánica pesada. Se disuelve en esta mezcla de fase 13 g de clorhidrato de antibiótico bruto obtenido como se ha indicado en el párrafo B. Después de 15 minutos de agitación y eliminación de un insoluble por filtración, se ajusta el pH 7,5 por adición de sosa N.

En las ampollas B y C se cargan 500 cm³ de fase acuosa ligera, siendo respectivamente ajustado el pH a 7 en la ampolla B y a 6,5, en la ampolla C, por ácido fosfórico al 85%.

Partiendo de la ampolla A para pasar a las ampollas B y después C, se efectúa una distribución a contracorriente

de 5 transferencias, utilizando la fase pesada (disolvente) como fase móvil y las fases ligeras (acuosas) a pH 7,5 - 7 y 6,5 como fases estacionarias, poniendo en práctica cada vez 500 cm³ de fase móvil y manteniendo constante el pH de las fases estacionarias.

El antibiótico contenido en la fase acuosa de la ampolla C es extraído a pH 9,5 por dos veces 500 cm³ de la mezcla cloroformo - n.butanol (8-2 en volúmen). Los extractos orgánicos reunidos son concentrados a presión reducida (5 a 10 mm de mercurio) a 40°C. Durante la concentración se añaden 30 cm³ de n.butanol que contienen 6% (en volúmen) de ácido clorhídrico 2 N. El concentrado es llevado hasta un volúmen de 5 cm³ y después vertido lentamente en 500 cm³ de hexano. El precipitado que se forma es escurrido, lavado y secado. Se obtienen así 275 mg de clorhidrato de 32.999 RP semi-purificado.

b) 80 mg de clorhidrato obtenido como se ha indicado anteriormente son puestos en solución en una mezcla de 1 cm³ de agua y 1 cm³ de metanol. Esta solución se reparte igualmente en forma de un depósito lineal sobre 4 placas de cromatografía analítica en capa delgada de gel de sílice MERCK. Las placas son desarrolladas durante 1 hora, en una cuba, cuyas paredes son recubiertas de papel filtro, que contiene mezcla cloruro de metileno-ácido fórmico - metanol (80-17-3 en volúmen). Después del secado, la zona que contiene el 32.999 RP es recuperada por rascadura de la sílice. El polvo obtenido es puesto en suspensión en 40 cm³ de agua y el antibiótico es extraído a un pH de 9,5 por dos veces 20 cm³ de cloroformo. Los extractos orgánicos reunidos son concentrados a presión reducida (5 a 10 mm de mercurio) a 40°C. Du-

rante la concentración se añade 1 cm³ de n.butanol que contiene 6 % (en volumen de ácido clorhídrico 2 N. El concentrado es llevado hasta un volumen de 2 cm³ y después vertido lentamente en 50 cm³ de hexano. El precipitado que se forma es escurrido, lavado y secado. Se obtienen así 4 mg. de clorhidrato de 32.999 RP puro en forma de un polvo microcristalino rojo-anaranjado que funde hacia los 200° C. con descomposición.

Las Figuras 1 a 5 llevan la siguiente leyenda:

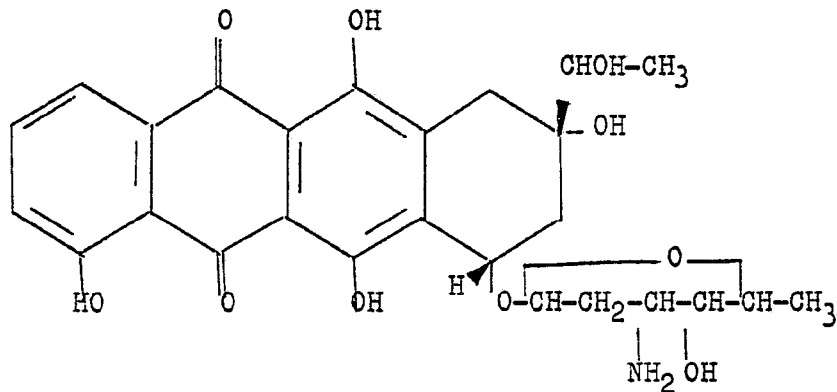
A - Densidad óptica; B - Nanómetro; C - Longitud de ondas (micrones), y D - Número de ondas (cm⁻¹).

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacer se 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.



15.

en forma de base libre o de sal de adición con un ácido, caracterizado porque se cultiva *Streptomyces atroviolaceus* DS 8938 (NRRL 8148) o sus mutantes productores en un medio nutritivo aireado que contiene fuentes de carbono y de nitrógeno asimilables y sales minerales a un pH inicial de 5,8 y 7,8 y a una temperatura de 23 a 33°C. y después se extrae el antibiótico del medio de cultivo, por un disolvente orgánico, purificante por cromatografía o cristalización y, eventualmente se transforma la base en sal de adición con un ácido.

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 32 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 30 SET. 1977

RHONE-POULENC INDUSTRIES

J. M. GOMEZ ACEDO Y ROMBO

Dr. Firmado: J. Gomez Acedo

FIG.1

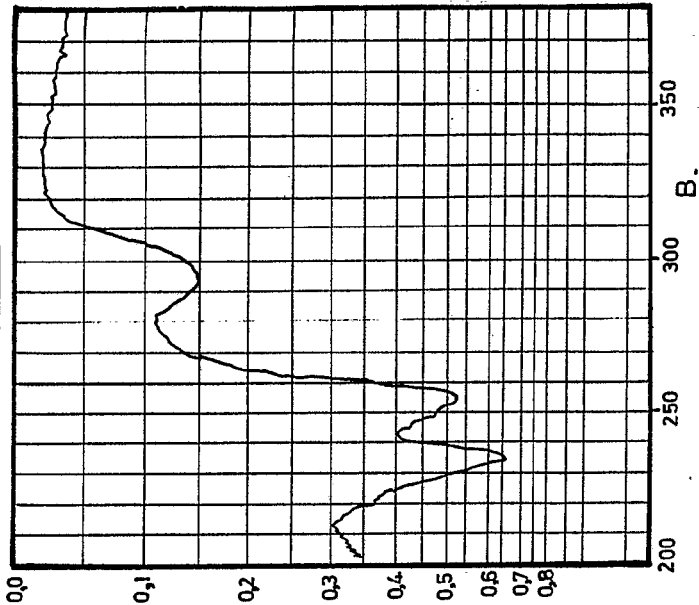


FIG.2

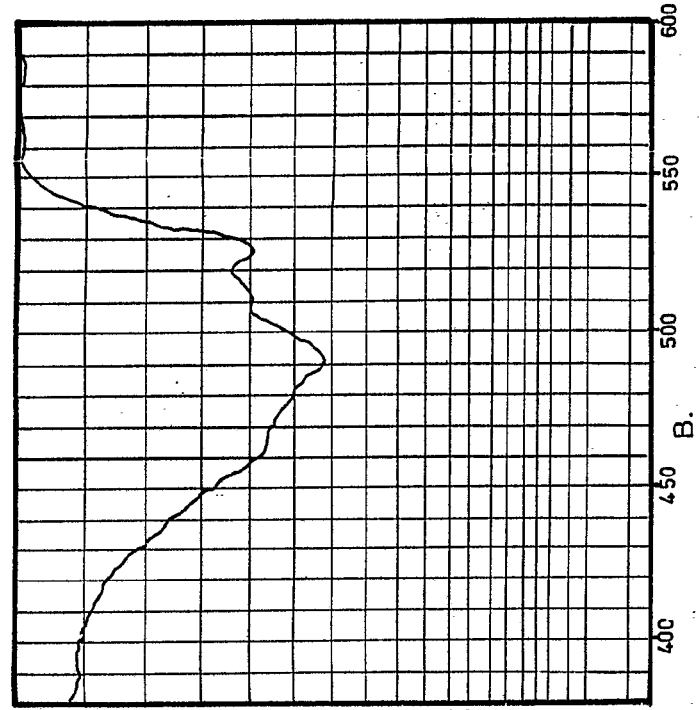
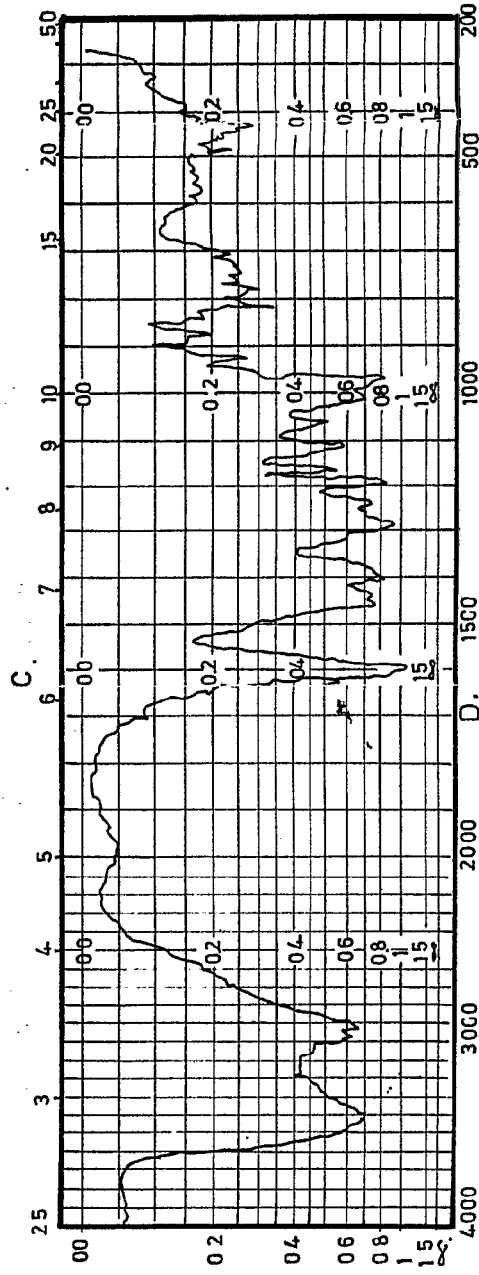


FIG.3



ESCALA VARIABLE

BOBES
L. BUNZEL ADEJO Y MOSES
P. S. Firmado: L. Guals Ferrandiz

L. Guals Ferrandiz

FIG. 1

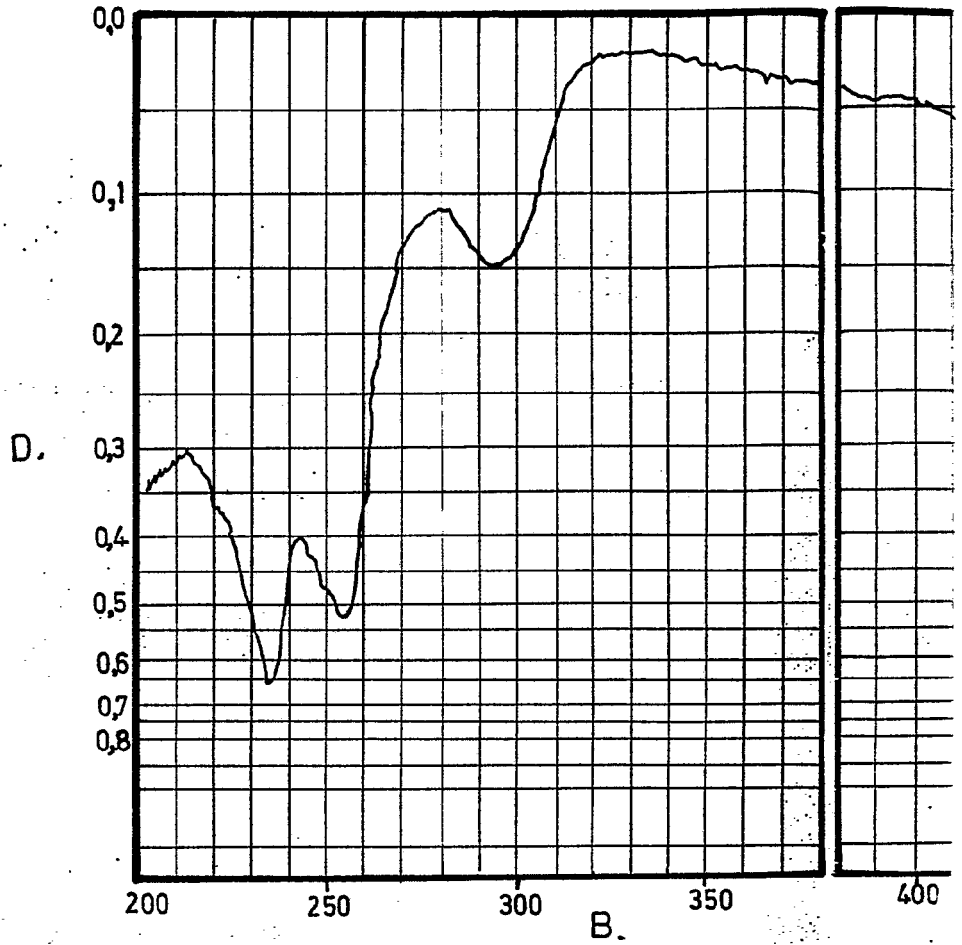


FIG. 3

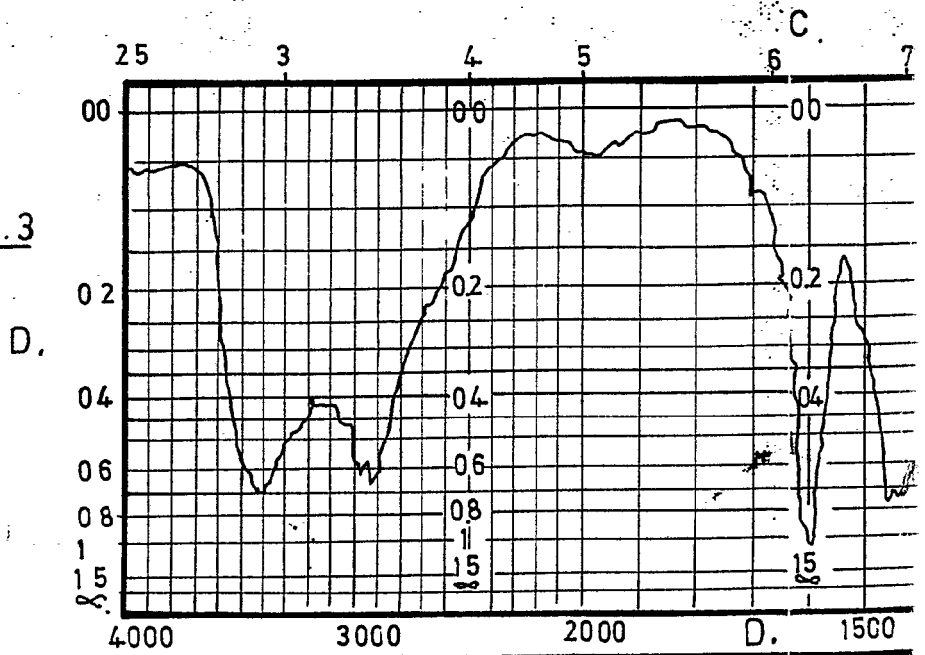
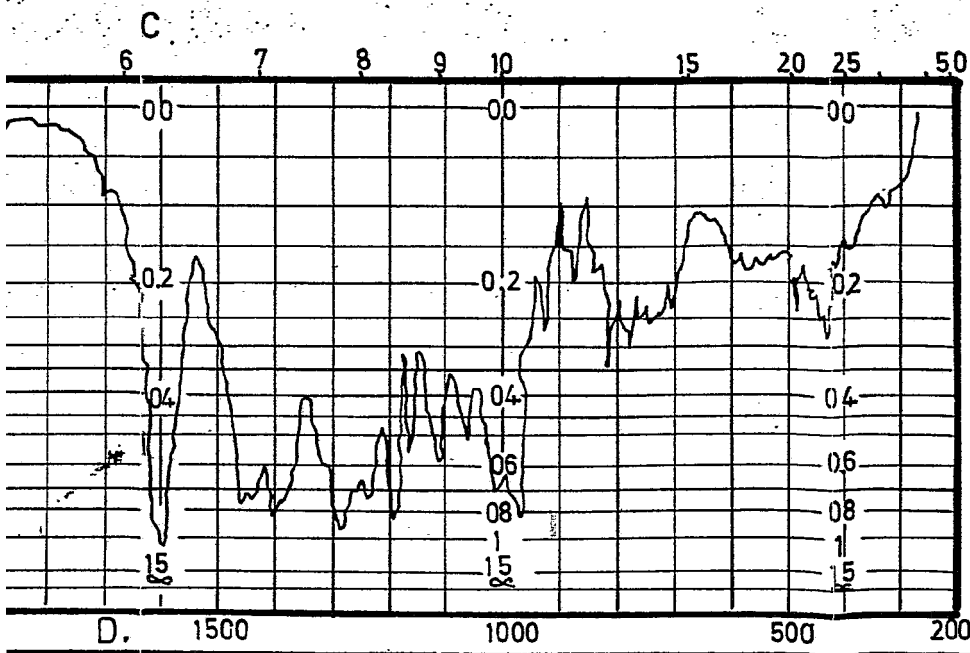
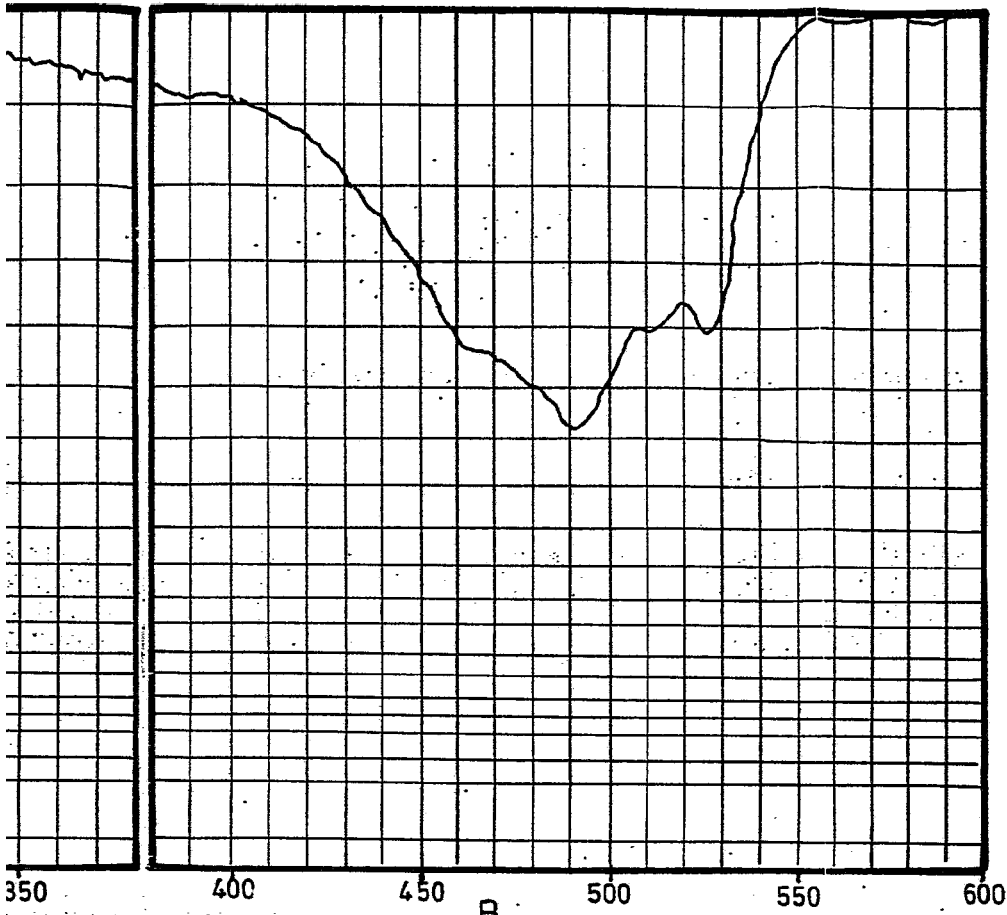


FIG.2



ESCALA
VARIABLE

Madrid 20 de Julio 1978
Z. GOMEZ ACEBO Y MORALES
P. Firmado: L. Gola Fernández

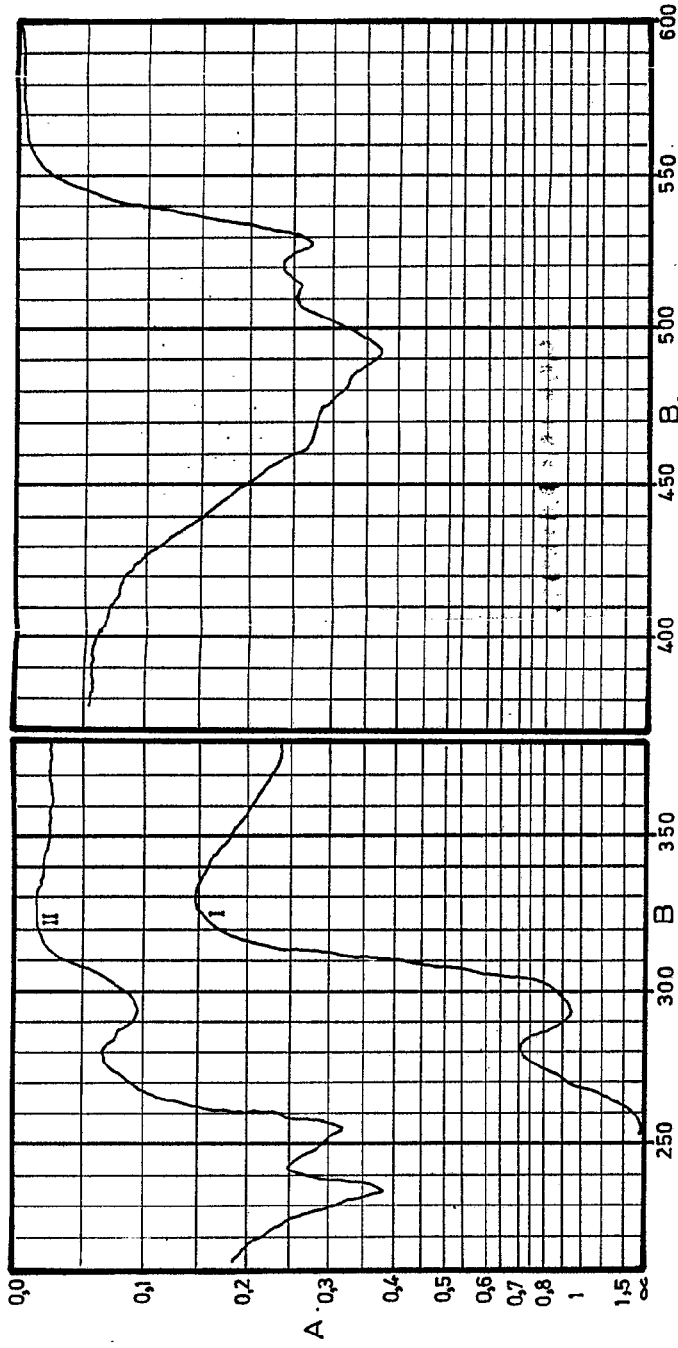


FIG. 5

FIG. 4

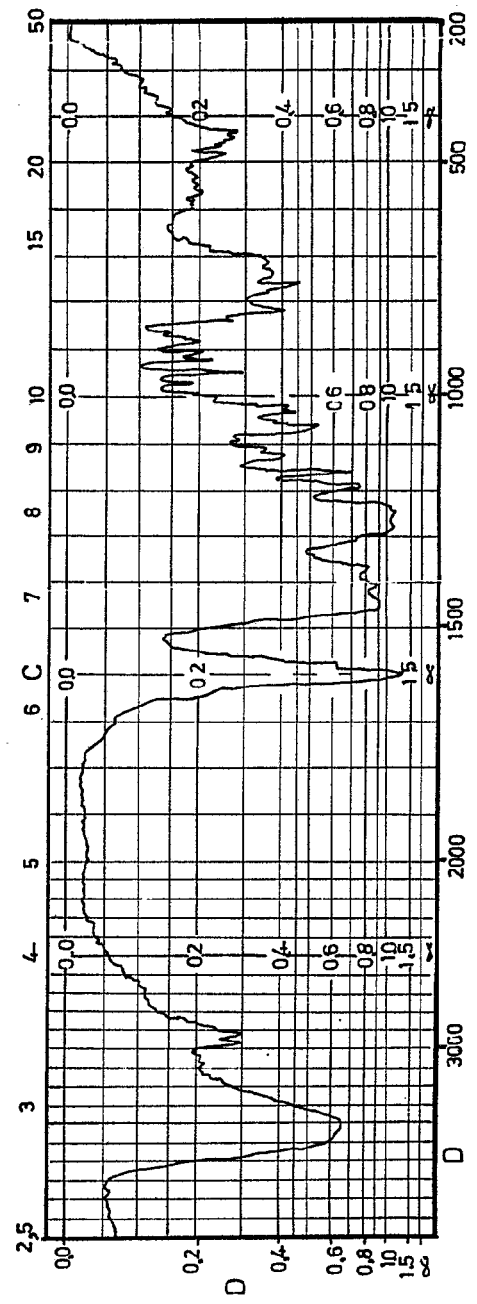


FIG. 6

ESCALA
REPLICABLE

INSTITUTO QUÍMICO DE SÃO CARLOS
 RUA PÉDRO DE TOULON, 400
 13560-970 SÃO CARLOS, SP
 BRASIL
 (51) 4101-1000
 www.iq.usp.br

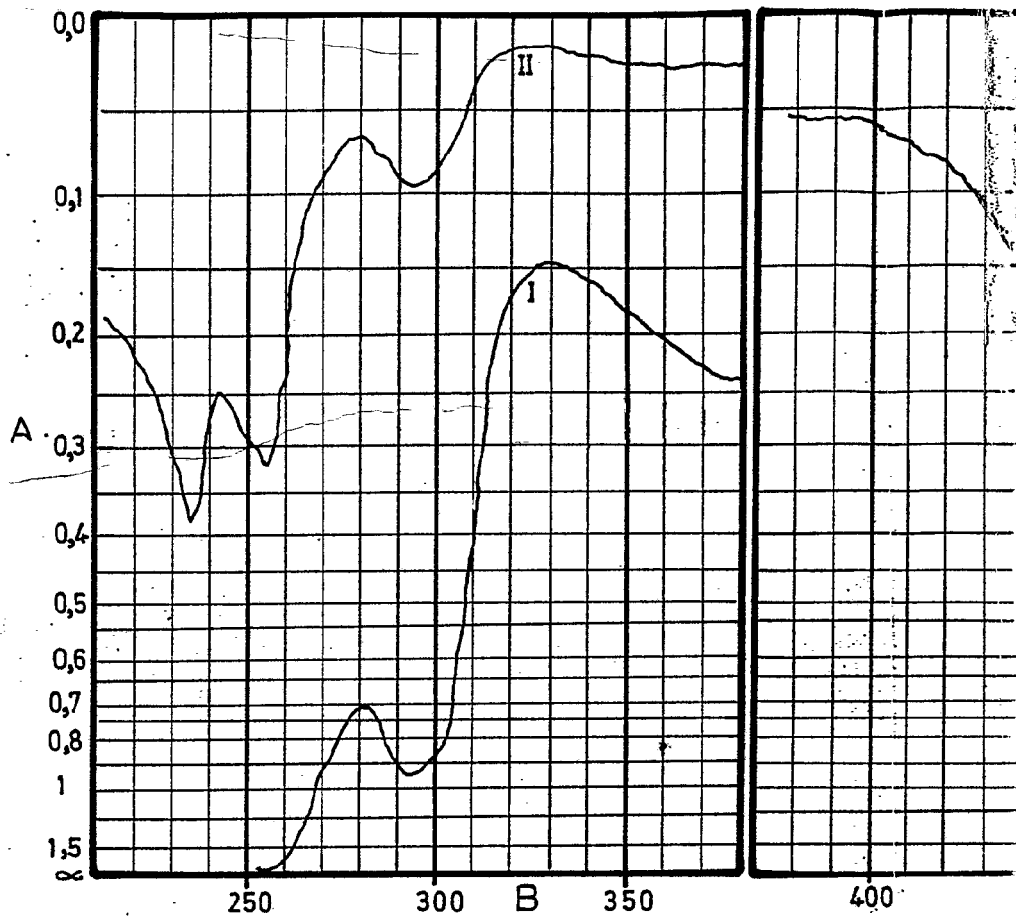


FIG. 4

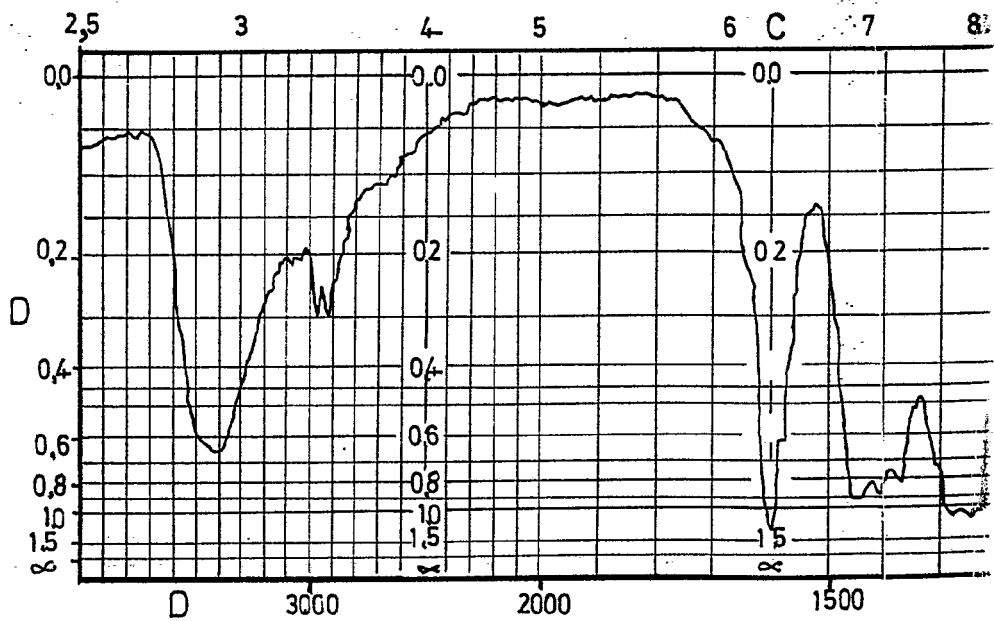


FIG. 6

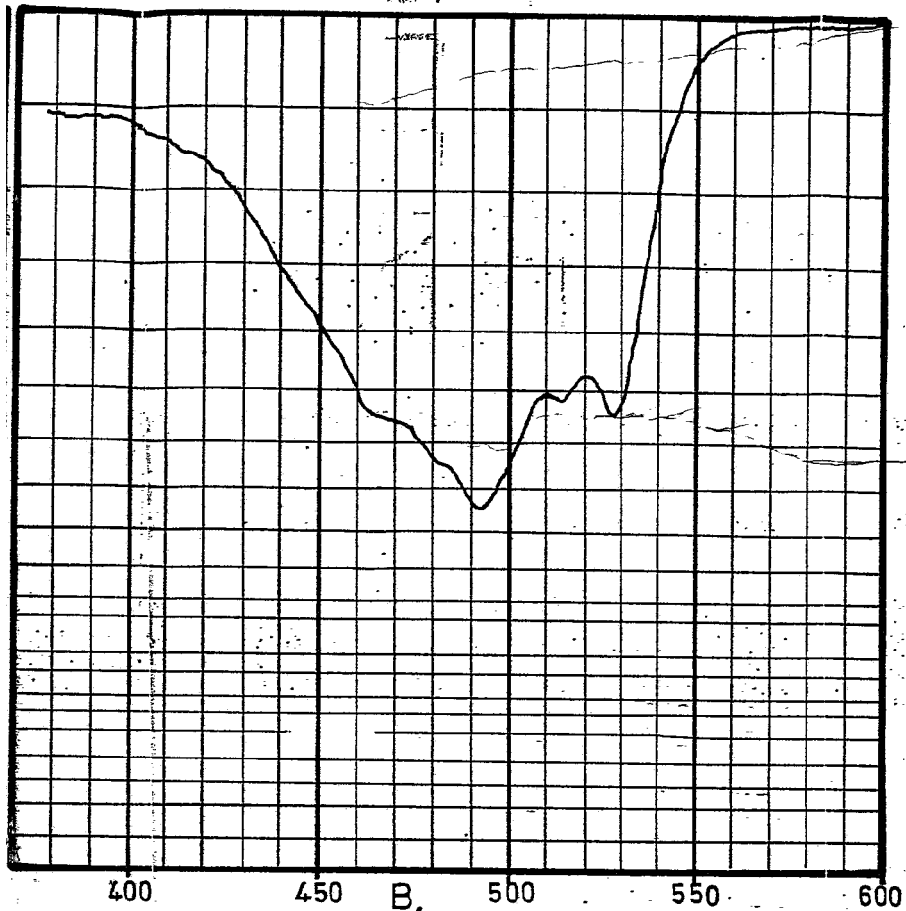
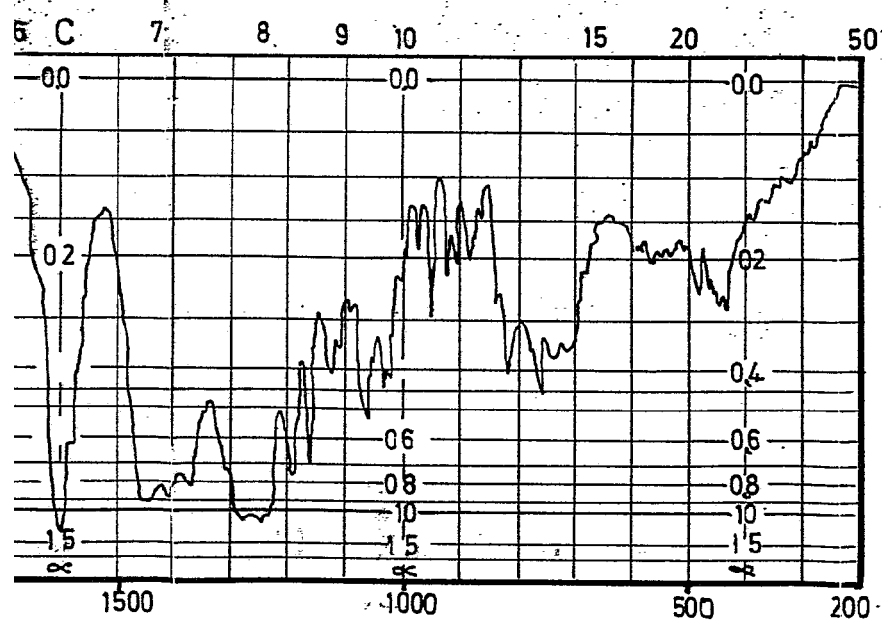


FIG.5



ESCALA
VARIABLE

SE-1971
RUMEZ ACERO Y MOSE
Ej. Ejecutor L. Gallo Fernández
[Signature]