



ESPAÑA

ES	(11) NUMERO	A1
	(21) 459663	
	(22) FECHA DE PRESENTACION	

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES: (31) NUMERO 123256/75	(32) FECHA 15 Octubre 1.975	(33) PAIS Japan
---	--------------------------------	--------------------

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL C07G, A61K	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
--------------------------	--	--

(54) TITULO DE LA INVENCION "UN PROCESO PARA LA PRODUCCION DE NEOTRAMIGINA A Y NEOTRAMIGINA B"

(71) SOLICITANTE (S) La Fundación establecida de acuerdo con las Leyes del Japón: ZAIDAN HOJIN BISEIBUTSU KAGAKU KENKYU KAI

DOMICILIO DEL SOLICITANTE No. 14-23, 3-chome, Kamiyoseki, Shinagawa-ku - TOKYO, Japón.

(72) INVENTOR (ES) 1.- Hamuro UMEZAWA 2.- Tomio TAKEUCHI 3.- Masa HAMADA 4.- Shinichi KONDO 5.- Masaki ISHIZUKA 6.- Hiroshi NAGANAWA (Todos de nacionalidad japonesa)
--

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE D. Francisco GARCIA CABRERIZO

LINEA 4 MONESIOS UTILICISE COMO PRIMERA PAGINA DE LA MEMORIA

CONCEDIDA

"UN PROCESO PARA LA PRODUCCION DE NEOTRAMICINA A Y NEOTRAMICINA B".

Esta invención se refiere a dos nuevos antibióticos que muestran cada uno una alta actividad inhibidora del crecimiento de las células de leucemia y son útiles como agentes anti-tumorales pero presentan baja actividad anti-bacteriana. Más particularmente, esta invención se refiere a los nuevos antibióticos llamados ahora neotramicina A y neotramicina B, respectivamente, y también a un proceso para la producción de estos nuevos antibióticos por cultivo de una cepa de Streptomyces.

5. Esta invención se refiere también a la recuperación y purificación de estas nuevas sustancias antibióticas específicas y a su uso para fines farmacéuticos.

10.

En lo que sigue, por el término neotramicina se entiende de neotramicina A o neotramicina B o sus mezclas a menos que se especifique lo contrario.

15.

Algunos antibióticos que son útiles como agentes anti-tumorales para el tratamiento terapéutico de la leucemia -- son por ejemplo, la daunomicina, adriamicina, etc. Con vistas a obtener otros nuevos agentes anti-tumorales del tipo - antibiótico, recogimos varias muestras de tierra, aislamos los micro-organismos de tales muestras de tierra e investigamos los productos metabólicos producidos por el cultivo aerobio de los micro-organismos aislados. Aislamos un nuevo micro-organismo de una muestra de tierra recogida en los campos de Biseibutsu Kagaku Kenkyu-sho en Shinagawa-ku, Tokio, Japón, y hemos designado este micro-organismo recientemente aislado como cepa MC916-04. Se ha confirmado que esta cepa MC916-04 pertenece al género Streptomyces. Hemos descubierto ahora que se produce y acumula dos nuevos antibióticos que tienen una

20.

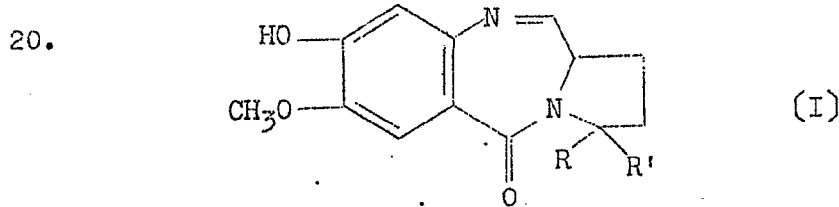
25.

30.

baja actividad antibacteriana pero alta actividad inhibidora del crecimiento de las células de leucemia L-1210 en los ratones y del crecimiento de cierta clase de células tumorales en el caldo de cultivo de la cepa MC916-C4. Hemos conseguido aislar ahora estos nuevos antibióticos del caldo de cultivo y los mismos han sido designados por neotramicina A y neotramicina B respectivamente.

Un objeto de esta invención es proporcionar nuevas sustancias que sean útiles como agentes anti-tumorales. Otro objeto de esta invención es proporcionar la neotramicina A y neotramicina B, bien sea solas o bien mezcladas como nuevos y útiles agentes anti-tumorales. Otro objeto de esta invención es proporcionar un proceso para la preparación de la neotramicina A y neotramicina B por cultivo de la cepa MC916-C4. Otros objetos de esta invención resultarán evidentes con las descripciones que siguen.

De acuerdo con un aspecto de esta invención se proporciona como nueva sustancia la neotramicina de la fórmula:

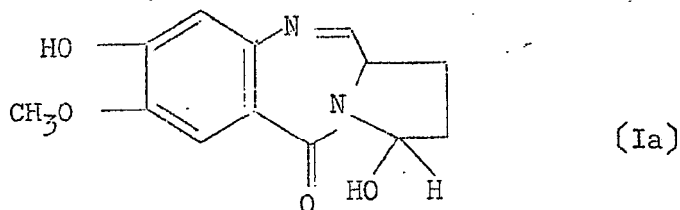


25. en la que R y R' son cada uno hidrógeno o hidroxilo, con tal que un par de R y R' forme un par de hidroxilo e hidrógeno o un par de hidrógeno e hidroxilo, y una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

La neotramicina de la fórmula que precede incluye:

30. (i) La neotramicina A de la fórmula:

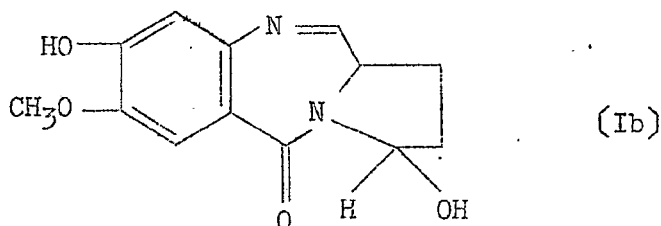
5.



y una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, así como -

(ii) la neotramicina B de la fórmula:

10.



15.

y una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

Un ejemplo apropiado de las sales farmacéuticamen--
te aceptables de neotramicina incluye las sales metálicas no
tóxicas tales como de sodio, potasio, calcio y aluminio, la
20. sal amónica y las sales amónicas sustituidas, por ejemplo las
sales de aminas no tóxicas tales como las trialquilaminas in-
cluyendo la trietilamina, procaína, dibencilamina, N-bencil-
beta-fenetilamina, 1-efenamina, N,N'-dibenciletildiamina,
deshidroabietilamina, N,N'-bis-deshidroabietildiamina, - -
25. N-(inferior)-alquil-piperidina, por ejemplo N-etilpiperidina,
y otras aminas que han sido usadas para formar sales con ben-
cilpenicilina.

Esta invención abarca las sustancias llamadas neo-
tramicina A y neotramicina B, bien sea solas o bien mezcladas,
30. que pueden estar presentes bajo forma de un producto sólido -

purificado, en forma de ácido libre y en forma de una sal del mismo con un metal o amina orgánica. Se ha obtenido la neotramicina A bajo forma de polvo incoloro que no tiene punto de fusión definido, funde gradualmente alrededor de los 105°C y se descompone a 132-147°C con espumación y que muestra una actividad óptica específica $[\alpha]_D^{26} = +272^\circ$ (c 0,52, dioxano).

El análisis elemental de la neotramicina A es como sigue:

Hallado: C 57,46, H 5,76, N 9,84, O 26,94%

Calculado para $C_{13}H_{14}N_2O_4 \cdot 1/2 H_2O$: C 57,56, H 5,57, N 10,33,

10. O 26,54%

La neotramicina A presenta un peso molecular comprendido entre 250 y 300 medido por el método Barger-Akiya. Por los resultados del análisis elemental y la determinación del peso molecular, es probable que la neotramicina A tenga la fórmula empírica

15. $C_{13}H_{14}N_2O_4 \cdot 1/2 H_2O$. Esta fórmula ha sido confirmada por espectrometría de masa de alta resolución (Hallado: m/e 262,0934,

Peso molecular calculado para $C_{13}H_{14}N_2O_4 = 262,0952$). El espectro de absorción ultravioleta de la neotramicina A en una solución alcalina muestra una desviación hacia la longitud de

20. onda más larga como se muestra en la figura 3. Según se ha mostrado en la Tabla I, es espectro NMR de la neotramicina A muestra la presencia de 14 protones.

La neotramicina B es muy similar en sus propiedades a la neotramicina A y ha sido obtenida en forma de polvo in-

25. coloro que no tiene punto de fusión definido, comienza a descomponerse a 144°C con espumación y se funde completamente a 151°C y que presenta una actividad óptica específica $[\alpha]_D^{26} =$

+314° (c 0,48, dioxano). El análisis elemental de la neotramicina B es como sigue:

30. Hallado: C 57,00, H 5,58, N 9,75, O 27,67%

Calculado para $C_{13}H_{14}N_2O_4 \cdot 1/2 H_2O$: C 57,56, H 5,57, N 10,33,
O 26,54%

- Por el resultado del análisis elemental y la determinación del peso molecular, es probable que la neotramicina B tenga simi-
5. larmente la fórmula empírica $C_{13}H_{14}N_2O_4 \cdot 1/2 H_2O$. Esta fórmula empírica ha sido confirmada por espectrometría de masa de alta resolución (Hallado: m/e 262,0939, Peso molecular calculado para $C_{13}H_{14}N_2O_4$, 262,0952). El espectro de absorción ultravioleta de la neotramicina B en una solución alcalina presenta una desviación hacia la longitud de onda más larga, según
10. se muestra en la figura 4. Según se muestra en la Tabla I, -- el espectro NMR de la neotramicina B muestra la presencia de 14 protones, de manera similar a la neotramicina A. Las neotramicinas A y B son estables durante un período de aproximada--
15. mente un mes o más cuando son almacenadas en forma de polvo sólido en un desecador de cristal marrón a 5°C.

- Pero, las neotramicinas A y B son inestables en etanol acuoso al 50% de un pH de 2,5 y sus actividades se reducen al 25 y 22% respectivamente, a temperatura ambiente durante -
20. 16 horas. En etanol acuoso al 50% con un pH de 6,5 o de 8,0 a temperatura ambiente durante 16 horas, se conserva el 80-90% de actividad en la neotramicina A y el 70-80% de actividad en la neotramicina B, pero se muestra una conversión de equilibri--
25. o de neotramicina A en B o de B en A por análisis cromatográfico de capa delgada.

- La neotramicina A y la neotramicina B son similares entre sí porque tienen una actividad inhibidora de crecimiento de las células de leucemia L-1210 en los ratones y una débil actividad anti-bacteriana; porque tienen una función ácida en su molécula; porque son solubles en metanol, etanol, pro
- 30.

- panol, cloroformo y dioxano y ligeramente solubles en agua pero raramente solubles o sustancialmente insolubles en éter -- etílico y n-hexano; porque son positivas a la reacción Rydon-Smith y a la reacción de tetrazolio rojo, débilmente positivas a la reacción de ninhidrina pero negativas a la reacción Ehrlich y a la reacción Sakaguchi; porque dan esencialmente sólo carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno por análisis elemental de las mismas; y porque muestran una movilidad relativa de dicha sustancia a la alanina (1,0) siendo de 0,17 por electroforesis de papel filtro de alto voltaje (3.500 voltios, 35 minutos) usando ácido fórmico-ácido acético-agua (25:75:900 en volumen) como solución de electrolito.
- 5.
- 10.

- La neotramicina A se caracteriza también por tener un espectro de absorción infrarroja modulizada en bromuro potásico correspondiente al mostrado en la figura 1 de los dibujos anexos y se caracteriza por tener picos de absorción a 3450, 2950, 1630 (hombro), 1600, 1510, 1460, 1440, 1410, 1280, 1200, 1180, 1120, 1080, 1010, 870, 790, y 760 cm^{-1} ; teniendo espectros de absorción ultravioleta correspondientes a los representados en la figura 3 de los dibujos anexos caracterizados por tener máximas de absorción a 223 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 855), 240 nm (hombro), 265 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 290) y 318 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 156) en una solución de la misma en agua-metanol al 10%, por máximas de absorción a 223 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 885), 240 nm (hombro) 265 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 290) y 320 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 139) en una solución de la misma en N/10 HCl-metanol (1:9) y máximas de absorción a 228 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 635), 254 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 566), 291 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 422) y 324 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 412) en una solución de la misma en N/10 NaOH-metanol (1:9); y dando un valor R_f de 0,57 en cromatografía de capa delgada sobre gel de sílice con cloroformo-metanol (10:1 en volumen) como disol-
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

vente de revelado.

- La neotramicina B se caracteriza además por tener -- un espectro de absorción infrarroja modulizada en bromuro potásico correspondiente al mostrado en la figura 2 de los dibujos anexos y se caracteriza por tener picos de absorción a 3400, 2960, 1630 (hombro), 1600, 1510, 1440, 1400, 1280, 1200, 1120, 1080, 1010, 990, 940, 870, 790 y 760 cm^{-1} ; teniendo espectros de absorción ultravioleta correspondientes a los mostrados en la figura 4 de los dibujos anexos y se caracteriza --
5. por tener máximas de absorción a 224 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 935), 240 nm (hombro), 265 nm (hombro) y 318 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 167) en una solución de la misma en agua-metanol al 10% (1:9), por máximas de absorción a 224 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 1000), 240 nm (Hombro), 265 nm (hombro) y 320 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 156) en una solución de la misma en N/10 HCl-metanol (1:9) y por máximas de absorción a 228 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 800), -
10. 254 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 725), 291 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 456) y 324 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 466) en una solución de la misma en N/10 NaOH-metanol (1:9); y dando un valor R_f de 0,50 en cromatografía de capa delgada sobre -- gel de sílice con cloroformo-metanol (10:1 en volumen) como -
15. disolvente de revelado.

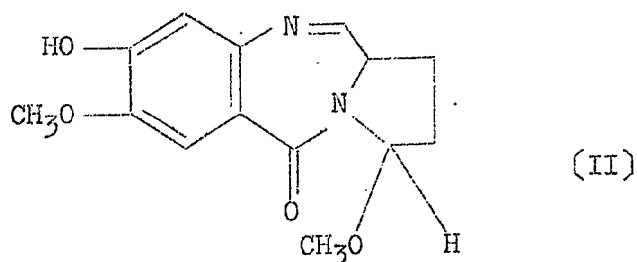
- La neotramicina A o B se convierte fácilmente en una mezcla de metilneotramicina A (R_f 0,71 sobre cromatograma en capa delgada de gel de sílice con cloroformo-metanol (10:1 en volumen)) y metilneotramicina B (R_f 0,61 sobre el mismo -
25. cromatograma en capa delgada de gel de sílice) en metanol anhidro a temperatura ambiente durante 16 horas. Se cristaliza la metilneotramicina A a partir de una mezcla de acetona y benceno dando microcristales incoloros con un punto de fusión de - 137-140°C (descomposición); $[\alpha]_D^{26} + 640^\circ$ (c, 0,24, dioxano), MS, m/e 276, 1089 (Peso molecular calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$, -
- 30.

276,1108). Se obtiene la metilneotramicina B en forma de polvo incoloro, con un punto de fusión de 61-69°C (descomposición); $\lambda_{\text{D}}^{26} + 778\mu$ (c, 0,22, dioxano), MS, m/e 276,1071. Los espectros UV de las metilneotramicinas son similares a los de

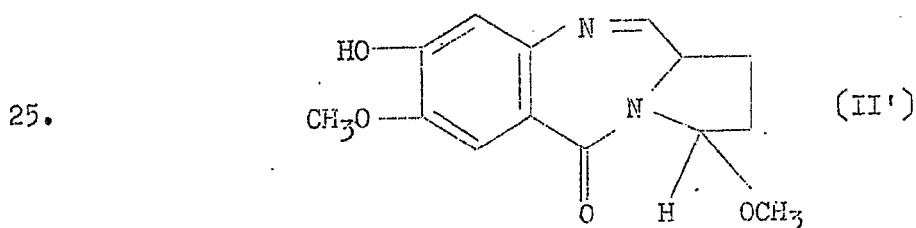
5. las neotramicinas y las desviaciones químicas PMR aparecen en la Tabla I. La hidrólisis suave de metilneotramicina A o B en 0,01N HCl-dioxano (1:1 en volumen) a temperatura ambiente durante una hora seguida por la cromatografía de columna sobre gel de sílice da las neotramicinas A y B con buen rendimiento.

10. En consecuencia, la metilneotramicina A puede ser útil como material de partida para la preparación de neotramicina A por hidrólisis suave, mientras que la metilneotramicina B puede ser útil como material de partida para la preparación de neotramicina B. La metilneotramicina A tiene la fórmula

15. la:



la metilneotramicina B tiene la fórmula:



30. Según estos datos, las neotramicinas A y B son isómeros que son convertibles entre sí y pertenecen al grupo antramicina -

de antibióticos que poseen una estructura benzodiazepina. Se distinguen de la antramicina, dextrocrisina y sibiromicina por sus espectros UV. Los espectros UV de la tomamicina y de las neotramicinas son muy similares pero son diferentes en sus --

5. fórmulas moleculares y otros espectros. _____

10.

15.

20.

25.

30.

Continúa Tabla 1 .../..

TABLA I

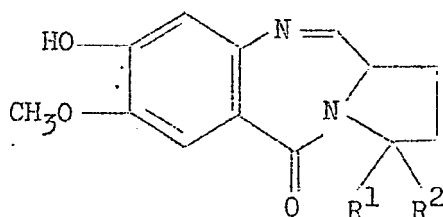
Desviaciones químicas PMR de las neotramicinas y sus derivados metílicos

<u>Protón</u>	<u>Neotramicina A</u>	<u>Neotramicina B</u>	<u>Metilneotramicina A</u>	<u>Metilneotramicina B</u>
CH ₂ x2	1.7-2.5	1.7-2.5	1.8-2.6	1.8-2.6
OCH ₃			3.28 s	3.44 s
CH	3.80 m	3.78 m	3.72 m	3.80 dd
OCH ₃ arom.	3.90 s	3.88 s	3.90 s	3.88 s
OH	5.00 d	5.10 d		
OH	5.69 dd	5.78 m	5.56 d	5.35 dd
H arom.	6.70 s	6.69 s	6.75 s	6.64 s
H arom.	7.43 s	7.40 s	7.48 s	7.36 s
OH	7.62 d	7.70 d	7.73 d	7.54 d
fenol OH	8.00 s	7.98 s	8.04 s	7.94 s

Se midieron las desviaciones químicas, δ (ppm) en deuterodioxano usando TMS como referencia interna.

Puede someterse las siguientes estructuras para representar generalmente a la neotramicina A ($R^1 = OH$, $R^2 = H$), neotramicina B ($R^1 = H$, $R^2 = OH$), metilneotramicina A ($R^1 = OCH_3$, $R^2 = H$) y metilneotramicina B ($R^1 = H$, $R^2 = OCH_3$).

5.



10.

Con referencia a los dibujos anexos:

La figura 1 muestra una curva del espectro de absorción infrarroja de una muestra auténticamente pura de neotramicina A nodulizada en bromuro potásico.

15.

La figura 2 muestra una curva del espectro de absorción infrarroja de una muestra auténticamente pura de neotramicina B nodulizada en bromuro potásico.

La figura 3 muestra curvas del espectro de absorción ultravioleta de una muestra auténticamente pura de neotramicina A disuelta en agua-metanol al 10%, en N/10 NaOH-metanol (1:9) y en N/10 HCl-metanol (1:9), respectivamente.

La figura 4 muestra curvas del espectro de absorción ultravioleta de una muestra auténticamente pura de neotramicina B disuelta en agua-metanol al 10%, en N/10 NaOH-metanol (1:9) y en N/10 HCl-metanol (1:9), respectivamente.

La neotramicina A y la neotramicina B de esta invención tienen baja actividad antibacteriana y fungicida como resultará evidente por los espectros anti-bacterianos de estas sustancias mostrados en la Tabla 2 que sigue. Las concentraciones inhibidoras mínimas (mcg./ml.) de la neotramicina A y B a varias

bacterias han sido determinadas sobre placas de agar nutriente que fueron incubadas a una temperatura de 37°C durante 17 horas. Las concentraciones inhibitoras mínimas a varios hongos han sido determinadas sobre placas de agar nutriente con 5. teniendo 1% de glucosa después de la incubación a 27°C durante 40 horas.

TABLA 2

Organismos del ensayo	Concentraciones inhibitoras mínimas (Mcg./ml.)	
	Neotramicina A	Neotramicina B
10. <u>Staphylococcus aureus</u> Smith	50	100
<u>Staphylococcus aureus</u> 209P	>100	>100
<u>Klebsiella pneumoniae</u> PCI 602	50	100
<u>Escherichia coli</u> NIHJ	100	100
15. <u>Escherichia coli</u> K-12	100	100
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> No.12	>100	>100
<u>Bacillus subtilis</u> PCI 219	100	>100
<u>Escherichia coli</u> W677	50	100
<u>Escherichia coli</u> JR66/W677	100	>100
20. <u>Aeromonas salmonicida</u> ATCC 14174	25	50
<u>Vibrio anguillarum</u> NCBM 6	50	100
<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	50	>100
<u>Candida albicans</u> 3147	>100	>100
<u>Aspergillus niger</u>	100	>100
25. <u>Piricularia oryzae</u>	50	>100
<u>Xanthomonas citri</u>	>100	>100
<u>Xanthomonas oryzae</u>	50	100

Según ha quedado expuesto anteriormente, las neotramicinas A y B de esta invención tienen una alta actividad inhibitora del crecimiento de las células de leucemia y

- se espera que sean útiles como agente para el tratamiento terapéutico de un animal vivo afectado de leucemia. Los efectos quimioterapéuticos de las neotramicinas A y B contra la leucemina L-1210 en los ratones fueron investigados de la siguiente manera.
5. Se inyectaron por vía intraperitoneal células de leucemina L-1210 (10^5 células/ratón) a ratones de raza CDF 1 que pesaban 19-22 gramos. Para el tratamiento de la leucemia así infectada, se comenzó inmediatamente la administración de neotramicinas A y B después de la inoculación del tumor.
10. Los ratones leucémicos fueron usados en grupos de cuatro ratones cada uno para cada dosis. Cuando fueron dosificados - 300, 150, 75, 37,5 y 18,7 mcg./ratón/día de las neotramicinas A y B por inyección intraperitoneal una vez al día durante 10 días, se observaron los efectos altamente favorables sobre la
15. relación de supervivencia (%) como resultará evidente por los resultados de la Tabla 3 que sigue.

TABLA 3

Media de la relación de supervivencia (%)

20.	<u>Dosificación</u> <u>(mcg./ratón/día)</u>	<u>Neotramicina A</u>	<u>Neotramicina B</u>
	300	muerte (dosis tóxica)	muerte (dosis tóxica)
	150	200	192
	75	167	154
	37,5	154	128
25.	18,7	122	103

- Se calcula la relación de supervivencia (%) dividiendo el número de días de supervivencia de los animales tratados (por ejemplo 10) por el número de días de supervivencia de los animales de control (por ejemplo 8) y multiplicando por 100, por
30. ejemplo $10/8 \times 100 = 125$. Las relaciones superiores a 125 son

consideradas generalmente como importantes.

Se observó también una prolongación efectiva en la relación de supervivencia (%) de los ratones inoculados con leucemia L-1210 por tratamiento con metilneotramicina A o metilneotramicina B, según se muestra en la Tabla 4 que sigue.

TABLA 4

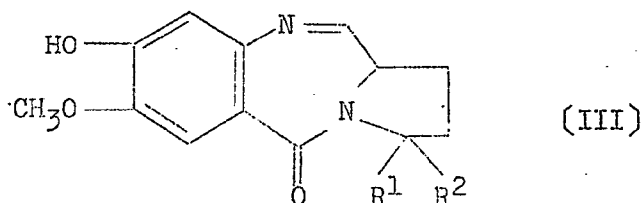
Media de la proporción de supervivencia (%)

	<u>Dosificación</u> <u>(mcg/ratón/día)</u>	<u>Metilneotramicina</u> <u>A</u>	<u>Metilneotramicina</u> <u>B</u>
	200	Tóxica	Tóxica
10.	100	128	154
	50	103	147
	25	---	115
	12,5	---	103

Las neotramicinas A y B de esta invención son de baja toxicidad para los animales y el hombre, según se pone de manifiesto por el hecho de que las neotramicinas A y B muestran valores LD_{50} de 20-30 mg/kg y 20-30 mg/kg, respectivamente, en los ratones, cuando se inyecta una solución de 0,25-0,5% en peso de neotramicina A o B en dimetilsulfóxido-agua al 10% por vía intraperitoneal a los ratones con el fin de evaluar la toxicidad aguda de estas sustancias.

Como resulta evidente de lo que precede, las metilneotramicinas A y B son también útiles como agente antitumoral. De acuerdo con un segundo aspecto, más amplio de esta invención se proporciona, por consiguiente un compuesto de la fórmula:

30.



5.

en la que R^1 es hidrógeno, hidroxilo o metoxilo, R^2 es hidrógeno, hidroxilo o metoxilo, con tal que un par de R^1 y R^2 forme un par de hidroxilo e hidrógeno, un par de hidrógeno e hidroxilo, un par de metoxilo e hidrógeno o un par de hidrógeno y metoxilo, y una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

10.

El compuesto de esta fórmula [III] incluye la neotramicina A, neotramicina B, metilneotramicina A y metilneotramicina B así como una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas. La sal farmacéuticamente aceptable del compuesto de la fórmula anterior [III] puede ser la misma que las mencionadas para las neotramicinas A y B anteriormente.

15.

De acuerdo con un tercer aspecto de esta invención, se proporciona un proceso para la producción de neotramicina A y neotramicina B, que consiste en cultivar una cepa productora de neotramicina del género Streptomyces bajo condiciones aerobias en un medio de cultivo apropiado para el mismo conteniendo fuentes de carbono y nitrógeno asimilables durante un período de tiempo suficiente para producir y acumular neotramicina A y neotramicina B en el medio de cultivo, y recuperar una mezcla de la neotramicina A y neotramicina B a partir del cultivo, y separar posteriormente, si es necesario, la mezcla recuperada en la neotramicina A y neotramicina B bajo sus formas aisladas. Para la producción de neotramicina de acuerdo con el proceso de esta invención, puede usarse una cepa del género Streptomyces con tal que esta cepa produzca neotrami-

30.

- cina. Un ejemplo apropiado de la cepa que puede ser empleada en esta invención para la producción de neotramicina es la cepa de Streptomyces MC-16-04 mencionada anteriormente. Esta cepa MC-16-04 fue depositada el 2 de Febrero de 1.974 en un depósito japonés autorizado "Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology". Inage, Chiba-City, Japón, bajo el número de depósito FERM-P 2452. Esta cepa MC916-04 fue depositada también el 15 de Febrero de 1.975 en la American Type Culture Collection, Washington, D.C. EE.UU.
- 5.
10. bajo el número A.T.C.C. 31123.

Las características de cultivo y taxonómicas de la cepa MC916-04 son descritas a continuación.

1.- Morfología microscópica

- La cepa MC916-04 tiene micelios de sustrato ramificados a partir de los cuales se desarrollan hifas aéreas en forma de gancho o espirales abiertas. No se observa ramificaciones en verticilo. Las cadenas de esporas maduras llevan usualmente más de 10 esporas cónicas. Las esporas miden aproximadamente 0,6-0,8 por 1,0-1,2 micras de tamaño y tienen una superficie lisa.
- 15.
- 20.

2.- Características del crecimiento sobre varios medios de cultivo.

- La designación de colores entre corchates [] mencionada a continuación sigue al patrón de colores dado en el "Color Harmony Manual" publicado por Container Corporation of America.
- 25.

- (1) Sobre sucosa-agar de nitrato (incubado a 27°C): El crecimiento de color amarillo pálido a amarillo rojizo [3 pe. ámbar] lleva hifas aéreas delgadas de color gris puzco claro a gris claro. El pigmento soluble está débilmente
- 30.

teñido de amarillo.

5. (2) Sobre glucosa-agar de asparagina (incubado a 27°C): El crecimiento de color naranja amarillo apagado [3 no, ámbar a 4 pe, óxido de naranja] desarrolla hifas aéreas de color gris claro a gris parduzco claro [2 ih, DK gris oscuro]. El pigmento soluble está débilmente teñido de amarillo.

10. (3) Sobre glicerol-agar de asparagina (medio ISP nº 5 incubado a 27°C): El crecimiento de color naranja amarillo oscuro a marrón amarillento [3 pi, marrón dorado] desarrolla hifas aéreas de color gris parduzco [3 ih, gris beige] a gris [5 ih, gris sombra]. Se produce pigmento soluble con matiz de amarillento a marrón amarillento.

15. (4) Sobre sales inorgánicas-agar de almidón (medio ISP nº 4, incubado a 27°C): El crecimiento de color marrón amarillento pálido a marrón amarillento [3 pi, marrón dorado] desarrolla hifas aéreas de color gris parduzco claro [3 fe, gris plata]. El pigmento soluble está teñido de marrón. La cara inversa del crecimiento es de color marrón amarillento oscuro.

20. (5) Sobre agar de tirosina (medio ISP nº 7, incubado a 27°C): El crecimiento de color amarillo oscuro a marrón amarillento [4 pg, color canela oscuro de equipaje] lleva hifas aéreas de color gris parduzco claro. El pigmento soluble está teñido de amarillo oscuro a marrón amarillento.

25. (6) Sobre agar nutriente (incubado a 27°C): El crecimiento es de color marrón amarillento pálido a marrón pálido sin desarrollar hifas aéreas. El pigmento soluble está débilmente teñido de marrón.

30. (7) Sobre extracto de levadura-agar de extracto de malta (medio ISP nº 2, incubado a 27°C): El crecimiento de -

color marrón amarillento [4 pg, color canela oscuro de equipa
je] a naranja amarillo [4 pe, óxido de naranja] desarrolla hi-
fas aéreas de color gris claro [2 fe, gris oscuro] a gris par-
duzco claro [2 ih, gris oscuro]. Se produce pigmento soluble -
5. de color marrón amarillento a marrón. La cara inversa del cre-
cimiento es de color marrón amarillento oscuro.

(8) Sobre agar de harina de avena (medio, ISP nº 3 -
incubado a 27°C): Crecimiento coloreado de amarillo rojizo a
naranja amarillo oscuro [4 pe, óxido de naranja] con hifas --
10. aéreas de color gris claro [5 fe, cenizas] a gris parduzco [3
ih, gris beige]. El pigmento soluble está teñido de amarillo.

(9) Sobre glicerol-agar de nitrato (incubado a 27°C):
El crecimiento de color amarillo pálido a amarillo rojizo [3
pe, ámbar] lleva hifas aéreas ligeramente desarrolladas de -
15. color blanco parduzco a gris parduzco claro. El pigmento so-
luble está débilmente teñido de amarillo.

(10) Sobre agar de almidón (incubado a 27°C): El cre-
cimiento es de color amarillo apagado a marrón amarillento -
[2 pi, marrón mostaza] sin desarrollar hifas aéreas o rara-
20. mente con desarrollo de hifas aéreas blancas. El pigmento so-
luble está débilmente teñido de marrón.

(11) Sobre calcio-agar de malato (incubado a 27°C):
El crecimiento es de color amarillo pálido a aceituna pálido
sin desarrollar hifas aéreas o con ligero desarrollo de hifas
25. aéreas de color blanco. El pigmento soluble está débilmente
teñido de amarillo.

(12) Sobre celulosa (incubado a 27°C): Crecimiento -
incolore sin hifas aéreas. No se produce pigmento soluble.

(13) Sobre medio de gelatina: Sobre medio de gelati-
30. na común (incubado a 20°C). el crecimiento es de incoloro a

5. amarillo apagado sin desarrollar hifas aéreas, y con producción de pigmento soluble de matiz débilmente amarillo. Sobre medio de glucosa-peptona-gelatina (incubado a 27°C), el crecimiento es de color amarillo pálido a amarillo apagado. No se desarrollan inicialmente hifas aéreas pero se producen -- después hifas de color blanco grisáceo. No se observa producción de pigmento soluble.

10. (14) Sobre leche desnatada (incubado a 37°C): El crecimiento es de color amarillo pálido a naranja pálido sin -- desarrollar hifas aéreas. El pigmento soluble está teñido -- muy débilmente de naranja.

3.- Propiedades fisiológicas

(1) Temperatura para el crecimiento

15. Se examinó el crecimiento sobre agar de glucosa y -- asparagina a 20°C, 24°C, 27°C, 30°C, 37°C y 50°C. La cepa - MC916-C4 creció a todas las temperaturas ensayadas, excepto a 50°C. La temperatura óptima para un buen crecimiento estaba comprendida según se observó en la proximidad de los 30°C.

(2) Licuefacción de la gelatina

20. El medio de gelatina común (15%) comenzó a licuarse -- desde el quinto día de la incubación a 20°C. El grado de licuefacción fue medio. La gelatina (15%) en el medio de glucosa-peptona-gelatina comenzó a licuarse desde el segundo día -- de incubación cuando se incubó a 27°C y el grado de licuefacción fue entonces de medio a fuerte.

(3) Hidrólisis del almidón

30. Se hidrolizó el almidón en el medio de sales inorgánicas-almidón-agar y en el medio de almidón-agar comenzando el 5º día de incubación cuando se incubó a 27°C. El grado de hidrólisis fue de medio a fuerte.

(4) Coagulación y peptonización de la leche desnatada.

5. Cuando se incubó a 37°C., la coagulación de la leche desnatada comenzó al 4º día de incubación y se observó la peptonización al 5º día de incubación una vez completada la coagulación. Los grados de coagulación y peptonización fueron de medio a fuerte.

(5) Formación de pigmentos melanoides

10. No se observó pigmentación en el caldo de triptón-extracto de levadura (medio ISP nº 1), ni en el de peptona-extracto de levadura agar de hierro (medio ISP nº 6), ni en el de agar de tirosina (medio ISP nº 7), cuando se incubaron a 27°C.

15. (6) Utilización de fuentes de carbono para el crecimiento.

Se ensayó la utilización de los siguientes hidratos de carbono en el medio de agar Pridham-Gottlieb (medio ISP nº 9) incubado a 27°C.

20. Se utilizaron glucosa y L-ramnosa para el crecimiento. No se utilizó L-arabinosa, D-fructosa, sucrosa, inositol y D-mannitol. La utilización de D-xilosa fue dudosa. A veces se utilizó rafinosa pero otras veces no fue utilizada.

(7) Liquefacción del malato cálcico.

25. El malato cálcico del medio de cultivo de malato cálcico-agar se licuó alrededor del cultivo comenzando en el 9º día de incubación, cuando se incubó a 27°C. El grado de liquefacción fue medio a fuerte.

(8) Reducción del nitrato

30. Se observó reducción del nitrato en solución de peptona acuosa conteniendo 1,0% de nitrato sódico (medio ISP nº

8), cuando se incubó a 27°C.

Resumiendo las características antes mencionadas de la cepa MC916-C4, se observa que esta cepa pertenece al género Streptomyces y que las hifas aéreas forman espirales abiertas pero no desarrollan verticilo. La superficie de la espora es lisa en observación microscópica. Sobre varios medios, el crecimiento tiene un color de naranja amarillo a marrón amarillento con desarrollo de hifas aéreas de color gris parduzco claro a gris parduzco. El pigmento soluble está teñido de amarillo a marrón con marrón amarillento. No se produce pigmento melanoide. La proteólisis e hidrólisis del almidón son de grado medio a fuerte.

Sobre la base de las propiedades mencionadas anteriormente, la cepa MC916-C4 se compara con las especies análogas conocidas de Streptomyces con referencia a las descripciones del International Streptomyces Project (ISP). Se comprueba que la cepa MC916-C4 se parece a la Streptomyces naraensis (Véase el "International Journal Of Systematic Bacteriology" Vol. 22, página 323 (1972)). No obstante, se observa que la cepa MC916-C4 es diferente de la cepa Streptomyces naraensis ISP 5508 con respecto a su utilización de fuentes de carbono. La S. naraensis produce cicloheximida, de manera similar a la cepa MC916-C4. Igualmente, entre las cepas productoras de cicloheximida, se observa que las cepas del Grupo C -- que son análogas a la Streptomyces griseolus según es indicado por T. Furumai y otros en un artículo titulado "Sobre los microorganismos productores de cicloheximida" [Véase el "Journal Of Antibiotics" Ser. B. Vol. 17 nº 4, página 181 (1964)] son muy similares a la cepa MC916-C4.

La cepa MC916-C4 coincide perfectamente con las ce--

pas anteriores del grupo C en muchos aspectos, aunque la cepa MC916-C4 no ha sido ensayada para comprobar si tiene las propiedades de hemolisis, licuefacción del suero y utilización de galactosa y lactosa que fueron mostradas por las cepas del grupo C. No obstante, estas cepas del grupo C no están disponibles en la actualidad, ya que han muerto. En esta situación se efectúa ahora la comparación de la cepa MC916-C4 con la Streptomyces sp.IFO 3300 que es conocida por su producción de fermicidina, un antibiótico análogo a la cicloheximida, y que es reseñado en el artículo antes citado por T.Furumai y otros como perfectamente coincidente con dichas cepas del grupo C. Los resultados de la comparación aparecen en la Tabla 5 que sigue, con referencia a las descripciones del "Journal of Antibiotics".

15.

20.

25.

30.

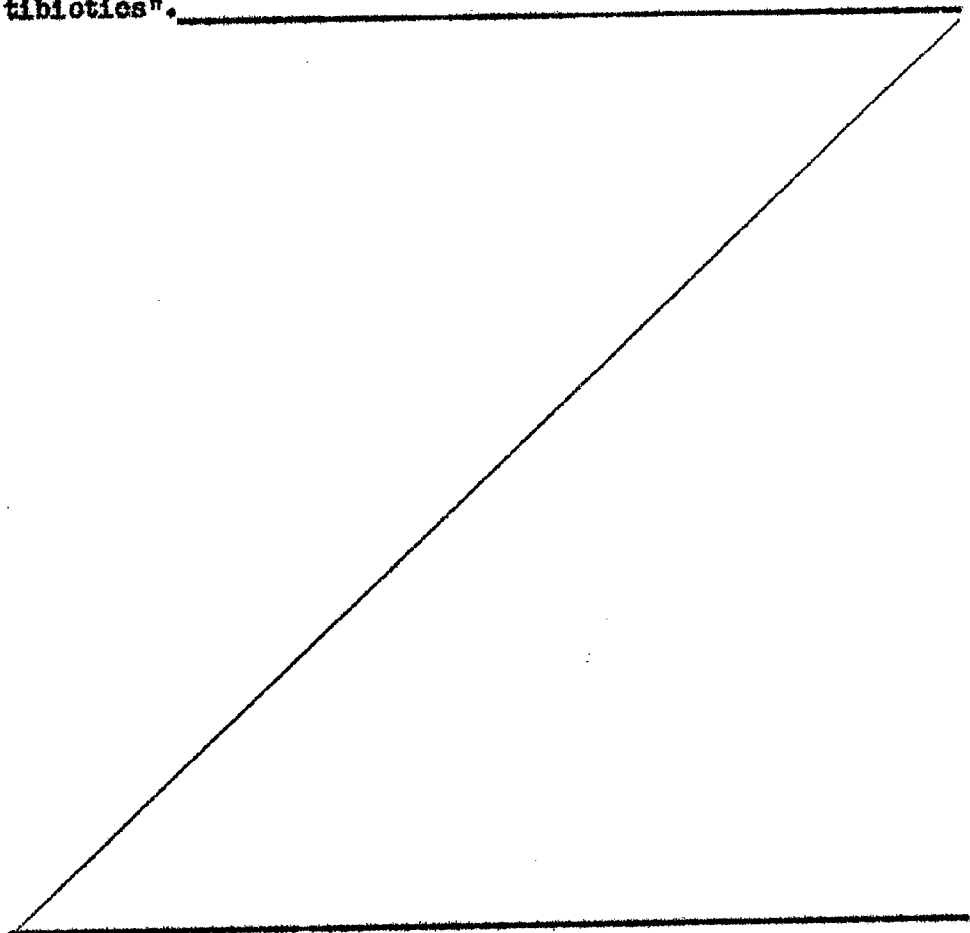


TABLA 5

Propiedades	Cepa MC916-04	Streptomyces sp. IFO 3300 (análogo a Streptomyces griseolus)	Streptomyces sp. IFO 3300 mostradas en la literatura*	Descripciones de streptomyces sp. IFO 3300 mostradas en la literatura*	Descripciones de cepas del grupo C mostradas en la literatura*
Formación de esporas	+	+	+	(+)	+
Superficie de las esporas	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa**	Lisa
Color de las hifas aéreas	Gris pardusco claro a Gris pardusco	Gris pardusco claro a Gris pardusco	Gris pardusco claro a Gris pardusco	Gris	Gris pardusco
Color del crecimiento	Naranja amarillento marrón amarillento	Incoloro a marrón amarillento pálido	Incoloro a marrón amarillento pálido	Tinte cremoso a marrón	Tinte cremoso a marrón
Pigmento soluble	Tinte amarillento marrón o marrón amarillento	No se observó o con tinte marrón	No se observó o con tinte marrón	No se observó o con marrón	No se observó o con marrón
Formación de pigmento similar a la melanina	-	-	-	**	-
Sobre medio ISP nº 1	+	+	+	**	-
Sobre medio ISP nº 6	+	+	+	**	-
Sobre medio ISP nº 7	+	+	+	**	-
Hidrólisis del almidón	+	+	+	+	+
Coagulación de la leche	+	+	+	-	+
Peptonización de la leche	+	+	+	-	+
Licuefacción de la gelatina en medio de gelatina común	+	+	+	Ligeramente licuada	+
en medio de glucosa-peptona-gelatina	+	+	+	+	+
Reducción del nitrato	+	+	+	+	A veces + pero otras veces -
Utilización de fuentes de carbono	+	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+
L-arabinosa	-	-	-	-	-

TABLA 5 (Continuación)

Propiedades	Cepa MC916-04	Streptomyces sp. IFO 3300 (análogo a Streptomyces griseolus)	Descripciones de streptomyces sp. IFO 3300 mostradas en la literatura*	Descripciones de cepas del grupo mostradas en la literatura*
D-xilosa	±	±		A veces + pero otras veces -
O-fructosa	-	±		-
Sucrosa	-	-		
Inositol	-	-		
L-ramnosa	(+)	+		
Rafinosa	±	±		
D-mannitol	-	-		
Antibióticos producidos	Cicloheximida & neotramicina A & B		Fermicidina (antibiótico análogo a la cicloheximida)	Cicloheximida

Notas: Literatura* designa el "Journal of Antibiotics" Ser. B. Vol.7, nº 7, pág. 221 (1954).

Literatura** designa el "Journal of Antibiotics" Ser. B. Vol.17, nº 4, pág. 181 (1964).

Con respecto a la utilización de fuentes de carbono: el símbolo ± significa probablemente no utilización.

El símbolo (+) significa probable utilización.

Como se verá por la tabla que precede, la cepa MC916-C4 es coincidente con la cepa del grupo C descrita en la literatura mencionada anteriormente pero se diferencia de la cepa Streptomyces sp. IFO 3300 con respecto a la coagulación y peptonización de la leche.

Igualmente, la cepa MC916-C4 es diferente de la cepa Streptomyces griseolus [véase el "International Journal of Systematic Bacteriology" Vol. 18, página 122 (1968)] que ha mencionado parecerse a dicha cepa IFO 3300, porque la cepa S. griseolus no forma espirales abiertas en sus hifas aéreas y es algo diferente de la cepa MC916-C4 con respecto a la utilización de fuentes de carbono. Se llevaron a cabo comparaciones adicionales de la cepa MC916-C4 con Streptomyces sp. IFO 3300, Streptomyces griseolus ISP 5067 y Streptomyces naraensis ISP 5508. Se ha comprobado que la cepa MC916-C4 está relacionada con la Streptomyces sp. IFO 3300 y Streptomyces naraensis ISP 5508 y más con la primera cepa. La cepa IFO 3300 es algo diferente de la cepa MC916-C4 teniendo un tinte naranja en el color de crecimiento. La cepa MC916-C4 se distingue claramente de dicha cepa ISP 5508 con respecto a la reducción del nitrato y de la citada cepa ISP 5067 con respecto a la formación de espirales, la utilización de fuentes de carbono y la reducción del nitrato.

La mutación de actinomicetos tiene lugar frecuentemente en condiciones bien artificiales bien espontáneas. En consecuencia, esta invención incluye el uso de la cepa MC916-C4 así como sus mutantes. Dicho en otras palabras, esta invención incluye el uso de todas las cepas del género Streptomyces que producen neotramicina.

Puede obtenerse neotramicina por cultivo aerobio de --

- esporas o micelios de una cepa productora de neotramicina del género Streptomyces tal como la cepa Streptomyces sp. MC916-G4 (identificada por A.T.C.C. 31123). Al llevar a cabo el proceso del segundo aspecto de esta invención, se inocula una cantidad
5. de esporas o micelios de una cepa productora de neotramicina en un medio de cultivo apropiado para los mismos comprendiendo fuentes nutrientes y luego se incuba bajo condiciones aerobias y preferentemente condiciones aerobias sumergidas, con el fin de obtener un caldo de cultivo que contiene neotramicina.
 10. Generalmente, los constituyentes de los medios de cultivo empleados comúnmente pero el cultivo de actinomicetos ordinarios -- pueden ser usados para los fines de esta invención. Por ejemplo, los productos disponibles comercialmente tales como la - harina de soja, polvo de cacahuete, polvo de semilla de alga-
 15. dón, levadura secada, peptona, extracto de carne, caseína, licor del embrión del maíz, N-Z amina, nitrato amónico, sulfato amónico y similares pueden ser útiles como fuentes de nitrógeno. Los hidratos de carbono disponibles comercialmente tales como la glucosa, el almidón, glicerol, maltosa, dextrina, sa-
 20. carosa, lactosa, melazas y similares así como las grasas y -- aceites son útiles como fuente de carbono. Además, el cloruro sódico, carbonato cálcico, sulfato de magnesio, cloruro de manganeso, fosfato sódico y otras sales inorgánicas pueden ser -- empleados como aditivo de sal en el medio de cultivo. Si es ne-
 25. cesario, puede añadirse también varias sales metálicas pesadas en cantidades de trazas. En el proceso de esta invención puede emplearse cualquier material nutriente que sea conocido para el cultivo de actinomicetos, con tal que sea asimilable por la cepa productora de neotramicina para la producción de
 30. neotramicina.

- Para la producción de neotramicina en gran escala, se prefiere el cultivo líquido. Puede emplearse para el cultivo cualquier temperatura a la que la cepa productora de neotramicina sea capaz de crecer y producir neotramicina, pero -
5. una temperatura de cultivo preferida está comprendida entre 25 y 35°C. Se continúa el cultivo durante un periodo de tiempo suficiente para producir y acumular una cantidad suficiente de las neotramicinas A y B en el medio de cultivo. Por ejemplo, se preparó y esterilizó a un pH de 6,8 un medio de cultivo comprendiendo 2% de glucosa, 2% de glicerol, 1,2% de harina de soja, 1,0% de harina de semilla de algodón, 0,32% de carbonato cálcico, 0,5% de cloruro sódico y 0,0005% de tetrahidrato de cloruro de manganeso. Este medio fue inoculado entonces con esporas o micelios recogidos de un cultivo en declive de la cepa MC916-C4. Cuando fue cultivado con agitación aeróbicamente a 28°C, la producción y acumulación de neotramicina en el medio de cultivo alcanzó un máximo al final de la incubación durante 3 a 5 días.
- 10.
- 15.

- Puede ensayarse la neotramicina usando Staphylococcus aureus o Escherichia coli como organismo de ensayo de acuerdo con un método normal de copa-plato que ha sido empleado usualmente para el ensayo de los antibióticos conocidos. Una neotramicina A auténticamente pura que fue obtenida en el ejemplo 4, descrito posteriormente, de esta invención puede ser --
20. usada como muestra patrón que presenta una actividad de 1000 unidades por mg. En caso de que sean producidas simultáneamente otras sustancias antibióticas tales como cicloheximida en el caldo de cultivo de la cepa MC916-C4 además de la neotramicina, el caldo de cultivo puede ser lavado con acetato de etil
- 25.
30. lo u otro disolvente orgánico apropiado para retirar tales --

sustancias antibióticas por extracción. La fase acuosa restante puede ser empleada entonces para el ensayo del contenido de la neotramicina A y B de acuerdo con el método normal de copa-plato antes citado.

5. Para la recuperación de la neotramicina del medio de cultivo, el caldo de cultivo de la cepa productora de neotramicina puede ser tratado con un disolvente orgánico apropiado tal como n-butanol para dar un extracto de la neotramicina en dicho disolvente o bien puede ser tratado con un adsorbente apropiado tal como carbón activo para hacer que sea adsorbida la neotramicina por el adsorbente. Se examinó la distribución de la neotramicina A o neotramicina B entre n-butanol y agua, y se comprobó que el coeficiente de repartición de la neotramicina en n-butanol/agua es superior a 5 a un valor pH de 2 a 7. En consecuencia, la neotramicina puede ser extraída con n-butanol a partir del caldo de cultivo acuoso que ha sido ajustado a un valor pH de 2 a 7 y preferiblemente de 6 aproximadamente. La neotramicina es prácticamente no extraíble por acetato de etilo o cloroformo a partir de la porción líquida del caldo de cultivo. Si se precisa, por consiguiente, es posible tratar el caldo de cultivo con acetato de etilo o cloroformo para la extracción con el fin de retirar las impurezas solubles del caldo de cultivo. Para separar la neotramicina del caldo de cultivo es preferible tratar el caldo de cultivo con carbón activo como adsorbente. La neotramicina que ha sido adsorbida por el carbón activo puede ser eluida del mismo por medio de una mezcla de metanol y agua, una mezcla de propanol y agua o una mezcla de acetona y agua, etc. Puede mejorarse la eficacia de la elución cuando se realiza la misma bajo condiciones débilmente alcalinas. Puede
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

efectuarse la purificación de la neotramicina usando el método de extracción y el método de adsorción elución mencionados anteriormente en una combinación apropiada de los mismos o de una manera repetida. Puede lograrse una purificación más in-

5. tensa por una cromatografía de columna usual de Sephadex LH-20 (un producto comercial vendido por Pharmacia Co., Suecia) o -- gel de sílice. El antibiótico conocido llamado cicloheximida que pueda estar frecuentemente coexistiendo en el caldo de cultivo de la cepa MC916-C4 puede ser separado fácilmente de la
10. neotramicina de esta invención por extracción con acetato de etilo o por cromatografía sobre Sephadex LH-20.

Para aislar la neotramicina A de la neotramicina B, se puede someter una mezcla de la neotramicina A y neotramicina B a una cromatografía de columna sobre gel de sílice con -

15. cloroformo y etanol (30:1 en volumen) como disolvente de desarrollo. La neotramicina A aislada o la neotramicina B aislada pueden ser purificadas por cromatografía de columna sobre gel de sílice usando una mezcla apropiada de disolventes orgánicos como disolvente de desarrollo.

20. La recuperación de la neotramicina A y neotramicina B puede ser llevada a cabo típicamente del siguiente modo: -- Primeramente se filtra o centrifuga el caldo de cultivo que - contiene la neotramicina para retirar las materias sólidas junto con los micelios. Se trata entonces el filtrado del caldo
25. con carbón activo para adsorber del mismo la neotramicina. El carbón activo que lleva la neotramicina adsorbida es eluido - con acetona-agua al 50% (una mezcla de acetona y agua en una proporción de 1:1 en volumen) a un pH de 8,0. El eluado es recogido en fracciones y las fracciones activas son combinadas
30. entre sí y concentradas hasta la sequedad bajo presión reduci

- da a una temperatura de hasta 40°C o de otro modo secadas por congelación para dar un polvo crudo que contiene neotramicina. Este polvo crudo es extraído con etanol acuoso con el fin de separar en el extracto resultante una mayor parte de los componentes activos. Este extracto es concentrado hasta la sequedad bajo presión reducida a una temperatura de hasta 40°C o secado de otro modo por congelación para dar un segundo polvo crudo. Se pasa una solución de este polvo crudo en metanol a través de una columna de Sephadex LH-20 (un producto de Pharmacia Co., Suecia) que es desarrollada posteriormente con metanol. Durante este proceso cromatográfico, la cicloheximida posiblemente coexistente es eluida en las fracciones que se desarrollan en la primera fase del proceso, mientras que la mezcla de neotramicina A y B es eluida en las fracciones que tienen lugar en la última fase del proceso.

- Las fracciones activas que contienen la neotramicina A y B son combinadas entre sí y posteriormente concentradas hasta la sequedad bajo presión reducida a una temperatura de hasta 40°C para dar un polvo crudo. Este polvo es echado en un pequeño volumen de metanol y la solución metanólica es mezclada uniformemente con una cantidad de gel de sílice neutra. La mezcla fue secada por evaporación y después fue colocada sobre la parte superior de una columna de otra cantidad de dicha gel de sílice neutra que ha sido impregnada con una mezcla de cloroformo y etanol (30:1 en volumen). La columna de gel de sílice es desarrollada posteriormente con cloroformo-etanol (30:1 en volumen). Durante este proceso cromatográfico, la neotramicina A es eluida en las fracciones activas que se desarrollan en la primera fase del proceso, mientras que la neotramicina B es eluida en las fracciones activas que tienen lugar --

en la fase posterior del proceso. Las fracciones activas que contienen la neotramicina A y las fracciones activas que contienen la neotramicina B son concentradas hasta la sequedad bajo presión reducida a una temperatura de hasta 40°C para dar un polvo crudo que contiene la neotramicina A y un polvo crudo que contiene la neotramicina B respectivamente.

El polvo crudo que contiene la neotramicina A así obtenido es echado en una cantidad apropiada de cloroformo y la solución es pasada a través de una columna de gel de sílice neutra que ha sido impregnada con cloroformo. Esta columna de gel de sílice es lavada con cloroformo y posteriormente desarrollada a 5°C con cloroformo-etanol (60:1 en volumen). El eluado es recogido en fracciones, y las fracciones activas deseadas que contienen solamente la neotramicina A son detectadas mediante referencia a los resultados de prueba del ensayo biológico y por cromatografía en capa delgada de cada fracción. Las fracciones activas deseadas así elegidas son combinadas entre sí y concentradas hasta la sequedad bajo presión reducida a una temperatura de hasta 40°C para dar un polvo incoloro que contiene neotramicina A. Este polvo puede ser purificado posteriormente para obtener un polvo incoloro que comprende neotramicina A y que tiene una temperatura de descomposición de 110-122°C, repitiendo el proceso cromatográfico de gel de sílice mencionado anteriormente o disolviendo dicho polvo incoloro en un pequeño volumen de cloroformo, añadiendo éter de etilo a la solución de cloroformo, separando por filtración y secando el precipitado resultante. Puede obtenerse un polvo incoloro que comprende neotramicina B y que tiene una temperatura de descomposición de 139-163°C a partir del producto crudo antes citado que contiene la neotramicina B por purificación

del mismo modo que para las neotramicina A. No obstante, se prefiere entonces que la cromatografía de columna sobre gel de sílice sea realizada usando una mezcla de cloroformo y etanol (100:1 en volumen) como disolvente de desarrollo.

5. El polvo incoloro antes mencionado que comprende -- neotramicina A y que tiene una temperatura de descomposición de 110-122°C se disuelve en un pequeño volumen de etanol y -- es cromatografiado nuevamente sobre una columna de gel de sílice neutro, usando agua-acetato de etilo saturado como disolvente de desarrollo. El eluado es recogido en fracciones, y las fracciones que contienen neotramicina A son combinadas y concentradas hasta la sequedad bajo presión reducida a una temperatura de hasta 40°C, dando un polvo incoloro, auténticamente puro de neotramicina A que presenta una temperatura de descomposición de 132-147°C y una actividad óptica específica $[\alpha]_D^{26} = +272^\circ$ (c 0,52, dioxano). El polvo incoloro antes citado que comprende neotramicina B y tiene una temperatura de descomposición de 139-163°C se disuelve en un pequeño volumen de etanol y se cromatografía nuevamente sobre una columna de gel de sílice neutro, usando agua-acetato de etilo saturado como disolvente de desarrollo. El eluado es recogido en fracciones, y las fracciones que contienen neotramicina B son combinadas y concentradas hasta la sequedad bajo presión reducida a una temperatura de hasta 40°C, dando un polvo incoloro, auténticamente puro de neotramicina B que presenta una temperatura de descomposición de 144-151°C y una actividad óptica específica $[\alpha]_D^{26} = +314^\circ$ (c 0,48, dioxano).

A la vista de las propiedades antes citadas de la neotramicina A y neotramicina B, se ha confirmado que estas sustancias son nuevos antibióticos que se diferencian de cual

- quiera de los antibióticos conocidos. De acuerdo con un cuarto aspecto de esta invención, se proporciona también una composición farmacéutica para el tratamiento terapéutico de un animal vivo, incluyendo el hombre, afectado de leucemia, que comprende como ingrediente activo por lo menos uno de los antibióticos neotramicina A, neotramicina B, metilneotramicina A y metilneotramicina B y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en una cantidad suficiente para reducir la afección por la leucemia in vivo, estando combinado el compuesto del ingrediente activo con un transportador farmacéuticamente aceptable.
- 5.
- 10.

- Se comprenderá que las cantidades preferidas reales de la neotramicina usada variarán de acuerdo con el compuesto particular usado, la composición particular formulada, el modo de aplicación y el lugar particular y el organismo que sean tratados. Muchos factores que modifican la acción de la droga serán tenidos en cuenta por los expertos en la materia, por ejemplo, la edad, el peso corporal, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la vía de administración, la cadencia de excreción, las combinaciones de las drogas, las sensibilidades de reacción y la gravedad en la enfermedad. Las cadencias de aplicación óptimas para un grupo determinado de condiciones pueden ser determinadas por los expertos en la materia usando ensayos convencionales de determinación de la dosis a la vista de las pautas facilitadas más arriba.
- 15.
- 20.
- 25.

- Se estima que usando la descripción precedente y sin más elaboración, el experto en la materia puede utilizar el concepto de esta invención en su sentido más amplio. Las realizaciones específicas preferidas que siguen deben ser consideradas, por lo tanto, como meramente ilustrativas y no li-
- 30.

mitativas en modo alguno del resto de la descripción.

Descripción de las realizaciones preferidas

Ejemplo 1

- Se inocularó una cantidad determinada de Streptomy-
5. ces sp. MC916-C4 (identificada por A.T.C.C. 31123) que había sido incubada en un medio de agar en declive, en un medio de cultivo líquido estéril (pH 7,0 125 ml.) comprendiendo 2,5% de maltosa, 0,75% de peptona, 0,75% de extracto de carne, 0,3% de extracto de levadura, 0,3% de cloruro sódico y 0,1% de sulfato de magnesio (7 H₂O). El medio inoculado fue cultivado --
10. con agitación a 28°C durante 48 horas para dar un cultivo de siembra primario. Este cultivo de siembra primario fue inoculado a un tamaño de inóculo de 0,48% en volumen a 50 l. de un medio de cultivo líquido esterilizado (pH 7,0) conteniendo --
15. 3,5% de jarabe de almidón, 0,75% de peptona, 0,75% de extracto de carne, 0,3% de extracto de levadura, 0,3% de cloruro sódico y 0,1% de sulfato de magnesio (7 H₂O) en un fermentador con depósito de acero inoxidable de una capacidad de 130 l. - El medio inoculado fue cultivado a 28°C durante 24 horas bajo
20. aireación y agitación para dar un cultivo de siembra secundaria. Este cultivo de siembra secundario fue inoculado a un -- tamaño de inóculo del 2% en volumen (6 l.) en un medio de cultivo líquido (pH 6,8, 300 l.) comprendiendo 2% de glucosa, 2% de glicerol, 1,2% de harina de soja, 1,0% de polvo de semilla de algodón, 0,32% de carbonato cálcico, 0,5% de cloruro sódico
25. y 0,0005% de cloruro de manganeso (4 H₂O) que había sido esterilizado a 120°C durante 30 minutos. Se realizó el cultivo a 28°C durante 92 horas bajo aireación y agitación (250 r.p.m.) mientras que la cadencia de aireación fue de 150 l./minuto du
30. rante las primeras 24 horas y luego fue incrementada a 300 l./

minute durante el período comprendido desde la hora 24 a la 92 del cultivo.

El caldo de cultivo resultante (pH 7,3, 300 l., actividad 88 u./ml.) fue mezclado con 24 kg. de un producto filtrante (tierra de infusorios disponible comercialmente bajo el nombre comercial "Hyflo-Supercel") y la mezcla fue filtrada por medio de un filtro de presión para dar 300 l. del filtrado del caldo. El filtrado del caldo fue mezclado perfectamente con 3 Kg. de carbón activo a temperatura ambiente durante una hora bajo agitación, con el fin de adsorber los antibióticos sobre el carbón.

La porción de carbón activo fue recogida por centrifugación y posteriormente lavada con 150 l. de agua. El carbón lavado fue mezclado con 70 l. de acetona-agua al 50% (pH 8,0) durante una hora bajo agitación, con el fin de extraer los antibióticos en el disolvente. Se condujo esta extracción por dos veces y los extractos así obtenidos fueron combinados entre sí a un volumen de 118 l. la solución del extracto fue concentrada bajo presión reducida a una temperatura de hasta 40°C y la solución concentrada (2,6 l.) fue secada por congelación para dar 565 g. de un polvo de color marrón (actividad, 35 u/mg.) que contenía las neotramicinas A y B. Este polvo de color marrón fue extraído con 11,6 l. de etanol-agua al 80%. Las materias insolubles que no tenían actividad anti-bacteriana fueron retiradas por filtración, para dar 11,2 l. de un extracto etanólico. Este extracto fue concentrado bajo presión reducida a una temperatura de hasta 40°C a un volumen de 800 ml., y la solución concentrada fue secada por congelación para dar 218,5 g. de un polvo crudo (actividad 53 u/mg.) este polvo crudo fue dividido en 5 partes iguales, y cada parte

- fue disuelta en 20 ml. de metanol. La solución metanólica fue pasada a través de una columna (90 mm. de diámetro) de 4 l. de Sephadex LH-20, que fue desarrollada posteriormente con metanol. El eluado fue recogido en fracciones de 200 ml. y se comprobó que se eluyó cicloheximida en las fracciones número 9 a 11 mientras que en las fracciones nº 12 a 14 se eluyó una mezcla de las neotramicinas A y B. Las fracciones nº 12-14 fueron combinadas entre sí y concentradas hasta la sequedad bajo presión reducida a una temperatura de hasta 40°C para dar 47 g. de un polvo crudo (actividad, 160 u/mg.) comprendiendo las neotramicinas A y B mezcladas. Rendimiento 28% (basado en el contenido de neotramicina del caldo de cultivo).
- 5.
- 10.

Ejemplo 2

- Se echó el polvo crudo (33 g.), comprendiendo las neotramicinas A y B mezcladas obtenidas en el ejemplo 1, en un pequeño volumen de metanol, y la solución fue mezclada uniformemente con 60 g. de un gel de sílice neutro, seguido por el secado bajo presión reducida. La masa secada así obtenida fue colocada encima de una columna (60 mm. de diámetro) de 660 g. de dicho gel de sílice neutro que había sido impregnado con cloroformo-etanol (30:1 en volumen). Esta columna de gel de sílice fué desarrollada a 5°C pasando un flujo de cloroformo-etanol (30:1 en volumen) a través de dicha columna. El eluado fue recogido en fracciones de 130 ml., y se comprobó que la neotramicina A fue eluida en las fracciones nº 23-31 mientras que la neotramicina B fue eluida en las fracciones nº 35-49. Las fracciones activas combinadas nº 23-31 fueron concentradas hasta la sequedad bajo presión reducida a una temperatura de hasta 40°C para dar 1,47 g. de un polvo crudo amarillento que contenía la neotramicina A (actividad, 520 u/mg.).
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

Rendimiento 14%. Las fracciones combinadas nº 35-49 fueron -
concentradas hasta la sequedad del mismo modo para dar 1,03 g.
de un polvo crudo amarillento que contenía la neotramicina B
(actividad, 450 u./mg.). Rendimiento 9%.

5.

Ejemplo 3

El polvo crudo amarillento conteniendo la neotrami-
cina A (1 g.) obtenido en el ejemplo 2 fue disuelto en 20 ml.
de cloroformo, y la solución fue pasada a 5°C a través de una
columna (13 mm. de diámetro) de 20 g. de un gel de sílice neu-
tro de la misma calidad que el empleado en el ejemplo 2 que -

10.

había sido impregnado con cloroformo. La columna fue lavada -
con 400 ml. de cloroformo y posteriormente desarrollada con -
cloroformo-etanol (60:1 en volumen). El eluado fue recogido en

15.

fracciones de 8 ml., y se observó que la neotramicina A fue -
eluida en las fracciones nº 13-27. Las fracciones combinadas
nº 13-27 fueron concentradas hasta la sequedad bajo presión
reducida a una temperatura de hasta 40°C, dando 320 mg. de un
polvo de color débilmente amarillo. Este polvo fue echado en un
volumen mínimo de cloroformo y a esta solución se añadió éter

20.

de etilo hasta que dejó de depositarse el precipitado formado.
El precipitado fue retirado por filtración y secado, dando -
183 mg. de un polvo incoloro que comprendía neotramicina A y
que tenía una temperatura de descomposición de 110-122°C (ac-
tividad 1000 u./mg.). Rendimiento 35%.

25.

Ejemplo 4

El polvo incoloro comprendiendo neotramicina A --
(153 mg.) obtenido en el ejemplo 3 fue disuelto en un pequeño
volumen de etanol y recromatografiado sobre una columna de un
gel de sílice neutro (4,07 g.) de la misma calidad que el em-
pleado en el ejemplo 2 que fue desarrollado con agua-acetato

30.

de etilo saturado a 5°C. El eluado fue recogido en fracciones de 0,6 ml. Las fracciones nº 55-95 conteniendo neotramicina A fueron combinadas y concentradas hasta la sequedad bajo presión reducida a una temperatura de hasta 40°C, dando 53 mg. -

5. de un polvo incoloro de neotramicina A auténticamente pura -- que tenía una temperatura de descomposición de 132-147°C (actividad 1000 u./mg.). $[\alpha]_D^{26} = +272^{\circ}$ (c 0,52, dioxano) Rendimiento 35%.

Ejemplo 5

10. El producto crudo amarillento conteniendo la neotramicina B (810 mg.) obtenido en el ejemplo 2 fue echado en 16 ml. de cloroformo y la solución fue pasada a 5°C a través de una columna (13 mm. de diámetro) de 16 g. de gel de sílice -- neutro de la misma calidad que el empleado en el ejemplo 2 --
15. que había sido impregnado con cloroformo. La columna fue lavada con 320 ml. de cloroformo y posteriormente desarrollada -- con cloroformo-etanol (100:1 en volumen). El eluado fue recogido en fracciones de 6,4 ml., y se comprobó que la neotramicina B fue eluida en las fracciones nº 34-70. Las fracciones
20. combinadas nº 34-70 fueron concentradas hasta la sequedad bajo presión reducida a una temperatura de hasta 40°C para dar 160 mg. de un polvo de color débilmente amarillo. Este polvo fue echado en un volumen mínimo de cloroformo, y a esta solución se añadió éter de etilo hasta que dejó de depositarse el
25. precipitado. El precipitado fue retirado por filtración y secado, dando 85 mg. de un polvo incoloro que comprendía neotramicina B y tenía una temperatura de descomposición de 139-163°C (actividad, 620 u./mg.). Rendimiento 14,6%.

Ejemplo 6

30. El polvo incoloro comprendiendo neotramicina B --

- (74 mg.) obtenido en el ejemplo 5 fue recromatografiado sobre un gel de sílice neutro (2,53 g.) que fue desarrollado con -- agua-acetato de etile saturado del mismo modo que fue empleado en el ejemplo 4. El eluado fue recogido en fracciones de -
5. 0,35 ml. Las fracciones (nº 75-157) conteniendo neotramicina B fueron combinadas y concentradas hasta la sequedad bajo presión reducida a una temperatura de hasta 40°C, dando 36 mg. - de un polvo incoloro de neotramicina B auténticamente pura -- que tenía una temperatura de descomposición de 144-151°C (actividad 835 u./mg.). $\left[\alpha \right]_D^{26} = +314^\circ$ (c 0,48, dioxano). Rendimiento 65%.
- 10.

Ejemplo 7

- Se inculó un cultivo de siembra primario (de 0,5 ml. cada uno) de Streptomyces sp. MC916-04, que fue obtenido
15. de un modo similar al empleado en el ejemplo 1, en cada 30 ml. de un medio de cultivo líquido esterilizado (pH 6,8) conteniendo 2% de glucosa, 2% de glicerol, 1,2% de harina de soja, 1,0% de polvo de semilla de algodón, 0,32% de carbonato cálcico, 0,5% de cloruro sódico y 0,0005% de cloruro de manganeso
20. (4 H₂O) en cuatro matraces Erlenmeyer. El medio inoculado fue cultivado a 28°C por espacio de 92 horas sobre un agitador - giratorio (220 r.p.m.). El caldo de cultivo resultante (pH 6,5, 90 ml., actividad 780 u./ml.) fue extraído con 90 ml. de buta- nel bajo enfriamiento con hielo. El butanol-extracto fue con-
25. centrado hasta la sequedad bajo presión reducida a una temperatura de hasta 40°C, dando 242 mg. de un jarabe pardusco conteniendo las neotramicinas A y B (actividad 100 u./mg.). Rendimiento 44%.

Ejemplo 8

30. Se disolvió en 20 ml. de metanol un polvo crudo oma

rillante (1,0 g., actividad 765 u./mg.) conteniendo las neotramicinas A y B, que fue obtenido de un modo similar al descrito en los ejemplos 1 y 2. La solución de metanol fue mantenida a 25°C durante 16 horas y concentrada hasta la sequedad bajo presión reducida, dando 1,0 g. de una mezcla de las metilneotramicinas A y B. La mezcla fue cromatografiada sobre una columna de gel de sílice (50 g., Wako-gel C-200, Wako Chemicals, Osaka) que fue desarrollada con una mezcla de benceno y metanol (20:1 en volumen). El eluado fue dividido en fracciones de 12,5 ml. Se obtuvieron las fracciones (nº 19-25) conteniendo metilneotramicina A y las fracciones (nº 26-38) conteniendo una mezcla de metilneotramicinas A y B. Las fracciones nº 26-38 fueron concentradas hasta la sequedad y el residuo fue recromatografiado sobre una columna de gel de sílice (18 g.) por el mismo método descrito más arriba. Las fracciones que contenían metilneotramicina A y las fracciones antes mencionadas que contenían neotramicina A fueron combinadas y concentradas hasta la sequedad, dando un polvo incoloro (299 mg). El polvo fue cristalizado con una mezcla de acetona y benceno para dar 240 mg. de cristales incoloros de metilneotramicina A. Las fracciones que contenían metilneotramicina B fueron combinadas y concentradas hasta la sequedad, dando 175 mg. de un polvo incoloro de metilneotramicina B pura.

25. Ejemplo 9

Se disolvió metilneotramicina A cristalina (225 mg.) obtenida en el ejemplo 8 en 45 ml. de 0,01 NHCl-dioxano (1:1 en volumen) y la solución fue mantenida a temperatura ambiente (22°C) durante una hora. La solución fue ajustada a un pH de 6,0 con 1 N NaOH y concentrada hasta la sequedad bajo pre-

sión reducida, dando 216 mg. de un polvo incoloro que contenía las neotramicinas A y B. El polvo fue cromatografiado sobre una columna de gel de sílice (20 g.) de un modo similar al empleado en el ejemplo 2. Se obtuvo neotramicina A (87 mg.) y neotramicina B (69 mg.) puras.

5.

La hidrólisis de la metilneotramicina B (100 mg.) en 20 ml. de 0,01 NHCl-dioxano (1:1 en volumen) a temperatura ambiente durante una hora por el mismo método descrito más -- arriba dió 95 mg. de un polvo incoloro que contenía las neo--

10.

tramicinas A y B.

El Sephadex LH-20 usado en los ejemplos precedentes puede ser reemplazado por otros agentes de filtración de gel similares, por ejemplo Sephadex G25 a G200, Sepharose 4B y 6B (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suecia) y Bio-Tal - Al.5m (Bio Rad Co.). Los agentes de filtración de gel preferidos incluyen los geles de dextrano degradados y sustituidos con carboximetilo que se describen en las columnas 3 y 4 de la patente estadounidense nº 3.819.836.

15.

N O T A

20.

La Patente de Invención que se solicita por veinte años, para España, de acuerdo con la vigente legislación, deberá recaer sobre: "UN PROCESO PARA LA PRODUCCION DE NEOTRAMICINA A Y NEOTRAMICINA B", con Prioridad de la solicitud de Patente en Japón nº 123256/75, de fecha 15 de Octubre de 1.975,

25.

según las características esenciales de las siguientes:

30.

REIVINDICACIONES

1^a.- Un proceso para la producción de neotramicina A y neotramicina B, que responden a la fórmula general (Ia) e (Ib) respectivamente, cuyo proceso consiste en cultivar -
5. una cepa productora de neotramicina del género Streptomyces bajo condiciones aerobias en un medio de cultivo apropiado - para el mismo que contiene fuentes de carbono y nitrógeno -- asimilables durante un período de tiempo suficiente para pro-
ducir y acumular neotramicina A y neotramicina B en el medio
10. de cultivo, y recuperar una mezcla de la neotramicina A y -- neotramicina B del cultivo y posteriormente, si es necesario separar la mezcla recuperada en la neotramicina A y neotrami-
cina B bajo sus formas aisladas.

2^a.- Un proceso para la producción de neotramicina A y neotramicina B, de acuerdo con la reivindicación 1, en -
15. el que se cultiva una cepa de Streptomyces productora de neotramicina, que tiene las características de identificación A.T.C.C. 31123, bajo condiciones aerobias sumergidas en un - medio nutriente que contiene una fuente de carbono y un nu--
20. triente nitrogenado hasta que es producida una cantidad sustancial de neotramicina por dicho organismo en dicho medio - nutriente.

3^a.- Un proceso para la producción de neotramicina A y neotramicina B, de acuerdo con la reivindicación 1, en -
25. el que se cultiva la cepa de Streptomyces en un medio nutriente a una temperatura comprendida entre 24 y 35°C.

4^a.- Un proceso para la producción de neotramicina A y neotramicina B, de acuerdo con la reivindicación 1, en -
el que se cultiva la cepa de Streptomyces en un medio nutrien-
30. te a una temperatura comprendida entre 25 y 29°C y con un pH

comprendido entre 6 y 8.

- 5^a.- Un proceso para la producción de neotramicina A y neotramicina B, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la neotramicina producida en el caldo cultivado es recuperada por extracción y purificada por un proceso que incluye al menos un proceso seleccionado del grupo consistente en extracción con sal, precipitación de disolvente, extracción con butanol, diálisis, ultra-filtración, precipitación isoelectrónica, filtración de gel, electroforesis, electro-concentración y adsorción seguido por la elución a partir de una resina de intercambio iónico.
- 10.

6^a.- "UN PROCESO PARA LA PRODUCCION DE NEOTRAMICINA A Y NEOTRAMICINA B".

- Según queda sustancialmente descrito en la presente Memoria que consta de cuarenta y tres hojas, escritas a máquina por una sola cara y acompañada de dibujos.
- 15.

Madrid, 22 DIC. 1976

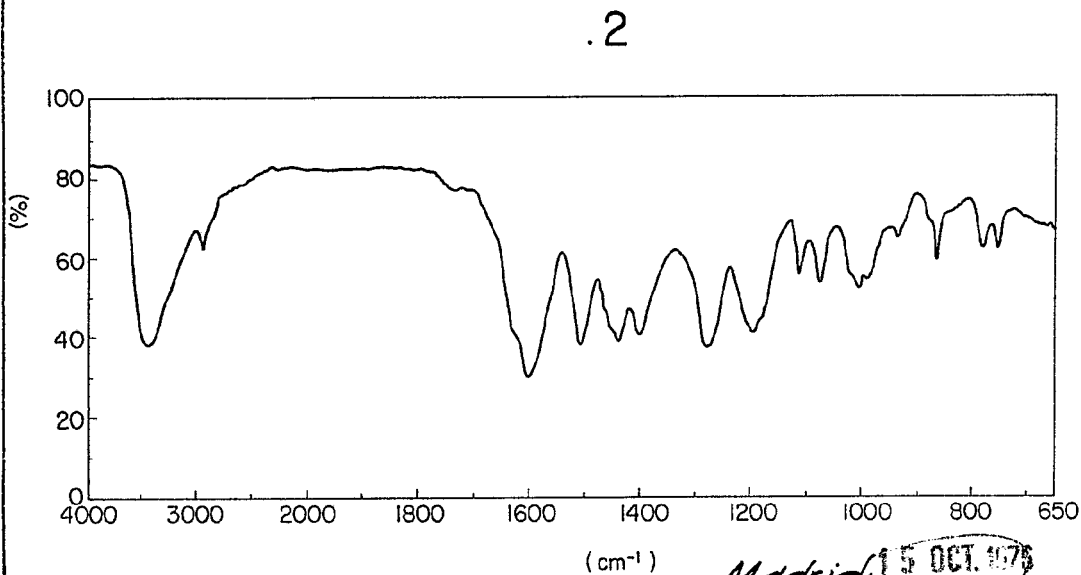
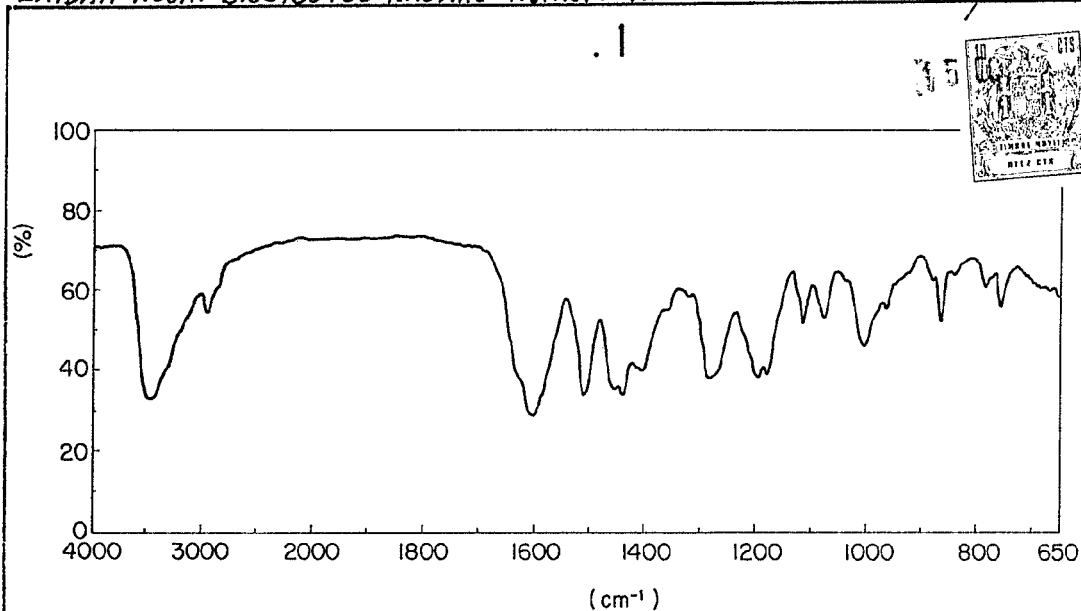
ZAIJAN HOJIN BISEIBUTSU KAGAKU KENKYU KAI

P.P.

FRANCISCO GARCIA CABRERIZO

P.P.

Francisco García Cabrerizo

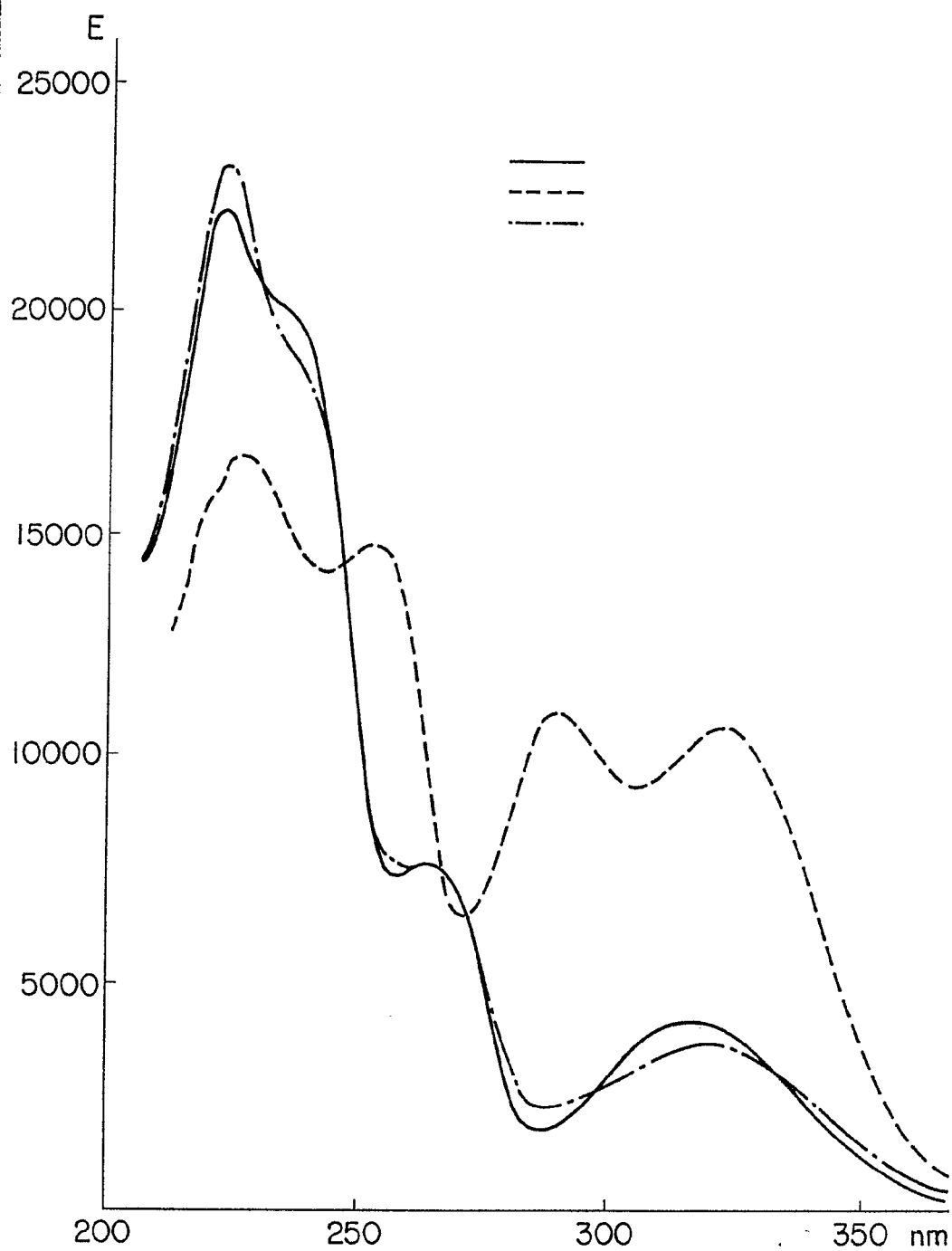
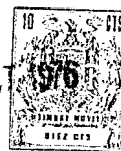


Escala variable

Madrid, 15 OCT. 1975
P.P.
FRANCISCO J. AGUIRRE
P.P.

Firmada: M. Dolores Jaquero

.3

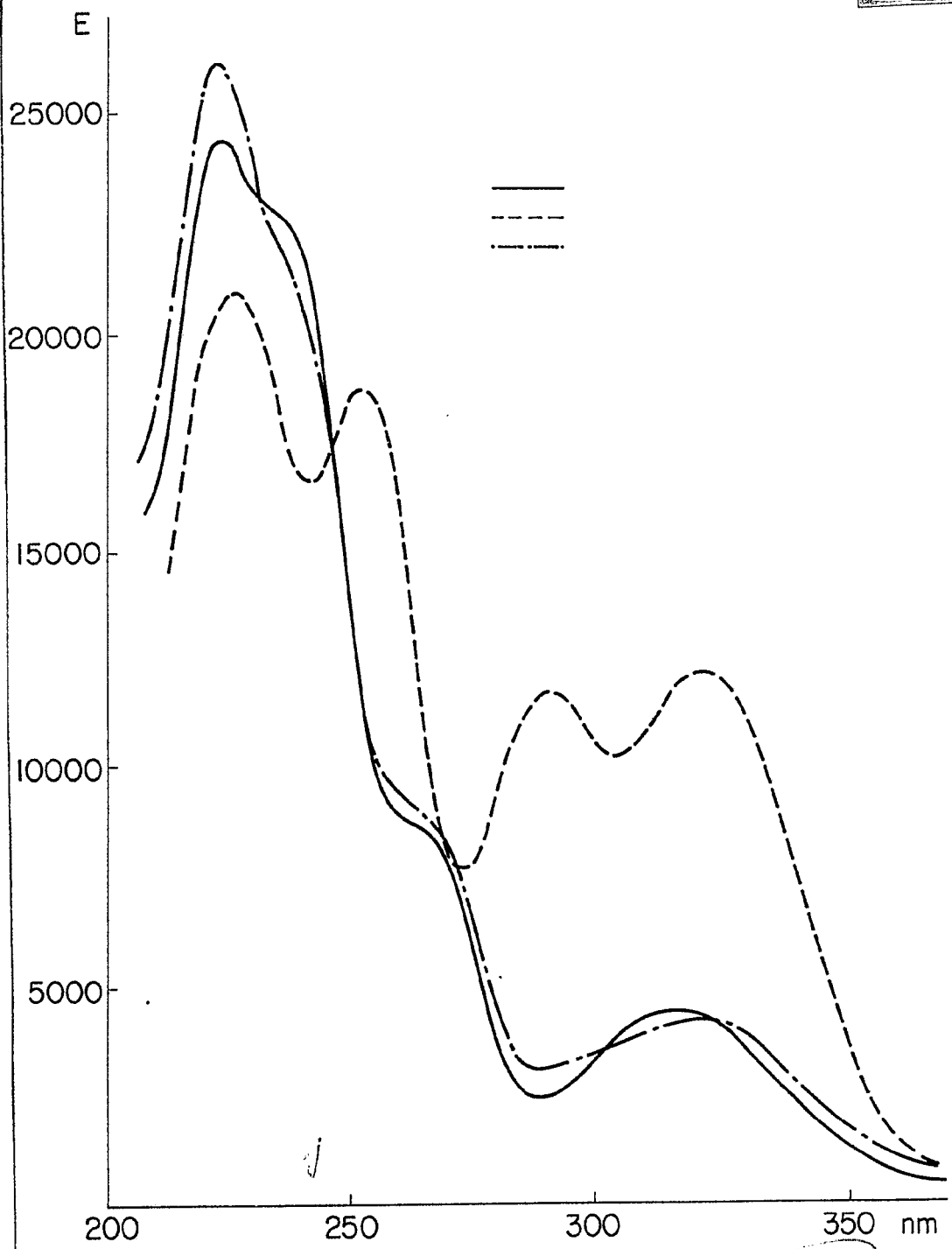


Escala variable

Madrid
P.P.
FRANCISCO GARCIA CABRERIZ
P.P.

Firmado: M.ª Dolores García

.4



Escala variable

Madrid, 5 Oct 1976
FRANCISCO GARCIA CABRINZO
P.R.
[Signature]
Firmado: M. Delgado de los rios