



10 ES	11 NUMERO	10 A1
21	463.206	
22	FECHA DE PRESENTACION	
	14-10-1977	

CONCEDIDA

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
37167/77	31-3-1977	Japón

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D//A61K	

64 TITULO DE LA INVENCION

"UN METODO PARA PREPARAR MAYTANSINOL, MAYTANACINA O PROPIONATO DE MAYTANSINOL"

71 SOLICITANTE (S)

TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. (Case F-2317A)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

27, Doshomachi 2-chome, Higashi-ku, Osaka, Japón

72 INVENTOR (ES)

Eiji Higashide, Mitsuko Asai y Seiichi Tanida

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ (P.-67.007)

UNE A.-4 MOD. 3106. Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.
20 JUL. 1978

UTILICESE COMO PRIMERA PAGINA DE LA MEMORIA

Jga

Esta invención se refiere a un método para preparar maytansinol, maytanacina y propionato de maytansinol, los cuales son agentes anti-tumor.

5 Es sabido que, entre los compuestos anteriores, la maytanacina y el propionato de maytansinol tienen una fuerte actividad anti-tumor (Kupchan y otros: Journal of the American Chemical Society 97, 5294 (1975). Por el contrario, el maytansinol propiamente dicho tiene sólo una débil actividad anti-tumor (véase la referencia arriba indicada), pero es un compuesto intermedio útil para la fácil preparación de maytanacina y propionato de maytansinol, así como de otros diversos derivados.

10 El maytansinol y la maytanacina han sido obtenidos por los anteriores Kupchan y otros a partir de la corteza de Putterlickia verrucosa (planta perteneciente al género Maytenus) y así el rendimiento es extremadamente bajo, tal como 0,025 mg del primero de aquellos compuestos y 0,36 mg del último a partir de 1 kg de corteza seca de la planta. En cuanto al propionato de maytansinol, se ha obtenido por propionación química del maytansinol.

15 Los autores de la presente invención han recogido diversas muestras de suelo o de otros tipos y han investigado acerca de los antibióticos producidos por microorganismos que se aíslan de las muestras, y estos estudios han permitido llevar a descubrir que algunos de los microorganismos así aislados pueden acumular maytansinol, maytanacina o propionato de maytansinol en el medio de cultivo, perteneciendo estos microorganismos al género Nocardia, y que estos compuestos pueden también obtenerse por cultivo de mutantes derivados de estos microorganismos en un medio nu-

20

25

30

triente apropiado en condiciones adecuadas.

Estudios ulteriores sobre la base de estos descubrimientos han permitido llegar ahora a la culminación de la presente invención.

5 Así, la presente invención se refiere a un método para preparar maytansinol, maytanacina o propionato de maytansinol, que comprende cultivar un microorganismo, que pertenece al género Nocardia y es capaz de producir maytansinol, maytanacina o propionato de maytansinol, en un
10 medio de cultivo para acumular maytansinol, maytanacina o propionato de maytansinol en el caldo de cultivo y recuperar los mismos.

De acuerdo con la técnica anterior, los compuestos anteriores se pueden obtener a partir de plantas, pero
15 las plantas se limitan a algunas específicas, y se requieren grandes gastos y un largo período de tiempo para la producción en cada etapa de crecimiento, cortado, secado y pulverización de las plantas y extracción, separación y purificación. Adicionalmente, el rendimiento es extremadamente bajo.
20

Por el contrario, los procedimientos de la presente invención pueden realizarse fácil y suavemente por cultivo del microorganismo, y puede producirse y obtenerse cuando se desea una gran cantidad de los compuestos buscados.
25

La presente invención es el primer ejemplo de obtención de estos compuestos como metabolitos de microorganismos, y puede considerarse como un método excelente para la preparación de aquéllos.

30 Como un ejemplo del microorganismo utilizable

en el presente método, se puede mencionar una cepa de actinomiceto N° C-15003, que fue aislada por los autores de la invención a partir del suelo y de otras muestras en las investigaciones en busca de microorganismos productores de antibióticos.

5

Los caracteres microbiológicos de la Cepa N° C-15003 fueron investigados por procedimientos análogos a los propuestos por Schirling y Gottlieb (International Journal of Systematic Bacteriology 16, 313-340 (1966)). Los resultados de las observaciones a 28°C a lo largo de 21 días son como sigue.

10

1) Caracteres morfológicos

El micelio vegetativo se extiende bien y se desarrolla en ramificaciones, tanto en agar como en medio líquido. Muchas de las hifas miden 0,8 a 1,2 micras de diámetro y, en ciertos casos, pueden dividirse en fragmentos que se asemejan a las bacterias de forma de bastoncillos o en longitudes cortas ramificadas de hifas. La cepa da un crecimiento satisfactorio sobre diversos medios taxonómicos, con el micelio aéreo superpuesto sobre el micelio vegetativo, aunque frecuentemente aquélla forma cuerpos semejantes a coremia (50-200 x 200-1000 micras) sobre los cuales tiene lugar el crecimiento aéreo adicional. Muchos de los micelios aéreos son flexuosos, rectos, encontrándose en un pequeño número de ocasiones una configuración que se asemeja ventajosamente a una espiral. El examen microscópico de los cultivos envejecidos revela que sólo en unos pocos casos las células semejantes a conidios se presentan en cadenas, mientras que las suspensiones de células obtenidas de las superficies de tales cultivos, cuando se exa-

15

20

25

30

minaron al microscopio, contenían muchos cuerpos elipsoidales alargados (0,8 - 1,2 micras x 4,8-6,8 micras) y elipsoidales (0,8-1,2 x 1,0-2,0 micras) que se asemejaban a artrosporas.

5 Los exámenes al microscopio electrónico mostraron que estos cuerpos tenían superficies lisas.

2) Los constituyentes de las células

La cepa se cultivó con sacudidas en el medio Nº 1 ISP modificado a 28°C durante 66 a 90 horas, al final de cuyo tiempo las células se recogieron y se enjuagaron. Por el método de B. Becker y otros (Applied Microbiology 12, 421 (1964) y el método de M.P. Lechevalier (Journal of Laboratory and Clinical Medicine 71, 934 (1968), se examinaron las células anteriores enteras en lo referente a su composición de ácido diaminopimélico y azúcares. Se encontró que el primero era la forma meso, mientras que se detectaron manchas que correspondían a galactosa y arabinosa.

3) Características en medios taxonómicos

20 La cepa exhibió comparativamente un crecimiento satisfactorio en diversos medios, siendo el micelio vegetativo incoloro o amarillo pálido en las fases iniciales del cultivo y canela amarillento ligero a canela amarillento en las fases finales. La cepa produce pigmentos solubles, de color amarillo a canela amarillento, en diversos medios taxonómicos. El micelio aéreo es pulverulento y generalmente da un crecimiento moderado, siendo blanco a amarillo o canela amarillento claro. Las características de la cepa en diversos medios taxonómicos se indican en la Tabla 1.

Tabla 1 Características de cultivo de la Cepa Nº C-15003
en medios taxonómicos.

- 5 (A) Agar de nitrato de sacarosa:
Crecimiento (G): Exuberante, Amarillo Melón Brite (3
ia)³⁶ a Ambar (3 lc)³⁶, con formación
de cuerpos semejantes a coremia
Micelio aéreo (AM): Escaso, blanco
Pigmento soluble (SP): Ninguno o canela amarillento
pálido
- 10 (B) Agar de nitrato de glicerina:
G: Moderado, Marfil Claro (2 ca)³⁶, con formación de
cuerpos semejantes a coremia
AM: Moderado, blanco
SP: Ninguno
- 15 (C) Agar de glucosa-asparagina:
G: Moderado, Maravilla Brite (3 pa)³⁶ a Amarillo Brite
(2 pa)³⁶.
AM: Escaso, blanco
SP: Amarillo Brite (2 pa)³⁶
- 20 (D) Agar de glicerina asparagina:
G: Moderado, Marfil claro (2 ca)³⁶, con formación de
cuerpos semejantes a coremia
AM: Escaso, blanco
SP: Ninguno
- 25 (E) Agar de almidón:
G: Moderado, Marfil claro (2 ca)³⁶ a Trigo claro (2 ea)³⁶
con formación de cuerpos semejantes a coremia
AM: Abundante, Marfil claro (2 ca)³⁶
SP: Ninguno
- 30 (F) Agar nutriente:

G: Moderado, Marfil claro (2 ca)³² a Amarillo Colonial (2 ga)³², con formación de cuerpos semejantes a coremia

AM: Escaso, blanco

5

SP: Ninguno

(G) Agar de melato de calcio:

G: Moderado, Marfil claro (2 ca)³² a Trigo claro (2 ea)³² con formación de cuerpos semejantes a coremia.

AM: Moderado, blanco a Marfil claro (2 ca)³²

10

SP: Ninguno

(H) Agar de extracto de levadura-extracto de malta:

G: Moderado, Amber (3 lc)³² a Amarillo Brite (3 la)³², con formación de cuerpos semejantes a coremia

AM: Moderado, blanco a Marfil claro (2 ca)³²

15

SP: Ninguno

(I) Agar de harina de avena:

G: Moderado, Marfil claro (2 ca)³² a Amarillo colonial (2 ga)³², con formación de cuerpos semejantes a coremia

20

AM: Escaso, blanco a amarillo claro

SP: Ninguno

(J) Agar de peptona-extracto de levadura-hierro:

G: Moderado, Amarillo colonial (2 ga)³²

AM: Ninguno

25

SP: Amarillo colonial (2 ga)³²

(K) Agar de tirosina:

G: Moderado, Marfil claro (2 ca)³² a Amarillo Melón claro (3 ea)³², con formación de cuerpos semejantes a coremia

30

AM: Moderado, blanco a Marfil claro (2 ca)³²

SP: Camello (3 ie)^{3*}

* Los códigos de color están de acuerdo con el Color Harmony Manual, 4ª edic. (Container Corporation of America 1958).

5

4) Caracteres fisiológicos

Los caracteres fisiológicos de la cepa se muestran en la Tabla 2. Intervalo de temperatura para el crecimiento: 12°C a 38°C. El intervalo de temperatura en el que se produce un crecimiento aéreo satisfactorio sobre agar (ISP Nº 2) es de 20 a 35°C.

10

Tabla 2 Caracteres fisiológicos de la Cepa Nº C-15003

Intervalo de temperatura para el

crecimiento: 12 a 38°C

Intervalo de temperatura para el

15

crecimiento aéreo: 20 a 35°C

Licuefacción de la gelatina: Positiva

Hidrólisis del almidón: Positiva

Reducción de los nitratos: Positiva

Peptonización de la leche: Positiva

20

Coagulación de la leche: Negativa

Descomposición de la caseína: Positiva

Producción de pigmentos melano-

noides: Negativa (agar de peptona-extracto de levadura-hierro) Positiva (agar de tirosina)

25

Descomposición de la tirosina: Positiva

Descomposición de la xantina: Negativa

Descomposición de la hipoxantina: Negativa

30

Tolerancia a la lisozima: Positiva

Tolerancia al cloruro de sodio:

2%

5) Utilización de diversas fuentes de carbono

Se investigó la utilización de diversas fuentes de carbono utilizando un medio descrito en Pridham y Gottlieb (Journal of Bacteriology 56, 107 (1948) y un medio basal de la misma composición más 0,1% de extracto de levadura. El espectro resultante se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3 Utilización de fuentes de carbono por la Cepa

Nº C-15003

	Fuente de Carbono	Crecimiento	Fuente de Carbono	Crecimiento
10	D-Xilosa	+ ++ [‡]	Rafinosa	± ± [‡]
	L-Arabinosa	+ +	Melibiosa	+ +
	D-Glucosa	++ ++	i-Inosita	- -
15	D-Galactosa	+ +	D-Sorbita	- -
	D-Fructosa	+++ ++	D-Manita	++ ++
	L-Ramposa	+ +	Glicerina	- ±
	D-Manosa	+++ ++	Almidón soluble	+ +
20	Sacarosa	++ ++	Testigo	- -
	Lactosa	- - [‡]		
	Maltosa	± +		
	Trehalosa	+ ++		

25 [‡] Medio basal con adición de 0,1% de extracto de levadura

Nota: +++: Crecimiento exuberante

++: Crecimiento satisfactorio

+: Crecimiento

±: Crecimiento deficiente

30 -: Crecimiento nulo

6) Otras características

Las células se cosecharon por el procedimiento previamente descrito en 2), y se preparó DNA por un procedimiento análogo al de J. Marmur y otros (Journal of Molecular Biology, 3 208, 1961). Se encontró que el contenido de G-C (Guanina-Citosina) del DNA era aproximadamente 71% en moles.

La tinción gram del micelio vegetativo de esta cepa era positiva.

Las características anteriores de la Cepa N° C-15003 se compararon con las descripciones dadas en la obra de S.A. Waksman "Los Actinomicetos", Vol. 2 (The Williams and Wilkins Co., 1961); R.E. Buchanan y N.E. Gibbons, "Manual Bergey de Bacteriología Determinativa", 8ª edición, 1974; y otras fuentes bibliográficas.

Si bien se pensó que esta cepa pertenecía al Grupo III del género Nocardia, el hecho de que no se lograra encontrar ninguna especie que tuviera las características descritas hasta ahora entre las cepas conocidas condujo a los autores de la invención a la conclusión de que esta cepa representaba una nueva especie de microorganismo.

La presente Cepa N° C-15003 se ha depositado en el Instituto de Investigaciones de Fermentación, Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial (FERM) bajo el número de recepción 3992, y en el Instituto de Fermentaciones, Osaka (IFO) bajo el número de entrada de IFO 13726, así como en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) Maryland, EE.UU. bajo el número de entrada 31281.

Si bien la Cepa N° C-15003 es una especie nueva del género Nocardia como se acaba de mencionar, es suscep-

tible, como ocurre generalmente con los microorganismos, de sufrir variaciones y mutaciones, bien sea espontáneamente o bajo la influencia de un mutágeno. Por ejemplo, las muchas variantes de la cepa que pueden obtenerse por irradiación con rayos X, rayos gamma, luz ultravioleta, etc., por aislamiento de monocélulas, por cultivo en medios que contienen diversos productos químicos, o por cualquier otro tratamiento mutágeno, así como los mutantes derivados espontáneamente de la cepa, no deben considerarse sustancialmente como representantes de ninguna otra especie distinta, sino que, en realidad, cualquiera de tales variantes y mutantes capaces de elaborar maytansinol, maytanacina y propionato de maytansinol puede utilizarse invariablemente para los fines de esta invención como la cepa N° C-15003. A título de ejemplo, cuando se somete la Cepa N° C-15003 a diversos tratamientos mutágenos produce mutantes que carecen sustancialmente de la capacidad de producir pigmentos solubles, mutantes con micelios de substrato que son incoloros, verde-amarillentos, canela-rojizos o rojo-anaranjados, mutantes cuyas hifas son propensas a fragmentarse en elementos bacilares o fragmentos de hifa cortos ramificados, y mutantes con abundantes micelios aéreos blancos o sustancialmente sin micelios aéreos.

El medio empleado para el cultivo de una cepa capaz de producir maytansinol, maytanacina o propionato de maytansinol (de aquí en adelante, abreviada algunas veces como "cepa producible") puede ser cualquier medio líquido o sólido únicamente si contiene nutrientes que la cepa pueda utilizar, aunque se prefiere un medio líquido para operaciones de alta producción. El medio puede comprender

fuentes de carbono y de nitrógeno que la cepa N° C-15003 pueda asimilar y digerir, materia inorgánica, nutrientes traza, etc. Como ejemplos de dichas fuentes de carbono pueden mencionarse glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa, dextrina, almidón, glicerina, manita, sorbita, etc., grasas y aceites (p.ej. aceite de soja, aceite de manteca de cerdo, aceite de pollo, etc.), etcétera. Las fuentes de nitrógeno pueden ser, por ejemplo, extracto de carne, extracto de levadura, levadura seca, harina de semilla de soja, licor de maceración de maíz, peptona, caseína, harina de semilla de algodón, melazas agotadas, urea, sales de amonio (p.ej. sulfato de amonio, cloruro de amonio, nitrato de amonio, acetato de amonio, etc.), etcétera. El medio puede contener además sales de sodio, potasio, calcio, magnesio, etc., sales de hierro, manganeso, zinc, cobalto, níquel, etc., sales de ácido fosfórico, ácido bórico, etc. y sales de ácidos orgánicos tales como acetatos y propionatos. Adicionalmente, el medio puede contener, como aditivos, diversos aminoácidos (p.ej. ácido glutámico, ácido aspártico, alanina, glicocola, lisina, metionina, prolina, etc.), péptidos (p.ej. dipéptidos, tripéptidos, etc.), vitaminas (p.ej. B₁, B₂, ácido nicotínico, B₁₂, C, E, etc.), ácidos nucleicos (p.ej. purina, pirimidina y derivados de las mismas), etcétera. Para el propósito de ajustar el pH del medio, puede añadirse un ácido inorgánico u orgánico, un álcali, una solución amortiguadora, etcétera. Pueden añadirse también cantidades adecuadas de aceites, grasas, agentes tensioactivos, etc. como agentes antiespuma.

El cultivo puede realizarse por cualquiera de los procedimientos estacionario, de sacudidas, aerobio sumergi-

do, y otros. Para operaciones de alta producción, se prefiere, por supuesto, el cultivo aerobio sumergido. Si bien las condiciones de cultivo, por supuesto, dependen de la condición y composición del medio, de la cepa, del método de cultivo y de otros factores, normalmente se prefiere realizar la incubación a 20-35°C con un pH inicial de aproximadamente 7,0 poco más o menos. Es particularmente deseable una temperatura de 23 a 30°C en una etapa intermedia de cultivo, con un pH inicial de 6,5 a 7,5. Si bien el tiempo de incubación es también variable de acuerdo con los mismos factores que se han mencionado arriba, es aconsejable continuar la incubación hasta que el título del producto antibiótico deseado se hace máximo. En el caso del cultivo con sacudidas o cultivo sumergido aerobio en medio líquido, el tiempo requerido está comprendido normalmente entre aproximadamente 48 y 144 horas.

La potencia del antibiótico se ensayó con Tetrahy
mena pyriformis W como organismo de ensayo. Así, el microor-
ganismo arriba indicado se cultivó en un medio de ensayo
[20 g de Proteosa-peptona (Difco), 1 g de extracto de leva-
dura (Difco), 2 g de glucosa, 1000 ml de agua destilada y
10 ml de tampón de fosfato 1 M (pH 7,0)] a 28°C durante 44
a 48 horas y la potencia del antibiótico se determinó por
el método de dilución en serie con una comprobación de la
turbidez del cultivo en crecimiento y por un ensayo de cro-
matografía en capa delgada (en abreviatura, TLC) que se
describirá más adelante en esta memoria.

La maytanacina, el propionato de maytansinol o el
maytansinol se producen y se acumulan en el caldo cultivado
resultante, tanto extracelular como intracelularmente.

Ninguna de estas sustancias exhibe actividad anti-
tibiótica clara, y por ello dichas sustancias se han detec-
tado por TLC que se indica en paralelo a la detección por
actividad frente a la cepa Tetrahymena. Así, el caldo de
5 fermentación se separa en células y filtrado por filtración
o centrifugación, y el filtrado se extrae con el mismo vo-
lumen de acetato de etilo. Se añade a las células la misma
cantidad de acetona-agua al 70% que el filtrado y, después
de 1 hora de agitación a 20°C, se filtra la suspensión. Se
10 separa la acetona del filtrado y el filtrado acuoso resul-
tante se extrae con acetato de etilo. Cada uno de los ex-
tractos se concentra a 1/100 de su volumen y se somete a
cromatografía de capa delgada sobre una placa de gel de sí-
lice-vidrio (Merck, Alemania Occidental, gel de sílice
15 60F₂₅₄, 0,25 mm, 20 x 20) (sistema disolvente: cloroformo-
metanol = 9:1). La potencia se determinó sobre la base
de la intensidad de las manchas detectadas por irradiación
con luz ultravioleta a 2537 Å.

La maytanacina, el propionato de maytansinol o el
20 maytansinol que se producen así en el caldo de cultivo, son
lipófilos y neutros, y pueden recuperarse convenientemente
por procedimientos de separación y purificación que se em-
plean normalmente para la recogida de tales metabolitos
microbianos. Por ejemplo, puede emplearse un procedimiento
25 que utiliza la diferencia de solubilidad entre el antibió-
tico y las impurezas, medios que utilizan la afinidad ad-
sorbente fraccionadora de diversos adsorbentes tales como
el carbono activado, resinas no iónicas macroporosas, gel
de sílice, alúmina, etc., un procedimiento de separación
30 de las impurezas por medio de resinas cambiadoras de ion,

etcétera, los cuales pueden aplicarse simplemente o en una combinación adecuada o bien aplicarse repetidamente.

Puesto que, como se ha indicado anteriormente, la maytanacina, el propionato de maytansinol o el maytansinol se encuentran tanto en el filtrado como en las células, los antibióticos se separan y purifican por medio de un tal adsorbente, si se emplea uno de éstos, bien sea directamente o bien después de una extracción con disolvente en el caso del filtrado, o después de una extracción con disolvente en el caso de las células microbianas. La extracción con disolvente puede realizarse por cualquiera de los métodos siguientes y otros métodos, p.ej. (1) extracción con disolvente a partir del caldo de cultivo antes de la separación de las células, y (2) extracción con disolvente de las células y el filtrado obtenido por filtración, centrifugación u otro procedimiento. Para extraer el filtrado y las células independientemente, puede llevarse a cabo con ventaja el procedimiento siguiente.

Los disolventes adecuados para la extracción del filtrado son disolventes orgánicos inmiscibles con el agua tales como ésteres de ácidos grasos, p.ej. acetato de etilo y acetato de amilo; alcoholes, p.ej. butanol; hidrocarburos halogenados, p.ej. cloroformo; y cetonas, p.ej. metil-isobutil-cetona. La extracción se lleva a cabo a un pH próximo a la neutralidad y, preferiblemente, el fluido de cultivo ajustado previamente a pH 7 se extrae con acetato de etilo. El extracto se lava con agua y se concentra a presión reducida. Después de ello, se añade al concentrado un disolvente no polar tal como éter de petróleo o hexano, y se re-

5

10

15

20

25

30

cupera el producto bruto I que contiene el compuesto activo. Debido a que, en la TLC, se detectan varias manchas distintas de las de maytanacina, propionato de maytansinol o maytansinol, el producto I se somete secuencialmente a los siguientes procedimientos de purificación. Así, es útil un procedimiento de purificación de rutina, particularmente la cromatografía de adsorción y, para este fin, puede emplearse uno de los adsorbentes más comunes tales como gel de sílice, alúmina, resinas adsorbentes no iónicas macroporosas, etc. Para la purificación del producto bruto I, es sumamente útil el gel de sílice. Puede realizarse cualquier revelado, por ejemplo comenzando con éter de petróleo y hexano, y la elución se lleva a cabo por adición de un disolvente polar tal como acetato de etilo, acetona, etanol o metanol. En un procedimiento típico, utilizando gel de sílice (Merck, Alemania Occidental, 0,05-0,2 mm) como soporte, se realiza una cromatografía en columna con un aumento seriado de la relación de hexano a acetato de etilo. El producto eluido se muestrea y se investiga por CCD, y las fracciones que contienen los ingredientes efectivos se reúnen y se concentran a presión reducida. Después de ello, se añade éter de petróleo o hexano al concentrado, con lo que se obtiene el producto bruto II. Como este producto contiene todavía impurezas, el mismo se purifica ulteriormente como sigue. Por ejemplo, el producto II puede purificarse por medio de una segunda columna de gel de sílice utilizando un sistema de disolventes distinto. El sistema de revelado para este fin puede estar constituido por un hidrocarburo halogenado tal como diclorometano o cloroformo, con la adición de un disolvente polar tal como un alcohol, p.ej. etanol o metanol,

una cetona, p.ej. acetona o metil-etil-cetona, o análogos. De esta manera, se aíslan la maytanacina, el propionato de maytansinol o el maytansinol. El orden de los sistemas disolventes para las columnas primera y segunda de gel de sílice puede invertirse y, adicionalmente, pueden utilizarse disolventes orgánicos ordinarios en conjunción con los sistemas anteriores, si es necesario.

Si se utiliza una resina adsorbente macroporosa como medio de purificación para el producto bruto II, la elución de la maytanacina, el propionato de maytansinol o el maytansinol se realiza con una mezcla de agua con un alcohol inferior, una cetona inferior o un éster. El alcohol inferior puede ser, por ejemplo, metanol, etanol, propanol o butanol, y la cetona inferior puede ser, por ejemplo, acetona o metil-etil-cetona. El éster puede ser, por ejemplo, acetato de etilo. En un procedimiento típico, el producto bruto II se disuelve en metanol-agua al 60% y se adsorbe en una columna de Diaion HP-10 (Mitsubishi Kasei K.K.). La columna se lava con metanol-agua al 70% y, a continuación, se lleva a cabo la elución con metanol-agua al 90%. De este modo, se eluyen de la columna la maytanacina, el propionato de maytansinol o el maytansinol.

En cualquiera de los procedimientos arriba descritos, las fracciones que contienen los componentes buscados como objetivo se reúnen y se concentran a presión reducida. Al producto seco se añaden 5 a 8 volúmenes de acetato de etilo y la mezcla se deja en reposo, con lo cual se separan los cristales de maytanacina, propionato de maytansinol o maytansinol, o bien, cuando los cristales contienen maytanacina y propionato de maytansinol, aquéllos se separan uno

de otro por medio de un adsorbente tal como los que se han mencionado anteriormente en esta memoria. Así, utilizando gel de sílice o una resina adsorbente no iónica macroporosa y los disolventes arriba mencionados, los compuestos deseados pueden eluirse fraccionadamente. Cuando, por ejemplo, se emplea gel de sílice, el revelado se realiza con hexano, acetato de etilo, o cloroformo-metanol, con lo que el propionato de maytansinol y la maytanacina emergen por este orden. Después de la detección por CCD, las fracciones se concentran respectivamente a presión reducida y se añade acetato de etilo a los concentrados. De esta manera, pueden obtenerse los compuestos respectivos como cristales. Cuando se emplea una resina adsorbente no iónica macroporosa, puede utilizarse una elución en gradiente con una relación variable de alcohol, cetona o éster a agua. Por ejemplo, por el método de elución en gradiente que implica el uso de metanol-agua al 60% y metanol-agua al 95%, con adición de cloruro de sodio al 5%, la maytanacina y el propionato de maytansinol emergen en el orden citado. Después del muestreo y la detección por CCD, cada grupo de fracciones activas se concentra a presión reducida y se cristaliza en acetato de etilo. Los cristales aislados incluyen acetato de etilo como disolvente de cristalización y, después de secado sobre pentóxido de fósforo a 70°C durante 8 horas, exhiben las características físicas y químicas siguientes. (Tabla 4).

Table 4

	Maytanacina C ₃₀ H ₃₉ ClN ₂ O ₉	Propionato de may- tansinol C ₃₁ H ₄₁ ClN ₂ O ₉	Maytansinol C ₂₈ H ₃₇ ClN ₂ O ₈
Punto de fusión (°C)	235-236°	188-190°	172,5-174°
Rotación específica	$[\alpha]_D^{22} -121 \pm 10^{\circ}$ (C=0,25, CHCl ₃)	$[\alpha]_D^{22} -127 \pm 10^{\circ}$ (C=0,35, CHCl ₃)	$[\alpha]_D^{22} -313 \pm 10^{\circ}$ (C=0,22, CHCl ₃)
Análisis encontrado (%)			
	C 59,62	59,93	59,28
	H 6,93	6,82	6,38
	N 4,28	4,32	5,02
	Cl 5,74	5,57	6,15
Análisis calculado (%)			
	C 59,85	59,94	59,52
	H 6,48	6,65	6,60
	N 4,61	4,51	4,96
	Cl 5,84	5,71	6,27

Maytenacina C ₃₀ H ₃₉ CLN ₂ O ₉	Propionato de may- tensinol C ₃₁ H ₄₁ CLN ₂ O ₉	Maytensinol C ₂₈ H ₃₇ CLN ₂ O ₈
--	---	--

Espectro de absorción en el ultravioleta nm(E)	233(30330) 240(inflexión 28240) 252(27850) 280(5680) 288(5660)	233(30240) 240(inflexión 28400) 252(27650) 280(5740) 288(5710)	232(32750) 244(inflexión 30850) 252(31650) 281(5750) 288(5700)
--	--	--	--

Espectro de absorción en el infrarrojo (cm ⁻¹)	1740,1730,1670,1580	1740,1730,1670,1580	1715,1670,1580
--	---------------------	---------------------	----------------

Espectro de masas (m/e)	545,485,470,450	559,485,470,450	503,485,470,450
-------------------------	-----------------	-----------------	-----------------

Acido, neutro o básico	Sustancia lipófila y neutra	Sustancia lipófila y neutra	Sustancia lipófila y neutra
------------------------	-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------

Reacciones de color	Reacción de Dragendorff: positiva	Reacción de Dragendorff: positiva	Reacción de Dragendorff: positiva
	Reacción de Beilstein: positiva	Reacción de Beilstein: positiva	Reacción de Beilstein: positiva

Los datos arriba mencionados de análisis elemental, rotación específica, espectros UV, espectros IR, espectros de masas, etc., están satisfactoriamente de acuerdo con los datos de maytanacina, propionato de maytansinol y maytansinol que se dan en la bibliografía de Kupchan y otros (The Journal of American Chemical Society 97, 5294 (1975)).

Los ejemplos siguientes son adicionalmente ilustrativos, pero en modo alguno limitantes de la invención, en los cuales "parte(s)" se refiere a peso a no ser que se indique otra cosa, y la relación entre "parte(s)" y "parte(s) en volumen" corresponde a la existente entre "gramo(s)" y "mililitro(s)", y "%" está basado en "peso/volumen" a no ser que se indique otra cosa.

15

Ejemplo 1

Se utilizó Nocardia N^o C-15003 (IFO 13726; FERM 3992; ATCC 31281) capaz de producir maytansinol, maytanacina y propionato de maytansinol sobre un medio (agar de extracto de levadura-extracto de malta) para inocular un fermentador de 200 partes en volumen que contenía 40 partes en volumen de un medio de cultivo de siembra (2% de glucosa, 3% de almidón soluble, 1% de harina de soja cruda, 1% de licor de maceración de maíz, 0,5% de Polypepton, 0,3% de NaCl, 0,5% de CaCO₃, pH 7,0). El medio inoculado se incubó a 28°C durante 48 horas para obtener un inóculo. Se transfirió una porción de 0,5 partes en volumen del inóculo así obtenido a un fermentador de 200 partes en volumen que contenía 40 partes en volumen de un medio de fermentación compuesto de 5% de dextrina, 3% de licor de maceración de maíz,

30

0,1% de Polypepton y 0,5% de CaCO_3 (pH 7,0), y se cultivó a 28°C durante 90 horas para dar un inóculo (cultivo de siembra).

5 Cuando se determinó por el método de dilución en serie utilizando Tetrahymena pyriformis W como organismo de ensayo y propionato de maytansinol como producto patrón, se encontró que el cultivo anterior tenía un título de 25 $\mu\text{g/ml}$.

10 Ejemplo 2

Una porción de 10 partes en volumen del inóculo (siembra) obtenido en el Ejemplo 1 se transfirió a un fermentador de 2000 partes en volumen que contenía 500 partes en volumen de un medio de cultivo de siembra (el mismo que arriba) y se incubó a 28°C durante 48 horas. Una porción de 15 500 partes en volumen del cultivo resultante se transfirió a un depósito de 50000 partes en volumen de acero inoxidable que contenía 30000 partes en volumen de medio de cultivo de siembra y se cultivó a 28°C con aireación (30000 partes en volumen/minuto), agitación [280 r.p.m. (1/2DT)] y presión interna (1 kg/cm^2) para obtener un cultivo de siembra. Se 20 utilizó este cultivo para sembrar un depósito de 200000 partes en volumen de acero inoxidable que contenía 100000 partes en volumen de un medio de fermentación similar al utilizado en el Ejemplo 1 con un grado de inoculación de 10%. El medio 25 inoculado se incubó a 28°C con aireación (100000 partes en volumen/minuto), agitación [200 r.p.m. (1/2DT)] y presión interna (1 kg/cm^2) durante 90 horas. Cuando se determinó por el mismo procedimiento que se ha descrito en el Ejemplo 30 1, se encontró que el cultivo obtenido arriba tenía un título

de 25 µg/ml.

5 A 90000 partes en volumen del cultivo obtenido arriba se añadieron 2000 partes de Hyflo-supercel[®] (Johns and Manville Products, EE.UU.) y, después de un mezclado a fondo, se filtró la mezcla sobre un filtro de presión para obtener 85000 partes en volumen de filtrado y 32000 partes de células húmedas. El filtrado (85000 partes en volumen) se agitó y se extrajo con 30000 partes en volumen de acetato de etilo. Se repitió este procedimiento una vez

10 más, Las capas de acetato de etilo se reunieron, se lavaron dos veces con porciones de 30000 partes en volumen de agua, se secaron por la adición de 500 partes de sulfato de sodio anhidro y se concentraron a presión reducida hasta 200 partes en volumen. Se añadió éter de petróleo al concentrado,

15 y el precipitado resultante se recuperó por filtración (53 partes). Este producto bruto I se agitó con 100 partes en volumen de acetato de etilo, y los insolubles se separaron por filtración. El filtrado se agitó con 10 partes

20 de gel de sílice (Merck, Alemania Occidental, 0,05-0,2 mm) y el acetato de etilo se separó a presión reducida. El residuo se cargó por el extremo superior de una columna de gel de sílice (400 partes en volumen). La elución se llevó a cabo con 500 partes en volumen de hexano, 500 partes en

25 volumen de hexano-acetato de etilo (3:1), 500 partes en volumen de hexano-acetato de etilo (1:3), 500 partes en volumen de acetato de etilo y 1000 partes en volumen de acetato de etilo-metanol (50:1), y 1000 partes en volumen de acetato de etilo-metanol (25:1), recogiendo el producto eluído en fracciones de 100 partes en volumen.

30

Una porción de 1 parte en volumen de cada frac-

ción se concentró a sequedad, y se añadió al concentrado 0,1 parte en volumen de acetato de etilo. La mezcla se depositó como una mancha a 2,5 cm del borde del fondo de una placa de gel de sílice-vidrio (Merck, Alemania Occidental, 60 F₂₅₄, 0,25 mm, 20 x 20) y se reveló hasta aproximadamente 17 cm con un sistema disolvente de acetato de etilo-metanol (19:1). Después del revelado, se llevó a cabo la detección con luz ultravioleta (2537 Å).

Las fracciones activas Nº 25-30 de Rf 0,58-0,63 y las fracciones Nº 38-40 de Rf 0,25-0,30 se recogieron y se concentraron a presión reducida hasta aproximadamente 20 partes en volumen, respectivamente. A cada uno de estos concentrados se añadieron 150 partes en volumen de éter de petróleo para obtener 5 partes de un producto bruto II y 2 partes de maytensinol bruto.

En 10 partes en volumen de acetato de etilo se disolvieron 0,5 partes del producto bruto II obtenido arriba y la solución se agitó bien con 4 partes de gel de sílice (Merck, Alemania Occidental, 0,05-0,2 mm). El acetato de etilo se separó a presión reducida. El residuo se cargó por el extremo superior de una columna de 300 partes en volumen de gel de sílice y la columna se lavó primeramente con 500 partes en volumen de cloroformo y se eluyó luego con 500 partes en volumen de cloroformo-metanol (50:1), 500 partes en volumen de cloroformo-metanol (20:1) y 500 partes en volumen de cloroformo-metanol (10:1). El producto de elución se recogió en fracciones de 25 partes en volumen.

Una porción de 0,5 partes en volumen de cada fracción se concentró a presión reducida. Se añadieron al

concentrado 0,05 partes en volumen de acetato de etilo, y la mezcla, como muestra, se sometió a cromatografía en capa delgada (sistema revelador: cloroformo-metanol = 9:1).

Las fracciones Nos. 40 y 41, con absorción a 2537 Å en la zona de Rf 0,48-0,50, se recogieron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Se añadieron al residuo 0,5 partes en volumen de acetato de etilo y la mezcla se dejó en reposo, obteniéndose 0,05 partes de cristales mezclados de maytanacina y propionato de maytansinol.

0,05 partes de los cristales mezclados anteriores de maytanacina y propionato de maytansinol se disolvieron en 5 partes en volumen de metanol, seguido por la adición de 0,1 parte de cloruro de sodio y 5 partes en volumen de agua. Se rellenó una columna con 200 partes en volumen de Diaion HP-10 (Mitsubishi Kasei K.K.) y se lavó con 600 partes en volumen de metanol-agua al 50% que contenía 5% de NaCl. La solución de muestra arriba preparada se hizo pasar a través de la columna, y se realizó una elución en gradiente utilizando 1500 partes en volumen de metanol-agua al 60% que contenía 5% de Na Cl y 1500 partes en volumen en metanol-agua al 95%. El producto eluido se recogió en fracciones de 15 partes en volumen, y se investigaron por cromatografía en capa delgada todas y cada una de las fracciones. Las fracciones 130 a 135 contenían maytanacina, y las fracciones 138-142 contenían propionato de maytansinol.

Cada grupo de fracciones se concentró y se disolvió por adición de 30 ml de agua y 50 ml de acetato de etilo. La solución se agitó en un embudo de separación y la capa de agua se separó y, después de lavar dos veces con porciones de 30 ml de agua, la capa de acetato de etilo se secó

sobre sulfato de sodio anhidro, se concentró y se dejó en reposo. De la manera arriba indicada, se obtuvieron cristales de cada grupo de fracciones. Los cristales se recogieron por filtración y se secaron. Se obtuvieron 0,013 partes de maytanacina y 0,025 partes de propionato de maytansinol.

En 3 partes en volumen de acetato de etilo se disolvieron 0,2 partes del maytansinol bruto obtenido arriba y la solución se agitó bien con 0,5 partes de gel de sílice (Merck, Alemania Occidental, 0,05-0,2 mm). El acetato de etilo se separó a presión reducida. El residuo se cargó por el extremo superior de una columna de 80 partes en volumen de gel de sílice y la columna se lavó en primer lugar con 150 partes en volumen de cloroformo y se eluyó después con 150 partes en volumen de cloroformo-metanol (50:1), 150 partes en volumen de cloroformo-metanol (20:1) y 300 partes en volumen de cloroformo-metanol (10:1). El producto eluido se recogió en fracciones de 10 partes en volumen.

Una porción de 0,5 partes en volumen de cada fracción se concentró a presión reducida. Al concentrado se añadieron 0,05 partes en volumen de acetato de etilo, y la mezcla se sometió como muestra a cromatografía en capa delgada (sistema revelador: cloroformo-metanol = 9:1).

Las fracciones N^os. 50 a 52, que absorbían a 2537 Å en la zona de R_f 0,33 a 0,38, se recogieron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Se añadieron al residuo 0,5 partes en volumen de acetato de etilo y la mezcla se dejó en reposo, obteniéndose 0,020 partes de cristales de maytansinol.

Ejemplo 3

Con agitación, 32000 partes de las células obtenidas en el Ejemplo 2 se extrajeron con 50000 partes en volumen de acetona-agua al 70% durante 3 horas y, después se filtraron sobre un filtro de presión. La extracción con 50000 partes en volumen de acetona-agua al 70% y la filtración subsiguiente se repitieron una vez más. Los filtrados se reunieron y la acetona se separó por concentración a presión reducida. El sistema acuoso resultante se hizo pasar a través de una columna de 5000 partes en volumen de Diaion HP-10 (Mitsubishi Kasei K.K.). La columna se lavó con 20000 partes en volumen de agua y metanol acuoso al 50%, seguido por elución con 15000 partes en volumen de metanol-agua al 90%. El producto eluido se concentró a presión reducida a 3000 partes en volumen y se agitó con 3000 partes en volumen de agua y 3000 partes en volumen de acetato de etilo. Se repitió el procedimiento anterior una vez más. Las capas de acetato de etilo se combinaron, se lavaron con agua, se secaron por adición de sulfato de sodio anhidro y se concentraron a presión reducida hasta 200 partes en volumen. Después de la adición de éter de petróleo, el precipitado se recuperó por filtración (280 partes). El producto bruto I arriba obtenido se purificó por medio de una columna de gel de sílice análogamente al Ejemplo 1 para recuperar 1,0 partes de producto bruto II y 0,5 partes de maytansinol bruto.

Ejemplo 4

1000 partes en volumen del cultivo del Ejemplo 2 se inocularon en un depósito de 200000 partes en volumen

de acero inoxidable que contenía 100000 partes en volumen de un medio de cultivo de siembra y el medio inoculado se incubó a 28°C con aireación (100000 partes en volumen/minuto) y agitación (200 revs. por min) durante 48 horas para preparar un cultivo de siembra. Este cultivo de siembra se transfirió a un depósito de 2000000 de partes en volumen de acero inoxidable que contenía 1 millón de partes en volumen de un medio de fermentación igual que el utilizado en el Ejemplo 1 con un grado de transplatación de 10%. El cultivo se realizó a 28°C con aireación (1000000 partes en volumen/minuto), agitación [120 revs. por min. (1/3 DT)] y presión interna (1 kg/cm²) durante 90 horas. Se encontró que el cultivo resultante tenía un título de 20 µg/ml cuando se ensayó por el procedimiento de ensayo descrito en el Ejemplo 1. A 900000 partes en volumen del cultivo arriba obtenido se añadieron 900000 partes en volumen de acetona y, después de una hora de agitación, se añadieron 20000 partes de Hyflo-Supercel (Johns & Manville, EE.UU.). La mezcla se agitó ulteriormente y se filtró en una máquina filtrante a presión. A 1700000 partes en volumen del filtrado resultante se añadieron 500000 partes en volumen de agua y, en un Podbielniak (Podbielniak Inc., EE.UU.) se extrajo la mezcla con 1000000 de partes en volumen de acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se lavó con agua, se secó por adición de sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Se añadió al concentrado éter de petróleo y el precipitado resultante se recuperó por filtración y se secó. Por el procedimiento anterior se obtuvieron 680 partes de producto bruto I. Después de ello, como en los Ejemplos 2 y 3, este producto bruto se

purificó para obtener 1,1 partes de maytenacina, 2,2 partes de propionato de maytansinol, y 0,1 parte de maytansinol.

REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

1^a.- Un método para preparar maytansinol, maytanacina o propionato de maytansinol que comprende cultivar un microorganismo que pertenece al género Nocardia y que es capaz de producir maytansinol, maytanacina o propionato de maytansinol en un medio de cultivo que contiene fuentes de carbono asimilables y fuentes de nitrógeno digestibles hasta que se acumulan sustancialmente maytansinol, maytanacina o propionato de maytansinol en aquél, y recuperar los mismos.

2^a.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1^a, en el que el producto obtenido es maytansinol.

3^a.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1^a, en el que el producto obtenido es maytanacina.

4^a.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1^a, en el que el producto obtenido es propionato de maytansinol.

5^a.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1^a, en el que el microorganismo es Nocardia Nº C-15003 (ATCC 31281; IFO 13726; FERM 3992).

6^a.- Un método para preparar maytansinol, maytanacina o propionato de maytansinol.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de treinta hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, 05. NOV. 1977

P.A.

Alberto de Elzaburu
Por Poder



GM.

