



19 ES	11 21	NUMERO 469424	10 A1
	22	FECHA DE PRESENTACION 3 mayo 1.978	

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

20 FEB. 1979

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO SH051-39688	7 abril 1.976	Japon

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D; A61K	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA 457.579 del 5.4.1977
------------------------	--	--

54 TITULO DE LA INVENCION
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE LOS ANTIBIOTICOS ANTITUMORALES MA 144-M₁ o MA 144-M₂.

71 SOLICITANTE (ES)
ZAIDANHOJIN BISEIBUTSU KAGAKU KENKYUKAI.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
14-23, 3 chome, Kamiohsaki, Shinagawa-ku, Tokyo, Japon.

72 INVENTOR (ES)
Hamao Umezawa; Tomio Takeuchi; Hiroshi Naganawa; Masaaki Ishizuka; Norio Shibamoto; Toshikazu Oki y Taiji Inui.

73 TITULAR (ES)
El mismo solicitante.

74 REPRESENTANTE
DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU.

POOR
QUALITY

RESUMEN DE LA INVENCION

1 Nuevos agentes antitumorales denominados MA 144-M₁
y MA 144-M₂, que son glicósidos de antraciclina e inhiben
el crecimiento de las bacterias Gram-positivas, v.g.
5 Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis y Sarcina lutea e
inhiben el crecimiento de los tumores animales como leucemia
L 1210, P 388 y sarcoma 180, son producidos por fermentación
de cepas de Streptomyces productoras de MA 144 y por conver-
sión química o enzimática de la aclacinomicina A o de la
10 cinerrubina A.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION1. Campo de la Invención

Esta invención se refiere a nuevos antibióticos
antitumorales que son glicósidos de la antraciclina, a pro-
15 cedimientos para su preparación y a composiciones farmacéuti-
cas que los contienen. Más especialmente, se refiere a nuevos
antibióticos antitumorales denominados MA 144-M₁ y MA 144-M₂,
a procedimientos para su preparación por fermentación de ce-
pas productoras de MA 144 pertenecientes al género Strepto-
20 myces y por conversión química o enzimática de aclacinomici-
na A o cinerrubina A, a métodos para su recuperación y purifi-
cación y a su aplicación como agentes quimioterapéuticos pa-
ra la inhibición de los tumores malignos y para el tratamien-
to de las enfermedades infecciosas causadas por bacterias
25 Gram-positivas.

2. Descripción de la técnica anterior

En el caldo cultivado de Streptomyces se han encontra-
do varios glicósidos de antraciclina. Entre ellos, la dauno-
micina y la adriamicina han sido ya aplicadas clínicamente
30 a cánceres humanos. En la continuación del estudio de los

1 antibióticos antitumorales, especialmente de los glicósidos
de antraciclina producidos por Streptomyces galilaeus MA
144-M₁, los inventores descubrieron nuevos compuestos y des-
5 pués de purificar y caracterizar basándose en sus propieda-
des físico-químicas, confirmaron que los antibióticos ahora
denominados MA 144-M₁ y MA 144-M₂ eran compuestos nuevos con
intensa actividad antitumoral y baja toxicidad en animales
y establecieron procedimientos y métodos para su preparación
y purificación.

10 La aclacinomicina A está descrita en la patente esta-
dounidense 3.988.315 y por Oki y colaboradores en J. Antibio-
tics 28; 830 (1975).

15 La cinerrubina A y la cinerrubina B están descritas
en la patente británica 846.130, patente estadounidense
3.864.480, Keller- Schierlein y colaboradores, "Antimicro-
bial Agents and Chemotherapy", pág. 68 (1970), Chemical
Abstracts 54: 1466 i (1960) y J. Antibiotics 28: 830 (1975).

20 Otros antibióticos de antraciclina con radicales
aglicóna aklavinona o é-pirromicinona están descritos en
la bibliografía siguiente:

(a) Pirromicina: Chem. Ber. 92: 1904-1909 (1959)

(b) Rutilantina: Biochem.J. 81: 101-104 (1961)

(c) Galirrubina A y B: Naturwiss. 52: 539-540 (1965)

Chemical Abstracts 64: 3896 g (1966)

25 Chemical Abstracts 67: 90573 z (1967)

(d) Aklavina: J. Bacteriol. 72: 90 (1956)

(e) Requinomicina: J. Antibiotics 25: 393 (1972).

30 Pueden encontrarse descripciones ilustrativas y com-
pendiadas de los antibióticos de antraciclina en el Index
of Antibiotics from Actinomycetes, Hamao Umezawa, Editor je-

1 fe, University Park Press, State College, Pennsylvania, Estados Unidos (1967) como sigue:

	<u>Antibiótico</u>	<u>Página, número</u>
	Aklavina	111
5	Cinerrubina A	220
	Cinerrubina B	221
	Pirromicina	542

10 En la obra Antibiotics volumen 1, Mechanisms of Action, editada por David Gottlieb y Paul D. Shaw, Spinger-Verlag New York, Inc., N.Y., N.Y. (1967), en las págs. 190-210, contiene una revisión por A. DiMarco titulada Daunomycin and Related Antibiotics.

15 El boletín de información n° 10 del International Center of Information of Antibiotics, en colaboración con WHO, Diciembre 1972, Bélgica, revisa las antraciclinas y sus derivados.

Esta memoria, en la pág. 25, se refiere a las descripciones de la amicetina: véase J.Am.Chem.Soc. 86: 3592 (1964).

20 Para una descripción de Streptomyces galilaeus, véase Arch. für Mikrobiol. 31: 356 (1958) e International Journal of Systematic Bacteriology 22: 298 (1972).

COMPENDIO DE LA INVENCION

25 Esta invención proporciona los antibióticos antitumorales de glicósidos de antraciclina denominados MA 144-M₁ y MA 144-M₂. Estos antibióticos pueden ser producidos por fermentación de cepas productoras de MA 144 pertenecientes al género Streptomyces o por conversión química o enzimática de aclacinomicina A o de cinerrubina A o de materiales
30 que las contengan, estando incluidos todos estos procedimientos

1 tos en esta invención. La conversión enzimática puede lle-
varse a cabo utilizando diversos tipos de enzimas activos
y la conversión química puede llevarse a cabo en presencia
de diversos agentes reductores. Los compuestos MA 144-M₁ y
5 MA 144-M₂ así producidos pueden ser aislados y purificados
por métodos convencionales empleados para aislar y purifi-
car antibióticos insolubles en agua, comprendiendo dichos
métodos por lo menos un procedimiento seleccionado entre el
10 grupo formado por extracción con disolvente, precipitación
con disolvente, concentración, filtración por gel, distribu-
ción en contracorriente, quelatación con iones metálicos y
adsorción seguida de elución de una resina cambiadora de
ion, un material silíceo adsorbente o un adsorbente sinté-
tico.

15 Esta invención también comprende los compuestos MA
144-M₁ y MA 144-M₂ como sólidos crudos, como sólidos purifi-
cados, como sus sales y como complejos DNA y los procedimien-
tos de preparación de los mismos, donde la solución que con-
tiene MA 144 es liofilizada después de la adición de por lo
20 menos una sustancia seleccionada entre el grupo formado por
ácido desoxirribonucleico, glicerol, azúcares, aminoácidos y
ácidos orgánicos o inorgánicos.

25 Esta invención, por lo tanto, proporciona los anti-
bióticos antitumorales MA 144-M₁ y MA 144-M₂ que:

(a) presentan actividad antimicrobiana contra las
bacterias Gram-positivas,

(b) son eficaces en la inhibición del crecimiento
de las formas sólidas y ascíticas de los tumores malignos
en mamíferos y

30 (c) presentan una elevada citotoxicidad y por lo tan

1

to inhiben el crecimiento de las células tumorales de los mamíferos en cultivos.

Las propiedades físico-químicas de los antibióticos MA 144-M₁ y MA 144-M₂ son las siguientes:

5

MA 144-M₁

Polvo amarillo que funde a 149-150°C

Fórmula empírica: C₄₂H₅₅O₁₅N

10

Máximos de absorción ultravioleta y visible a: 229 (775), 258 (335), 290 (128), 432 (155) nm en metanol, 229 (815), 259 (345), 290 (130), 432 (160) nm en metanol-HCl 0,01N y 237 (575), 250 s (405), 290 (125), 323 s (80), 526 (135) nm en metanol-NaOH 0,01N.

MA 144-M₂

15

Cristales aciculares rojos que funden a 151-152°C.

Fórmula empírica: C₄₂H₅₅O₁₆N

20

Máximos de absorción ultravioleta y visible a: 235 (600), 259 (310), 269 (170), 291 (105), 492 (165) nm en metanol, 235 (615), 259 (325), 269 (185), 291 (115), 492 (170) nm en metanol-HCl 0,01N y 237 (505), 269 (145), 292 (95), 330 (55), 554 (175), 597 (145) nm en metanol-NaOH 0,01N.

25

Los antibióticos MA 144-M₁ y MA 144-M₂ son solubles en agua acidulada, dimetilsulfóxido, metilcellosolve, metanol, etanol, acetato de etilo, acetona, cloroformo, benceno y tolueno; ligeramente solubles en agua, éter dietílico y n-hexano; dan reacción negativa con la ninhidrina y no reducen la solución de Fehling.

30

Esta invención también proporciona composiciones farmacéuticas para el tratamiento de las infecciones debidas a microorganismos Gram-positivos. Además, esta invención

1 proporciona composiciones farmacéuticas para la inhibición de los tumores malignos de los mamíferos.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

5 La Figura 1 muestra los espectros de absorción ultravioleta y visible del MA 144-M₁ en metanol.

La Figura 2 muestra el espectro de absorción infrarrojo del MA 144-M₁ en bromuro potásico.

La Figura 3 muestra el espectro de RMN de MA 144-M₁ en CDCl₃ (100 MHz).

10 La Figura 4 muestra los espectros de absorción ultravioleta y visible del MA 144-M₂ en metanol.

La Figura 5 es el espectro de absorción infrarrojo de MA 144-M₂ en bromuro potásico.

15 La Figura 6 muestra el espectro de RMN del MA 144-M₂ en CDCl₃ (100 MHz).

La Figura 7 es el espectro de absorción infrarrojo del disacárido metilado.

La Figura 8 muestra el espectro de RMN del disacárido metilado.

20 La Figura 9 muestra la curva de pH de la reacción enzimática para la formación de MA 144-M₁ y MA 144-M₂.

DESCRIPCION DETALLADA

25 Esta invención proporciona dos nuevos antibióticos de antraciclina, MA 144-M₁ y MA 144-M₂, que han resultado poseer actividad antimicrobiana y antitumoral. Más especialmente, los compuestos de esta invención presentan actividad contra las bacterias Gram-positivas, inhiben el crecimiento de diversos tumores de los mamíferos tales como leucemia L 1210 y P 388 en ratones y presentan poca toxicidad. Por
30 consiguiente, los compuestos son útiles como agentes antibac

1

terianos y como agentes antitumorales.

En el sentido utilizado aquí, el término MA 144 se refiere al antibiótico que incluye por lo menos un antibiótico seleccionado entre MA 144-M₁ y MA 144-M₂.

5

Los compuestos de esta invención pueden ser producidos por un proceso de fermentación o por reducción química o enzimática de ciertas antraciclinas conocidas de partida.

10

De acuerdo con un método de preparación, la aclacinomicina A, la cinerrubina A o una mezcla de las mismas, se convierten enzimáticamente en MA 144-M₁, MA 144-M₂ o una mezcla de los mismos. Las antraciclinas de partida pueden ser utilizadas en forma purificada, en forma de sales o en forma impura, v.g. en forma de materiales que contienen los substratos de antraciclina tales como caldos de fermentación o extractos crudos de dichos caldos.

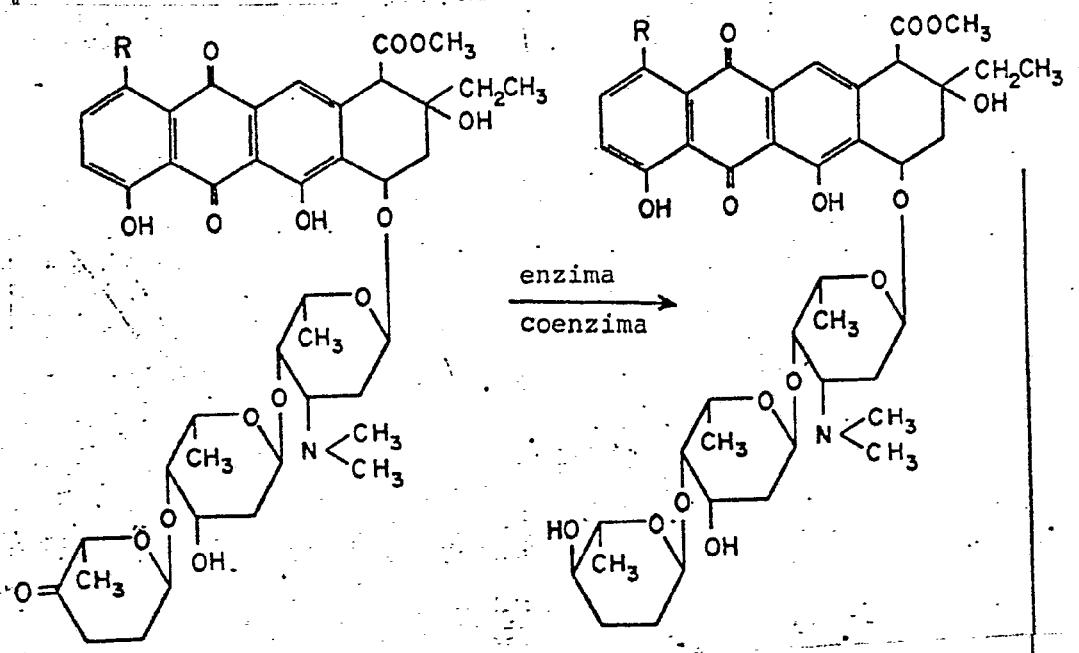
15

La conversión enzimática puede ser fácilmente observada en el siguiente esquema de reacción:

20

25

30



1 R = H (aclacinomicina A) R = H (MA 144-M₁)

R = OH (cinerrubina A) R = OH (MA 144-M₂).

5 El sistema enzimático utilizado para reducir el grupo ceto del radical sacárido cinerulosa A puede obtenerse de ciertos microorganismos pertenecientes al género Streptomyces y de diversos tejidos de mamíferos, v.g. tejidos de monos, perros, conejos, hamsters, ratas o ratones. En el caso del enzima obtenido a partir de microorganismos, las cepas pertenecientes al género Streptomyces que son capaces de producir MA 144-M₁ y MA 144-M₂ y que son descritas con más detalle más adelante, también pueden ser empleadas en forma de caldo cultivado, suspensión celular, células secas, células homogeneizadas, solución sobrenadante, enzima parcialmente purificado y enzima inmovilizado obtenidos a partir de los mismos.

15 En el caso del enzima obtenido a partir de mamíferos, también pueden utilizarse diversas fuentes enzimáticas de mamíferos como diversos órganos, tejidos, homogenados de tejidos, sus preparados secos y soluciones enzimáticas parcialmente purificadas obtenidas por desplazamiento salino, precipitación con disolvente orgánico, filtración por gel y cromatografía. Los enzimas inmovilizados obtenidos de estas fuentes de mamíferos también son adecuados en este procedimiento. La fuente de mamífero más preferida del sistema enzimático convertidor es el homogenado del hígado, v.g. homogenado del hígado de rata.

25 La reacción de conversión de aclacinomicina A en MA 144-M₁ o de cinerrubina A en MA 144-M₂ es realizada por el sistema enzimático que se obtiene de las fuentes de enzimas antes mencionadas.

30

1 Las condiciones de la reacción enzimática tales como
pH, temperatura, concentración del substrato, periodo de
reacción, coenzima, etc, dependen del estado de la enzima,
5 del material de partida utilizado, etc. En términos genera-
les, es preferible seleccionar las condiciones que aceleran
la reacción enzimática y que no inactivan al sistema enzi-
mático. En general, son preferibles temperaturas de 20 a
42°C, pH de 5,5 a 10,5, una concentración de substrato infe-
rior a 5 % y un periodo de reacción de 20 a 120 minutos.

10 La actividad enzimática de diversas fuentes utili-
zadas en esta invención y las necesidades de coenzimas para
la actividad enzimática en ratas están indicadas en la si-
guiente tabla:

TABLA I

15 Comparación de la actividad enzimática en el homogenado de
hígado de diversos mamíferos

<u>Mamíferos</u>	<u>MA 144-M₁ formado (micromoles/g de tejido)</u>
20 Cobaya	0,08
Hamster	0,24
Mono	0,38
Ratón	0,38
Conejo	0,26
25 Rata	0,37

Composición de la mezcla de reacción enzimática

Homogenado de hígado (enzima)	0,8 ml
Solución NADP (2 µg/ml)	0,1 ml
Substrato: aclacinomicina A (80 µg/ml)	0,1 ml

30 donde NADP es nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato y
la reacción se llevó a cabo durante una hora a 37°C. La de-

1 terminación se realizó utilizando cromatoexploración de onda
doble Shimazu después de extraer el producto con el disol-
vente (cloroformo/metanol 1:1).

TABLA II

5 Coenzimas requeridos para la reacción enzimática (hígado de
rata)

<u>Coenzima</u>	<u>MA 144-M₁ formado (micromoles/g de tejido)</u>
Ninguno	0
NAD	0
NADH	0
NADP	0,35
NADPH	0,37

10
15 La reacción enzimática se realizó por el método da-
do en la Tabla I. NAD es nicotinamida adenina dinucleótido,
NADH es la forma reducida de NAD, NADP es el mismo que en
la Tabla I y NADPH es la forma reducida de NADP.

20 La Figura 9 muestra el pH óptimo en la formación
enzimática de MA 144-M₁ por el homogenado de hígado de rata,
donde la línea vertical indica µg/tubo de MA 144-M₁ formados
y la solución tampón utilizada para ajustar el pH es veronal
M/10-acetato sódico en la línea continua 1 y glicina M/10-clo-
ruro sódico-hidróxido sódico en la línea de puntos 2.

25 Los compuestos de esta invención también pueden ser
preparados por reducción química de la aclacinomicina A y/o
cinerrubina A con diversos agentes reductores capaces de re-
ducir selectivamente el radical sacárido cinerulosa A al ra-
dical sacárido amicetosa del MA 144-M₁ y del MA 144-M₂. Los
30 agentes reductores preferidos son los hidruros metálicos co-
mo borchidruro sódico, hidruros de litio (v.g. LiH, LiAlH₄)

1 e hidruros de aluminio (v.g. AlH_3).

5 La reacción de reducción química en esta invención puede llevarse a cabo en un sistema disolvente individual o en un sistema disolvente mixto, que disuelva los antibió-
ticos de la invención. Las condiciones de reacción como tem-
peratura, concentración del substrato, periodo de reacción,
etc, dependen del sistema disolvente, del material de par-
tida y similares, seleccionándose preferiblemente las con-
diciones que producen el rendimiento más alto y la mayor
10 velocidad de reacción.

Además de los procesos químico y enzimático mencio-
nados anteriormente, los antibióticos MA 144 también pue-
den ser producidos fermentativamente cultivando las cepas
productoras de MA 144 antes mencionadas, en condiciones ade-
15 cuadas. Para la producción fermentativa de los antibióti-
cos de esta invención, pueden utilizarse cepas productoras
de MA 144 pertenecientes al género Streptomyces, tales co-
mo Streptomyces galilaeus MA 144-M₁ ATCC 31133 (FERM P-2455),
Streptomyces sp. ME 505-HE1 ATCC 31237 (FERM P-3667),
20 S. galilaeus ATCC 14969, S. cinereoruber ATCC 19740,
S. niveoruber ATCC 14971, S. antibioticus ATCC 8663,
S. purpurascens ATCC 25489 y mutantes de los mismos. Entre
las cepas antes mencionadas, el St. galilaeus MA 144-M₁
ATCC 31133 (FERM P-2455) ha sido aislado por estos invento-
res de una muestra de terreno recogida en Osaka,
25 Shinagawa-ku, Tokyo, Japón. Se ha depositado un cultivo de
St. galilaeus MA 144-M₁ en la American Type Culture Collec-
tion, Rockville, Maryland, Estados Unidos y en el Fermenta-
tion Research Institute, Japón y se ha incorporado a sus co-
30 lecciones permanentes de microorganismos como ATCC n°31133

1 y FERM n° 2455, respectivamente.

La cepa n° MA 144-M₁ tiene las siguientes propiedades:

5 (1) Propiedades morfológicas:

Bajo el microscopio, se observan espirales abiertas bien desarrolladas que parten del micelio de substrato ramificado. No hay vórtices y la cadena de esporas maduras es moderadamente larga con más de 10 esporas. Las esporas son elípticas y miden 0,4 a 0,8 micras x 0,8 a 1,6 micras y su superficie es lisa.

10 (2) Propiedades sobre diversos medios:

La descripción entre paréntesis responde al patrón de color del "Color Harmony Manual" publicado por Container Corporation of America, Estados Unidos.

15 (a) Sobre agar glucosa-asparagina, incubado a 27°C: crecimiento marrón amarillento claro (3 gc, tostado claro); sin micelio aéreo; sin pigmento soluble.

(b) Sobre agar sacarosa-asparagina, incubado a 27°C: crecimiento incoloro o marrón amarillento claro (3 gc, tostado claro); sin micelio aéreo; sin pigmento soluble.

20 (c) Sobre agar glicerol-asparagina (medio ISP n°5), incubado a 27°C: naranja amarillento (4 ic, tostado solar) a marrón (51 g, marrón chocolate); micelio aéreo blanco a gris claro (2 fe, gris Covert); pigmento soluble marrón.

25 (d) Sobre agar almidón-sales inorgánicas (medio ISP n° 4) incubado a 27°C: crecimiento naranja pálido (3 ea, amarillo melón claro) a marrón amarillento pálido (3 ie, camello); micelio aéreo gris claro (2 fe, gris Covert) a gris (e, gris); pigmento soluble marrón.

30 (e) Sobre agar tirosina (medio ISP n° 7) incubado a

1 27°C: micelio aéreo gris parduzco (3 li, castor) a marrón
(4 lg, tostado de parrilla), pigmento soluble negro.

5 (f) Sobre agar nutritivo incubado a 27°C: crecimiento
incoloro a marrón grisáceo; sin micelio aéreo, pigmento
soluble marrón.

10 (g) Sobre agar extracto de malta-extracto de levadura
(medio ISP n° 2) incubado a 27°C: crecimiento marrón
claro (4 le, arce) a marrón (4 ng, marrón claro); micelio
aéreo gris claro (3 fe, gris plata) a gris (3 ih, gris
beige); pigmento soluble marrón.

15 (h) Sobre agar harina de avena (medio ISP n°3) incu-
bado a 27°C: crecimiento incoloro a marrón amarillento pá-
lido (2 gc, bambú); micelio aéreo gris claro (3 fe, gris
plata); pigmento soluble marrón.

20 (i) Sobre agar glicerol-nitrato incubado a 27°C:
crecimiento incoloro a marrón amarillento pálido (3 gc,
tostado claro) o gris oliva claro (2 db, parches); sin mico-
lio aéreo; sin pigmento soluble.

25 (j) Sobre agar almidón incubado a 27°C: crecimiento
marrón amarillento pálido (3 gc, tostado claro); micelio
aéreo gris (e, gris); pigmento soluble marrón claro.

30 (k) Sobre agar malato cálcico incubado a 27°C: cre-
cimiento incoloro; micelio aéreo blanco grisáceo (b, blanco
ostra) a gris parduzco claro (3 dc, natural); sin pigmento
soluble.

(l) Sobre placa de gelatina incubada a 20°C: creci-
miento marrón pálido a marrón amarillento pálido; micelio
aéreo blanco; pigmento soluble marrón.

(m) Sobre placa de glucosa-peptona-gelatina, incuba-
da a 27°C: crecimiento marrón pálido a marrón; sin micelio

1 aéreo; pigmento soluble marrón.

(n) Sobre leche descremada incubada a 37°C: crecimiento marrón pálido a marrón; sin micelio aéreo; pigmento soluble marrón.

5 (3) Propiedades fisiológicas:

(a) Se estudió la temperatura de crecimiento sobre agar maltosa-extracto de levadura (maltosa 1,0 %, extracto de levadura 0,4 %, agar 3,5 %, pH 6,0) a 20, 24, 27, 30, 37 y 50°C. La temperatura óptima para el crecimiento es de 27 a 37°C, no habiendo desarrollo a 50°C.

10 (b) Licuefacción de la gelatina sobre placa al 15 % de gelatina a 20°C y sobre placa de glucosa-peptona-gelatina a 27°C: en el primer medio, se observa débil licuefacción de la gelatina con 14 días de incubación pero en el segundo se observa una licuefacción entre débil y moderada al cabo de 7 días de incubación.

15 (c) Hidrólisis del almidón sobre agar almidón-sales inorgánicas a 27°C: al cabo de 5 días de incubación se observó una hidrólisis débil.

20 (d) Peptonización y coagulación de la leche descremada a 37°C: al cabo de 5 días de incubación comenzó una peptonización entre moderada e intensa que terminó al cabo de unos 17 días. No se produce coagulación.

25 (e) Formación de melanina sobre agar tirosina (medio ISP n°7), caldo de tirosina-extracto de levadura (medio ISP n° 1) y agar peptona-extracto de levadura-ferroso (medio ISP n° 6) a 27°C: positiva en todos los medios.

(f) Licuefacción del malato cálcico sobre agar malato cálcico a 27°C: fuertemente positiva.

30 (g) Reducción de nitratos o de agar peptona conte-

1 niendo 1,0 % de nitrato sódico (medio ISP n° 8) a 27°C:
positiva.

5 (h) Utilización de los hidratos de carbono del me-
dio basal de Pridham-Gottlieb (medio ISP n° 9), incubado a
27°C: crecimiento abundante con L-arabinosa, D-xilosa,
glucosa, D-fructosa, sacarosa, inositol, L-ramnosa y rafi-
nosa; no se produce crecimiento con D-manitol.

10 Resumiendo todas las características anteriores
del MA 144-M₁, la cepa pertenece al género Streptomyces y:
al tipo cromogénico y produce pigmento soluble marrón en
diversos medios de agar. El micelio aéreo forma espirales
abiertas pero no vórtices. La superficie de las esporas es
15 lisa. Se ha hallado que en general el crecimiento sobre
diversos medios es de marrón amarillento pálido a marrón
pero verde oliva en algunos medios y el micelio aéreo es
gris claro. Los nitratos son reducidos a nitritos. La ac-
ción proteolítica es entre débil y moderada y la hidrólisis
del almidón es relativamente débil. Se produce melanina
sobre agar tirosina, caldo de tirosina-extracto de levadura
20 y agar peptona-extracto de levadura-ferroso.

Entre las especies conocidas de Streptomyces la
cepa n° MA 144-M₁ es semejante al Streptomyces galilaeus.
Referencia 1: Archiv für Mikrobiologie 31: 356 (1958). Re-
ferencia 2: International Journal of Systematic Bacterio-
25 logy, 22: 298 (1972). Prestando especial atención a la dife-
renciación basada en la morfología, el color del micelio
aéreo y otras propiedades fisiológicas, la diferencia en-
tre esta cepa y la cepa patrón de S. galilaeus ISP 5481
obtenida fué investigada mediante cultivos paralelos.

30 Los resultados indican que esta cepa concuerda

1

muy estrechamente con el S. galilaeus ISP 5481 en morfología y color del crecimiento y del micelio sobre diversos medios y en propiedades fisiológicas. Además, hay similitud entre ambas cepas en los productos de fermentación; es

5

decir, la cinerrubina que puede ser producida por S. galilaeus es uno de los subproductos de la cepa de esta invención. Por lo tanto, la cepa MA 144-M₁ puede ser identificada como Streptomyces galilaeus.

10

La cepa Streptomyces sp. ME 505-HE1 FERM P-3667 fué aislada también de una muestra de tierra recogida en Osaki, Shinagawa-ku, Tokyo, Japón y fué depositada en el Fermentation Research Institute, Japón y en la American Type Culture Collection y agregada a sus colecciones permanentes de microorganismos como FERM P-3667 y ATCC 31273, respectivamente. A continuación incluimos una breve descripción de sus propiedades morfológicas y fisiológicas.

15

20

Las características del Streptomyces sp. ME 505-HE1 están bajo investigación detallada. La cepa n° ME 505-HE1 tiene las siguientes características en la actualidad: bajo el microscopio, el micelio aéreo no presenta ramas verticiladas y estructura espiral. El crecimiento sobre los diversos medios es incoloro, marrón rojizo pálido a púrpura parduzco oscuro y no se forma micelio aéreo o se forma ligeramente con un color blanco a blanco rosado. Se forma un ligero pigmento soluble rojo mate. La formación de melanina es positiva. Por lo tanto, la cepa n° 505-HE1 pertenece al género Streptomyces.

25

30

Además de las cepas aisladas recientemente antes mencionadas, también pueden utilizarse en esta invención otros Streptomyces conocidos como S. galilaeus ATCC 14969,

1 S. cinereoruber ATCC 19740, S. niveoruber ATCC 14971,
2 S. antibioticus ATCC 8663, S. purpurascens ATCC 25489 y
3 mutantes de los mismos.

4 Como los Streptomyces son fácilmente mutables por
5 métodos naturales o artificiales, el S. galilaeus n° MA
6 144-M₁ y otros microorganismos de esta invención incluyen
7 la cepa típica antes descrita y todas las variantes y mu-
8 tantes naturales y artificiales de la misma. Se desea y
9 pretende especialmente incluir los mutantes productores de
10 MA 144 obtenidos a partir de las cepas antes mencionadas
11 por métodos conocidos.

12 En cuanto a la producción fermentativa de MA 144-M₁
13 y MA 144-M₂, es especialmente adecuado un cultivo aerobio
14 sumergido para la producción de cantidades grandes de los
15 antibióticos. Pueden utilizarse medios constituidos por
16 clases conocidas de fuentes nutritivas de los actinomicetes
17 y los procedimientos generales utilizados para el cultivo
18 de otros actinomicetes son aplicables al cultivo de esta
19 invención. Preferiblemente el medio contiene productos co-
20 merciales como glicerol, glucosa, almidón, dextrina, malto-
21 sa, melazas, aceites, grasas, lípidos y similares como fuen-
22 tes de carbono, en estado crudo o purificado, productos co-
23 merciales como harina de soja, extracto de malta, peptona,
24 extracto de levadura, solubles de destilería, harina de pes-
25 cado, harina de gluten, licor de infusión de maíz, harina
26 de algodón, caseína, sustancias proteicas hidrolizadas, ni-
27 tratos, sales amónicas, urea y similares como fuentes de ni-
28 trógeno; sales inorgánicas como cloruro sódico, cloruro po-
29 tásico, fosfato potásico, sulfato magnésico, carbonato cálcico
30 y cantidades traza de sales metálicas pesadas como co-

1 bre, cinc, manganeso, hierro y similares. En el cultivo
sumergido aireado, se utiliza un antiespumante como para-
fina líquida, aceite de soja, grasa o silicona. Puede em-
5 plearse cualquier temperatura de fermentación dentro del
intervalo de 20 a 35°C, a la que pueda crecer el organismo
productor de MA 144, aunque el intervalo preferido de tem-
peratura es de 25 a 30°C. El pH del medio de cultivo osci-
la entre 5 y 8,0. El periodo necesario para la producción
es habitualmente de 48 a 72 horas.

10 Para aislar MA 144-M₁ o MA 144-M₂ de la mezcla de
reacción o del caldo cultivado, se da como ejemplo el si-
guiente procedimiento:

15 Una vez completada la reacción enzimática, el MA
144-M₁ o el MA 144-M₂ de la mezcla de reacción se extrae
con disolventes orgánicos no miscibles con agua, como ace-
tato de etilo, acetato de butilo, cloroformo, benceno, n-
butanol, metilpropilcetona, cloruro de metileno, tolueno,
etc, en medio neutro o débilmente ácido. En lugar de la
20 extracción con disolvente de la mezcla de reacción o en
combinación con esta técnica, la cromatografía empleando
carbón activo, alúmina, gel de sílice, Sephadex LH-20
(marca registrada, Pharmacia Fine Chemicals AB) etc y la
distribución en contracorriente utilizando un sistema disol-
vente adecuado constituyen un procedimiento más convenien-
25 te para la recuperación y purificación de MA 144-M₁ o
MA 144-M₂. Los extractos con disolvente que contienen di-
cho compuesto se extraen de nuevo directamente o después de
concentrarlos a presión reducida, con disolventes orgáni-
cos no miscibles con agua y la capa de disolvente que con-
30 tiene MA 144-M₁ o MA 144-M₂ se mezcla con agua acidulada a

1 un pH inferior a 3,0 y después el MA 144-M₁ o el MA 144-M₂
transferido a una capa acuosa ácida se vuelve a extraer
con disolventes orgánicos adecuados. La sustancia activa
se obtiene en forma de polvo pigmentado crudo por concentra
5 ción a presión reducida hasta sequedad a partir de la solu
ción orgánica. Repitiendo estos procesos, pueden obtenerse
los compuestos en forma purificada.

Después de agregar agua a la mezcla de reacción
química, los compuestos MA 144-M₁ o MA 144-M₂ se extraen, pu
10 rifican y obtienen en forma de polvo crudo, de acuerdo con
los procedimientos antes mencionados. La solución que con
tiene el MA 144-M₁ o el MA 144-M₂ también puede ser liofili
zada sólo o por lo menos con una sustancia seleccionada en
tre suero, seroalbúmina, globulina, gelatina, glicerol,
15 azúcares, aminoácidos, ácido desoxirribonucleico y ácidos orgá
nicos o inorgánicos como ácido clorhídrico, ácido fosfórico,
ácido sulfúrico, ácido acético, ácido propiónico, ácido
oleico, ácido palmítico, ácido cítrico, ácido succínico y
ácido pantoténico. El MA 144-M₁ o el MA 144-M₂ contenidos en
20 el caldo de fermentación se obtiene por los procedimientos
de purificación antes mencionados para la mezcla de reacción
enzimática.

Con objeto de obtener MA 144-M₁ o MA 144-M₂ en forma
pura, puede realizarse una nueva purificación por cromatogra
25 fía en columna, empleando diversos adsorbentes como ácido
silícico, albúmina, Sephadex LH-20 (marca registrada, Pharma
cia Fine Chemicals AB), cambiadores de ion como resinas débil
mente ácidas y Amberlite XAD (marca registrada, Rohm and
Haas Co., Inc.) y carbón activo, filtración por gel, quelata
30 ción con diversos metales y una combinación con por lo menos

1

uno o más procesos seleccionados entre los métodos de que-
latación con iones metálicos, precipitación con disolventes,
extracción con disolventes, distribución en contracorriente,
cromatografía, concentración, adsorción en el adsorbente y
5 adsorción seguida de elución de una resina cambiadora de
ion, una tierra silícea adsorbente o un adsorbente sintéti-
co, de forma convencional que será mencionada con detalle
en los ejemplos.

5

Las siguientes son las propiedades fisicoquímicas
de los compuestos MA 144-M₁ y MA 144-M₂ puros:

MA 144-M₁

Polvo débilmente básico, lipófilo y amarillo. El
análisis elemental da los siguientes valores:

10

Encontrado: C = 62,37	Calculado: C = 61,98
H = 7,08	H = 6,81
O = 28,81	O = 29,49
N = 2,07	N = 1,72

15

Peso molecular = 814 para C₄₂H₅₅O₁₅N.

20

Los valores del punto de fusión de la rotación espe-
cífica ($[\alpha]_D^{20}$ de su solución al 1 % en cloroformo) son 149-
150° y +40°, respectivamente. Su espectro de absorción en la
región ultravioleta y en la región visible en metanol presen-
ta máximos a las siguientes longitudes de onda (Figura 1).

25

	$\lambda_{\max} \left(\frac{E^{1\%}}{1 \text{ cm}} \right)$
en metanol	299 (775), 258 (335), 290 (128), 432 (155)
en metanol-HCl 0,01N	229 (815), 259 (345), 290 (130), 432 (160)
en metanol-NaOH 0,01N	237 (575), 250 _s (405), 290 (125),

30

323_s (80), 526 (135).

s: hombro

En la Figura 1, la línea continua representa los espectros de absorción ultravioleta y en la luz visible en metanol, la línea de puntos corresponde al metanol-HCl 0,01N y la línea x - x -x corresponde al metanol-NaOH 0,01N. La Figura 2 muestra el espectro de absorción infrarrojo (pastilla de KBr). La Figura 3 muestra el espectro de resonancia magnética nuclear (100 MHz, CDCl₃).

El compuesto MA 144-M₁ es soluble en agua acidulada, dimetilsulfóxido, metilcellosolve, metanol, etanol, acetato de etilo, acetona, cloroformo, benceno y tolueno y ligeramente soluble en agua, éter dietílico y n-hexano. Por su parte, el hidrocloruro de este compuesto es soluble en agua, metanol y cloroformo pero ligeramente soluble en acetona y acetato de etilo. La solución metanólica de MA 144-M₁ es amarilla en HCl concentrado pero se vuelve pardo rojiza en ácido sulfúrico concentrado. Con acetato magnésico alcohólico, la solución presenta un color rojo que se vuelve púrpura rojizo por alcalinización. El MA 144-M₁ da reacción negativa con la ninhidrina y no reduce el licor de Fehling.

MA 144-M₂

Cristales aciculares débilmente básicos, lipófilos y rojos. El análisis elemental da los siguientes valores:

Encontrado: C = 60,43	Calculado: C = 60,79
H = 6,74	H = 6,68
O = 29,70	O = 30,84
N = 1,75	N = 1,69

para C₄₂H₅₅O₁₆N

Peso molecular = 830.

1 El punto de fusión es de 151-152°C y la rotación
específica $(\alpha)_D^{20}$ de su solución al 1. % en cloroformo) es
de +127°. El espectro de absorción en la región ultravioleta
5 y en la región visible presenta máximos a las siguientes
longitudes de onda (Figura 4):

	$\lambda_{\max} (E_1^1 \text{ cm})$
en metanol	235 (600), 259 (310), 269 (170), 291 (105), 492 (165)
en metanol-HCl 0,01N	235 (615), 259 (325), 269 (185), 291 10 (115), 492 (170)
en metanol-NaOH 0,01N	237 (505), 269 (145), 292 (95), 330 15 (55), 554 (175), 597 (145).

En la Figura 4, la línea continua se refiere a los
espectros de absorción ultravioleta y visible en me-
tanol, la línea de puntos se refiere al metanol-HCl 0,01N
15 y la línea x - x - x se refiere al metanol-NaOH 0,01N.

La Figura 5 muestra el espectro de absorción infra-
rojo (pastilla de KBr) y la Figura 6 muestra el espectro
de resonancia magnética nuclear (100 MHz, CDCl_3).

20 El compuesto MA 144-M₂ es soluble en agua ácida,
dimetilsulfóxido, metilcellosolve, cloroformo, acetato de
etilo, metanol, etanol, acetona y benceno y ligeramente so-
luble en agua, n-hexano, ciclohexano, éter dietílico y
éter de petróleo. El hidrocloruro de este compuesto es so-
luble en agua, metanol, etanol y cloroformo pero ligeramen-
te soluble en acetona y acetato de etilo. El MA 144-M₂ da
25 reacción negativa con la ninhidrina y no reduce el licor
de Fehling.

La solución metanólica es roja en ácido clorhídri-
co concentrado y se vuelve violeta en ácido sulfúrico con-
30

1 centrado. La solución aparece de color púrpura rojizo en acetato magnésico alcohólico y da un color azul purpúreo en solución en NaOH.

5 La estructura química de los compuestos MA 144-M₁ y MA 144-M₂ fué determinada de la siguiente forma:

10 Por hidrólisis del MA 144-M₁ o del MA 144-M₂ con ácido clorhídrico diluido, las propiedades fisicoquímicas obtenidas, como el espectro de absorción ultravioleta, visible e infrarrojo, el espectro de masas y resonancia magnética nuclear, el punto de fusión, el análisis elemental y los valores R_f sobre capa fina de ácido silícico de la parte de aglicona, coinciden totalmente con los de la aglicona obtenida a partir del material de partida, es decir, la aglicona del MA 144-M₁ era la aklavinona y la del MA 144-M₂ era la ϵ -pirromicinona.

15 Por otra parte, comparando los valores R_f sobre capa fina de ácido silícico de los radicales sacáridos obtenidos por hidrólisis del material de partida (aclacinomicina A o cinerrubina A) con los de los compuestos de esta invención, se detectó rodosamina y 2-desoxifucosa en ambos, pero el azúcar terminal, es decir, L-cinerulosa, era diferente. Además, el disacárido metilado, que se obtuvo a partir de MA 144-M₁ y MA 144-M₂ por metanolisis parcial en metanol conteniendo ácido clorhídrico 0,1N a la temperatura ambiente, se extrajo con éter, se purificó por cromatografía en columna de ácido silícico y Sephadex LH-20 (marca registrada) y después se cristalizó en éter en forma de placas cristalinas blancas.

20
25
30 Las propiedades fisicoquímicas del disacárido metilado son las siguientes:

Análisis elemental, %:

Encontrado: C = 57,09 Calculado: C = 56,51
 H = 8,61 H = 8,75
 O = 34,30 O = 34,74

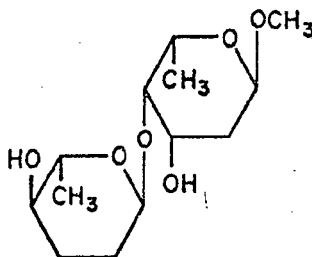
para $C_{13}H_{24}O_6$

Peso molecular = 276

Punto de fusión: 87 a 91°C (punto de sublimación)

Rotación específica: $[\alpha]_D^{20} = -161^\circ$ (c = 1,0, cloroformo).

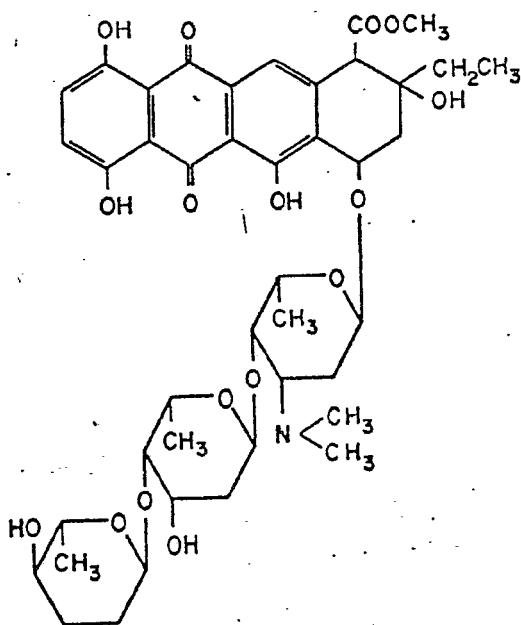
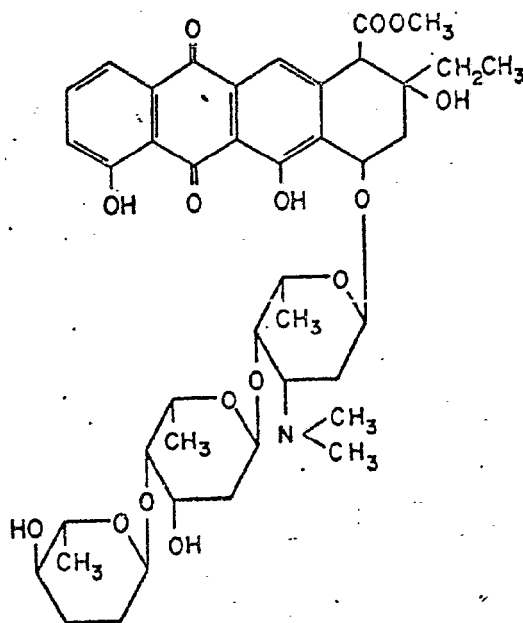
Los espectros de absorción en las regiones ultravioleta y visible del disacárido metilado presentan absorción terminal y sus espectros de absorción infrarrojo y de RMN están indicados en las Figuras 7 y 8, respectivamente. De los resultados analizados, se deduce que la estructura del metildisacárido es:



Los metildisacáridos obtenidos a partir de MA 144-M₁ y MA 144-M₂ presentan propiedades fisicoquímicas idénticas. Basándose en el análisis elemental, espectros de absorción en las regiones infrarroja, ultravioleta y visible, espectro de RMN, punto de fusión y valores R_f sobre capa fina de ácido silícico, se demuestra que la metanolisis de MA 144-M₁ y MA 144-M₂ producen respectivamente 1-desoxipirromicina y pirromicina.

De los resultados antes mencionados se deduce que las

1 estructuras de los compuestos MA 144-M₁ y MA 144-M₂ de esta
5 invención son las siguientes:



30 Aunque son conocidos varios antibióticos glicósidos de antraciclina con radicales aglicona aclavinona y ε-pirro-micinona, los compuestos MA 144-M₁ y MA 144-M₂ son claramen-

1 te diferentes de cualquiera de ellos en características como
fórmula molecular, productos de degradación por hidrólisis
5 ácida, espectros de absorción ultravioleta, visible, infra-
rojo y RMN y similares, como ya se ha indicado. Como se ha
dicho antes, el MA 144-M₁ y el MA 144-M₂ se diferencian de
sus materiales de partida, aclacinomicina A y cinerrubina A,
en su azúcar terminal. (Referencias: 1. The Journal of
Antibiotics 28, n°10: 830-834 (1975). 2. Antimicrobial Agents
and Chemoterapy: 68-77 (1970).

10 La amictosa, que es el azúcar terminal de estos com-
puestos, ha sido identificada solamente en el antibiótico
amicetina. (Referencia: J.Am.Chem.Soc. 86: 3592-3594 (1964))
Entre los antibióticos del tipo de la rodomicina, hay un
antibiótico con un radical azúcar similar, la rodosamin-2-
15 desoxifucosa-rodinosa, pero se diferencia claramente de los
compuestos MA 144-M₁ y MA 144-M₂ en su aglicona y su azúcar
terminal. (Referencia: Pharmazie 27: 782-789 (1972)).

Por lo tanto, se comprueba que los compuestos MA
144-M₁ y MA 144-M₂ son sustancias nuevas.

20 Para clarificar mejor las propiedades del MA 144-M₁
y del MA 144-M₂, se dan a continuación los valores Rf sobre
capa fina de ácido silícico, utilizando diversos sistemas
disolventes:

25

Sistema disolvente	Valores Rf	
	MA 144-M ₁	MA 144-M ₂
(1) cloroformo/metanol 10:1	0,45	0,45
(2) cloroformo/metanol 20:1	0,11	0,11
(3) acetona	0,38	0,28
(4) acetato de etilo	0,024	0,024

30

Las actividades biológicas del MA 144-M₁ y MA 144-M₂

1 son las siguientes:

(1) El MA 144-M₁ y el MA 144-M₂ presentan actividad antimicrobiana frente a diversos tipos de microorganismos. La concentración mínima de inhibición de estos compuestos, 5 determinada por el método de dilución del caldo, está indicada en la Tabla III.

TABLA III

Concentración mínima de inhibición (CMI, µg/ml) de MA 144-M₁

Organismo de ensayo	y MA 144-M ₂		
	MA 144-M ₁	MA 144-M ₂	
<u>Staph. aureus</u>	FDA 209P	3,1	0,78
<u>Staph. aureus</u>	Smith	0,2	0,1
<u>Bac. subtilis</u>	ATCC 6633	0,4	0,05
15 <u>Bac. cereus</u>	ATCC 9634	0,78	0,05
<u>Bac. megaterium</u>	NRRL B-938	3,1	0,78
<u>Sarcina lutea</u>	ATCC 341	0,05	0,05
<u>Mic. flavus</u>		0,2	0,2
<u>Cory. bovis</u>		0,4	0,1
20 <u>Ps. fluorescens</u>	NIH JB-254	>100	>100
<u>Proteus morgani</u>	(Institute for Infectious Diseases)	>100	>100
<u>Mycobac. smegmatis</u>	ATCC 607	2,5	1,25
<u>Strep. pyogenes</u>	NY 5	1,25	0,63
25 <u>Can. albicans</u>	IAM 4905	100	50
<u>Can. tropicalis</u>	IAM 4942	>100	100

Como ya se ha dicho, los compuestos MA 144-M₁ y MA 144-M₂ presentan actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram-positivas y por lo tanto son terapéuticamente 30 útiles en el tratamiento de la difteria, tuberculosis, pneumo

1

nía, tétanos, enfermedades infecciosas causadas por Staphylococcus y Streptococcus, etc.

5

(2) Los compuestos MA 144-M₁ y MA 144-M₂ también presentan una marcada actividad antitumoral con baja toxicidad y se ha demostrado que son eficaces para uso farmacéutico como agentes anticancerígenos.

(a) Eficacia terapéutica sobre ratones portadores de L1210.

10

Dosis (mg/kg/día)	Prolongación del tiempo de supervivencia (%)	
	MA 144-M ₁	MA 144-M ₂
10	90	-
5	200	46
2,5	192	85
1,25	137	200
0,625	123	192
0,313	110	144
0,156	110	116

15

CDF₁-L1210. La droga fué administrada intraperitonealmente desde el día 0 hasta el día 10.

20

(b) Eficacia terapéutica sobre ratones portadores de P388.

25

Dosis (mg/kg/día)	Prolongación del tiempo de supervivencia (%)	
	MA 144-M ₁	MA 144-M ₂
5	100	57
2,5	184	83
1,25	149	206
0,625	135	148
0,313	110	125

30

CDF₁-P388. La droga fué administrada por vía intraperitoneal desde el día 1 hasta el día 9.

1 (c) Eficacia terapéutica sobre el tumor sólido Sarcoma 180

Dosis (mg/kg/día)	Peso del tumor (g)		% de inhibición del crecimiento del tumor	
	MA 144-M ₁	MA 144-M ₂	MA 144-M ₁	MA 144-M ₂
5	0,38	tóxico	77,4	-
2,5	0,65	0,28	61,3	83,3
1,25	0,81	0,39	51,9	76,8
0,6	0,78	0,90	53,7	46,5
0,3	1,25	1,41	25,5	16
Control	1,68	-	0	-

5
10 Unos ratones dd fueron inoculados con 2×10^6 células de Sarcoma 180 y la droga fué administrada intraperitonealmente desde el día 1 hasta el día 10.

(3) Toxicidad aguda

15 En la siguiente tabla se dan los valores de la DL₅₀ del MA 144-M₁ y MA 144-M₂.

Animal	Vía	DL ₅₀ (mg/kg)	
		MA 144-M ₁	MA 144-M ₂
ratón	i.p.	35	12,5
	i.v.	30-35	12-20
rata	i.p.	25-30	10-15
	i.v.	25-30	10-15

(4) Citotoxicidad

25 Los compuestos MA 144-M₁ y MA 144-M₂ inhiben el crecimiento de las células tumorales de los mamíferos en cultivo, especialmente a baja concentración e inhiben por completo la síntesis de RNA. En este experimento, se inocularon células de L1210 en medio RPMI 1640 (Nissui, Roswell Park Memorial Institute 1640) conteniendo 10 % de suero de ternera y se cultivaron a 37°C durante 3 días en un incubador de CO₂, agregan

30

1 do después MA 144-M₁, MA 144-M₂ y precursor ¹⁴C a diversas
concentraciones. En la siguiente tabla se encuentran los
efectos sobre la síntesis de proteínas, RNA y DNA, expresa-
dos como concentración de inhibición al 50 % (µg/ml). De los
5 resultados se deduce que el MA 144-M₁ y el MA 144-M₂ inhiben
marcadamente el crecimiento de las células L1210 cultivadas
y la síntesis del RNA a concentración baja. Estos resultados
ponen de manifiesto la eficacia terapéutica sobre tumores
experimentales en animales.

10 Efectos del MA 144-M₁ y del MA 144-M₂ sobre el crecimiento y

síntesis macromolecular en células L1210 cultivadas

	DI ₅₀ (µg/ml)	
	MA 144-M ₁	MA 144-M ₂
15 Células L1210		
crecimiento	0,12	0,05
síntesis de DNA	1,7	1,0
síntesis de RNA	0,7	0,5
síntesis de proteínas	10*	-

20 * % de inhibición a una concentración de 10 µg/ml

Como se ha mencionado antes, los compuestos MA 144-M₁ y
MA 144-M₂ ejercen una marcada acción inhibitoria de los tumo-
res malignos en mamíferos, especialmente sobre los tumores
ascíticos y sólidos y la leucemia. Por lo tanto, los compues-
tos MA 144-M₁ o MA 144-M₂, sus sales o sus complejos, pueden
25 ser utilizados como agentes terapéuticos frente a los tumores
malignos de tipo sólido y ascítico.

Los compuestos de esta invención forman sales de adición
de ácidos no tóxicos con diversos reactivos orgánicos e inor-
gánicos formadores de sales y complejos no tóxicos con los
30

1 ácidos nucleicos. Así, las sales de adición de ácido forma-
das con ácidos orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente
aceptables como sulfúrico, fosfórico, clorhídrico, acético,
propiónico, oleico, palmítico, cítrico, succínico, tartárico,
5 glutámico, pantoténico, etc, pueden emplearse de la misma
forma que los compuestos MA 144 propiamente dichos. Estas sa-
les se forman, aislan, purifican y formulan por los métodos
generalmente empleados en la formación de sales de los anti-
bióticos. Por ejemplo, el antibiótico seleccionado y el
10 ácido deseado se disuelven independientemente en un disolven-
te apropiado, en el que las sales sean poco solubles, v.g.
éter etílico y acetona o su mezcla y después se combinan. La
solución se concentra si es necesario y se enfría, dando los
cristales de la sal de adición de ácido que se recogen y
15 secan para obtener un polvo cristalino. Las sales resultan-
tes presentan mayor solubilidad en agua que los correspondien-
tes antibióticos y son preferiblemente utilizadas en aplica-
ciones terapéuticas. Al aplicar los antibióticos de esta
invención, también es útil terapéuticamente un complejo no
20 tóxico como el complejo DNA. En este caso, puede utilizarse
el DNA extraído de animales y microorganismos como el timo
de la ternera, células Hela, células embrionarias humanas
y animales, levaduras, etc. La preparación de los complejos
DNA-MA 144 puede realizarse por métodos descritos en la bi-
25 bliografía para la preparación de complejos de DNA de otros
antibióticos de antraciclina, tales como adriamicina, dauno-
rrubicina, etc [véase, por ejemplo, Nature, New Biol. 239:
110 (1973) y Europ. J. Cancer 10: 399 (1974)]. Para los fines
de esta invención, los compuestos en forma de base libre son
30 equivalentes a sus sales de adición de ácidos no tóxicos y

1 complejos.

De acuerdo con otro aspecto de esta invención, se proporciona un método para tratar terapéuticamente a un mamífero, incluidos los seres humanos y los demás animales, afectados de leucemia, cuyo método consiste en administrar al hombre o a los animales una dosis inhibidora de la leucemia de MA 144-M₁, MA 144-M₂ o una mezcla de ambos.

De acuerdo con otro aspecto de esta invención, se proporciona una composición farmacéutica que contiene MA 144-M₁ o MA 144-M₂ o una mezcla de los mismos, en cantidad suficiente para reducir la afección de leucemia in vivo, siendo combinados el MA 144-M₁, el MA 144-M₂ o ambas sustancias a la vez con un vehículo o diluyente inerte y farmacéuticamente aceptable. Se observará que las cantidades reales preferidas de la sustancia MA 144 utilizada variará de acuerdo con el compuesto particular empleado, con la composición particular formulada, con la forma de aplicación y con el lugar y organismo particulares en tratamiento. Los expertos en la técnica tendrán en cuenta muchos factores que modifican la acción de la droga, por ejemplo edad, peso corporal, sexo, dieta, tiempo de administración, vía de administración, velocidad de excreción, combinaciones de drogas, sensibilidades reactivas y gravedad de la enfermedad. Las dosis de aplicación óptimas para una serie dada de condiciones pueden ser determinadas por los expertos en este campo, utilizando los ensayos convencionales de determinación de la dosis a la vista de las guías anteriores.

Cuando se inyectan por vía parenteral, el MA 144-M₁ o el MA 144-M₂, sus sales o sus complejos, se disuelven en agua destilada para inyección o en solución salina fisiológica y

1 se inyectan por vía intraperitoneal, intravenosa, subcutánea
o local en el animal huésped. La dosis y la vía de inyección
deben tener en cuenta los resultados de los experimentos
con animales, el estado de los pacientes y de los animales
5 experimentales, la edad, el peso corporal, el sexo, la sensi-
bilidad, el programa de inyección, el periodo de inyección
y la combinación con otras drogas. La administración puede
llevarse a cabo de forma continua o periódica, dentro de la
dosis tolerada máxima. Los compuestos MA 144-M₁ o MA 144-M₂,
10 sus sales o sus complejos de acuerdo con esta invención tam-
bién pueden ser administrados por vía oral en forma de ta-
bletas, píldoras, cápsulas, polvos y gránulos o suspensio-
nes y similares.

15 Los siguientes ejemplos se dan con fines ilustrativos
solamente y no se pretende que limiten el alcance de la in-
vención.

EJEMPLO 1

20 Una mezcla de los hígados aislados de 10 ratas Wistar
(300 g, ♂) y 10 volúmenes de tampón Tris 10mM (pH 7,8) con-
teniendo 10 milimoles de cloruro magnésico y 0,25 moles
de sacarosa se homogeneiza en un homogeneizador de Teflon
y se centrifuga a 10.000 rpm durante 20 minutos. El líquido
quesobrenada obtenido (400 ml) se mezcla con 50 ml de cine-
25 rrubina A a una concentración de 5 mg/ml y 50 ml de NADP
a una concentración de 6 mg/ml, se distribuyen fracciones
de 50 ml en matraces de 500 ml y se incuba a 40°C durante
una hora en un sacudidor giratorio. Se interrumpe la reac-
ción por adición de dos volúmenes de una mezcla fría de clo-
30 roformo-metanol 1:1. Esta solución se mezcla bien y se se-
para de la capa de cloroformo y la fracción activa residual

1 que queda en la capa acuosa se extrae de nuevo con un volumen
igual de cloroformo.

5 Se combinan las dos capas de cloroformo, se concentran
a presión reducida, se aplican sobre placas de capa fina de
ácido silícico y se desarrollan con cloroformo-metanol (10:1)
para la preparación. Después de la cromatografía, se rasca
la banda correspondiente al MA 144-M₂ y el MA 144-M₂ se ex-
trae con metanol, se concentra a presión reducida y se cris-
taliza en una mezcla de cloroformo/n-hexano. Se obtienen
10 51,3 mg de cristales aciculares rojos de MA 144-M₂.

EJEMPLO 2

15 Utilizando homogenados de hígado de ratón como fuente
de enzimas, se tratan 100 mg de aclacinomicina A siguiendo
el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 (el coenzima uti-
lizado es NADP) y se obtienen 48,5 mg de MA 144-M₁ en forma
de polvo amarillo.

EJEMPLO 3

20 Utilizando rebanadas de hígado fresco de conejo como
fuente de enzimas, se incuban 200 mg del substrato mixto
que contiene 35,5 mg de cinerrubina A y 112,5 mg de aclaci-
nomicina A con rebanadas de hígado y coenzima NADP en 1000 ml
de solución de magnesio-sacarosa-Tris (pH 7,8) como se des-
cribe en el Ejemplo 1.

25 La mezcla de reacción se extrae con cloroformo y a la
capa clorofórmica (100 ml) se añaden 20 ml de CuSO₄.5H₂O al
1 %. Después la solución se sacude fuertemente, se añaden
una solución 10⁻³ M de EDTA a la capa de cloroformo separada
de la capa acuosa y se sacude fuertemente y después la capa
de cloroformo se lava sacudiéndola dos veces con una pequeña
30 cantidad de agua. Se concentra el extracto clorofórmico obte-

1 niéndose 51 mg de MA 144-M₁ en forma de polvo amarillo por
adición de n-hexano. Se centrifuga la capa acuosa inicial que
contiene el complejo precipitado de MA 144-M₂ quelatado con
Cu⁺⁺ y el precipitado se lava con acetona, se disuelve en
5 10 ml de HCl 0,1N y se extrae con un volumen igual de aceta-
to de etilo. El extracto se lava dos veces con agua saturada
de NaCl, se lava de nuevo con agua y se concentra a presión
reducida. Por adición de n-hexano al concentrado, se obtie-
nen 10,5 mg de MA 144-M₂ en forma de polvo rojo.

10 EJEMPLO 4

Se disuelve 1 g de aclacinomicina A en 40 ml de ace-
tato de etilo, se mezcla con 40 ml de agua conteniendo 100 mg
de borohidruro sódico y se sacude fuertemente durante 20 mi-
nutos a la temperatura ambiente, en un embudo de separación.
15 La mezcla de reacción se deja en reposo, se separa de la
capa de acetato de etilo y el extracto se lava con solución
saturada de NaCl que contiene 10⁻⁵M de EDTA, se lava dos ve-
ces con agua y después se concentra y se deshidrata con sul-
fato sódico anhidro. Después de cromatografiar en una colum-
na de ácido silícico (3 x 20 cm) utilizando una mezcla de
20 tolueno-metanol 100:3, se reúnen las fracciones activas que
contienen MA 144-M₁, se concentran y se agregan sobre n-he-
xano. El precipitado amarillo resultante de MA 144-M₁ pesa
450 mg.

25 EJEMPLO 5

Se disuelven 2 g de cinerrubina A en 80 ml de una mez-
cla de acetato de etilo-cloroformo-metanol 10:1:1, se mezcla
con 80 ml de agua que contienen 200 mg de borohidruro sódico
y se sacude fuertemente durante 20 minutos a la temperatura
30 ambiente, en un embudo de separación. Se continúa purificando

1 siguiendo el método del Ejemplo 1, obteniéndose 760 mg de
MA 144-M₂ de acetato de etilo-n-hexano en forma de cristales
aciculares rojos.

EJEMPLO 6

5 Se prepara un medio nutritivo de la siguiente compo-
sición:

	Almidón de patata	2 % en peso/volumen
	Glucosa	2
10	"Meat" (marca registrada de Soybean Powder)	2,5
	KH ₂ PO ₄	0,1
	K ₂ HPO ₄	0,1
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1
	NaCl:	0,3
15	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,0005
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0005
	Silicona	0,005 (pH 7,2).

20 Se esterilizan 50 ml de este medio a 120°C durante 15
minutos, en un matraz de 500 ml, que se inocula con 1 ml de
cultivo congelado de Streptomyces galilaeus MA 144-M₁ (FERM
P-2455) y se incuba a 30°C durante 48 horas en un sacudidor
rotatorio. Se inoculan asépticamente 10 litros del medio pre-
viamente esterilizado en un fermentador vibratorio de acero
25 inoxidable, de 20 litros, con 200 ml del cultivo de siembra
anterior. La fermentación se realiza a 30°C durante 18 horas
con agitación (300 rpm) y aireación (5 litros/minuto). Des-
pués se transfieren 10 litros de este cultivo a 600 litros
del medio previamente esterilizado en un tanque de acero ino-
30 xidable de 1000 litros como segunda siembra y se cultiva a
30°C durante 48 horas, con agitación (180 rpm) y aireación

1 (200 litros/minuto).

5 El caldo cultivado obtenido (570 litros) se ajusta a pH 5,0 con ácido sulfúrico y se filtra con tierra de diatomeas. La torta filtrada resultante (54 kg) se suspende en 7 litros de acetona y se filtra después de agitar durante 3 horas. El residuo se extrae de nuevo con 85 litros de acetona. Ambos extractos se concentran a 40 litros a presión reducida, se agregan sobre 25 litros de acetato de etilo y se agitan. Después de separar la capa de acetato de etilo y 10 concentrar hasta 1 litro bajo presión reducida, la mezcla cruda de aclacinomicina A se precipita por adición de n-hexano al concentrado y después se obtienen 16 g de un polvo amarillo anaranjado una vez que se ha lavado dos veces con una mezcla de n-hexano/acetato de etilo 50:1.

15 Este polvo crudo se disuelve en 200 ml de acetato de etilo, se aplica sobre una columna rellena con 700 g de Column-Lite (nombre comercial de Fuji Chemical Co. para el ácido silícico) y se eluye con una mezcla de acetato de etilo/metanol 1:1. El eluato amarillo se concentra a sequedad a 20 presión reducida. El polvo de aclacinomicina cruda obtenido (12 g) se disuelve en 100 ml de cloroformo, se sacude con 50 ml de tampón de EDTA 10^{-3} M - fosfato 0,01M (pH 6,8) para separar los iones metálicos residuales y la capa de cloroformo se lava dos veces con agua, se seca con sulfato sódico 25 anhidro y después se concentra a sequedad bajo presión reducida. Se obtienen 11 g de un polvo amarillo que contiene aclacinomicina A.

30 Este polvo se disuelve en una pequeña cantidad de tolueno, se aplica a una columna de ácido silícico (4 x 40 cm) y se eluye. La aclacinomicina A, B y otras impurezas se eluyen

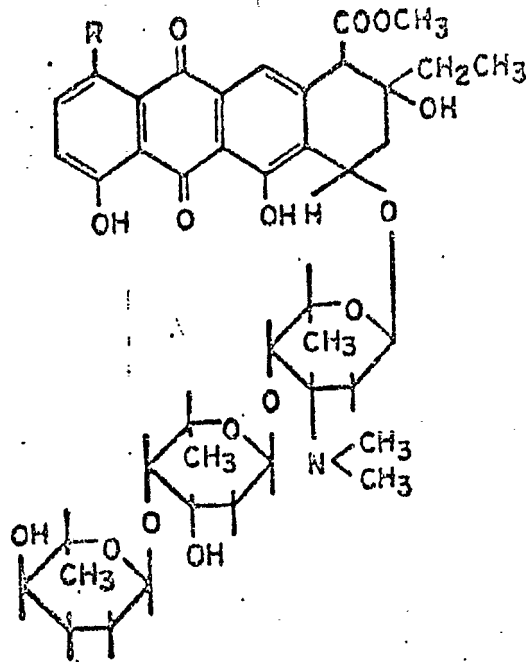
1 con tolueno que contiene 2 % en volumen de metanol y des-
pués la fracción de MA 144-M₁ se eluye con tolueno que con-
tiene 3 % de metanol y se concentra a sequedad para dar
10,5 mg de MA 144-M₁ en forma de polvo amarillo.

5 La columna de Column-Lite antes mencionada, des-
pués de eluir las fracciones amarillas, se trata con una
mezcla de metanol al 30 % que contiene EDTA 10⁻³M y el elua-
to rojo resultante se evapora a sequedad para dar 5,0 g de
un polvo rojo que contiene cinerrubina A. Este polvo rojo
10 se trata con EDTA y se cromatografía en una columna de áci-
do silícico como se ha descrito para el MA 144-M₁. Se obtie-
nen 6,2 mg de MA 144-M₂ en forma de polvo rojo.

En resumen, la Patente de Invención que se solici-
ta deberá recaer sobre las siguientes:

15 REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de los an-
tibióticos antitumorales MA 144-M₁ o MA 144-M₂ de fórmula
general



1 donde R representa un átomo de hidrógeno en el caso de MA
144-M₁ o un grupo hidroxilo en el caso de MA 144-M₂ o una
sal de adición acida, no tóxica de los mismos, cuyo proce-
dimiento comprende

5 a) reducir químicamente aclacinomicina A en el
caso de MA 144-M₁ o cinerrubina A en el caso de MA 144-M₂,
con un agente reductor seleccionado entre el grupo formado
por borohidruro de sodio, hidruros de litio e hidruros de
10 aluminio en un sistema disolvente único o en un sistema di-
solvente mixto, y

b) opcionalmente, recuperar el MA 144-M₁ o el MA
144-M₂ de la mezcla de reacción con o sin salificación.

15 2. Un procedimiento según la reivindicación 1,
donde el caldo de cultivo de un treptomyces productor de
alcacinomicina A o cinerrubina A, se usa como fuente de
aclacinomicina A o cinerrubina A.

20 3. Un procedimiento según la reivindicación 1,
donde el MA 144-M₁ o el MA 144-M₂ producido en la mezcla de
reacción se extrae y purifica por un procedimiento que com-
prende por lo menos un proceso seleccionado entre el grupo
formado por extracción con disolventes, precipitación con
disolventes, concentración, distribución en contracorrien-
te, quelatación con iones metálicos, adsorción en un adsor-
bente y adsorción seguida de elución de una resina cambia-
25 dora de ion, una tierra silícea adsorbente o un adsorbente
sintético.

30 4. Un procedimiento según la reivindicación 1,
donde la solución que contiene MA 144-M₁ o MA 144-M₂ se
concentra a sequedad o se liofiliza.

5. Un procedimiento según la reivindicación 1,

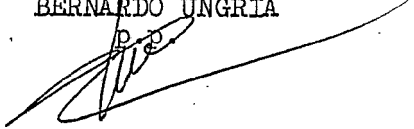
1 donde la solución que contiene el MA 144-M₁ o el MA 144-M₂
se concentra a sequedad o se liofiliza después de la adi-
ción de por lo menos una sustancia seleccionada entre el gru-
po formado por suero, seroalbúmina, seroglobulina, glice-
5 rol, gelatina, azúcares, aminoácidos, ácido desoxirribonu-
cleico y ácidos orgánicos e inorgánicos.

6. Se reivindica por último como objeto sobre
el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE LOS ANTIBIOTICOS
10 ANTITUMORALES MA 144-M₁ o MA 144-M₂.

Todo conforme queda descrito y reivindicado en
la presente memoria descriptiva que consta de cuarenta y
una página mecanografiadas y dibujos que se acompañan.

15 Madrid, 3 mayo 1.978

BERNARDO UNGRIA



20

25

30

FIG.1

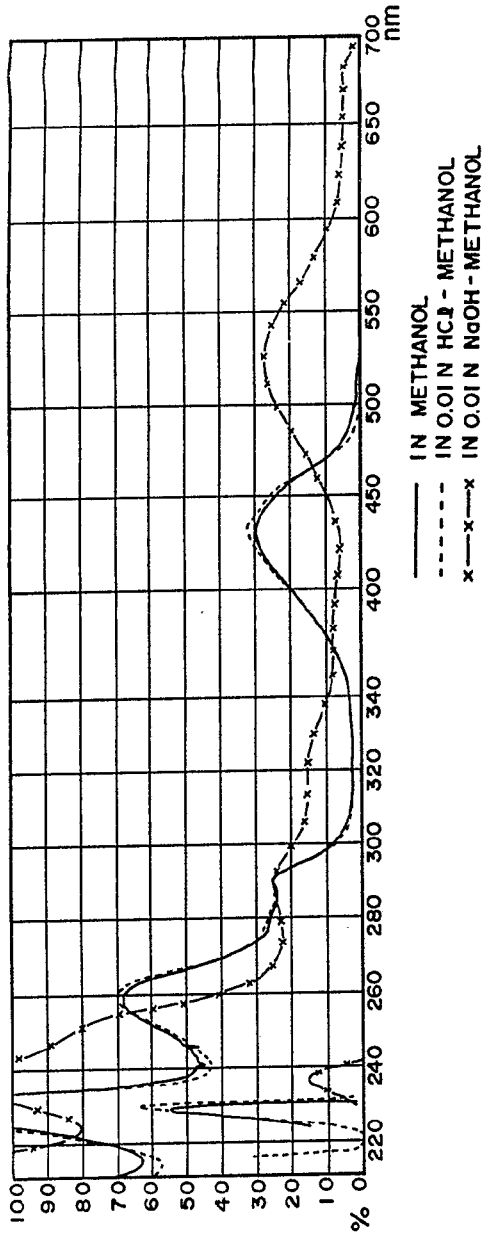
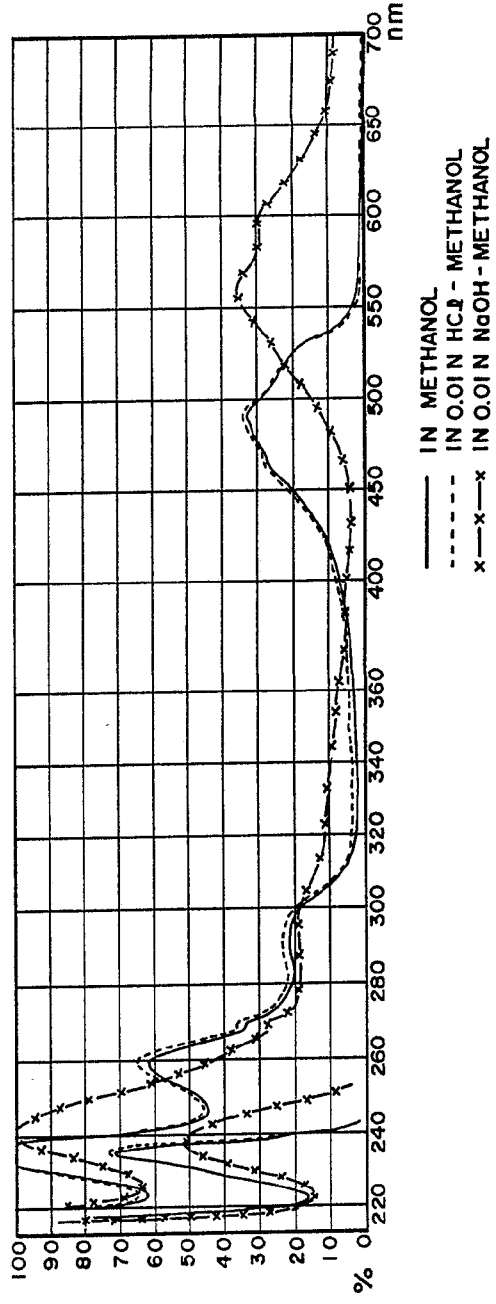


FIG.4



ESCALA VAFABILL
 Madrid, 3 de Mayo de 1978
 BERNARDO UNGRIA
 P.P.

FIG.1

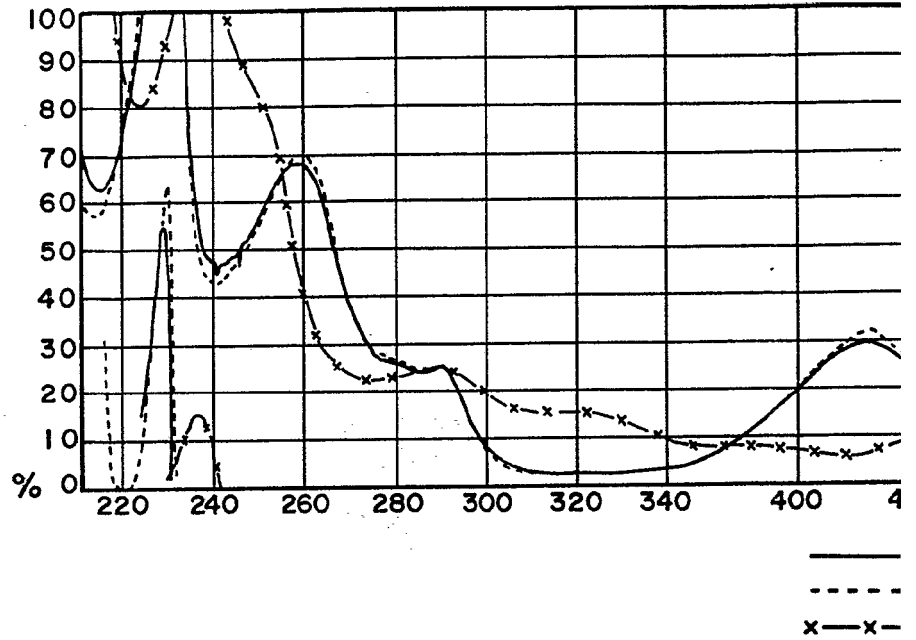
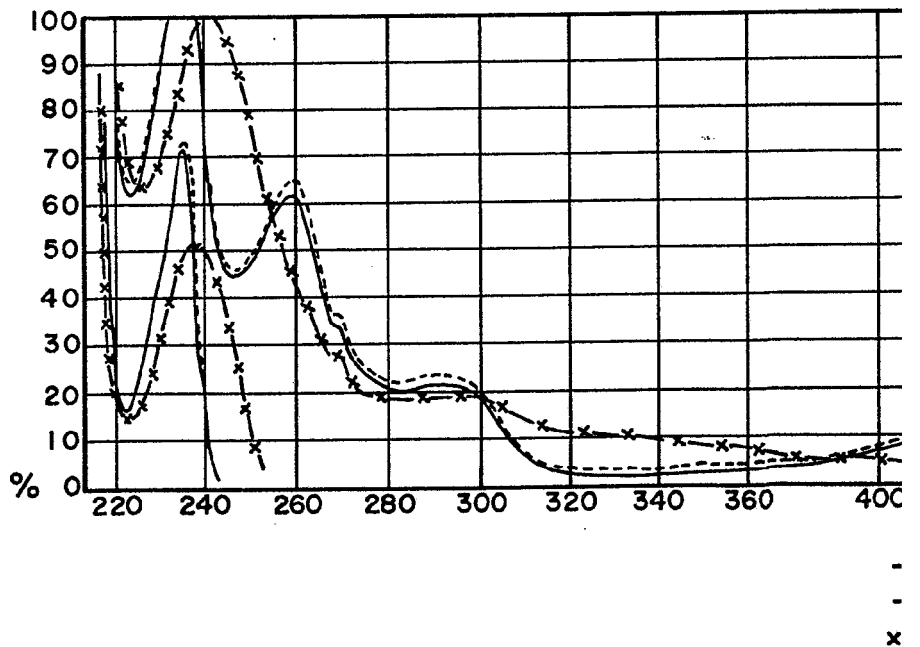


FIG.4



POOR
QUALITY

FIG.1

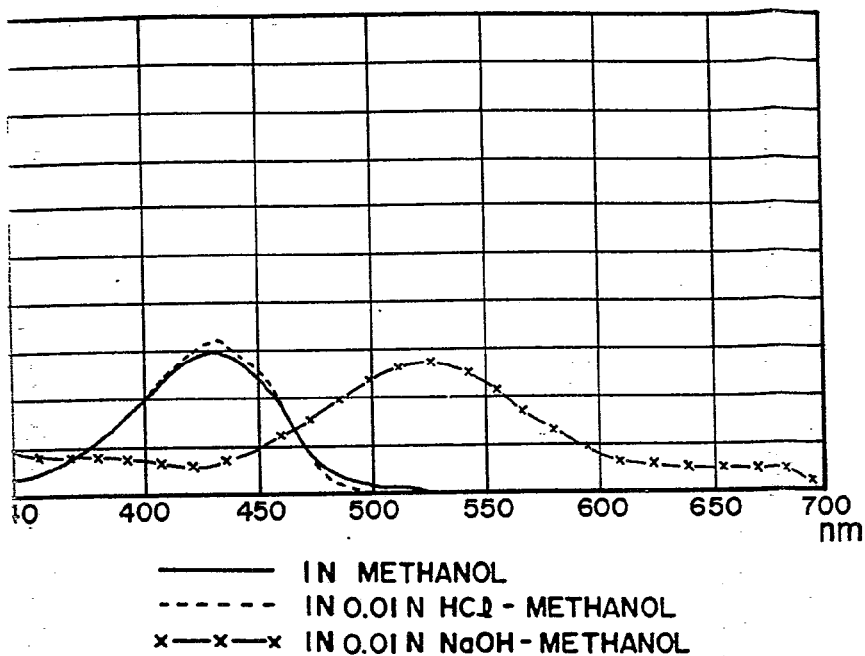
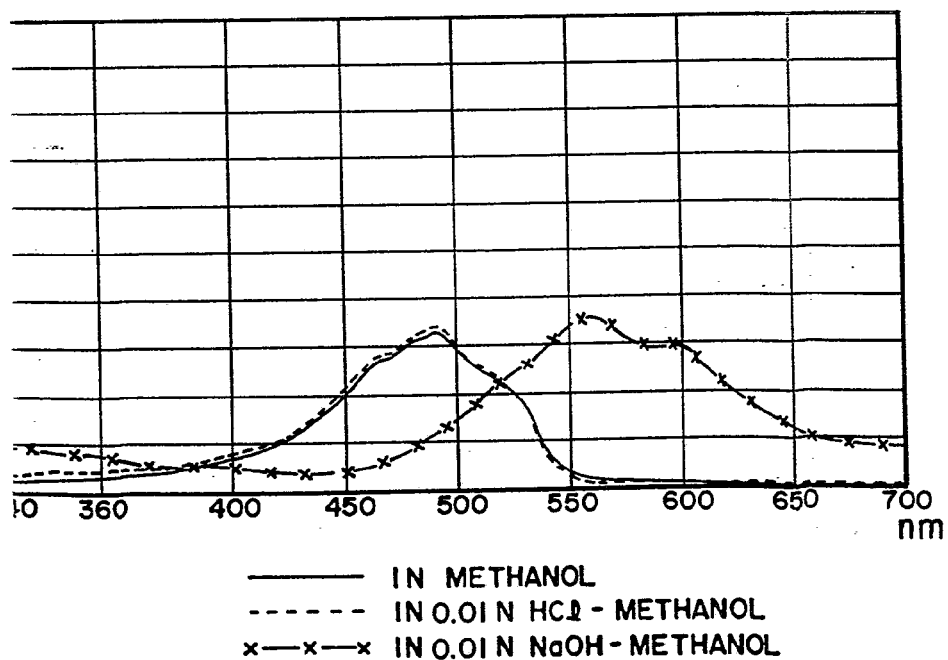


FIG.4



ESCALA VARIABLE
 Madrid, 3 de Mayo de 1.978
 BERNARDO UNGRIA
 P.P.

FIG. 2

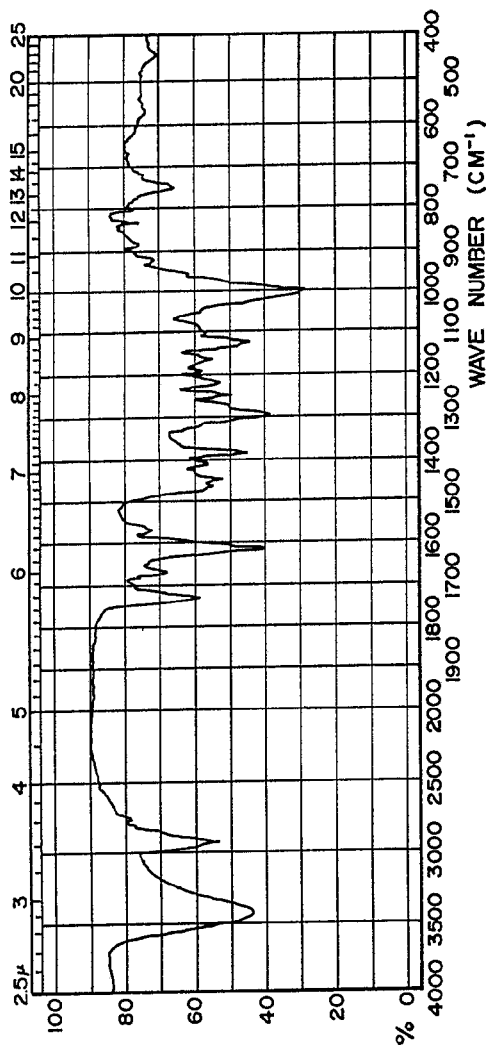
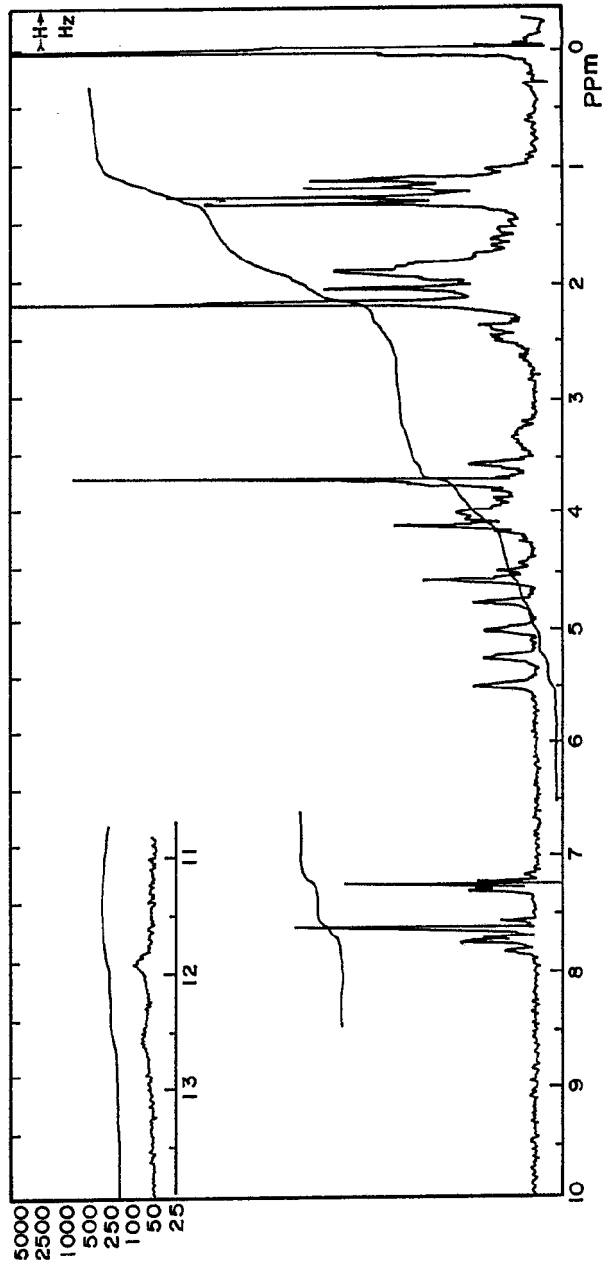


FIG. 3



ESCALA VARIABLE
Madrid, 3 de Mayo de 1.978
BERNABO JUNGUÍA
p.p.

FIG. 2

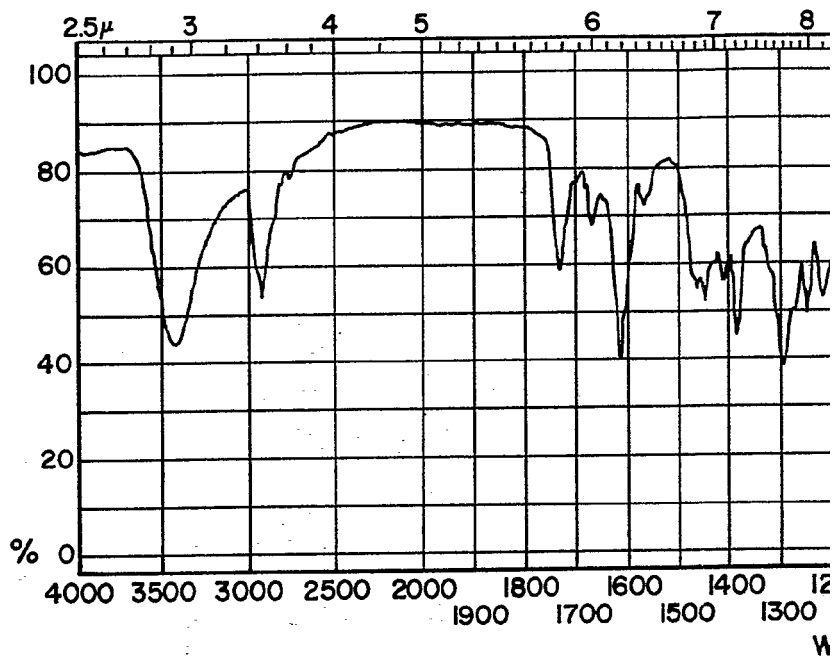
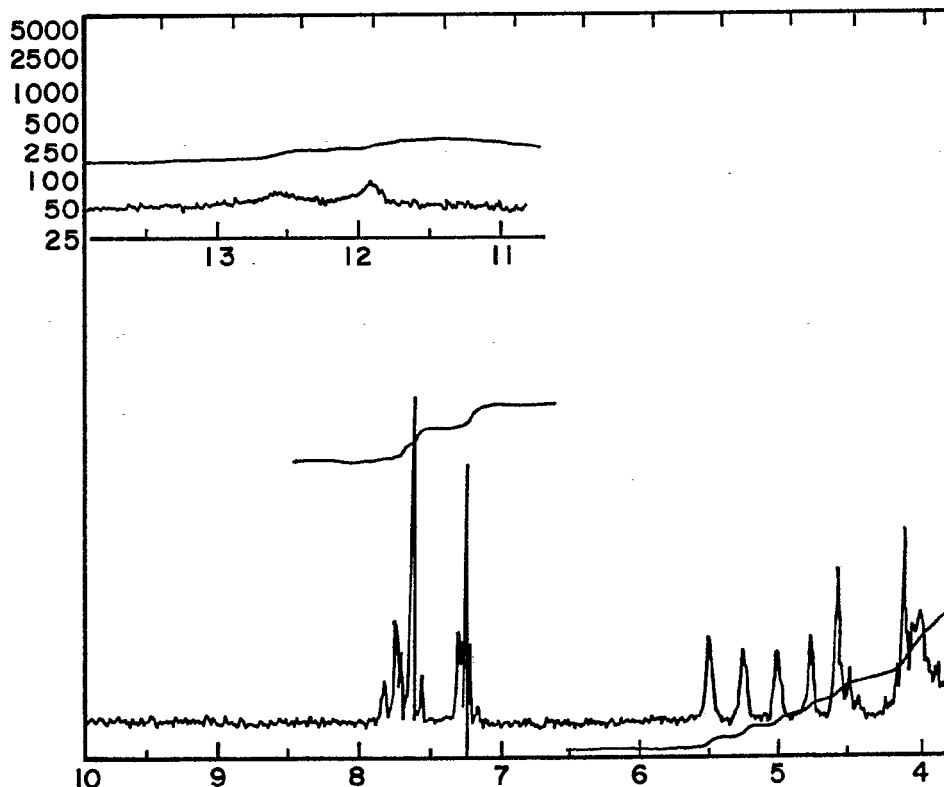


FIG. 3



POOR
QUALITY

3.2

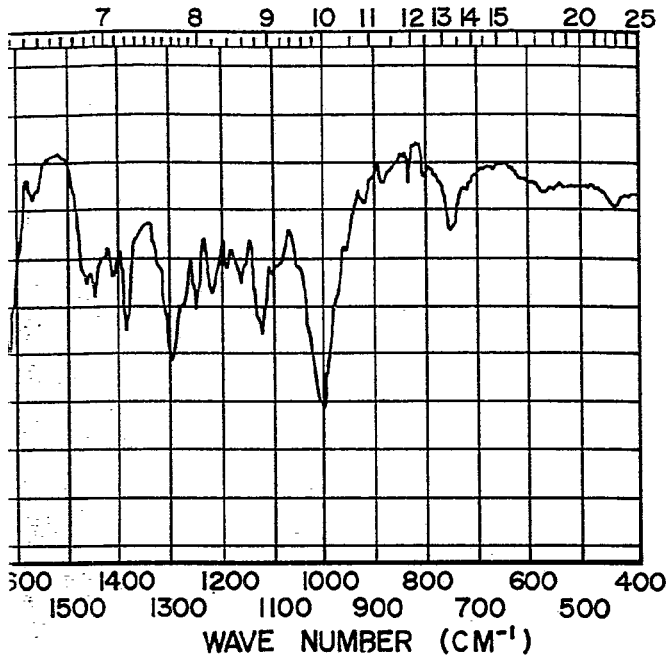
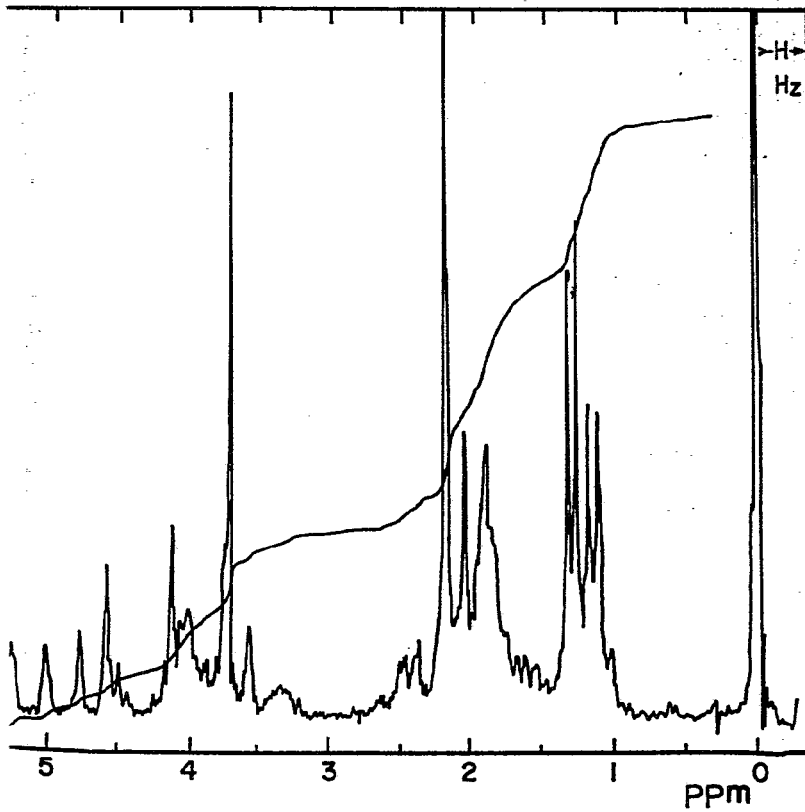


FIG. 3



ESCALA VARIABLE
Madrid, 3 de Mayo de 1.978
BERNARDO LINGHIA
p.p.

FIG.5

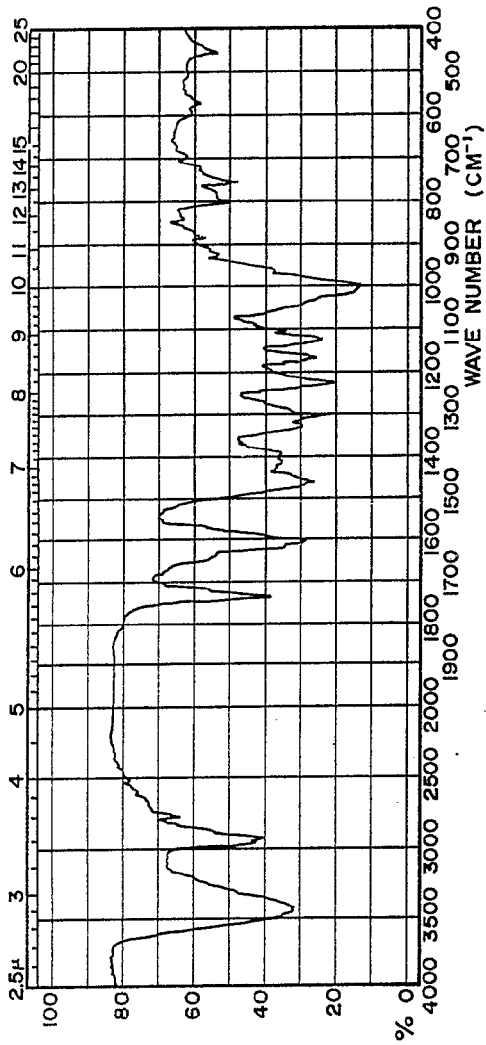
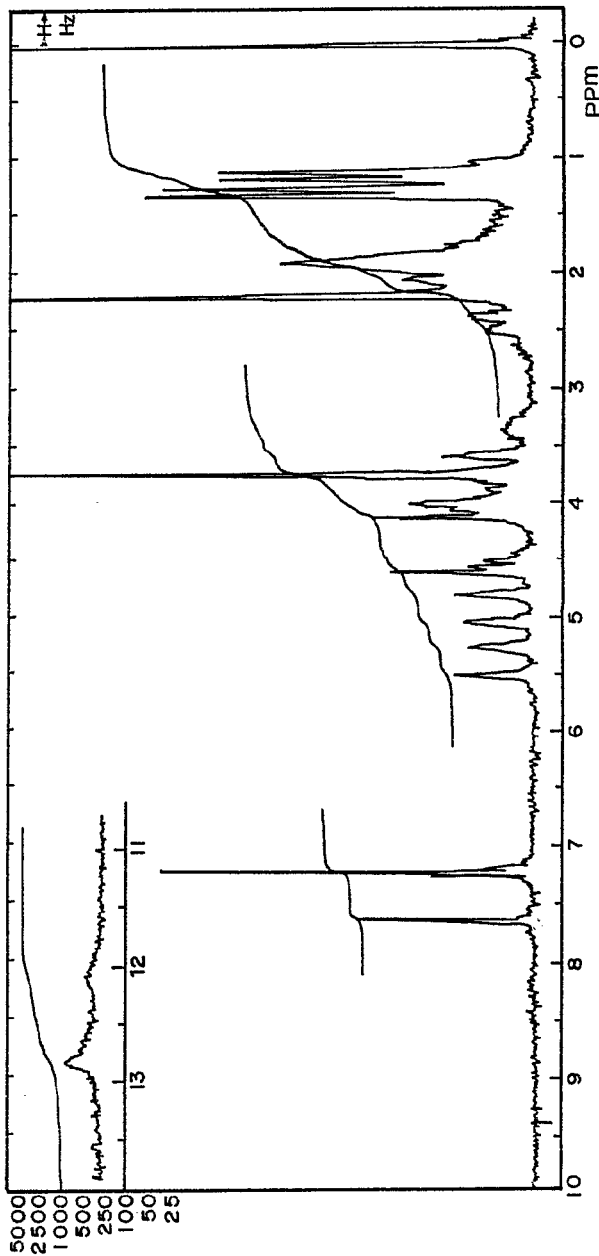


FIG.6



ESCALA VARIABLE
Madrid, 3 de Mayo de 1.978
BERNARDO VERA
P.P.

FIG. 5

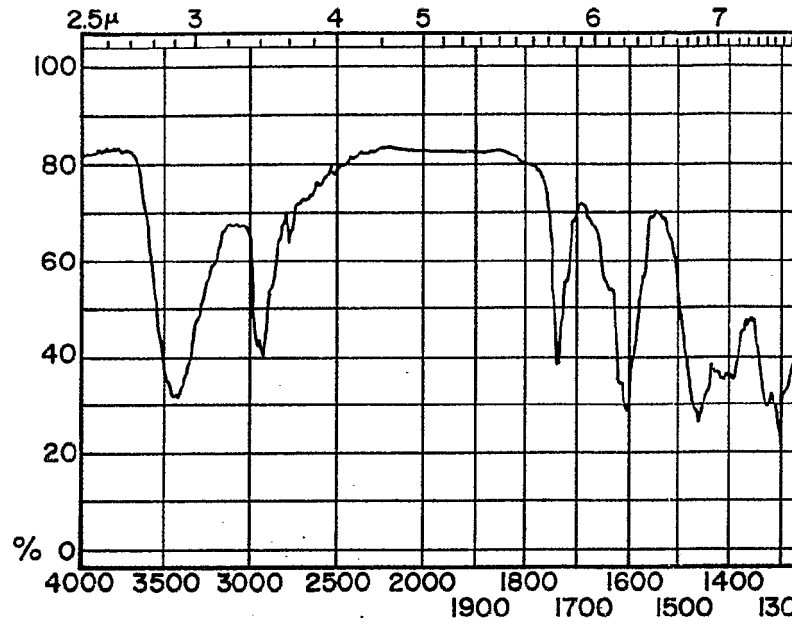
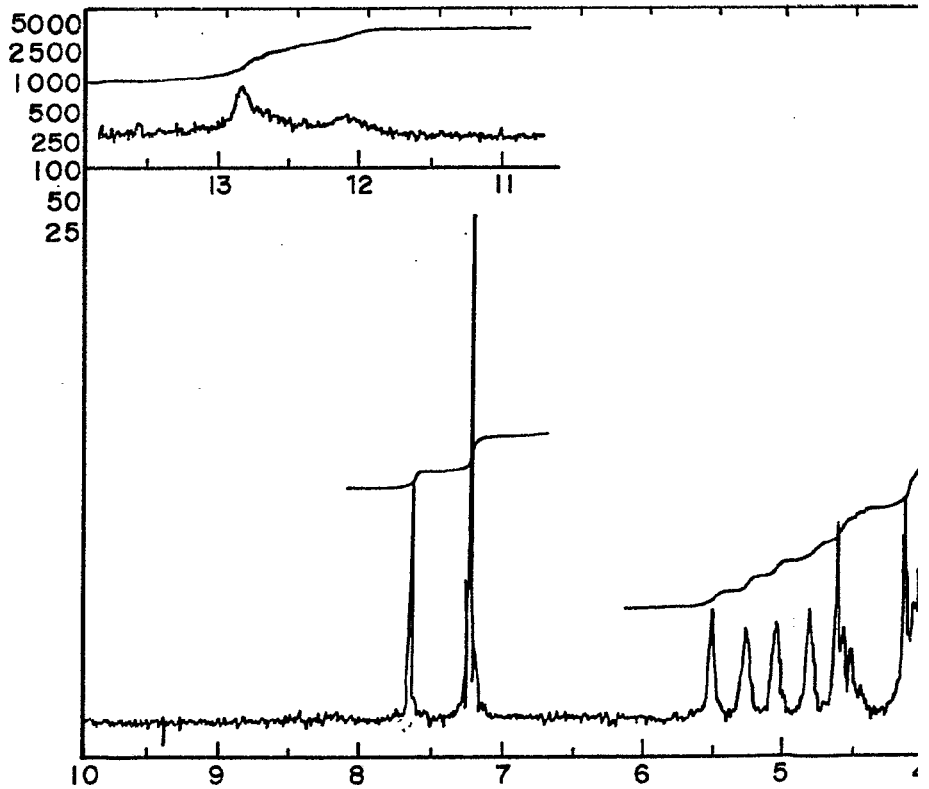


FIG. 6



POOR
QUALITY

FIG.5

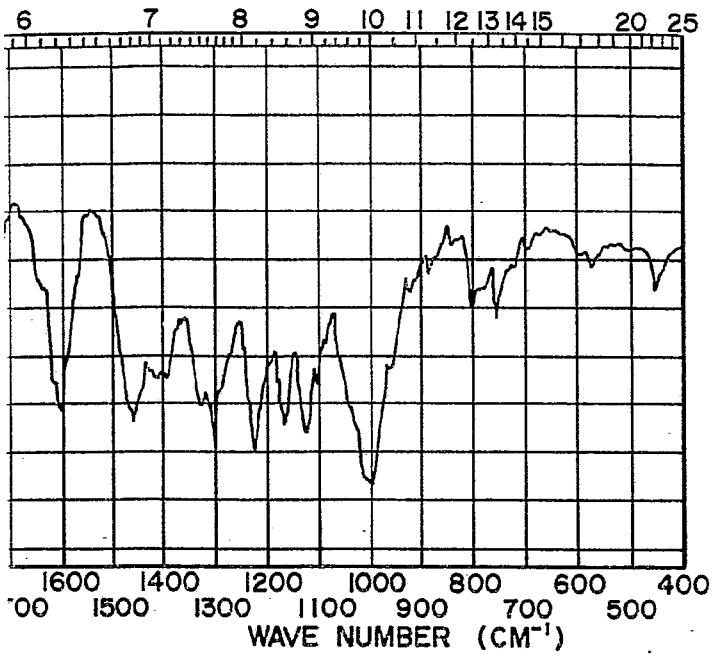
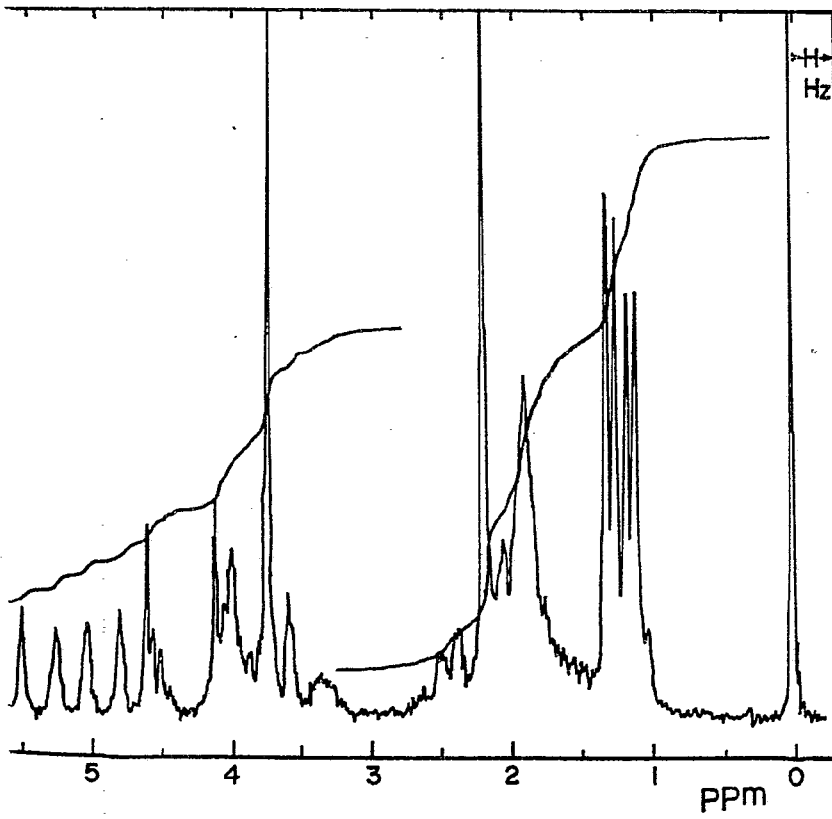


FIG.6



ESCALA VARIABLE
Madrid, 3 de Mayo de 1.978
BERNARDO INGRÍA
P.P.

FIG. 7

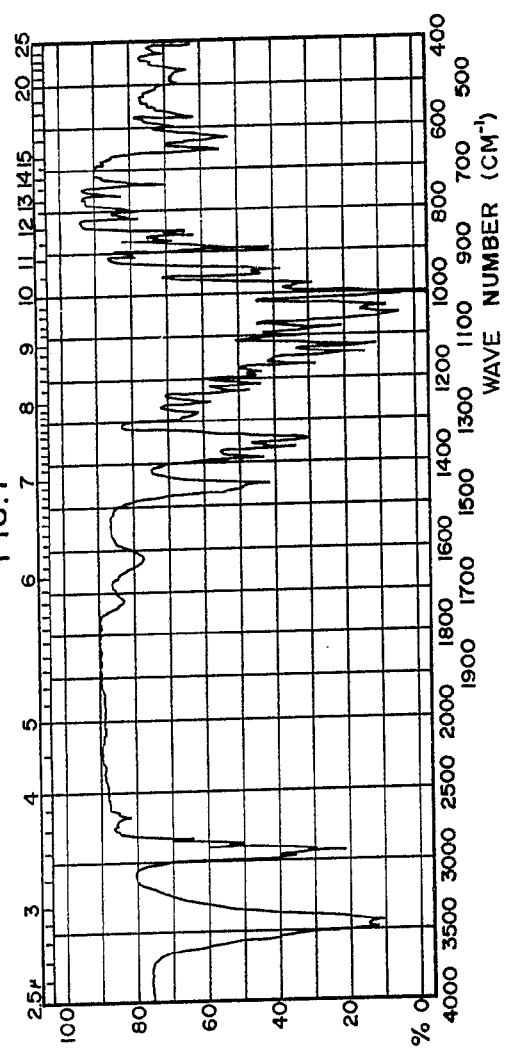


FIG. 8

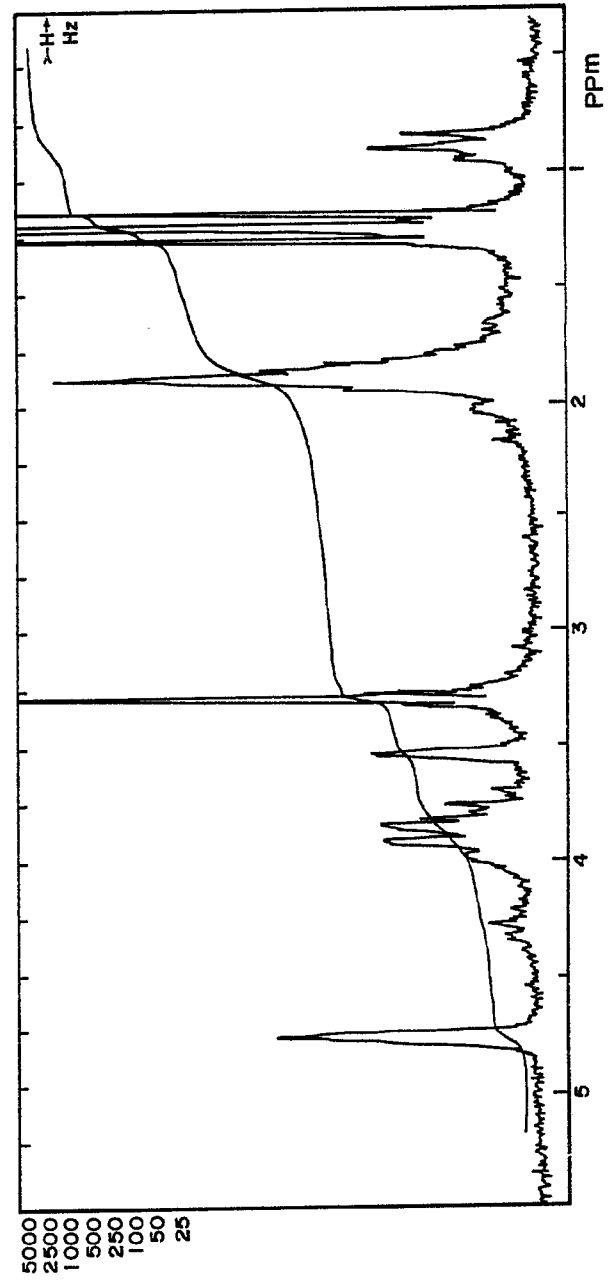
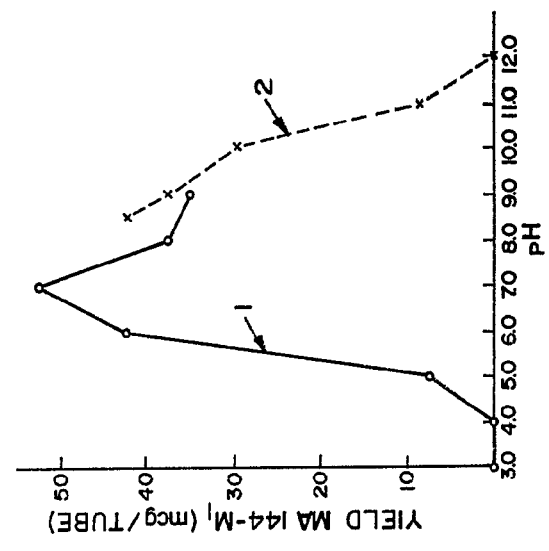


FIG. 9



ESCALA VARIABLE
 Madrid, 3 de Mayo de 1978
 BERNARDO UNGER
 P.P.

FIG.7

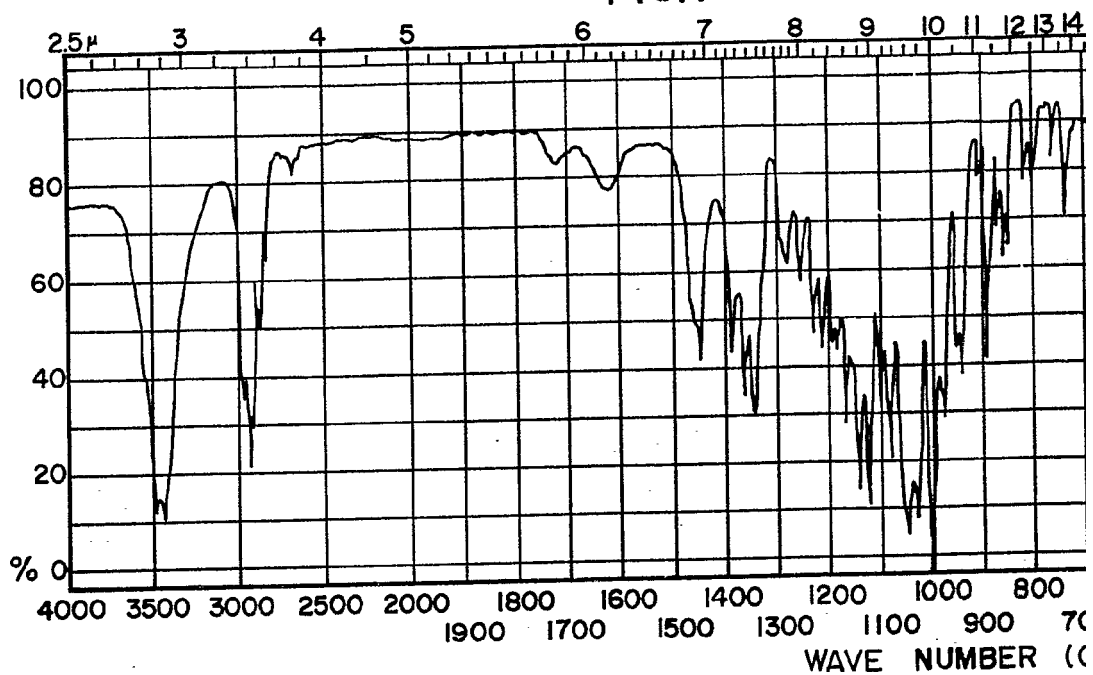
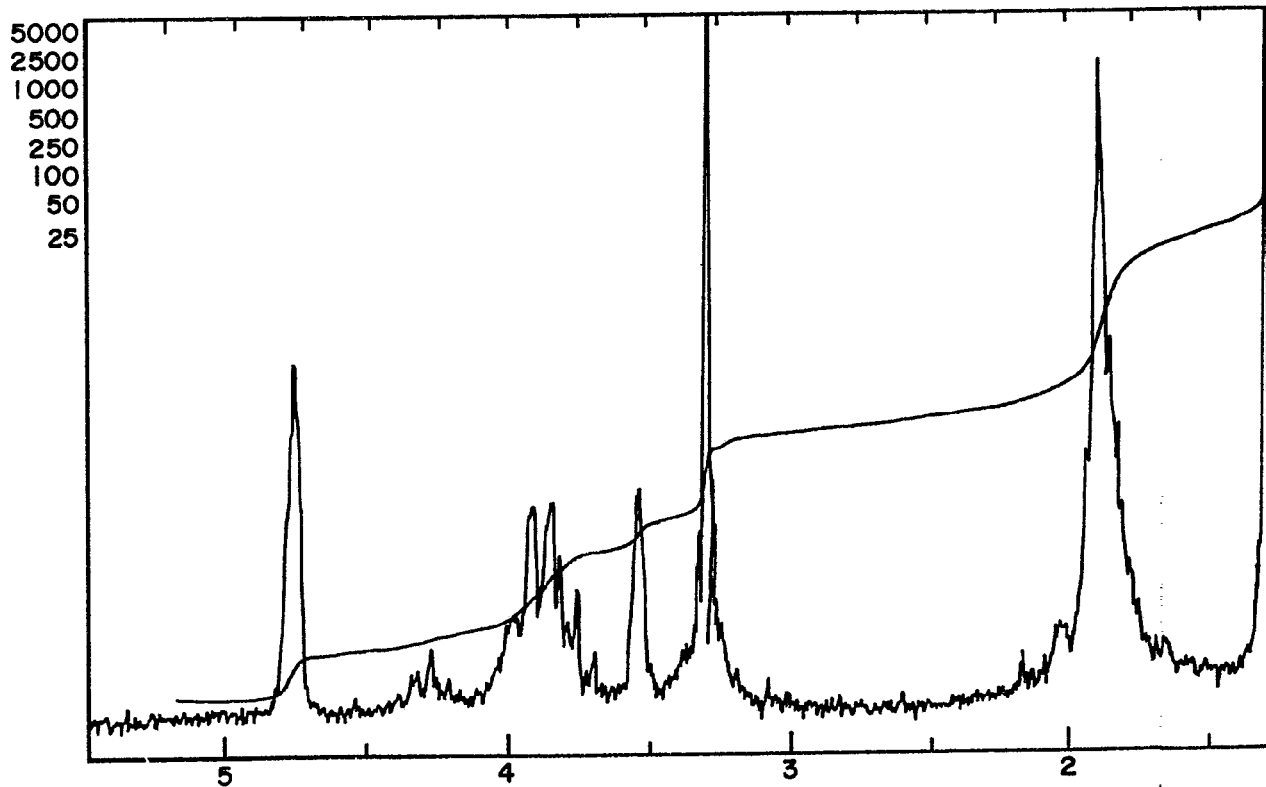


FIG.8



POOR
QUALITY

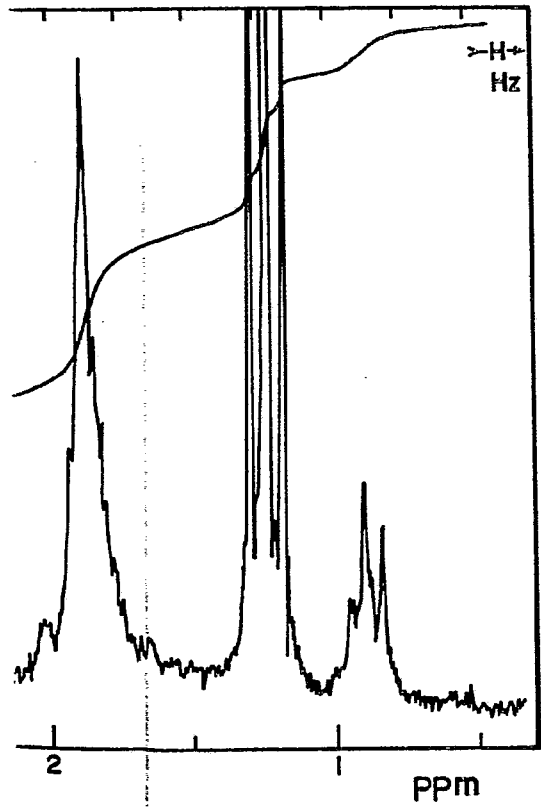
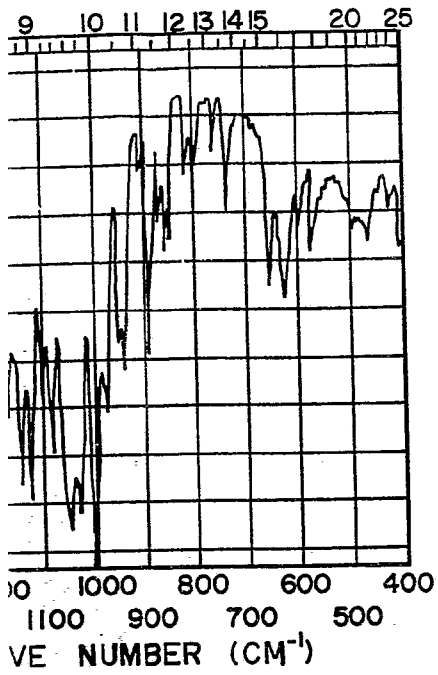
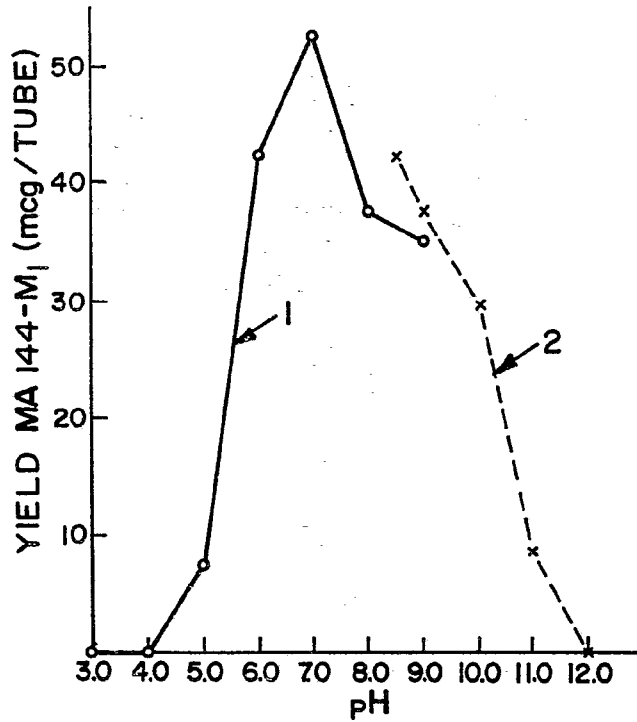


FIG. 9



ESCALA VARIABLE
 Madrid, 3 de Mayo de 1.978
 BERNARDO UNGA
 p.p.