

ENE. 1979



ESPAÑA

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

NUMERO	11
471823	21
FECHA DE PRESENTACION	22
17 julio 1.978	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
SH051-12037	5 octubre 1.976	Japón
SH052-60908	24 mayo 1.977	Japón

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07H/A61K	462.832 del 30.9.1977

54 TITULO DE LA INVENCION

UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE GLICOSIDOS DE ANTRACICLINA.

71 SOLICITANTE (S)

ZAI DANHOJIN BISEIBUTSU KAGAKU KENKYUKAI.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

14-23, Kamiosaki 3-chome, Shinagawa-ku, Tokyo - Japón.

72 INVENTOR (ES)

Hamao Umezawa; Tomio Takeuchi; Toshikazu Oki y Taiji Inui.

73 TITULAR (ES)

El mismo solicitante.

74 REPRESENTANTE

DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU.

1

RESUMEN DE LA INVENCION

5

Se obtienen nuevos agentes antitumorales denominados MA144-G1, -G2, -L, -N1, -S1, -S2, -U1, -U2 e -Y, que son glicósidos de antraciclina, inhiben el crecimiento de bacterias Gram-positivas, v.g. Corynebacterium bovis, Staphylococcus aureus y Micrococcus flavus e inhiben el crecimiento de tumores en animales como la leucemia L1210 en ratones, por fermentación de un microorganismo perteneciente al género Streptomyces y por conversión química o enzimática de aclacinomicina A, MA144-N1, MA144-M1, MA144-M2, cinerrubina A, MA144-Y, MA144-G1, MA144-G2, MA144-U1, MA144-U2 o rodirrubina A.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Campo de la invención

15

Esta invención se refiere a nuevos antibióticos antitumorales a base de glicósidos de antraciclina, a su producción y recuperación y a su empleo en terapéutica. Más especialmente, se refiere a nuevas sustancias antibióticas antitumorales denominadas MA144-G1, -G2, -L, -N1, -S1, -S2, -U1, -U2 e -Y, a procedimientos para su preparación por fermentación de cepas productoras de MA144 pertenecientes al género Streptomyces y por conversión química o enzimática de MA144-N1, -M1, -M2, aclacinomicina A, cinerrubina A, MA144-Y, MA144-G1, MA144-G2, MA144-U1, MA144-U2 o rodirrubina A, a métodos para su recuperación y purificación y a su aplicación como agente quimioterapéuticas para inhibir el crecimiento de los tumores malignos y para el tratamiento de las enfermedades infecciosas causadas por bacterias Gram-positivas.

20

25

2. Descripción de la técnica anterior

30

Se han hallado en el caso cultivado de diversos microorganismos varios tipos de glicósidos de antraciclina, que

1 festán descritos en la bibliografía. Entre ellos, la daunomi-
cina y la adriamicina ya han sido aplicados clínicamente pa-
ra cánceres humanos y la aclacinomicina A, la carminomicina
5 y la rubidazona están sometidas a pruebas clínicas con gran
interés en el campo de la quimioterapia del cáncer.

Como resultado de cultivos de selección de Streptomyces
para obtener metabolitos con actividad antitumoral, estos
inventores han descubierto nuevos compuestos confirmando,
después de purificar y caracterizar basándose en sus propie-
10 dades fisicoquímicas, que los antibióticos ahora denominados
MA144-G1, -G2, -L, -L1, -S1, -S2, -U1, -U2 e -Y, son nuevos
compuestos con potente actividad antitumoral y baja toxici-
dad en animales y han establecido procedimientos y métodos
para su preparación y purificación.

15 La preparación de la adriamicina por fermentación de
S. peuceticus var. caesius está descrita en la patente esta-
dounidense 3.590.028. La conversión química de la daunomici-
na en adriamicina está descrita en la patente estadouniden-
se 3.803.124.

20 La daunomicina (producida por fermentación de S. peuceticus
en la patente británica 1.003.383) puede ser el mismo pro-
ducto que el de la patente P.R. 13057 de Rhône-Poulenc (ante-
riormente rubidomicina y ahora daunorribicina; véanse las
patentes británicas 985.598, 1.188.262 y 1.241.750 y la pa-
25 tente estadounidense 3.616.242) y es probablemente idénti-
ca a la danubomicina de Ciba descrita en la patente estado-
unidense 3.092.550 y en la patente británica 901.830. Véase
también la patente estadounidense 3.686.163 sobre la dihidro
30 daunomicina.

Los antibióticos de antraciclina con un radical aklavi-

1 mon-aglicona están descritos en las siguientes referencias:

(a) Aclacinomicina A y B en la patente estadounidense núm. 3.988.315 y por Oki y colaboradores en J. Antibiotics 28: 830 (1975).

5 (b) Aklavina en J. Bacteriol. 72:90 (1956).

Los antibióticos de antraciclina con un radical ϵ -pirromicinon-aglicona están descritos en las siguientes referencias:

(c) musetamicina y marcelomicina a partir de un complejo de ácido bohémico en J. Antibiotics 30:525 (1977)

10 (d) pirromicina en Chem. Ber. 92:1904 (1959)

(e) cinerrubina A y B en la patente británica 846.130 (véase también la patente estadounidense 3.864.480 y Keller-Schierlein y colaboradores, Antimicrobial Agents and Chemoterapy, pág. 68 (1970)).

15 Otros antibióticos de antraciclina con una aglicona diferente de la aklavinona y de ϵ -pirromicinona están descritos en las siguientes referencias:

(f) Nogalamicina en J. Amer. Soc. 99:542 (1977)

(g) Estefimicina en J. Antibiotics 27:805, 809 (1974)

20 (h) Carminomicina en J. Antibiotics 27:254 (1974), en la patente de Alemania Occidental 2.362.707 y en J. Amer. Chem. Soc. 97:5955 (1975)

(i) Tripanomicina en Antimicrobial Agents and Chemoterapy 1:385 (1972)

25 (j) Requinomicina en J. Antibiotics 25:393 (1972)

(k) Galirrubina A y B en Naturwiss. 52:539 (1965) y Chem. Abst. 67:90573z (1967).

30 Para más detalles ilustrativos de los antibióticos de antraciclina véase la obra Index of Antibiotics from Actinomycetes, Hamao Umezawa, Editor en Jefe, University Park Press,

1 State College, Pennsylvania, Estados Unidos (1967) en las si-
guientes páginas:

	<u>Antibiótico</u>	<u>Nº de página</u>
	Aklavina	111
5	Cinerrubina A	220
	Cinerrubina B	221
	Danubomicina	242
	Daunomicina	243
	Pirromicina	524
10	Rodomicina A, B	561
	Rubidomicina	574

La obra Antibiotics, volumen 1, Mechanism of Action, editada bajo la dirección de David Gottlieb y Paul D. Shaw, Springer-Verlag, New York, Inc., N.Y., (1967), págs. 190-
15 210, contiene una revisión realizada por A. DiMarco y titulada Daunomicina and Related Antibiotics. El Information Bulletin, nº 10, International Center of Information of Antibiotics, en colaboración con WHO, Diciembre 1972, Bél-
gica, revisa las antraciclina y sus derivados.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a nuevos antibióticos glicósidos de antraciclina, a procedimientos para su preparación, a composiciones farmacéuticas que los contienen y al uso de
25 estos antibióticos o composiciones en el tratamiento de las infecciones bacterianas y en la inhibición de los tumores de mamíferos. Más especialmente, se refiere a los nuevos antibióticos de glicósidos de antraciclina denominados
30 MA144-G1, -G2, -L, -N1, -S1, -S2, -U1, -U2 e -Y. Estos antibióticos se obtienen por fermentación de cepas productoras

1 de MA144 pertenecientes al género Streptomyces o por conver
sión química o enzimática de aclacinomicina A, cinerrubina
A, MA144-M2, MA144-M1, MA144-N1, rodirrubina A, MA144-Y,
5 MA144-G1, MA144-G2, MA144-U1, MA144-U2 o materiales que los
contengan, estando incluidos todos estos procedimientos en
esta invención. La conversión enzimática puede llevarse a
cabo utilizando diversos tipos de enzimas activos obtenidos
de mamíferos y microorganismos pertenecientes al género
10 Streptomyces y la conversión química incluye la reducción y
la hidrólisis. Los compuestos MA144-G1, -G2, -L, -N1, -S1,
-S2, -U1, -U2 e -Y así producidos pueden ser recuperados, se
parados y purificados por métodos convencionales empleados
para aislar y purificar los antibióticos insolubles en agua,
cuyos métodos incluyen por lo menos un proceso seleccionado
15 entre el grupo formado por extracción con disolvente, preci-
pitación con disolvente, concentración, filtración de gel,
distribución en contracorriente, quelatación con iones metá-
licos y procesos convencionales de cromatografía en columna.

Esta invención también abarca los compuestos MA144-G1,
20 -G2, -L, -N1, -S1, -S2, -U1, -U2 e -Y como sólidos crudos,
como sólidos purificados, como sus sales y como complejos
con DNA y el procedimiento de preparación de los anteriores
según el cual la solución que contiene los componentes -
MA144 es liofilizada después de la adición de por lo menos
25 una sustancia seleccionada entre el grupo formado por ácido
desoxi-ribonucleico, glicerol, azúcares, aminoácidos y áci-
dos orgánicos e inorgánicos.

Por lo tanto, esta invención proporciona los antibió-
ticos antitumorales MA144-G1, -G2, -L, -N1, -S1, -S2, -U1, -U2,
30

1 e -Y que

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

5 (b) son eficaces en la inhibición del crecimiento de los tumores malignos en mamíferos y

(c) presentan una gran citotoxicidad y por lo tanto inhiben el crecimiento de la síntesis de RNA de las células tumorales de los mamíferos en cultivo.

10 Las propiedades fisicoquímicas de estos componentes MA144 son las siguientes:

15 MA144-G1 puede ser aislado como polvo amorfo amarillo; tiene un punto de fusión de 141 a 145°C y es ópticamente activo con un $[\alpha]_D^{20} + 54^\circ$ ($c = 0,33, CHCl_3$); es un glicósido de antraciclina débilmente básico, D-cinerulosil-2-desoxi-L-fucosil-L-rodosaminil-aklavinona, cuya fórmula empírica es $C_{42}H_{53}O_{15}N$.

20 MA144-G2 puede ser aislado en forma de polvo amorfo rojo; tiene un punto de fusión de 152 a 156°C; es un glicósido de antraciclina débilmente básico, D-cinerulosil-2-desoxi-L-fucosil-L-rodosaminil-ε-pirromicinona, de fórmula empírica $C_{42}H_{53}O_{16}N$.

25 MA144-L puede ser aislado como polvo amorfo amarillo; tiene un punto de fusión de 134 a 136°C y es un glicósido de antraciclina débilmente básico, L-cinerulosil-2-desoxi-L-fucosil-N-monodesmetil-L-rodosaminil-aklavinona, de fórmula empírica $C_{41}H_{51}O_{15}N$.

30 MA144-N1 puede ser aislado como polvo amorfo amarillo; tiene un punto de fusión de 146 a 147°C y es ópticamente activo con una $[\alpha]_D^{20} + 57,5^\circ$ ($c = 0,4, CHCl_3$); es un glicósido de antraciclina débilmente

- 1 básico, L-rodosil-2-desoxi-L-fucosil-L-rodosami-
nil-aklavinona, de fórmula empírica $C_{42}H_{55}O_{15}N$.
- 5 MA144-S1 puede ser aislado como polvo amorfo amarillo; tie-
ne un punto de fusión de 144 a 147°C y es óptica-
mente activo con una $[\alpha]_D^{20} + 77^\circ$ (c = 1,0, $CHCl_3$);
es un glicósido de antraciclina débilmente básico,
2-desoxi-L-fucosil-L-rodosaminil-aklavinona, de
fórmula empírica $C_{36}H_{45}O_{13}N$.
- 10 MA144-S2 puede ser aislado como polvo amorfo rojo; tiene un
punto de fusión de 154 a 158°C; es un glicósido
de antraciclina débilmente básico, 2-desoxi-L-fu-
cosil-L-rodosaminil-ε-pirromicinona, de fórmula
empírica $C_{36}H_{45}O_{14}N$.
- 15 MA144-U1 puede ser aislado como polvo amorfo amarillo; tie-
ne un punto de fusión de 152 a 155°C y es óptica-
mente activo con una $[\alpha]_D^{20} + 31^\circ$ (c = 1,0, $CHCl_3$);
es un glicósido de antraciclina débilmente básico,
2-desoxi-L-fucosil-2-desoxi-L-fucosil-L-rodosami-
nil-aklavinona, de fórmula empírica $C_{42}H_{55}O_{16}N$.
- 20 MA144-U2 puede ser aislado como polvo amorfo rojo; tiene
un punto de fusión de 160 a 164°C; es un glicósido
de antraciclina débilmente básico, 2-desoxi-L-fu-
cosil-2-desoxi-L-fucosil-L-rodosaminil-ε-pirromi-
cinona, de fórmula empírica $C_{42}H_{55}O_{17}N$.
- 25 MA144-Y puede ser aislado como polvo amorfo amarillo; tie-
ne un punto de fusión de 153 a 155°C y es óptica-
mente activo con una $[\alpha]_D^{20} + 66^\circ$ (c = 1,0, $CHCl_3$);
es un glicósido de antraciclina débilmente básico,
L-aculosil-2-desoxi-L-fucosil-L-rodosaminil-aklavi-
30 nona, de fórmula empírica $C_{42}H_{51}O_{15}N$.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

- 1 1 Fig. 1 muestra el espectro de absorción ultravioleta y visible de MA144-G1 en metanol al 90 %.
- 5 2 Fig. 2 muestra el espectro de absorción ultravioleta y visible de MA144-G2 en metanol al 90 %.
- 3 Fig. 3 muestra el espectro de absorción ultravioleta y visible del MA144-L en metanol al 90 %.
- 4 Fig. 4 muestra el espectro de absorción ultravioleta y visible del MA144-N1 en metanol al 90 %.
- 10 5 Fig. 5 muestra el espectro de absorción ultravioleta y visible del MA144-S1 en metanol al 90 %.
- 6 Fig. 6 muestra el espectro de absorción ultravioleta y visible del MA144-S2 en metanol al 90 %.
- 15 7 Fig. 7 muestra el espectro de absorción ultravioleta y visible del MA144-U1 en metanol al 90 %.
- 8 Fig. 8 muestra el espectro de absorción ultravioleta y visible del MA144-U2 en metanol al 90 %.
- 9 Fig. 9 muestra el espectro de absorción ultravioleta y visible del MA144-Y en metanol al 90 %.
- 20 10 Fig. 10 muestra el espectro de absorción infrarrojo del MA144-G1 en bromuro potásico.
- 11 Fig. 11 muestra el espectro de absorción infrarrojo del MA144-G2 en bromuro potásico.
- 25 12 Fig. 12 muestra el espectro de absorción infrarrojo del MA144-L en bromuro potásico.
- 13 Fig. 13 muestra el espectro de absorción infrarrojo del MA144-N1 en bromuro potásico.
- 14 Fig. 14 muestra el espectro de absorción infrarrojo del MA144-S1 en bromuro potásico
- 30 15 Fig. 15 muestra el espectro de absorción infrarrojo del

- 1 6 MA144-S2 en bromuro potásico.
- Fig. 16 muestra el espectro de absorción infrarrojo del MA144-U1 en bromuro potásico.
- 5 Fig. 17 muestra el espectro de absorción infrarrojo del MA144-U2 en bromuro potásico.
- Fig. 18 muestra el espectro de absorción infrarrojo del MA144-Y en bromuro potásico.
- Fig. 19 muestra el espectro de RMN del MA144-G1 en CDCl_3 (60 MHz).
- 10 Fig. 20 muestra el espectro de RMN del MA144-G2 en CDCl_3 (60 MHz).
- Fig. 21 muestra el espectro de RMN del MA144-L en CDCl_3 (60 MHz).
- Fig. 22 muestra el espectro de RMN del MA144-N1 en CDCl_3 (100 MHz).
- 15 Fig. 23 muestra el espectro de RMN del MA144-S1 en CDCl_3 (60 MHz).
- Fig. 24 muestra el espectro de RMN del MA144-S2 en CDCl_3 (60 MHz).
- 20 Fig. 25 muestra el espectro de RMN del MA144-U1 en CDCl_3 (60 MHz).
- Fig. 26 muestra el espectro de RMN del MA144-U2 en CDCl_3 (60 MHz).
- 25 Fig. 27 muestra el espectro de RMN del MA144-Y en CDCl_3 (100 MHz).
- Fig. 28 muestra el espectro de absorción ultravioleta y visible del disacárido metilado obtenido a partir de MA144-Y en metanol (0,04 g/l).
- 30 Fig. 29 muestra el espectro de absorción infrarrojo del disacárido metilado obtenido a partir de MA144-Y en

1 bromuro potásico.

Rig. 30 muestra el espectro de RMN del disacárido metilado obtenido a partir de MA144-Y en $CDCl_3$ (100 MHz).

DESCRIPCION DETALLADA

5 Esta invención proporciona 9 nuevos antibióticos de antraciclina, MA144-G1, -G2, -L, -N1, -S1, -S2, -U1, -U2 e -Y, que se ha encontrado que poseen actividad antibacteriana y antitumoral. Más especialmente, los compuestos de esta invención presentan actividad contra las bacterias Gram-positivas e inhiben el crecimiento de diversos tumores en mamíferos como la leucemia L1210 y P388 en ratones y son poco tóxicos. Por consiguiente, los compuestos de esta invención son útiles como agentes antibacterianos y antitumorales. En el sentido utilizado aquí, el término "componentes MA144" se refiere al antibiótico que comprende por lo menos uno de los compuestos MA144-G1, -G2, -L, -N1, -S1, -S2, -U1, -U2 e -Y.

10
15
20
25
30 Estos compuestos se obtienen cultivando una cepa productora de MA144 de Streptomyces en una solución acuosa de hidratos de carbono que contiene nutrientes nitrogenados orgánicos, en condiciones aerobias sumergidas o por reducción química e hidrólisis de ciertos glicósidos de antraciclina conocidos o por conversión enzimática de ciertos glicósidos de antraciclina conocidos. Los compuestos en caldos de cultivo o en las mezclas de reacción química y enzimática así producidos pueden ser extraídos y purificados por los métodos convencionales empleados para la extracción y purificación de los antibióticos insolubles en agua. Esta invención también abarca estos componentes MA144 como sólidos crudos, como sólidos purificados, como sus sales y como complejos con DNA.

1 Producción de los componentes MA144

La producción de los compuestos de esta invención se lleva a cabo mediante un proceso de fermentación y algunos de los compuestos también pueden ser producidos por métodos químicos y enzimáticos.

5 Proceso de fermentación

Para la producción fermentativa de los compuestos de esta invención, pueden utilizarse cepas productoras de MA144 pertenecientes al género Streptomyces, tales como Streptomyces galilaeus MA144-III (FERM P-2455, ATCC 31133), St. galilaeus (ATCC 14969), St. cinereoruber (ATCC 19740), St. niveoruber (ATCC 14971), St. antibioticus (ATCC 8663), St. purpurascens (ATCC 25489), Streptomyces esp. ME505-HE1 (ATCC 31273) y los mutantes de los mismos.

15 La producción de todos los compuestos de esta invención se lleva a cabo cultivando la cepa antes mencionada de Streptomyces en un medio nutritivo acuoso convencional que contiene las fuentes nutritivas conocidas para los actinomicetes, es decir, fuentes de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas. Para la producción de cantidades sustanciales de los componentes MA144, exactamente igual que para la de otros antibióticos, se emplea preferiblemente un cultivo aerobio sumergido. Los procedimientos generales utilizados para el cultivo de otros actinomicetes son también aplicables al cultivo de esta invención. Preferiblemente el medio contiene fuentes de carbono comerciales como glucosa, glicerol, almidón, dextrina, sacarosa, maltosa, aceites, grasas y similares, en estado crudo o purificado y fuentes de nitrógeno comerciales como polvo de soja, extracto de levadura, peptona, polvo de semilla de algodón, levadura desecada, li-

20

25

30

1 cor de infusión de maiz o sales inorgánicas como sulfato
amónico, nitrato sódico o cloruro amónico. Como sales inorgá-
nicas se utilizan preferiblemente el cloruro sódico, el clo-
ruro potásico o los fosfatos y también pueden agregarse,
5 si es necesario, iones metálicos traza y antiespumantes co-
mo Adekanol (marca registrada, Asahi Denka Ind. Co.) o si-
licona (marca registrada, Shinetsu Chem. Ind. Co.). La tem-
peratura de fermentación debe estar comprendida entre 20 y
37°C, siendo preferiblemente alrededor de 25 a 30°C. El pH
10 del medio debe mantenerse entre 6 y 9 aproximadamente. La
producción de los componentes MA144 en el caso de cultivo
llega a un máximo al cabo de 2 a 7 días en matraces sacu-
didos o en un medio de fermentación aerobia sumergida, don-
de la aireación y la agitación se realizan de la forma des-
crita en los ejemplos dados más adelante.

15 Procedimiento químico.

De acuerdo con un método de preparación, se convier-
ten químicamente los compuestos aclacinomicina A, cinerru-
bina A, rodirrubina A, MA144-M1, MA144-M2, MA144-N1, -
20 MA144-G1, MA144-G2, MA144-U1, MA144-U2, MA144-Y o una mez-
cla de los mismos en MA144-S1, -S2, -N1 o una mezcla de los
mismos. Los materiales de partida pueden utilizarse en for-
ma pura, como sales o en forma impura, por ejemplo en forma
de materiales que contienen las sustancias antraciclínicas
25 tales como los caldos de fermentación o los extractos cru-
dos de dichos caldos.

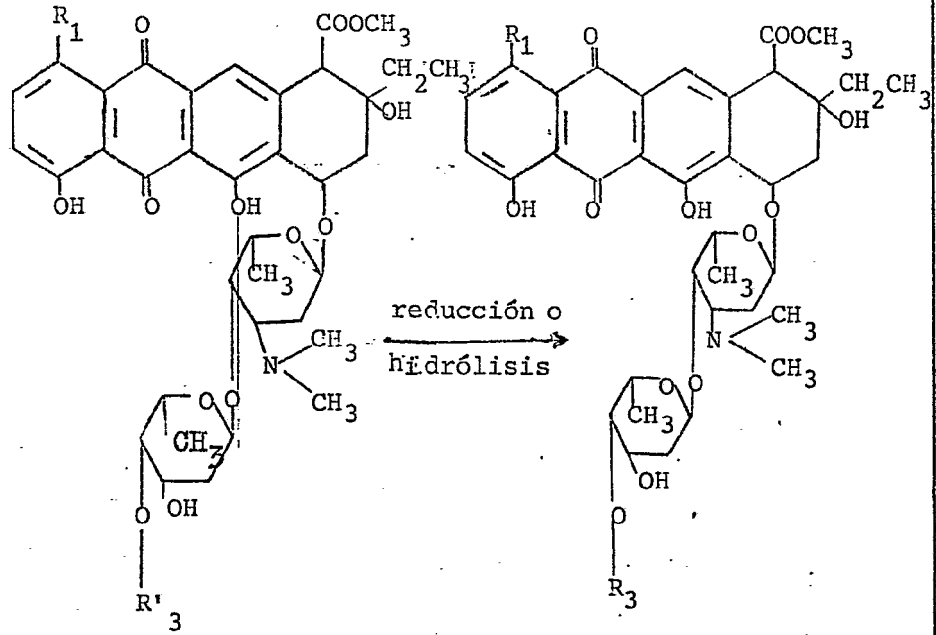
La conversión química puede comprenderse mas fácil-
mente mediante el siguiente esquema de reacción:

30 -----

1

5

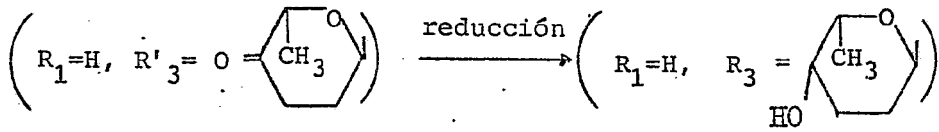
10



i) Aclacinomicina A

MA144-N1

15



ii) Aclacinomicina A

MA144-N1

MA144-G1

MA144-U1

MA144-Y

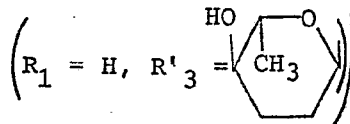
MA144-M1

Hidrólisis

MA144-S1

(R₁ = H, R₃ = H)

25



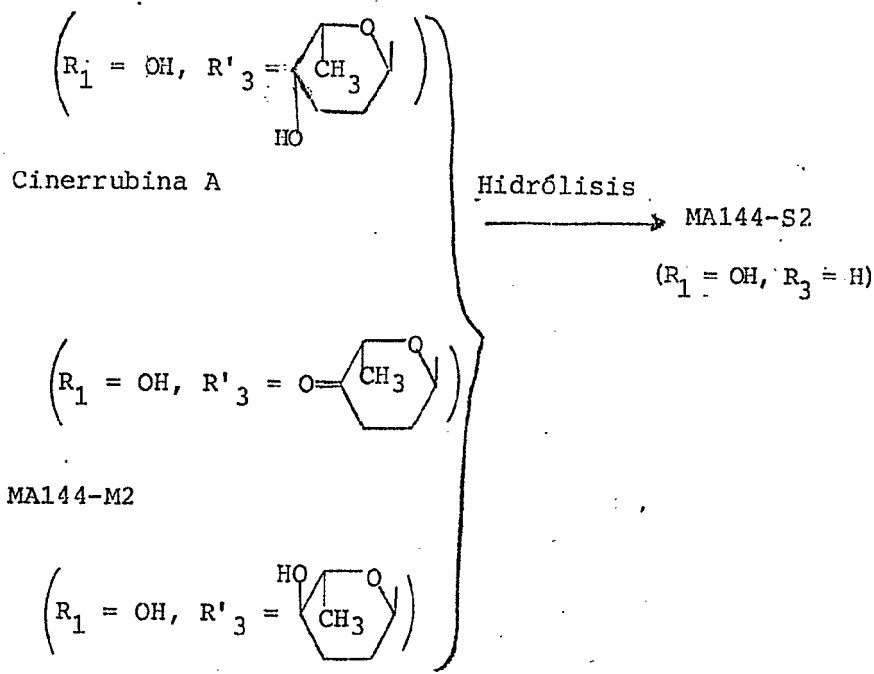
MA144-G2

MA144-U2

Rodirrubina A

30

1
5
10
15
20
25
30



Los componentes MA144-S1 y -S2 pueden ser producidos por hidrólisis ácida de la aclinomicina A (solicitud de patente japonesa Sho51-15690) y MA144-M1 (solicitud de patente japonesa Sho51-39688); MA144-N1, MA144-M2 (solicitud de patente japonesa Sho51-39688), cinerrubina A, MA144-G1, MA144-G2, MA144-U1, MA144-U2, MA144-Y o rodirrubina A (solicitud de patente japonesa Sho51-98113) y MA144-N1 pueden ser producidas por reacción de aclinomicina A.

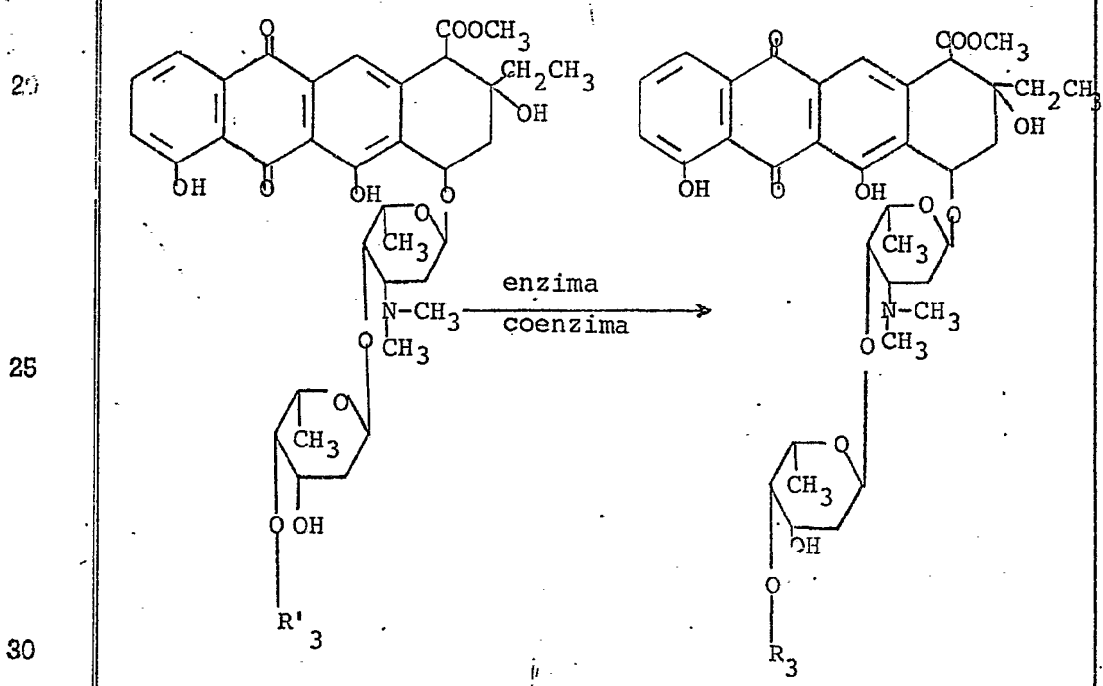
- i) Los agentes reductores preferidos son los hidruros metálicos como borohidruro sódico, los hidruros de litio (v.g. LiH, LiAlH₄) y los hidruros de aluminio (v.g. AlH₃) y
- ii) la hidrólisis puede llevarse a cabo en condiciones suaves utilizando un ácido mineral como HCl, H₂SO₄ y similares. La reacción química en esta invención puede llevarse a cabo en un sistema disolvente único o en un sistema disolvente mixto que disuelva a los compuestos de la invención. Las

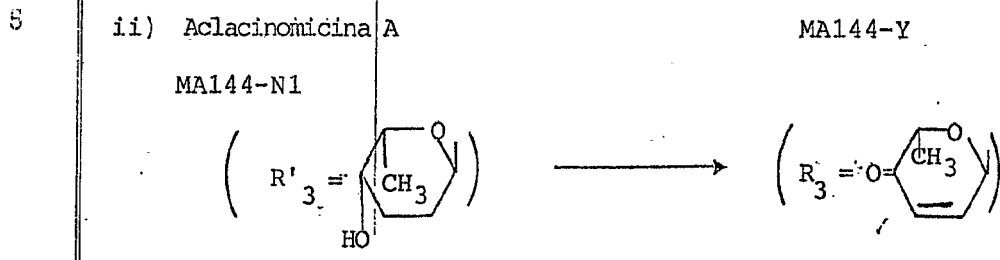
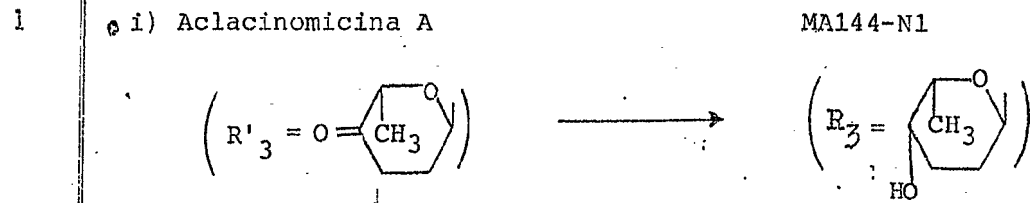
1 condiciones de reacción como temperatura, concentración del
substrato, tiempo de reacción, etc, dependen del sistema
5 disolvente, del material de partida y factores similares,
siendo preferiblemente seleccionadas las condiciones que
10 permiten obtener el máximo rendimiento y la mayor velocidad
de reacción.

Métodos enzimáticos

De acuerdo con un método de preparación la aclacinomi-
cina A, el MA144-N1 o una mezcla de los mismos se convierten
10 enzimáticamente en MA144-N1, MA144-Y o una mezcla de los
mismos. Los materiales de partida pueden utilizarse en for-
ma pura, como sales o en forma impura, es decir en forma de
15 materiales que contienen los substratos de antraciclina ta-
les como los caldos de fermentación o los extractos crudos
de estos caldos.

La conversión enzimática puede comprenderse más fácil-
mente mediante el siguiente esquema de reacción:





10 i) El MA144-N1 puede producirse a partir de aclacinomicina A por el sistema enzimático que se obtiene de los mamíferos y de los microorganismos. El sistema enzimático utilizado para reducir el grupo ceto del radical de cinerulosa A puede existir en una fracción microsómica y se obtiene de

15 ciertos microorganismos que pertenecen 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, pueden emplearse cepas pertenecientes al género Streptomyces en forma de

20 caldo de cultivo, suspensión celular, células secas, homogenado celular, enzima parcialmente purificado y el enzima inmovilizado obtenido a partir de ellos. En el caso del enzima de mamíferos, pueden utilizarse también diversas fuentes enzimáticas como varios órganos, cortes de tejidos, homogenados de tejidos, sus preparados secos y enzimas parcial

25 mente purificados obtenidos por desplazamiento salino, precipitación con disolventes orgánicos, filtración de gel y cromatografía de absorción. También son adecuados para este proceso los enzimas inmovilizados obtenidos a partir de estas

30 fuentes de mamíferos. Las condiciones de la reacción

1 enzimática como pH, temperatura, concentración del substrato, tiempo de reacción, coenzima, etc, dependen del estado del enzima, del material de partida utilizado, etc. En términos generales, es preferible seleccionar las condiciones que aceleran la reacción enzimática y que no inactivan al sistema enzimático. En general, son preferibles unas temperaturas comprendidas entre 20 y 42°C, un pH de 5,5 a 10,5, con un pH óptimo de 6 a 8, una concentración de substrato inferior al 5 % y un tiempo de reacción de 20 a 120 minutos en condiciones aerobias. Pueden utilizarse NADH y NADPH como coenzima. Los iones Cu^{++} , Hg^{++} , Fe^{++} y Fe^{+++} y los compuestos PCMB y N-etilmaleimida inhiben la reacción enzimática. (PCMB = ácido p-cloromercuribenzoico, NADH = dinucleótido de nicotinamidoadenina reducido, NADPH = fosfato de dinucleótido de nicotinamidoadenina reducido).

15 ii) El MA144-Y puede ser producido a partir de aclacinomicina A o de MA144-N1 mediante el sistema enzimático microbiano. Los enzimas utilizados en esta invención pueden obtenerse de cepas pertenecientes al género Streptomyces, que son capaces de convertir la aclacinomicina A o el MA144-N1 en MA144-Y, tales como Streptomyces galilaeus MA144-M1 (FERM P-2455, ATCC 31133), St. galilaeus (ATCC 14969), St. cinereoruber (ATCC 19740), St. niveoruber (ATCC 14971), St. antibioticus (ATCC 8663), St. purpurascens (ATCC 25489) Streptomyces esp. ME505-HE1 (ATCC 31273) y los mutantes de los mismos y pueden ser empleados en forma de caldo de cultivo, suspensión celular, células secas, homogenado celular, solución sobrenadante, enzima purificado y parcialmente purificado y enzima inmovilizado obtenido a partir de aquéllos.

30 Las condiciones de la reacción enzimática como pH, tem-

1 temperatura, concentración del sustrato, tiempo de reacción,
 etc, dependen del estado del enzima, del material de parti-
 da utilizado, etc. En general, es preferible seleccionar
 las condiciones que aceleran la reacción enzimática y que no
 5 la inhiben. Generalmente se prefiere una temperatura de 20
 a 50°C, un pH de 4,0 a 9,0, una concentración de sustrato
 inferior al 5 % y un tiempo de reacción de 10 minutos a 5
 horas, que depende de la cantidad de oxígeno disuelto. La
 reacción enzimática requiere oxígeno pero no coenzima.

Ver de los organismos
 parte 10
 a descripción de
 Stain ME505-HE1

La actividad enzimática en diversos Streptomyces utili-
 zados en esta invención es la siguiente:

Comparación de la actividad enzimática de diversos Strepto-
 myces

15

Organismos	Actividad enzimática unidades/ml
<u>Streptomyces galilaeus</u> MA144-M1 (ATCC 31133)	100
<u>St. galilaeus</u> ATCC 14969	75
<u>St. esp.</u> ME505-HE1, ATCC 31273	25
<u>St. cinereoruber</u> ATCC 19740	85
<u>St. niveoruber</u> ATCC 14971	35
<u>st. antibioticus</u> ATCC 8663	15
<u>St. purpurascens</u> ATCC 25489	20

20

Composición de 1 ml de mezcla de reacción enzimática:

25

Aclacinomicina A como sustrato (0,4 μ moles/ml)	0,25 ml
Tampón de citrato 0,2M (pH 5,5)	0,25 ml
Solución de enzima	0,50 ml.

30

La reacción se lleva a cabo durante 30 minutos a 37° C,
 se termina en un baño de hielo y se agrega 1 ml de tampón
 tris-HCl 0,2M (pH 7,5). Los productos de reacción se extraen
 con 0,25 ml de tolueno, se desarrollan en una capa fina de

1 ácido silícico y se analizan utilizando un cromatoexplorador
modelo CS900 de onda doble Shimazu. Una unidad de actividad
enzimática se define como la cantidad de enzima que forma
0,001 moles de MA144-Y por minuto.

5 Para la purificación del enzima de las 7 cepas de
Streptomyces antes descritas pueden emplearse métodos con-
vencionales de purificación. Por ejemplo, puede obtenerse
un preparado enzimático purificado, electroforéticamente
homogéneo, a partir del filtrado de cultivo por precipita-
10 ción de una solución de sulfato amónico al 50 % de la sa-
turación y por cromatografía en columna de DEAE-celulosa,
DEAE-Sephadex A-50 y Sephadex G-75.

Las propiedades generales del enzima purificado obte-
nido a partir de Streptomyces galilaeus MA144-M1 (ATCC 31133)
15 son las siguientes:

Peso molecular	72.000
Punto isoeléctrico	pH 5,9
pH Óptimo	5,5
Estabilidad al pH	5,0 a 8,0
20 Estabilidad térmica	por debajo de 50°C (pH neutro)
Reacción	depende del oxígeno
km	0,125 mM
Inhibidores	Fe ⁺⁺ , SO ₃ ⁻⁻ , S ₂ O ₄ ⁻⁻ , 25 S ₂ O ₅ ⁼ , NaN ₃ , ácido ascórbico, NADP y do- nadores de hidrógeno

Las propiedades de los enzimas obtenidos de las 7 ce-
pas de Streptomyces citadas son idénticas a las del Strepto-
30 mices galilaeus MA144-M1.

1 Separación y aislamiento de los componentes MA144

Los compuestos de esta invención pueden ser recuperados del caldo de cultivo o de la mezcla de reacción y separados entre sí mediante los siguientes procedimientos:

5 Los componentes MA144 producidos por fermentación se encuentran tanto intracelularmente como extracelularmente pero principalmente en el micelio. Para recuperar los componentes MA144 del caldo de cultivo, puede filtrarse el caldo y después extraerse el filtrado con un disolvente orgánico
10 no miscible con agua como cloroformo, acetato de etilo, tolueno, benceno, acetato de butilo, n-butanol, metilpropilcetona, cloruro de metileno, etc, en un medio de neutro a débilmente ácido. Los componentes MA144 del micelio pueden recuperarse por extracción con un disolvente orgánico como
15 cloroformo, acetona, n-butanol, metanol, etanol, acetato de etilo o una solución acuosa de un ácido orgánico o inorgánico como ácido clorhídrico o ácido acético. Alternativamente, los componentes MA144 pueden extraerse directamente del caldo de cultivo por los procedimientos de extracción
20 antes mencionados, sin separación previa del micelio. Después de concentrar a vacío, los extractos de MA144 pueden ser extraídos de nuevo con un disolvente orgánico no miscible con agua, a un pH comprendido entre 6 y 9 y, después de concentrar a presión reducida, los concentrados de MA
25 se mezclan con una solución acuosa ácida a un pH inferior a 4, después se extraen de nuevo los componentes MA144 de dicha solución acuosa ácida con un disolvente orgánico una vez que se ha ajustado a pH débilmente básico. Repitiendo el procedimiento anterior, si es necesario, pueden prepararse los componentes MA144 en forma purificada. Como alter

1 alternativa al uso de un método de recuperación por extracción
con disolvente o en combinación con dicho método, el MA144
puede ser recuperado del caldo de cultivo por cromatografía
5 en columna, utilizando adsorbentes como carbón activo, alú-
mina, ácido silícico o un dextrano modificado como el que
se encuentra en el mercado con el nombre de Sephadex LH-20
(Pharmacia Fine Chem.Co., New York), distribución en contra
corriente o cromatografía de líquidos, utilizando disolven-
10 tes orgánicos adecuados. Los extractos activos obtenidos
por estos métodos se concentran a presión reducida y se
obtienen los componentes MA144 en forma de polvo rojo o
amarillo.

15 Los componentes MA144 de las mezclas químicas y enzimá-
ticas se extraen después de agregar agua, se purifican y
se obtienen en forma de polvo crudo siguiendo los procedi-
mientos antes mencionados. La solución que contiene los
componentes MA144 también puede ser liofilizada sola o por
20 lo menos con una sustancia seleccionada entre suero, sero-
albúmina, globulina, gelatina, glicerol, azúcares, aminoáci-
dos, ácido desoxirribonucleico y ácidos orgánicos o inorgá-
nicos como ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido acéti-
co, ácido succínico y ácido pantoténico.

25 Para obtener los componentes individuales MA144-G1,
-G2, -L, -N1, -S1, -S2, -U1, -U2 e Y, pueden efectuarse
nuevas purificaciones y separaciones utilizando técnicas de
separación comunes como cromatografía en columna con diver-
sos adsorbentes como ácido silícico, dextranos modificados,
resinas cambiadoras de ion débilmente ácidas o carbón activo,
30 distribución en contracorriente, cromatografía de líquidos
con disolventes orgánicos adecuados o quelatación con diver-

1 esos iones metálicos, o una combinación de uno o más de los
procedimientos antes mencionados.

5

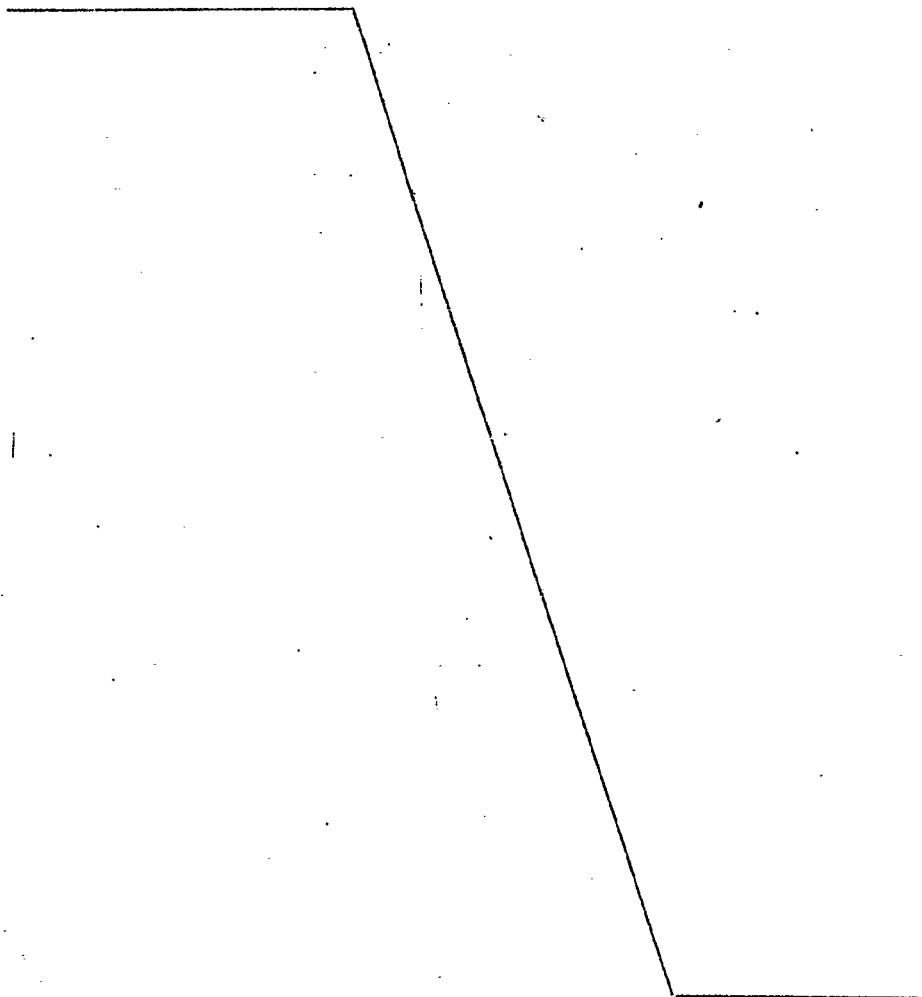
10

15

20

25

30



Propiedades fisicoquímicas de los componentes MA144

Las propiedades fisicoquímicas de los componentes MA144-G1, -G2, -L, -N1, -S1, -S2, -U1, -U2 e -Y son

los siguientes:

Aspecto	G1			G2			L			N1		
	C	H	O	C	H	O	C	H	O	C	H	O
MA144												
Aspecto	Polvo amarillo amorfo, débilmente básico			Polvo rojo amorfo, débilmente básico			Polvo amarillo amorfo, débilmente básico			Polvo rojo amorfo, débilmente básico		
Análisis elemental												
Encontrado	61,45	6,31	1,44	28,93	61,15	6,21	1,75	30,58	61,39	6,31	1,54	30,13
Calculado	62,14	6,58	1,73	29,56	60,93	6,45	1,69	30,92	61,72	6,44	1,76	30,08
Fórmula empírica	$C_{42}H_{53}O_{15}N$			$C_{42}H_{53}O_{16}N$			$C_{41}H_{51}O_{15}N$			$C_{42}H_{55}O_{15}N$		
Peso molecular	811,9			827,9			797,9			813,9		
Punto de fusión (°C)	141-145			152-156			134-136			146-147		
Rotación específica $(\alpha)_D^{20}$	+ 54° (c = 0,33, $CHCl_3$)									+ 57,5° (c = 0,4, $CHCl_3$)		
Solubilidad	Soluble en agua ácida, metanol, etanol, n-butanol, acetona, acetato de etilo, cloroformo, benceno, tolueno, dimetilsulfóxido, metilcelosolve, dimetilformamida. Ligéramente soluble en agua, n-hexano, ciclohexano, éter dietílico y petróleo. El hidrocianuro es soluble en agua, metanol, etanol pero solo ligeramente soluble en cloroformo, acetona y acetato de etilo.											
Valores R_F^{**}	0,38			0,38			0,31			0,21		
* C:M = 20:1												
Reacción	La solución acuosa ácida y metanólica es amarilla y vira a púrpura rojizo en medio alcalino y a púrpura alcañino y a pardo rojizo en solución concentrada de H_2SO_4											
Espectros de absorción ultravioleta y visible y λ_{max}^{1cm} en metanol (línea continua)	Fig. 1 230 (537), 259 (330), 290 (140), 432 (165)			Fig. 2 235 (580), 259 (295), 292 (101), 492 (175)			Fig. 3 230 (480), 259 (298), 290 (118), 433 (151)			Fig. 4 229,5 (482), 259 (298), 290 (121), 433 (144)		
En HCl-0,1N-metanol (línea de puntos)	229,5 (610), 259 (372), 289 (159), 430 (169)			235 (627), 259 (300), 292 (104), 492 (178)			230 (530), 259 (324), 290 (128), 433 (156)			229,5 (488), 259 (304), 290 (123), 433 (151)		
En NaOH 0,1N-metanol (línea -.-.-)	239 (521), 285 (151), 317 (96), 522 (144)			242 (575), 565 (230), 605 (198)			238 (412), 287 (100), 318s (68), 525 (140)			239 (450), 287 (121), 318s (76), 525 (133)		
Espectro de absorción infrarrojo (KBr)	Fig. 10			Fig. 11			Fig. 12			Fig. 13		
Espectro de RMN (RMP)	Fig. 19			Fig. 20			Fig. 21			Fig. 22		
* C = cloroformo, M = metanol. ** Condiciones de la cromatografía en capa fina: capa fina de ácido silícico 60F ₂₅₄ (Merck Co.) (a 27°C)												

1

5

10

15

20

25

50

Propiedades físicoquímicas de los componentes MA

Las propiedades físicoquímicas de los componentes MA144-G1, -G2 los siguientes:

	MA144	G1	G2
5	Aspecto	Polvo amarillo amorfo, débilmente básico	Polvo rojo amorfo, débilmente básico
	Análisis elemental	C H N O	C H N O
	Encontrado	61,45 6,31 1,44 28,93	61,15 6,21 1,75 30,58
	Calculado	62,14 6,58 1,73 29,56	60,93 6,45 1,69 30,92
10	Fórmula empírica	C ₄₂ H ₅₃ O ₁₅ N	C ₄₂ H ₅₃ O ₁₆ N
	Peso molecular	811,9	827,9
	Punto de fusión (°C)	141-145	152-156
	Rotación específica $[\alpha]_D^{20}$	+ 54° (c = 0,33, CHCl ₃)	
15	Solubilidad	Soluble en agua ácida, metanol, etanol, n-butanol, acetona, dimetilsulfóxido, metilcellosolve, dimetilformamida. Ligero éter dietílico y petróleo. El hidrocloreuro es soluble en: en cloroformo, acetona y acetato de etilo.	
	Valores R _F **	0,38	0,38
	* C:M = 20:1		
20	Reacción	La solución acuosa ácida y metanólica es amarilla y vira a púrpura rojizo en medio alcalino y a pardo rojizo en solución concentrada de H ₂ SO ₄	La solución acuosa ácida es roja y vira a azul púrpura en medio alcalino y a púrpura en solución concentrada de H ₂ SO ₄
	Espectros de absorción ultravioleta y visible y $\lambda_{max} E_{1cm}^{1\%}$ en metanol (línea continua)	Fig. 1 230 (537), 259 (330), 290 (140), 432 (165)	Fig. 2 235 (580), 259 (295), 292 (101), 492 (175)
25	En HCl-0,1N-metanol (línea de puntos)	229,5 (610), 259 (372), 289 (159), 430 (169)	235 (627), 259 (300), 292 (104), 492 (178)
	En NaOH 0,1N-metanol (línea -.-.-)	239 (521), 285 (151), 317 (96), 522 (144)	242 (575), 565 (230), 605 (198)
30	Espectro de absorción infrarrojo (KBr)	Fig. 10	Fig. 11
	Espectro de RMN (RMP)	Fig. 19	Fig. 20
	* C = cloroformo, M = metanol. ** Condiciones de la cromatografía en capa fina: capa		

químicas de los componentes MA144.

Los componentes MA144-G1, -G2, -L, -N1, -S1, -S2, -U1, -U2 e -Y son

	G2				L				N1			
	C	H	N	O	C	H	N	O	C	H	N	O
débil	Polvo rojo amorfo, débilmente básico				Polvo amarillo amorfo, débilmente básico				Polvo rojo amorfo, débilmente básico			
,93	61,15	6,21	1,75	30,58	61,39	6,31	1,54	30,13	61,43	6,71	1,71	29,22
,56	60,93	6,45	1,69	30,92	61,72	6,44	1,76	30,08	61,97	6,82	1,72	29,48
	C ₄₂ H ₅₃ O ₁₆ N				C ₄₁ H ₅₁ O ₁₅ N				C ₄₂ H ₅₅ O ₁₅ N			
	827,9				797,9				813,9			
	152-156				134-136				146-147			
									+ 57,5° (c = 0,4, CHCl ₃)			

13)

a, metanol, etanol, n-butanol, acetona, acetato de etilo, cloroformo, benceno, tolueno, tilmcellosolve, dimetilformamida. Ligeramente soluble en agua, n-hexano, ciclohexano, róle. El hidrocioruro es soluble en agua, metanol, etanol pero solo ligeramente soluble na y acetato de etilo.

0,38

0,31

0,21

ácida y
la y
no en me
do roj
entrada

La solución acuosa ácida es roja y vira a azul púrpúreo en medio alcalino y a púrpura en solución concentrada de H₂SO₄

igual que para el MA144-G1

igual que para el MA144-G1

, 290 Fig. 2
235 (580), 259 (295), 292
(101), 492 (175)

Fig. 3
230 (480), 259 (298), 290
(118), 433 (151)

Fig. 4
229,5 (482), 259
(298), 290 (121),
433 (144)

72), 289 Fig. 2
235 (627), 259 (300), 292
(104), 492 (178)

Fig. 3
230 (530), 259 (324), 290
(128), 433 (156)

Fig. 4
229,5 (488), 259
(304), 290 (123),
433 (151)

, 317 Fig. 2
242 (575), 565 (230), 605
(198)

Fig. 3
238 (412), 287 (100), 318s
(68), 525 (140)

Fig. 4
239 (450), 287
(121), 318s (76),
525 (133)

Fig. 11

Fig. 12

Fig. 13

Fig. 20

Fig. 21

Fig. 22

de la cromatografía en capa fina: capa fina de ácido silícico 60F₂₅₄ (Merck Co.) a 27°C

	MA144	S1	S2	U1												
Aspecto	Polvo amarillo amorfo débilmente básico Polvo rojo amorfo, débilmente básico Polvo amarillo amorfo, débilmente básico															
Análisis elemental	C	H	N	O	C	H	N	O	C	H	N	O				
5 Encontrado	61,37	6,45	1,97	29,36	60,09	6,13	1,88	30,94	60,42	6,77	1,74	3				
Calculado	61,79	6,84	2,00	29,72	60,41	6,34	1,96	31,13	60,79	6,68	1,69	3				
Fórmula empírica	$C_{36}H_{45}O_{13}N$				$C_{36}H_{45}O_{14}N$				$C_{42}H_{55}O_{16}N$							
Peso molecular	699,8				715,8				829,9							
Punto de fusión(°C)	144-147				154-158				152-155							
10 Rotación específica $[\alpha]_D^{20}$	+77° (c = 1,0, CHCl ₃)				-				+31° (c = 1,0, CHCl ₃)							
Solubilidad	La misma que el MA144-G1				La misma que el MA144-G1				La misma que el MA144-G1							
Valores R _F **	* C:M = 20:1				0,14				0,14				0,07			
15 Reacción	La misma que el MA144-G1				La misma que el MA144-G2				La misma que el MA144-G1							
Espectros de absorción ultravioleta y visible	Fig. 5				Fig. 6				Fig. 7							
y λ_{max} (E ₁ ^{1%} en 1 cm) en MeOH (línea continua)	230 (638), 258,5 (371), 289,5 (160), 432 (177)				234,5 (607), 258,5 (306), 293 (110), 491 (189)				230 (511), 258,5 (110), 491 (189)							
20 En HCl 0,1N-metanol (línea de puntos)	229,5 (652), 258,5 (380), 289,5 (163), 431 (192)				234,5 (629), 258,5 (318), 293 (114), 491 (197)				229,5 (602), 258,5 (110), 491 (189)							
En NaOH 0,1N-metanol (línea -.-.-)	237,5 (553), 286 (141), 320 (90), 524 (161)				242 (606), 566 (244), 606 (210)				239 (520), 286 (141), 317 (94), 522 (161)							
Espectro de absorción infrarrojo (KBr)	Fig. 14				Fig. 15				Fig. 1							
Espectro de RMN(RMP)	Fig. 23				Fig. 24				Fig. 2							
25 * C = cloroformo, M = metanol																
** Condiciones de la cromatografía en capa fina: capa fina de ácido silícico 60F ₂₅₄ (Me																

S2	U1				U2				Y						
Polvo rojo amorfo, débilmente básico	Polvo amarillo amorfo, débilmente básico				Polvo rojo amorfo, débilmente básico				Polvo amarillo amorfo, débilmente básico						
H	N	O	C	H	N	O	C	H	N	O	C	H	N	O	
9	6,13	1,88	30,94	60,42	6,77	1,74	31,07	59,26	6,60	1,58	31,87	61,98	6,30	1,70	30,02
1	6,34	1,96	31,13	60,79	6,68	1,69	30,85	59,64	6,55	1,65	32,15	62,29	6,35	1,73	29,63
$C_{36}H_{45}O_{14}N$				$C_{42}H_{55}O_{16}N$				$C_{42}H_{55}O_{17}N$				$C_{42}H_{51}O_{15}N$			
715,8				829,9				845,9				810			
154-158				152-155				160-164				153-155			
-				+31° (c = 1,0, CHCl ₃)				-				+66° (c = 1,0, CHCl ₃)			
La misma que el MA144-G1				La misma que el MA 144-G1				La misma que el MA144-G1				La misma que el MA144-G1			
0,14				0,07				0,07				0,47			
La misma que el MA144-G2				La misma que el MA 144-G1				La misma que el MA144-G2				La misma que el MA144-G1			
Fig. 6				Fig. 7				Fig. 8				Fig. 9			
234,5 (607), 258,5 (306), 293 (110), 491 (189)				230 (511), 259 (325), 290 (135), 432 (164)				235 (452), 259 (247), 292 (104), 492 (150)				229,5 (580), 259 (320), 290 (126), 432 (158)			
234,5 (629), 258,5 (318), 293 (114), 491 (197)				229,5 (602), 259 (365), 283 (150), 430 (168)				235 (465), 259 (250), 292 (103), 492 (152)				229,5 (590), 259 (334), 290,5 (130), 433 (160)			
242 (606), 566 (244), 606 (210)				239 (520), 285 (143), 317 (94), 522 (144)				242 (448), 566 (200), 606 (164)				239 (497), 287 (133), 320s (82), 524 (138)			
Fig. 15				Fig. 16				Fig. 17				Fig. 18			
Fig. 24				Fig. 25				Fig. 26				Fig. 27			

capa fina de ácido silícico 60F₂₅₄ (Merck Co.) (a 27°C)

1 Determinación de la estructura

La estructura de los componentes MA144-G1, -G2, -L, -N1, -S1, -S2, -U1, -U2 e -Y de esta invención se determinó como sigue:

5 Por hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 0,1N durante 30 minutos a 85°C, las propiedades fisicoquímicas, tales como los espectros de absorción en las regiones ultravioleta, visible e infrarroja, espectros de masas y de resonancia magnética nuclear, punto de fusión, análisis elemental y valores R_f sobre capa fina de ácido silícico del radical aglicona obtenido de los componentes MA144-G1, -L, -N1, -S1, -U1 e -Y coinciden totalmente con los de la aklavinona (Tetrahedron Lett. n° 8, 28-34, 1960) y los del radical aglicona obtenido de los componentes MA144-G2, -S2 y -U2 coinciden completamente con los de la ϵ -pirromicinona (Chem.Ber.92, 1880-1903, 1959). Por otra parte, los radicales azúcar existentes en la fracción soluble en agua de los hidrolizados anteriores se determinaron por cromatografía en capa fina de ácido silícico (placa de ácido silícico 60F₂₅₄ Merck Co., n-butanol/ácido acético/agua 4:1:1) después de neutralizar y concentrar, comparando sus valores R_f con los de los azúcares auténticos obtenidos a partir de la aclacinomicina A (J.Antibiotics, 28, 830-834, 1975) y de la estreptolidizina (J.Amer.Chem.Soc. 86, 3592-3594, 1972). Los valores R_f de los radicales azúcar obtenidos de los componentes MA144 se encuentran en la siguiente tabla, observándose que hay tres clases de azúcares en MA144-G1, -G2, -L, -Y y -N1 y dos clases de azúcares en MA144-S1, -S2, -U1 y -U2.

1 Valores R_f del radical azúcar de los componentes MA144

Compuestos	Valores R_f					
	0,16	0,20	0,60	0,72	0,83	0,78
5 MA144-G1	+	-	+	-	+	-
-G2	+	-	+	-	+	-
-L	-	+	+	-	+	-
-N1	+	-	+	+	-	-
-S1	+	-	+	-	-	-
10 -S2	+	-	+	-	-	-
-U1	+	-	+	-	-	-
-U2	+	-	+	-	-	-
-Y	+	-	+	-	-	+

15 Comparando los valores R_f , las diversas reacciones coloreadas y la rotación óptica de los azúcares auténticos, una fracción de azúcar correspondiente a una $R_f = 0,16$ se identificó como L-rodosamina, la correspondiente a $R_f = 0,60$ se identificó como 2-desoxi-L-fucosa, la correspondiente a $R_f = 0,72$ se identificó como L-rodinosa y la correspondiente a $R_f = 0,83$ se identificó como L-cinerulosa pero los azúcares de $R_f = 0,20$ y $0,78$ eran desconocidos.

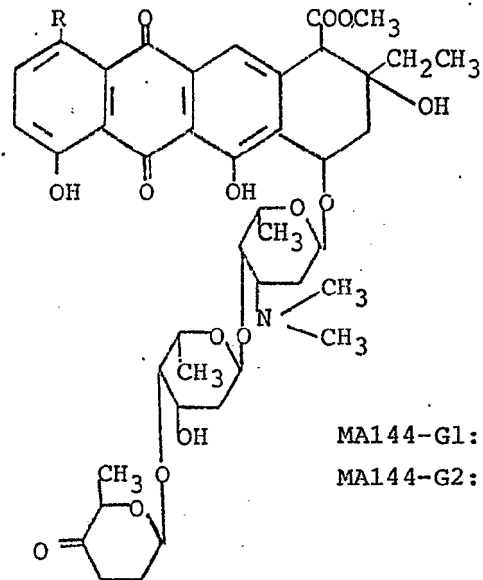
20 Por metanolisis parcial de los componentes MA144 en metanol conteniendo ácido clorhídrico 0,01N a la temperatura ambiente, los componentes MA144-G1, -N1, -S1, -U1 e -Y formaron 1-desoxipirromicina (L-rodosaminil-aklavinona, J. Antibiotics, 28, 830-834, 1975) que se identificó sobre la base de sus propiedades fisicoquímicas tales como el valor de R_f sobre capa fina de ácido silícico, punto de fusión, espectros de absorción infrarrojo, ultravioleta y visible y espectro de RMN y los correspondientes sacáridos metilados, MA144-G2,

25

30

1 -S2 y -U2, formaron pirromicina (Chem.Ber. 92, 1880-1903,
1959) mientras que los correspondientes sacáridos metilados
y MA144-L dieron un glicósido de antraciclina desconocido
y el correspondiente disacárido metilado.

5 La siguiente fórmula general para la D-cinerulosil-2-
desoxi-L-fucosil-L-rodosaminil-aclavinona y -ε-pirromicinona
de MA144-G1 y -G2, fué determinada mediante los espectros
de RMN, RMN-¹³C e IR de dichos compuestos y los del disacári-
do metilado de los mismos.

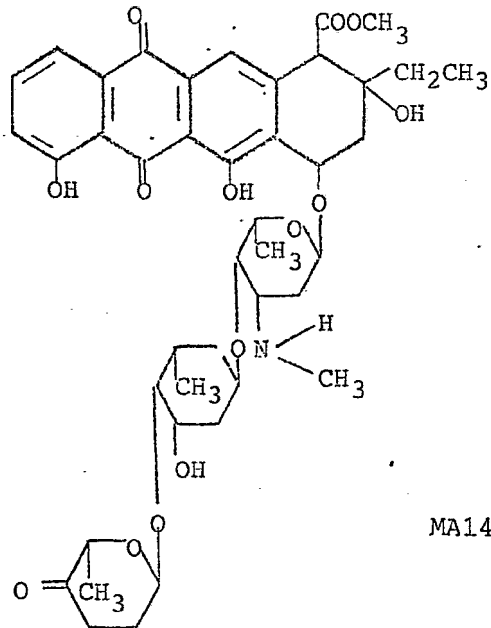


20 El componente MA144-L está constituido por aklavinona
y tres azúcares: un aminoazúcar desconocido con una R_f de
0,20, 2-desoxi-L-fucosa y L-cinerulosa. El análisis de los
25 espectros de RMN y RMN-¹³C del glicósido aklavinona y del di-
sacárido metilado obtenido a partir de MA144-L por metanoli-
sis indica que se trata de N-monodesmetil-L-rodosaminil-akla-
vinona y metil-cinerulosil-2-desoxi-L-fucósido que se obtiene
a partir de la aclacinomicina A, respectivamente.

30

Por lo tanto, se determinó que la estructura química del

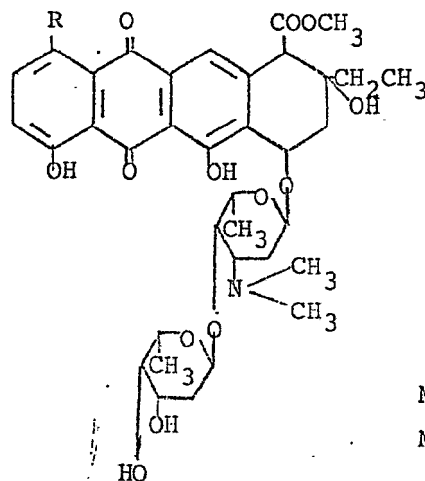
1 MA144-L era la siguiente:



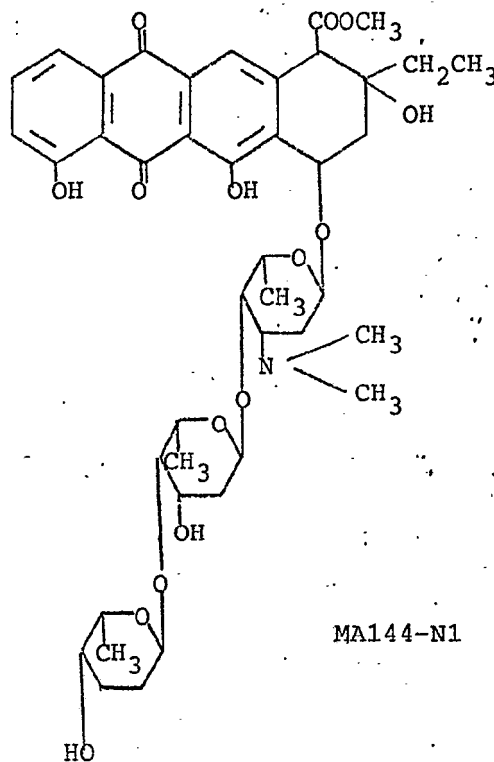
15

Los componentes MA144-S1 y -S2 contienen dos tipos de azúcares: L-rodosamina y 2-desoxi-L-fucosa. Por metanolisis se formaron metil-2-desoxi-L-fucósido y 1-desoxipirromicina o pirromicina y por lo tanto, se demostró la siguiente estructura de 2-desoxi-L-fucosil-L-rodosaminil-aklavinona o -ε-pirromicinona para los componentes MA144-S1 y -S2.

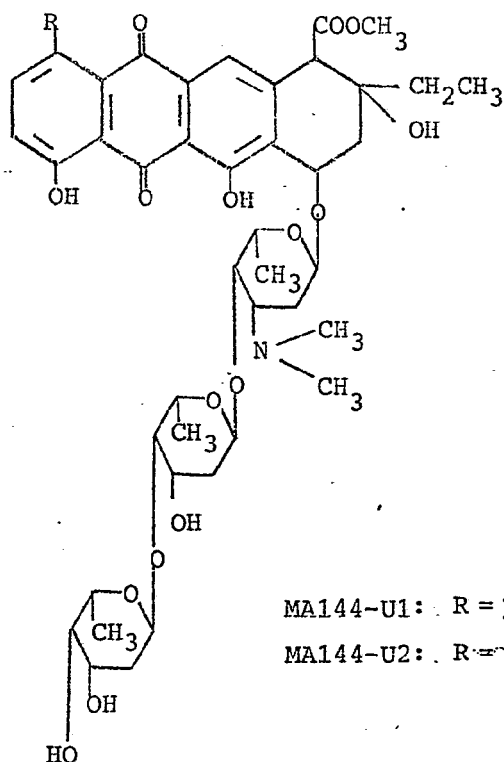
20



1 El componente MA144-N1 está constituido por aklavinona
y tres clases de azúcares: L-rodosamina, 2-desoxi-L-fucosa y
L-rodinosa. Para determinar la secuencia de los azúcares,
5 se realizó una hidrólisis suave en ácido clorhídrico al 0,5%
a la temperatura ambiente, durante 10 minutos, siguiendo el
método de Biedermann y colaboradores (Pharmazie, 27, 782-
789, 1972), liberándose L-rodinosa y formándose simultánea-
mente MA144-S1. Por lo tanto, la estructura química del MA144-
N1 es la siguiente:



25 Los componentes MA144-U1 y -U2 contienen dos clases de
azúcares: L-rodosamina y 2-desoxi-L-fucosa. Además, por meta-
nolisis, se forman metil-2-desoxi-L-fucosil-2-desoxi-L-fucó-
sido, que se detecta por los espectros de RMN y RMN-¹³C y
30 1-desoxipirromicina o pirromicina y, por lo tanto, se propu-
so la siguiente estructura química:



El componente MA144-Y está constituido por aklavinona y tres clases de azúcares: L-rodosamina, 2-desoxi-L-fucosa y un azúcar desconocido. Además, por metanolisis del MA144-Y se obtiene 1-desoxipirromicina y un disacárido metilado desconocido. Este disacárido metilado se extrajo con éter y se purificó por cromatografía en columna de ácido silícico y Sephadex LH-20 (marca registrada) y después se cristalizó en benceno formando agujas blancas. Las propiedades fisicoquímicas de dicho sacárido metilado son las siguientes:

Análisis elemental para $C_{13}H_{20}O_6$:

Encontrado : C, 57,77 %; H, 7,31 %

Calculado : C, 57,34 %; H, 7,40 %.

Peso molecular: 272

Punto de fusión: 109-110°C

Rotación óptica: $[\alpha]_D^{22} = -65^\circ$ (c = 1,0, $CHCl_3$).

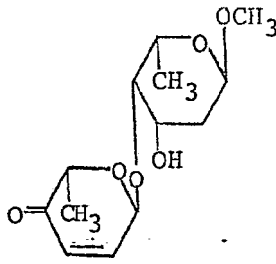
1 6 Espectro de absorción ultravioleta y visible en
metanol: Figura 28, $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (ϵ) = 209 (6726).
Espectro de absorción infrarrojo en KBr: Fig. 29.
Espectro de RMN en CDCl_3 : Fig. 30 (100 MHz).

5 Como puede verse en las Figuras 28 y 29, el metil-disacárido del MA144-Y presenta absorción a 1680 cm^{-1} y $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (ϵ): 209 (6726), indicando la presencia del grupo ceto α,β -insaturado en la estructura.

10 En el espectro de RMN protónico de la Figura 30, un doblete de tres protones a δ 1,26 ($J = 6,8 \text{ Hz}$), uno de dos protones a δ 1,9, un doblete de doblete de un protón a δ 3,74 ($J = 1$ y 3 Hz), un cuartete de un protón a δ 3,94 ($J = 6,8 \text{ Hz}$), una banda de un protón a δ 4,07 y una banda de un protón a δ 4,8 fueron atribuidos a 9 protones de la 2-desoxi-L-fucosa
15 y un doblete de 3 protones a δ 1,4 ($J = 6,8 \text{ Hz}$) y un cuartete simétrico de un protón a δ 4,73 ($J = 6,8 \text{ Hz}$), desprotegido por el átomo de oxígeno etéreo, fueron acoplados entre sí y atribuidos a los protones metílicos en C-6' y al protón en C-5', respectivamente. Mediante experimentos de desacoplamiento de spin, un doblete a δ 6,86 ($J = 3,5$ y $10,0 \text{ Hz}$), y
20 dos dobletes a δ 6,11 ($J = 10,0 \text{ Hz}$) y δ 5,26 ($J = 3,5 \text{ Hz}$) fueron atribuidos a los protones vinílicos del sistema ABM, correspondientes a los protones en C-2', C-3' y C-1', respectivamente. Por lo tanto, el azúcar distinto de la 2-desoxi-L-fucosa en el metil-disacárido se identificó como 2,3,6-tri-
25 desoxihex-2-enopiranos-4-ulosa que está unida al C-4 de la 2-desoxi-L-fucosa.

30 De los resultados analizados anteriormente, se deduce que el disacárido metilado es un nuevo azúcar de la siguiente estructura:

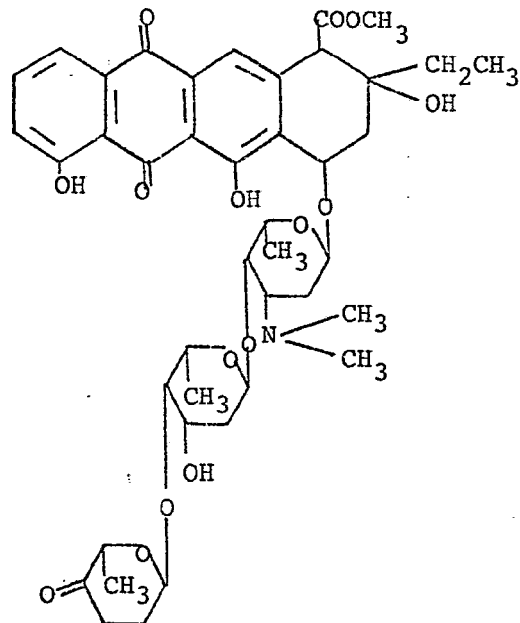
1



5

y el azúcar terminal fué denominado aculosa. Por lo tanto, la estructura química del MA144-Y determinada en esta invención es la siguiente:

10



15

20

25

Aunque se conocen diversos antibióticos de glicósidos de antraciclina que contienen las agliconas aklavinona y ϵ -píromicinona, los compuestos MA144-G1, -G2, -L, -N1, -S1, -S2, -U1, -U2 e -Y son claramente diferentes de cualquiera de ellos en características tales como fórmula molecular, productos de degradación por hidrólisis ácida, espectros ultravioleta-

30

1 ta, visible, infrarrojo y de RMN y similares, como ya se ha
descrito en lo que antecede. Entre los glicósidos de antraci-
clina conocidos, la aklavina y la pirromicina están consti-
tuidos por aklavinona o ϵ -pirromicinona y un azúcar, la L-ro-
5 dosamina, que los distingue de los compuestos de esta inven-
ción. La aclacinomicina A y la cinerrubina A contienen tres
azúcares: L-cinerulosil-2-desoxi-L-fucosil-L-rodosamini-
lo. Los componentes MA144-M1 y MA144-M2 (solicitud de paten-
te japonesa Showa 51-39688) contienen también tres azúcares:
10 L-amicetosil-2-desoxi-L-fucosil-L-rodosaminilo y la ro-
dirrubina B (solicitud de patente japonesa Showa 51-98113)
está constituida por L-rodinosil-L-rodinosil-L-rodosaminilo
y estos tres antibióticos conocidos se distinguen de los com-
puestos de esta invención por el azúcar. El azúcar de la ro-
15 dirrubina A está constituido por L-rodinosil-2-desoxi-L-fu-
cosil-L-rodosaminilo que es el mismo que el del MA144-N1 de
esta invención pero la aglicona del MA144-N1 es la aklavino-
na que es diferente de la ϵ -pirromicinona de la rodirrubi-
na A.

20 Por lo tanto, se ha comprobado que los componentes
MA144-G1, -G2, -L, -N1, -S1, -S2, -U1, -U2 e -Y de esta in-
vención son sustancias nuevas.

Actividad antimicrobiana de los componentes MA144

25 Los componentes MA144-G1, -G2, -L, -S1, -S2, -N1, -U1,
-U2 e -Y presentan actividad antimicrobiana contra diversos
tipos de microorganismos. La concentración mínima de inhibi-
ción de estos antibióticos, determinada por el método de
dilución del caldo, se encuentra en la siguiente tabla.

Espectro antimicrobiano de los componentes MA144

Microorganismo de ensayo	C.M.I. (mcg/ml)										Y
	G1	G2	L	N1	S1	S2	U1	U2	Y	Y	
Staph. aureus FDA 209P	6,25	3,12	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	3,1	6,25	3,1	0,4
Staph. aureus, Smith	1,56	1,56	1,56	0,78	3,1	0,78	3,1	0,78	3,1	0,78	0,2
Bac. subtilis ATCC 6633	3,12	1,56	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	0,2
Bac. cereus ATCC 9634	1,56	0,78	1,56	0,78	1,56	0,78	0,78	1,56	1,56	1,56	0,1
Bac. megaterium NRRL B-938	6,25	6,25	6,25	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	1,56	0,2
Sar. lutea ATCC 9341	0,78	0,78	0,78	0,78	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	0,2
Mic. flavus	0,2	0,2	0,2	0,4	1,56	0,78	0,78	1,56	1,56	0,78	0,1
Cory. bovis 1810	1,56	0,78	1,56	0,78	0,78	0,78	0,78	6,25	6,25	6,25	0,2
Ps. fluorescens NIHJB-254	100	100	100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Pr. morganii	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Mycobact. smegmatis ATCC 607	3,12	3,12	3,1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	3,1
Can. albicans IAM 4905	100	>100	100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Can. tropicalis IAM 4942	100	>100	100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100

1

5

10

15

20

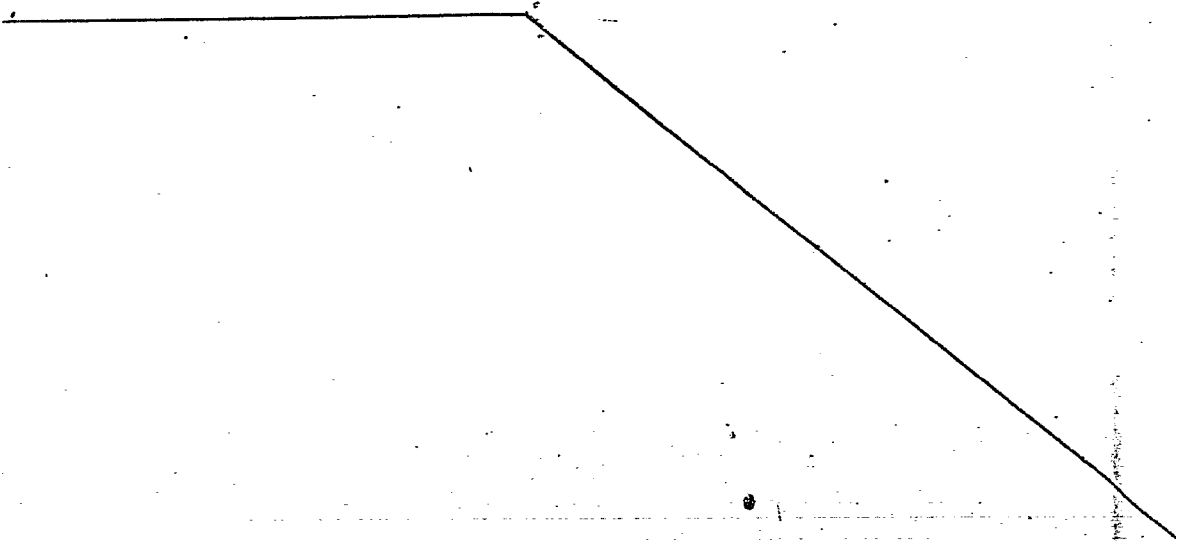
25

50

Espectro antimicrobiano de los compo

1
5
10
15
20
25
30

<u>Microorganismo de ensayo</u>	<u>C.M.I. (mcg)</u>				
	<u>MAI 44-</u>				
	<u>G1</u>	<u>G2</u>	<u>L</u>	<u>N1</u>	<u>S1</u>
<u>Staph. aureus</u> FDA 209P	6,25	3,12	6,25	6,25	6,25
<u>Staph. aureus</u> , Smith	1,56	1,56	1,56	0,78	3,12
<u>Bac. subtilis</u> ATCC 6633	3,12	1,56	3,1	3,1	3,12
<u>Bac. cereus</u> ATCC 9634	1,56	0,78	1,56	0,78	1,56
<u>Bac. megaterium</u> NRRL B-938	6,25	6,25	6,25	3,1	3,12
<u>Sar. lutea</u> ATCC 9341	0,78	0,78	0,78	0,78	1,56
<u>Mic. flavus</u>	0,2	0,2	0,2	0,4	1,56
<u>Cory. bovis</u> 1810	1,56	0,78	1,56	0,78	0,78
<u>Ps. fluorescens</u> NIHJB-254	100	100	100	>100	>100
<u>Pr. morgani</u>	>100	>100	>100	>100	>100
<u>Mycobact. smegmatis</u> ATCC 607	3,12	3,12	3,1	>100	>100
<u>Can. albicans</u> IAM 4905	100	>100	100	>100	>100
<u>Can. tropicalis</u> IAM 4942	100	>100	100	>100	>100



1

Como ya se ha dicho, los componentes MA144 de esta invención presentan actividad antimicrobiana, especialmente contra las bacterias Gram-positivas y, por lo tanto, son terapéuticamente útiles en el tratamiento de la difteria, tuberculosis, pneumonía, tétanos y otra enfermedades infecciosas causadas por las bacterias Gram-positivas en los mamíferos.

5

Actividad antitumoral y toxicidad aguda de los componentes

MA144

10

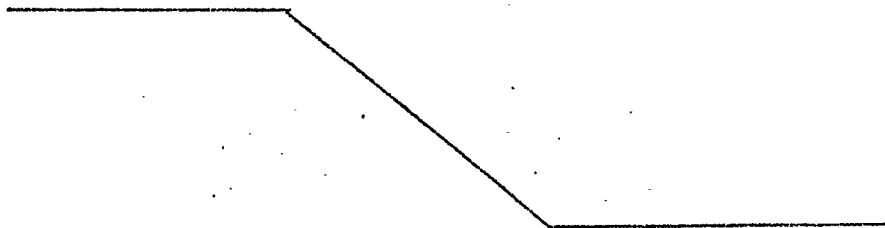
Los componentes MA144 de esta invención presentan una marcada actividad antitumoral con poca toxicidad en los ensayos con animales experimentales y, por lo tanto, son terapéuticamente útiles para inhibir el crecimiento de los tumores en mamíferos. En especial, los compuestos de esta invención presentan marcados efectos inhibidores de la leucemia L1210 del ratón. Por ejemplo, unos ratones BDF₁, de 19-22 g de peso, se inocularon intraperitonealmente con 1×10^6 células de L1210 por ratón y 24 horas después de la inoculación, se inyectó intraperitonealmente el compuesto una vez al día, durante 9 días consecutivos. Al cabo de 30 días, se determinó el porcentaje de prolongación del tiempo de supervivencia con respecto al control, encontrándose los resultados en la siguiente tabla junto con los valores de la DL₅₀ obtenidos mediante una sola inyección intraperitoneal en ratones dd.

15

20

25

30



1 Eficacia terapéutica frente a la leucemia L1210 en ratones
y toxicidad de los componentes MA144

Prolongación del tiempo de supervivencia (% T/C)

MA144-

Compuestos	G1	G2	L	N1	S1	S2	U1	U2	Y
Actividad anti-L1210 dosis (mg/kg/día)									
20	-	-	-	-	-	-	-	-	65
10	-	-	135	108	98	-	90	-	143
5	187	90	128	200	140	85	127	86	127
2,5	215	130	114	184	168	110	165	86	115
1,25	145	164	95	137	133	145	157	112	-
0,6	130	140	-	123	114	130	129	135	-
0,3	118	108	-	110	96	118	114	129	-
0,15	101	97	-	-	-	97	-	110	-

15 Toxicidad (ratones)

DL₅₀

Administración intraperitoneal (mg/kg)

28,5	17,0	45,5	32,5	24,4	12,5	30,2	14,5	40-50
------	------	------	------	------	------	------	------	-------

20 Citotoxicidad frente a células de L1210 cultivadas de los
componentes MA144

25 Los componentes MA144 de esta invención inhiben el crecimiento de las células tumorales de los mamíferos en cultivos, especialmente a baja concentración e inhiben por completo la síntesis de RNA. En este experimento, se inocularon células de L1210 en un medio RPMI 1640 (Nissui, Rosewell Park Memorial Institute 1640) conteniendo 20 % de suero de ternera y se cultivaron a 37°C durante 3 días en un incubador de CO₂ y después se agregaron a una solución de los compuestos de esta invención a una concentración de 0,1µg/ml, el primer día. En el experimento de incorporación de ¹⁴C, los compues-

30

1 Estos de esta invención se agregaron a una concentración de
0,5 µg/ml para la síntesis de RNA y de 1,0 µg/ml para la
síntesis de DNA y también se agregó al medio ¹⁴C-timidina
o ¹⁴C-uridina, durante 60 minutos a 37°C. Los efectos sobre
5 el crecimiento y la síntesis de DNA y RNA fueron indicados
por el porcentaje de inhibición con respecto al control,
mostrado en la siguiente tabla. De los resultados se deduce
que los componentes MA144 inhiben marcadamente el crecimen-
to y la síntesis de RNA de las células de L1210 cultivadas
10 a baja concentración. Estos resultados corroboran la efi-
cacia terapéutica sobre los tumores experimentales en ani-
males.

15 Efectos de los componentes MA144 sobre el crecimiento y la
síntesis macromolecular en células de L1210 cultivadas

Compuestos	Inhibición, %	
	Crecimiento (el día 2)	Síntesis de RNA DNA
Aclacinomicina	89,7	81,6 69,6
MA144-G1	80,7	65,6 40,9
-G2	82,1	57,8 39,4
-L	27,4	39,7 11,3
-N1	79,2	74,4 57,4
-S1	86,0	74,1 76,5
-S2	88,1	65,6 48,8
-U1	78,5	67,2 27,7
-U2	80,5	71,5 30,5
-Y	90,2	93,9 99,6

1 9 Aplicación terapéutica de los componentes MA144

5 Como se ha mencionado anteriormente, los componentes MA144-G1, -G2, -L, -N1, -S1, -S2, -U1, -U2 y -Y de esta invención son antibióticos nuevos, útiles en medicina humana y veterinaria y también presentan marcada acción inhibidora de los tumores malignos de los mamíferos y frente a las bacterias Gram-positivas.

10 La invención incluye dentro de su alcance las composiciones farmacéuticas que contienen como mínimo uno de los compuestos antibióticos antes mencionados junto con un vehículo compatible y farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden prepararse en cualquier forma farmacéutica apropiada para la vía de administración utilizada. Son ejemplos de estas composiciones las composiciones sólidas para administración oral como tabletas, cápsulas, píldoras, polvos y gránulos; las composiciones líquidas para administración oral como soluciones, suspensiones, jarabes y elixires y los preparados para administración parenteral como soluciones, suspensiones o emulsiones estériles.

15 20 Los compuestos de esta invención forman sales de adición de ácidos no tóxicos con diversos reactivos orgánicos e inorgánicos formadores de sales y forman complejos no tóxicos con el ácido desoxirribonucleico. Así, las sales de adición de ácidos formadas con ácidos farmacéuticamente aceptables como sulfúrico, fosfórico, clorhídrico, acético, propiónico, oleico, palmítico, cítrico, succínico, tartárico, glutámico, pantoténico, etc y los complejos no tóxicos con ácido desoxirribonucleico pueden emplearse de la misma forma que los componentes MA144 propiamente dichos.

25 30 Se observará que las cantidades actualmente preferidas

1 de los compuestos de esta invención varían con el compues-
to particular utilizado, con la composición particular for-
mulada, con la forma y el punto de aplicación particulares
5 y con el huésped y la enfermedad en tratamiento. En gene-
ral, los componentes MA144 se inyectan intraperitoneal,
intravenosa, subcutánea o localmente o se administran por
vía oral a los animales y por vía intravenosa, intraperito-
neal, local u oral a los seres humanos. Los expertos en la
10 técnica deben tener en cuenta muchos factores que modifican
la acción de la droga, por ejemplo edad, peso corporal, se-
xo, dieta, tiempo de administración, vía de administración,
velocidad de excreción, estado del paciente, combinación de
drogas, sensibilidades de reacción y gravedad de la enfer-
15 medad. La administración puede realizarse continua o periód-
icamente dentro de la dosis máxima tolerada. Las propor-
ciones óptimas de aplicación para una serie dada de condi-
ciones pueden ser determinadas por los expertos en este
campo utilizando ensayos convencionales de determinación de
la dosis a la vista de las indicaciones anteriores.

20 Para uso como agentes antibacterianos, los componentes
MA144 se administran en general de manera que la concentra-
ción de ingrediente activo sea superior a la concentración
mínima de inhibición para el organismo particular que está
siendo tratado.

25 Descripción de la cepa ME505-HE1

Uno de los organismos (productor de los antibióticos rodirru-
binas) de acuerdo con esta invención fué aislado de una
muestra de tierra recogida en el Instituto de Química Mi-
crobiana, Tokyo, en Julio de 1974, y recibió el número de
30 cepa ME505-HE1.

La cepa n° ME505-HE1 tiene las siguientes propiedades:

1. Propiedades morfológicas

Bajo el microscopio, se observan micelios aéreos relativamente largos y rectoflexibles a partir de micelios de substrato ramificados. La cadena de esporas madura está constituida por más de 10 esporas que miden 0,6-0,8 x 1,0-1,2 micras y su superficie es lisa.

2. Propiedades en diversos medios

La descripción entre paréntesis sigue los patrones de color del "Color Harmony Manual" publicado por la Container Corporation of America, Estados Unidos.

- (1) Sobre agar nitrato de sacarosa, incubado a 27°C: crecimiento incoloro a púrpura rojizo pálido (el centro de las colonias es de rosa a púrpura rojizo mate [9 ic a 9 lc, rosa frambuesa]). Micelio aéreo ausente o blanco escaso; no hay pigmento soluble. Cuando se agrega una gota de HCl 1N a un pequeño trozo de micelio cortado con un taladra-corchos al cabo de 15 días de incubación, el color púrpura rojizo del cultivo cambia a rosa pálido.
- (2) Sobre agar glucosa-asparagina, incubado a 27°C: crecimiento que varía de incoloro a naranja rojizo mate (5 lc cobre) hasta naranja rojizo claro (6 ga, rosa coral claro); no hay micelio aéreo; no hay pigmento soluble.
- (3) Sobre agar glicerol-asparagina (medio ISP n° 5) incubado a 27°C: crecimiento que varía de incoloro a naranja rojizo claro (5 lc, cobre) hasta rojo amarillento (6 ne, pino rojo) hasta rojo purpúreo (9 nc, frambuesa); no hay micelio aéreo o se observa un micelio aéreo parcial y fino, cuyo color varía de blanco a blanco rosado a rosa pálido; no hay pigmento soluble. Cuando se agrega una

- 1 gota de NaOH 1N al micelio cortado mediante un pequeño
 taladra-corchos al cabo de 15 días de incubación, el
 color rojo amarillento del cultivo se vuelve púrpura.
- 5 (4) Sobre agar sales inorgánicas-almidón (medio ISP n° 4)
 incubado a 27°C: crecimiento incoloro a marrón rojizo
 grisáceo (4 ni, marrón de especias a 5 lg, marrón cacao);
 delgado micelio aéreo de blanco a rosa pálido; ligero
 pigmento soluble marrón.
- 10 (5) Sobre agar tirosina (medio ISP n° 7) incubado a 27°C:
 crecimiento de incoloro a marrón pálido a marrón amari-
 llento a marrón rojizo grisáceo; además, al cabo de unos
 15 días de incubación el color varía a marrón amarillen-
 to pálido (6 lc, coral) a rojo mate (6 ne, pino rojo) o
 a marrón rojizo oscuro (7 pn, marrón rosa oscuro a 7 1/2
15 pl, marrón intenso); no se observa micelio aéreo o se
 observa un micelio aéreo blanco escaso al cabo de 21
 días de incubación; ligero pigmento soluble marrón ro-
 jizo.
- 20 (6) Sobre agar nutriente, incubado a 27°C: crecimiento ma-
 rrón amarillento pálido a marrón pálido; micelio aéreo
 nulo o escaso blanco al cabo de 15 días de incubación;
 pigmento soluble marrón.
- 25 (7) Sobre agar extracto de malta-extracto de levadura (me-
 dio ISP n° 2) incubado a 27°C: crecimiento incoloro a
 amarillo pálido a marrón pálido a rojo mate a púrpura
 rojizo oscuro (7 1/2 ng, vino viejo a 7 1/2 pg, vino);
 micelio aéreo delgado de blanco a blanco rosado al cabo
 de unos 7 días de incubación; muy ligero pigmento solu-
 ble marrón al cabo de 11 días de incubación.
- 30 (8) Sobre agar harina de avena (medio ISP n°3) incubado a

- 1
27°C: crecimiento incoloro a marrón pálido a naranja rojizo mate a marrón rojizo (6 pi, caoba marrón); sin micelio aéreo; muy ligero pigmento soluble naranja mate.
- 5
(9) Sobre agar nitrato de glicerol incubado a 27°C: incoloro a rosa pálido a rojo grisáceo a rojo mate a rojo oscuro (8 ne, vino rosado) a púrpura rojizo oscuro (9 ne, frambuesa a 9 pg, ciruela roja) a púrpura marrón oscuro; micelio aéreo blanco escaso o nulo. Cuando se agrega una gota de NaOH 1N a un pequeño trozo de micelio cortado con el taladra-corchos al cabo de 15 días de incubación, el color rojo oscuro del cultivo se vuelve púrpura; no hay pigmento soluble.
- 10
(10) Sobre agar almidón, incubado a 27°C: crecimiento incoloro a rosa pálido a marrón rojizo pálido a naranja rojizo mate o púrpura rojizo mate (8 ne, vino rosado); micelio aéreo delgado blanco rosado; no hay pigmento soluble.
- 15
(11) Sobre agar malato cálcico incubado a 27°C: crecimiento incoloro a rosa pálido; no hay casi micelio aéreo o se observa un escaso micelio aéreo blanco; sin pigmento soluble.
- 20
(12) Sobre agar celulosa incubado a 27°C: crecimiento incoloro a marrón pálido; sin micelio aéreo y sin pigmento soluble.
- 25
(13) Sobre placas de gelatina:
Sobre placa de gelatina pura incubada a 20°C: crecimiento incoloro a marrón amarillento pálido a marrón pálido; no hay micelio aéreo; pigmento soluble marrón
- 30
Sobre placa de gelatina de glucosa-peptona incubada a 27°C: crecimiento incoloro a marrón amarillento pálido

1 a marrón pálido; no hay micelio aéreo; pigmento soluble
marrón oscuro.

5 (14) Sobre leche descremada incubada a 30°C: crecimiento in-
coloro a marrón amarillento pálido a marrón amarillento;
micelio aéreo blanco parduzco escaso o casi nulo; pigmen-
to soluble marrón.

(3) Propiedades fisiológicas

(1) Intervalo de temperaturas de crecimiento:

10 La temperatura óptima para el crecimiento sobre agar
de extracto de levadura-almidón (almidón soluble 1,0 %, extracto de levadura (Daigoeiyokagaku Co.) 0,2 %; agar 3,4 %; pH 7,0-7,2) fué estudiada a 20°, 24°, 27°, 30°, 37° y 50°C. Se observó crecimiento a todas las tempera-
15 turas excepto a 37° y 50°C y la temperatura óptima parece encontrarse alrededor de 27°C:

(2) Licuefacción de la gelatina (incubado a 20°C sobre ge-
latina pura al 15 %; a 27°C sobre gelatina de glucosa-
peptona:

20 Sobre un medio de gelatina pura, la licuefacción comenzó moderadamente al cabo de unos 3 días de incubación. So-
bre un medio de gelatina de glucosa-peptona, la licuefac-
ción comenzó entre moderada e intensamente al cabo de unos 3 días de incubación.

25 (3) Hidrólisis del almidón (incubado a 27°C sobre agar sales inorgánicas-almidón y agar almidón): actividad hidrolíti-
ca de moderada a intensa observada al cabo de 5 días de incubación.

30 (4) Coagulación y peptonización de la leche descremada (in-
cubado a 30°C sobre leche descremada): no se observó nin-
guna variación al cabo de 7 días de incubación, la coagu-

1 lación fué completa al cabo de 10 días de incubación y después comenzó la peptonización que terminó al cabo de 3 semanas de incubación. La acción fué entre moderada e intensa.

5 (5) Formación de pigmento melanoide (incubado a 27°C sobre caldo de triptona-extracto de levadura, medio ISP n° 1; agar de peptona-extracto de levadura-hierro, medio ISP n° 6; agar tirosina, medio ISP n° 7); se observó un pigmento melanoide sobre el agar de peptona-extracto de
10 levadura-hierro y el agar tirosina y no se observó pigmentos sobre el caldo de triptona-extracto de levadura.

(6) Utilización de los hidratos de carbono (incubado a 27°C, agar basal de Pridham-Gottlieb, medio ISP n° 9): buen crecimiento con L-arabinosa, D-xilosa, D-glucosa, D-fructosa, inositol, L-ramnosa, rafinosa y D-manitol pero no hay crecimiento con sacarosa.
15

(7) Licuefacción del malato cálcico (incubado a 27°C sobre agar de malato cálcico): la licuefacción del malato cálcico alrededor del crecimiento comenzó al cabo de 5 días de incubación con actividad entre moderada e intensa.
20

(8) Reducción de nitratos (incubado a 27°C sobre peptona-agua conteniendo 1,0 % de nitrato potásico, medio ISP n° 8): negativo.

25 Resumiendo las propiedades anteriores, la cepa ME505-HE1 pertenece al género Streptomyces y el micelio aéreo no forma espirales o remolinos y la superficie de las esporas es lisa. El crecimiento sobre diversos medios es de marrón pálido a naranja rojizo mate a púrpura rojizo mate a púrpura rojizo oscuro y no se observó micelio aéreo o se observó un
30 delgado micelio de blanco a blanco rosado a rosa pálido. No

1 se observó pigmento soluble en casi ningún medio pero en
algunos casos se produjo un ligero pigmento soluble pardo
o marrón rojizo. Además, el reverso de la colonia presenta-
ba un característico color rojo vino con propiedades de indi-
5 cador del pH. La producción de pigmento melanoide fué posi-
tiva sobre agar peptona-extracto de levadura-hierro y agar
tirosina y negativa sobre caldo de triptona-extracto de le-
vadura. Las actividades hidrolíticas sobre proteína y almi-
dón son de moderadas a intensas. Además, como punto caracte-
10 rístico de la cepa, no hay crecimiento a 37°C. Considerando
las especies conocidas en comparación con las característi-
cas anteriores, el Streptomyces capoamus parece estar estre-
chamente relacionado con esta cepa. (Referencia 1. Journal
of Systematic Bacteriology, vol. 22, 282, 1972). Cuando se
15 comparó la cepa ME505-HE1 con la cepa patrón de Streptomyces
capoamus, se obtuvieron los resultados indicados en la si-
guiente tabla.

Como puede verse en la tabla, aparecen diferencias en-
tre la cepa ME505-HE1 y el Streptomyces capoamus en primer
20 lugar en la forma del micelio aéreo; es decir, el Streptomyces
capoamus forma espirales terminales de los micelios aéreos
mientras que la cepa ME505-HE1 tiene un micelio aéreo escaso
y no hemos podido observar ninguna espiral. La formación de
pigmento melanoide sobre medio ISP n° 1, la coagulación de
25 la leche, la licuefacción de la gelatina y la utilización
de inositol y de la L-ramnosa de ambas cepas difieren entre
sí pero otras propiedades de las dos cepas coinciden bastan-
te bien. Se ha depositado un cultivo de la cepa ME505-HE1 en
el Instituto de Investigaciones sobre fermentación el 7 de
30 Agosto de 1976, bajo el n° FERM 3667.

	ME505-HE1	Streptomyces capoamus ISP 5494	
1	Forma del micelio aéreo	Rectoflexible	Espirales terminales (Retinaculia perti)
	Superficie de las esporas	Lisa	Lisa
5	Color del micelio aéreo	Blanco parduzco a blanco rosado. rosa pálido	Blanco parduzco a rosa. gris pálido
	Color del cultivo	Púrpura rojizo mate a púrpura rojizo oscuro	Naranja rojizo mate a marrón rojizo a púrpura rojizo oscuro
	Pigmento soluble	parduzco o marrón rojizo	parduzco o naranja rojizo claro
10	Formación de pigmento melanoide		
	Medio ISP n° 1	-	(+)
	Medio ISP n° 6	+	+
	Medio ISP n° 7	+	+
	Hidrólisis del almidón	+	±
15	Coagulación de la leche	+	-
	Peptonización de la leche	+	+
	Licuefacción de la gelatina		
	Placa de gelatina pura	+	+
	Placa de gelatina de glucosa-peptona	+	-
	Reducción de nitratos	-	-
20	Utilización de hidratos de carbono:		
	D-glucosa	+	+
	L-arabinosa	+	+
	D-xilosa	+	+
	D-fructosa	+	+
	Sacarosa	-	-
	Inositol	+	-
25	L-ramnosa	+	-
	Rafinosa	+	+
	D-manitol	+	+

(+) Probablemente +, ±: débilmente positiva, -: casi negativa.

Los siguientes ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no debe considerarse que limitan el alcance de la invención.

EJEMPLO 1

30

Se prepara un medio nutritivo de la siguiente composición:

1	Glucosa	2 %
	Almidón de patata	2 %
	"Meat" (polvo de soja Ajinomoto Co.)	2 %
5	K ₂ HPO ₄	0,1 %
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 %
	NaCl	0,3 %
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,0008 %
	CuSO ₄ ·7H ₂ O	0,0007 %
10	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,0001 %
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,0002 %
	pH	7,2

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 MA144-M1 (FERM-P-2455) ATCC 31133 y se incuba a 30°C durante 48 horas en un sacudidor rotatorio. Se inoculan asépticamente 10 litros del medio previamente esterilizado, en un fermentador vibratorio de acero inoxidable de 20 litros, con 200 ml del cultivo de siembra anterior. La fermentación se realiza a 28°C durante 18 horas con agitación (300 rpm) y aireación (5 litros/minuto). Después se trasiegan 10 litros de este cultivo a 600 litros del medio previamente esterilizado en un tanque de acero inoxidable de 2 kilolitros y se cultiva a 28°C durante 36 horas con agitación (180 rpm) y aireación (300 litros/minuto).

El caldo de cultivo obtenido (580 litros) se ajusta a pH 5,0 con ácido sulfúrico y se filtra con tierra de diatomeas. La torta filtrada resultante (56 kg) se suspende en 50 litros de acetona y se filtra después de agitar durante una hora. El residuo se extrae de nuevo con 50 litros de

1 acetona. Ambos extractos se concentran a 25 litros bajo presión reducida, se agregan a 20 litros de acetato de etilo y se agitan. Después de separar la capa de acetato de etilo y concentrar hasta 1 litro a presión reducida, se precipita
5 la mezcla cruda de MA144 por adición de 15 litros de n-hexano al concentrado y después de lavar dos veces con n-hexano, se obtienen 36 g de un polvo rojo. Por otra parte, el filtrado de cultivo antes obtenido se ajusta a pH 6,8 con hidróxido sódico y se extrae con 100 litros de tolueno. El extracto se concentra a 10 litros a presión reducida y se extrae
10 de nuevo con 10 litros de tampón de acetato a pH 3,5. La capa acuosa obtenida se ajusta a pH 6,8, se extrae de nuevo con 4 litros de tolueno y se concentra a 30 ml a presión reducida. La mezcla cruda de MA144 se precipita por adición de 300 ml de n-hexano al concentrado, obteniéndose 2,5 g de
15 polvo rojo.

EJEMPLO 2

20 El polvo crudo de mezcla MA144 obtenido a partir de la torta filtrada en el Ejemplo 1 (10 g) se disuelve en 100 ml de tolueno y se introduce en una columna (5 x 40 cm) rellena con 300 g de ácido silícico y, después de desprejar el eluato inicial con tolueno al 1,5 % de metanol, se eluyen sucesivamente las fracciones MA144-G1, -G2 y -L con tolueno al 2 % de metanol. Después se eluye la fracción de MA144-N1 con
25 tolueno al 3 % de metanol y las fracciones MA144-S1 y -S2 y MA144-U1 y -U2 se eluyen con tolueno al 5 % de metanol, sucesivamente. Después de concentrar cada una de las fracciones obtenidas, se obtienen por adición de n-hexano 210 mg de una mezcla de MA144-G1 y -G2, 190 mg de MA144-L, 570 mg
30 de una mezcla de MA144-N1 y rodirrubina A, 360 mg de una mez-

1 cla de MA144-S1 y -S2 y 270 mg de una mezcla de MA144-U1 y
-U2, todos ellos en forma de polvo rojo anaranjado crudo.

EJEMPLO 3

5 En 6, ml de tolueno se disuelven 2,5 g del polvo crudo
de la mezcla de MA144 obtenida a partir del filtrado de cul-
tivo del Ejemplo 1, se introduce en una columna rellena con
100 g de ácido silícico y después se eluye la fracción de
MA144-Y con tolueno al 1,7 % de metanol a 5°C. La fracción
10 resultante se concentra a sequedad a presión reducida, obte-
niéndose 400 mg de MA144-Y crudo en forma de polvo rojo ana-
ranjado.

EJEMPLO 4

15 Se disuelven 210 mg de la mezcla de MA144-G1 y -G2 obte-
nida en el Ejemplo 2 en una pequeña cantidad de acetato de
etilo y se introduce en una columna rellena con 30 g de
Column-Lite (marca registrada, Fuji Chem.Co. para el ácido
silícico) y se eluye con una mezcla de acetato de etilo y
metanol 1:1. La fracción amarilla se concentra a sequedad a
20 presión reducida y el residuo obtenido se disuelve en 50 ml
de cloroformo, se sacude con 50 ml de tampón de fosfato
0,01M conteniendo EDTA 10^{-3} M para eliminar los iones metáli-
cos residuales y la capa clorofórmica se lava dos veces con
agua, se seca con sulfato sódico anhidro y después se concen-
25 tra a sequedad a presión reducida. Se obtienen 110 mg de un
polvo amarillo de MA144-G1.

30 Después de eluir las fracciones amarillas, la columna
de Column-Lite antes mencionada se trata con una mezcla de
metanol al 30 % que contiene EDTA 10^{-3} M y el eluato rojo
resultante se evapora a sequedad, se disuelve en una peque-
ña cantidad de cloroformo y se separan los iones metálicos

1 6residuales siguiendo el método antes mencionado, obteniéndose
se 22 mg de MA144-G2 en forma de polvo rojo (EDTA = ácido
etilendiaminotetraacético).

5 El polvo crudo de MA144-L del Ejemplo 2 se trata de la
misma forma que el MA144-G1 y se obtienen 115 mg de un pol-
vo amarillo de MA144-L. Siguiendo el procedimiento de refi-
nado del MA144-G1 y -G2 antes descrito, se obtienen 260 mg
de MA144-N1, 150 mg de MA144-S1, 88 mg de MA144-S2, 128 mg
de MA144-U1, 54 mg de MA144-U2 y 114 mg de MA144-Y, en for-
ma de polvo purificado.

EJEMPLO 5

15 Siguiendo el método general de los Ejemplos 1, 2 y 4,
se obtienen los compuestos de esta invención utilizando las
cepas de Streptomyces indicadas:

Cepas	MA144 obtenido (mg)								
	G1	G2	L	N1	S1	S2	U1	U2	Y
<u>S. galilaeus</u> ATCC 14969	42	68	55	126	63	145	115	63	43
<u>S. esp. ME505-HE1</u> (FERM P-3667), ATCC 31273	-	-	-	-	143	89	97	101	-
<u>S. cinereoruber</u> ATCC 19740	25	37	38	76	88	79	27	83	16
<u>S. niveoruber</u> ATCC 14971	-	56	-	43	54	38	-	64	12
<u>S. antibioticus</u> ATCC 8663	-	28	-	-	-	18	-	32	-
<u>S. purpurascens</u> ATCC 25489	-	13	-	-	-	9	-	14	-

25 S = Streptomyces

EJEMPLO 6

30 En un homogeneizador de Teflon (marca registrada) se
homogeneiza una mezcla de los hígados aislados de 5 cobayas
macho (500 g) y 10 volúmenes del tampón de tri(hidroximetil)-

1 2-aminometano 10 mM - HCl (pH 7,8) conteniendo cloruro magné-
sico 10 mM y sacarosa 0,25M y se centrifuga a 10.000 rpm
durante 20 minutos. El líquido sobrenadante obtenido (400 ml)
se mezcla con 50 ml de aclacinomicina A a una concentración
5 de 4 mg/ml y 50 ml de NADP (fosfato de nicotinamidoadenin-
dinucleótido) a una concentración de 6 mg/ml, se distribuyen
partes alícuotas de 50 ml en matraces de 500 ml y se incuba
a 40°C durante una hora en un sacudidor rotatorio. La reac-
ción se termina por adición de dos volúmenes de una mezcla
10 fría de cloroformo-metanol 1:1. Esta solución se mezcla bien,
se separa de la capa de cloroformo y la fracción activa que
queda en la capa acuosa se extrae de nuevo con un volumen
igual de cloroformo. Se combinan las dos capas clorofórmicas,
se concentran a presión reducida, se aplican sobre placas
15 de capa fina de ácido silícico (Merck Co. 60F₂₅₄) y se desa-
rolla con una mezcla de cloroformo-metanol 10:1 para reali-
zar la preparación. Después de cromatografiar, se separa por
rascado la banda correspondiente al MA144-N1 y este componen-
te se extrae con una mezcla de cloroformo-metanol 10:1 y se
20 concentra a presión reducida. Se obtienen 62,3 mg de un pol-
vo amarillo de MA144-N1.

EJEMPLO 7

Se disuelve 1 g de aclacinomicina A en 40 ml de acetato
de etilo, se mezcla con 40 ml de agua conteniendo 100 mg de
25 borohidruro sódico y se sacude fuertemente durante 20 minutos
a la temperatura ambiente en un embudo de separación. La mez-
cla de reacción se deja en reposo y se separa de la capa de
acetato de etilo y después el extracto se lava con una solu-
ción saturada de NaCl que contiene EDTA 10⁻³M, se lava dos
30 veces con agua y después de deshidratar con sulfato sódico

1 canhidro se concentra. A continuación se cromatografía en
una columna de ácido silícico (columna de 3 x 20 cm) utili-
zando una mezcla de tolueno-metanol 100:3 y las fracciones
5 activas que contienen MA144-N1 y MA144-M1 se reúnen, se
concentran y se agregan sobre n-hexano. Se obtienen 250 mg
de MA144-N1 y 400 mg de MA144-M1 en forma de polvo amarillo.

EJEMPLO 8

10 Se disuelven 400 mg del MA144-M1 obtenido en el Ejemplo
7 en 100 ml de ácido clorhídrico al 0,5 % y se hidroliza a
20°C durante 15 minutos. Después de neutralizar con solución
alcalina diluída a pH 7,0, el MA144-S1 se extrae dos veces
con 200 ml de cloroformo. Las capas clorofórmicas se reúnen
y se concentran a presión reducida. Las fracciones activas
15 conteniendo MA144-N1 que se obtienen por cromatografía en
columna de ácido silícico (3 x 25 cm) utilizando una mezcla
de metanol-tolueno 5:100, se reúnen, se concentran y se agre-
gan sobre n-hexano. Se obtienen 237 mg de un polvo amarillo
de MA144-S1.

EJEMPLO 9

20 Se prepara un medio nutritivo de la siguiente composi-
ción:

Almidón soluble	1 %
"Esusan meat" (polvo de soja)	2 %
Extracto de levadura	0,3 %
25 K_2HPO_4	0,1 %
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 %
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,0005 %
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,0005 %
30 pH	7,7

Se esterilizan 50 ml de este medio a 120°C durante 15

1 minutos en un matraz de 500 ml que se inocula con Strepto-
myces galilaeus MA144-M1 (ATCC 31133) y se incuba a 28°C
durante 3 días en un sacudidor rotatorio.

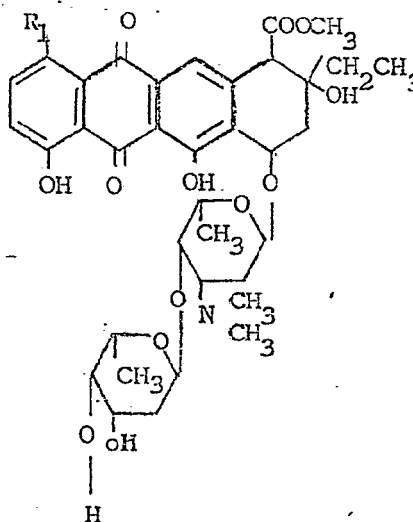
5 El caldo de cultivo obtenido se centrifuga y se ajusta
a pH 7,2 con hidróxido sódico 1N. Al líquido que sobrenada
se añade sulfato amónico hasta llegar al 50 % de la satura-
ción y se deja en reposo durante la noche a 8°C. Después de
centrifugar, el precipitado resultante se disuelve en 300 ml
10 de tampón de Tris 0,01M-HCl (pH 7,2) y se dializa frente a
40 volúmenes del tampón anterior durante la noche a 8°C, en
una bolsa de colodión. Se obtienen alrededor de 1000 unida-
des/ml de preparado enzimático crudo.

15 La reacción enzimática para producir MA144-Y se reali-
za de la forma siguiente: se disuelve 1 g de aclacinomicina
A en 20 ml de metanol y 10 ml de HCl 0,05N, y se mezcla con
200 ml de tampón de citrato 1M (pH 5,5), 80 ml de la solu-
ción enzimática cruda antes preparada y 4000 ml de agua des-
tilada. Se distribuyen partes alícuotas de 100 ml de la mez-
cla de reacción en matraces de 500 ml y se sacude durante 5
20 horas a 28°C en un sacudidor rotatorio. La mezcla de reacción
se ajusta a pH 6,8 con hidróxido sódico 1N, se extrae con
1 litro de tolueno y se concentra a 30 ml a presión reducida.
El precipitado obtenido por adición de 300 ml de n-hexano al
concentrado está formado por 0,95 g de un polvo de MA144-Y
25 al 90 % de pureza. Este polvo crudo de MA144-Y se disuelve
en 5 volúmenes de tolueno, se introduce en una columna de
ácido silícico (Wako gel C-200, 100 g) y se cromatografía con
tolueno al 1,7 % de metanol a 5°C. Las fracciones activas
obtenidas se concentran a sequedad, obteniéndose 0,82 g de
30 MA144-Y puro en forma de polvo amarillo.

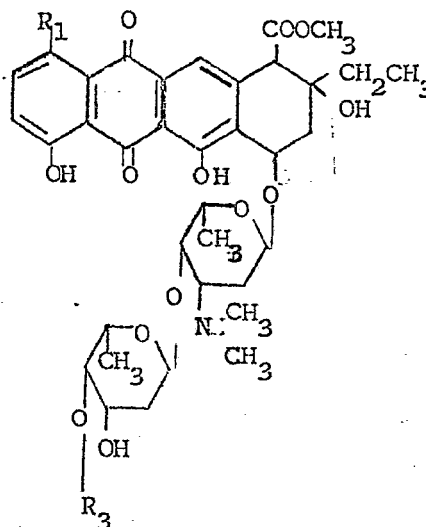
En resumen, la Patente de Invención que se solicita
deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

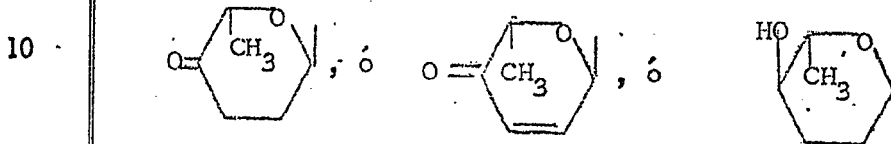
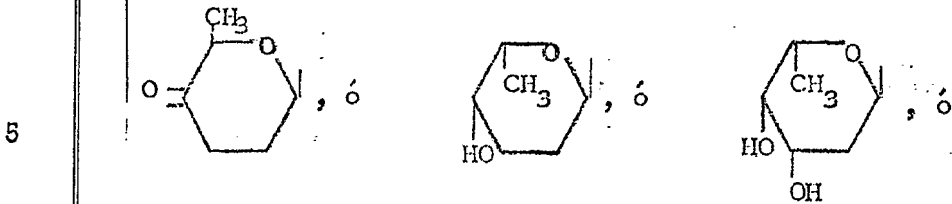
1. Un procedimiento para la producción de glicósidos de antraciclina de fórmula general II:



donde R₁ es un átomo de hidrogeno o un grupo hidroxilo,
cuyo procedimiento comprende hidrolizar un compuesto de
fórmula general III:



1 donde R_1 es un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo y
2 R_2 es



15 o una sal de adición de ácido no tóxico del mismo, con
ácidos minerales.

2. Se reivindica por último como objeto sobre el que
ha de recaer la patente de invención que se solicita por:
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE GLICOSIDOS DE AN-
20 TRACICLINA.

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente memoria descriptiva que consta de cincuenta y seis
páginas mecanografiadas y dibujos que se acompañan.

Madrid, 17 julio 1.978
BERNARDO UNGRIA

P. 9.

25

30

FIG. 1

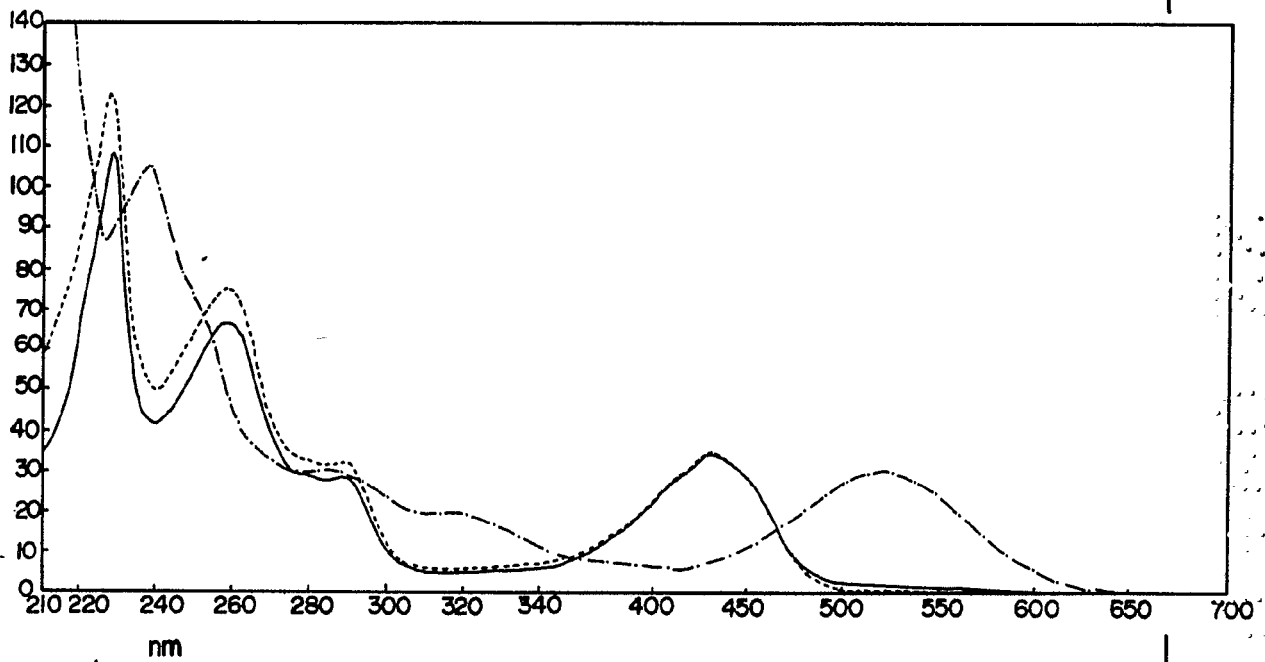
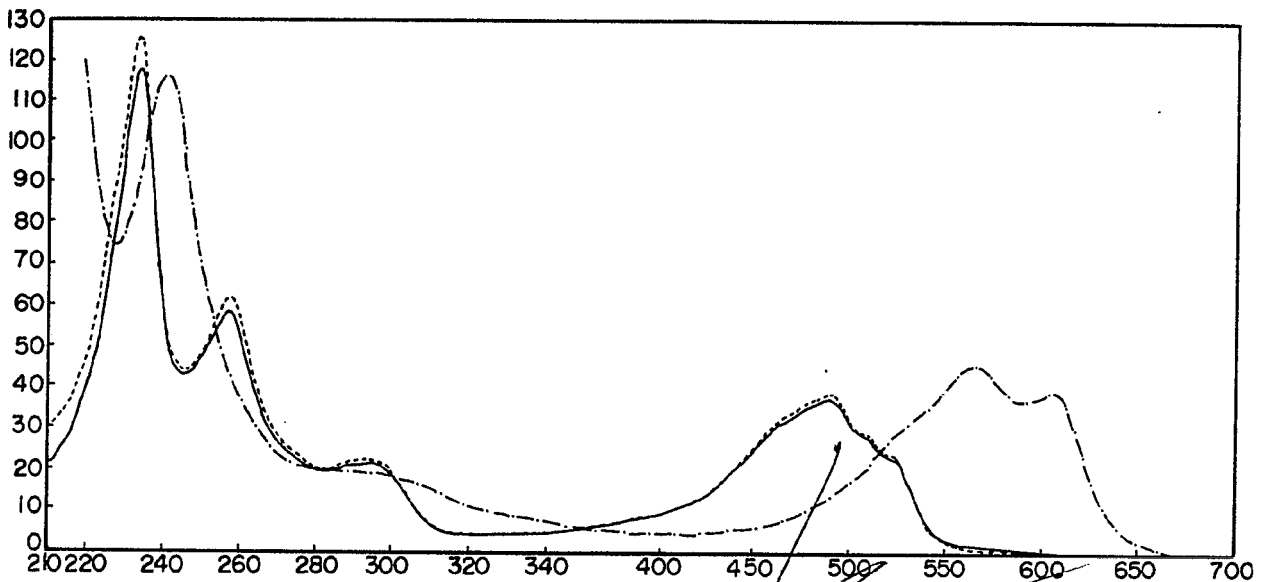


FIG. 2



ESCAZA VARIABLE
Madrid 17 de Julio de 1.978
BERNARDO UNGRIA
P.P

FIG. 3

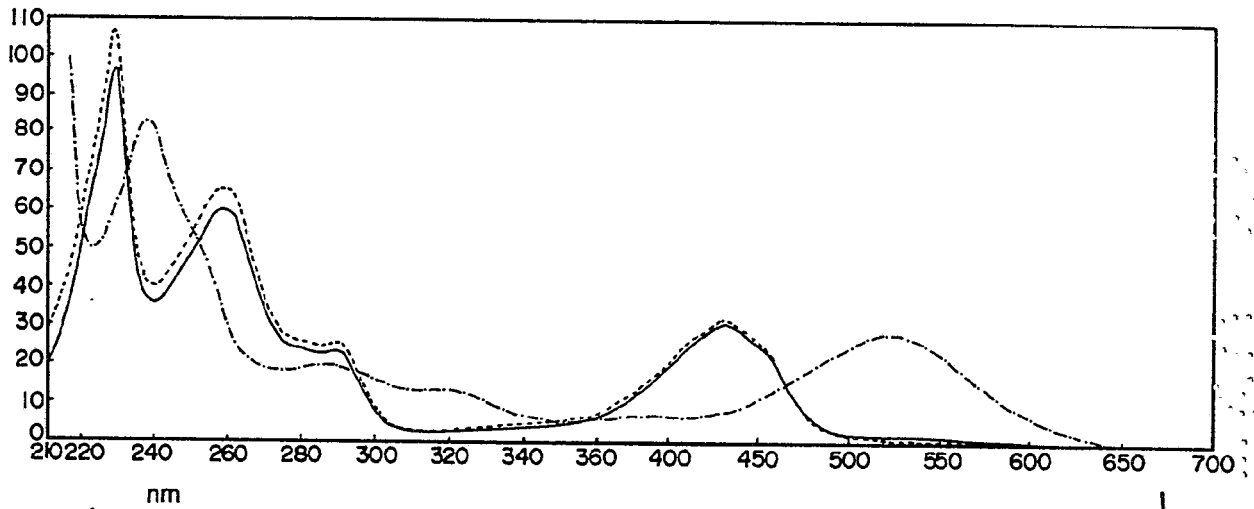
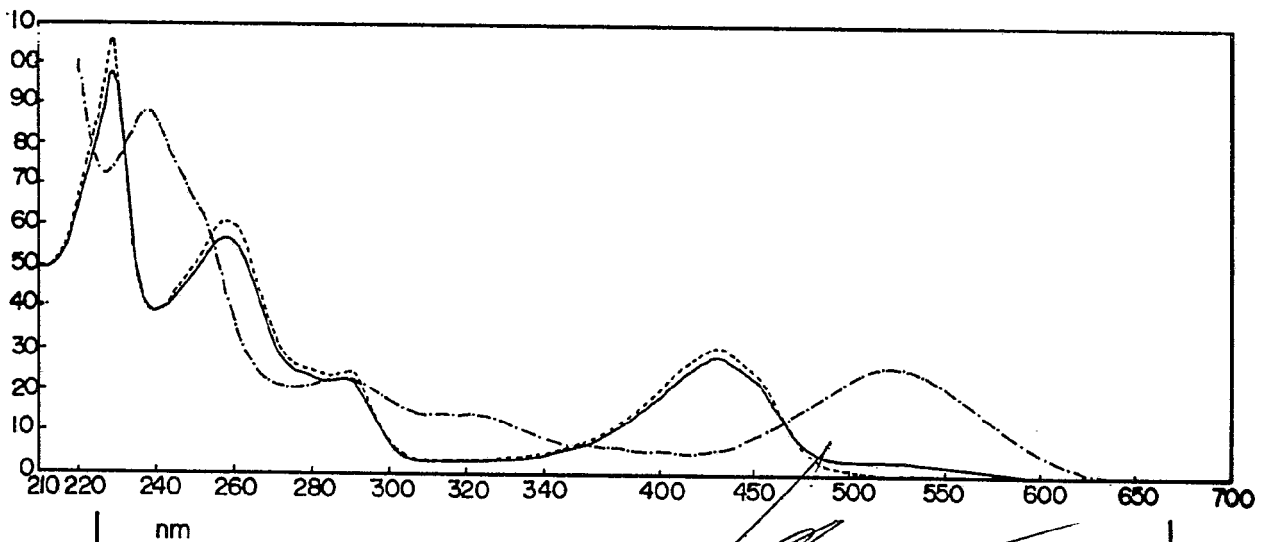
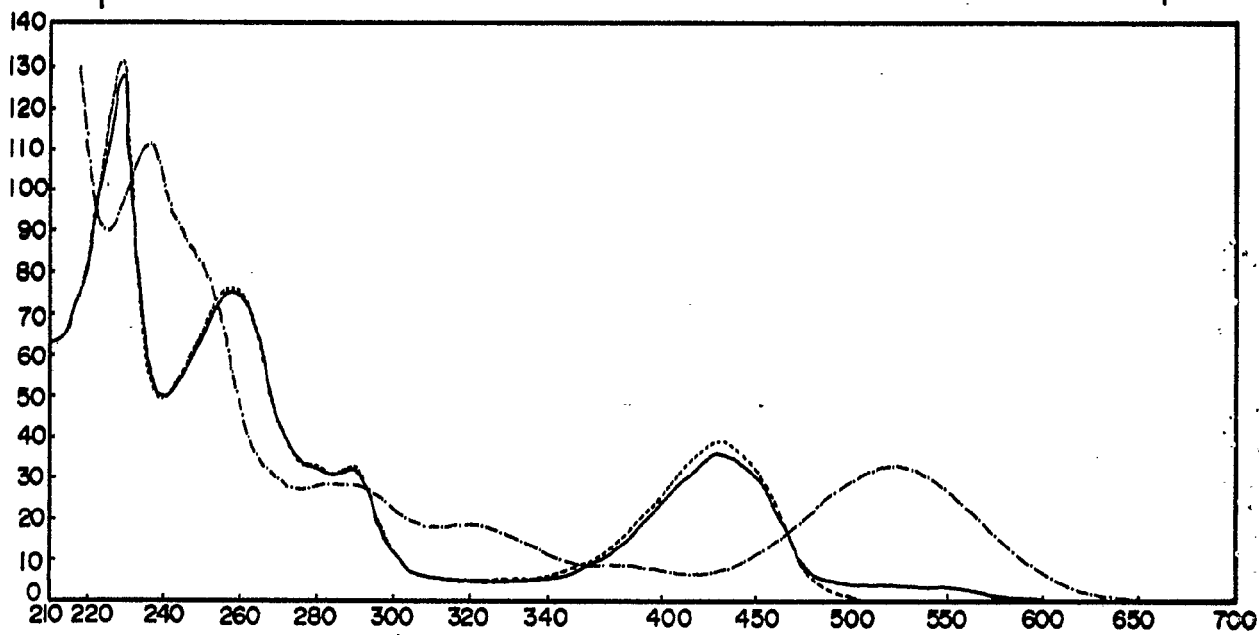


FIG. 4



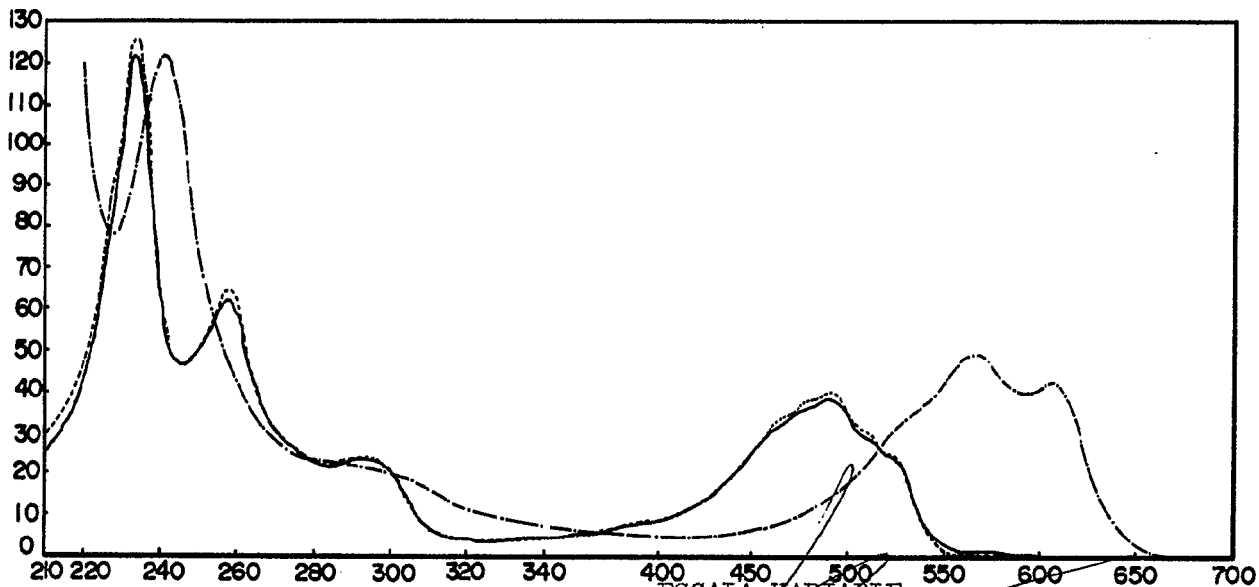
ESCALA VARIABLE
Madrid, 17 de Julio de 1.978
BERNARDO UNGRIA

FIG. 5



nm

FIG. 6



nm

ESCALA VARIABLE
Madrid, 17 de Julio de 1.978
BERNARDO UNGRIA
p.p

FIG. 7

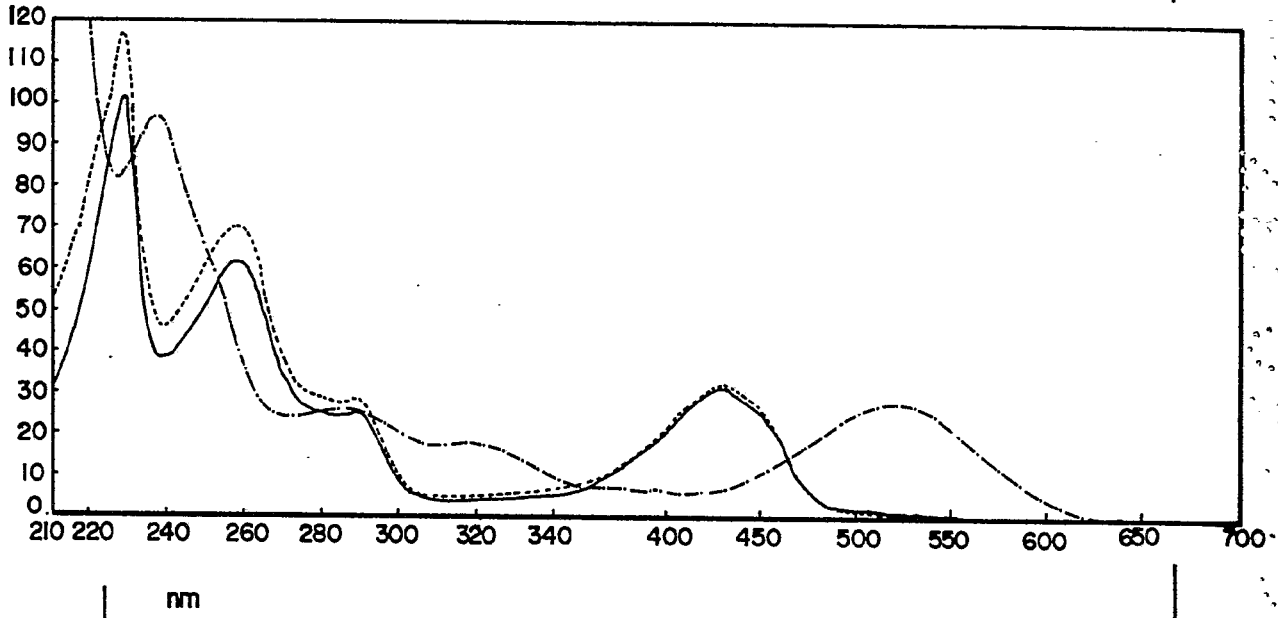
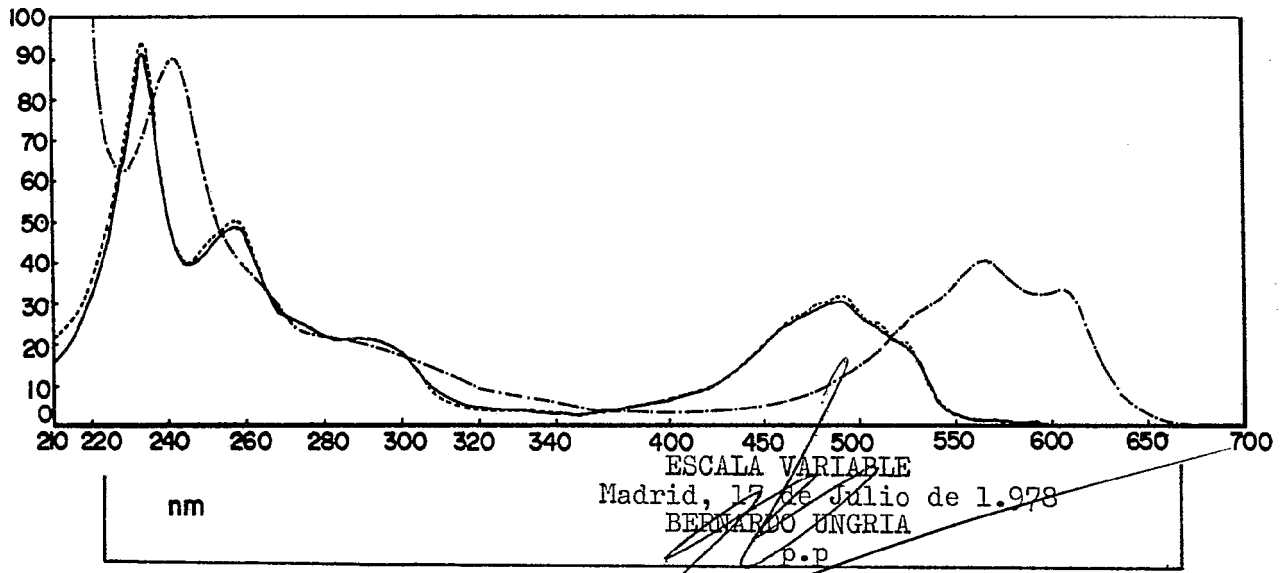
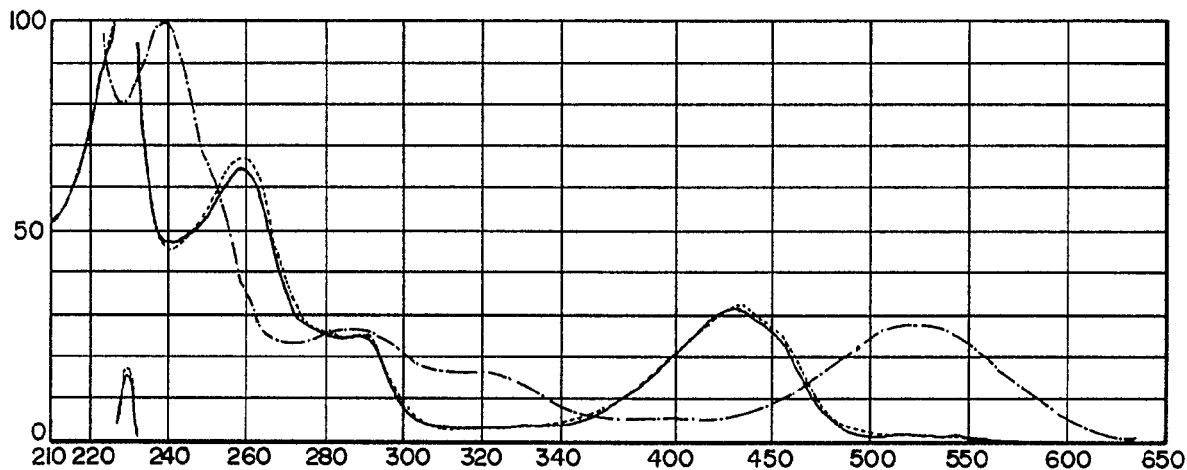


FIG. 8



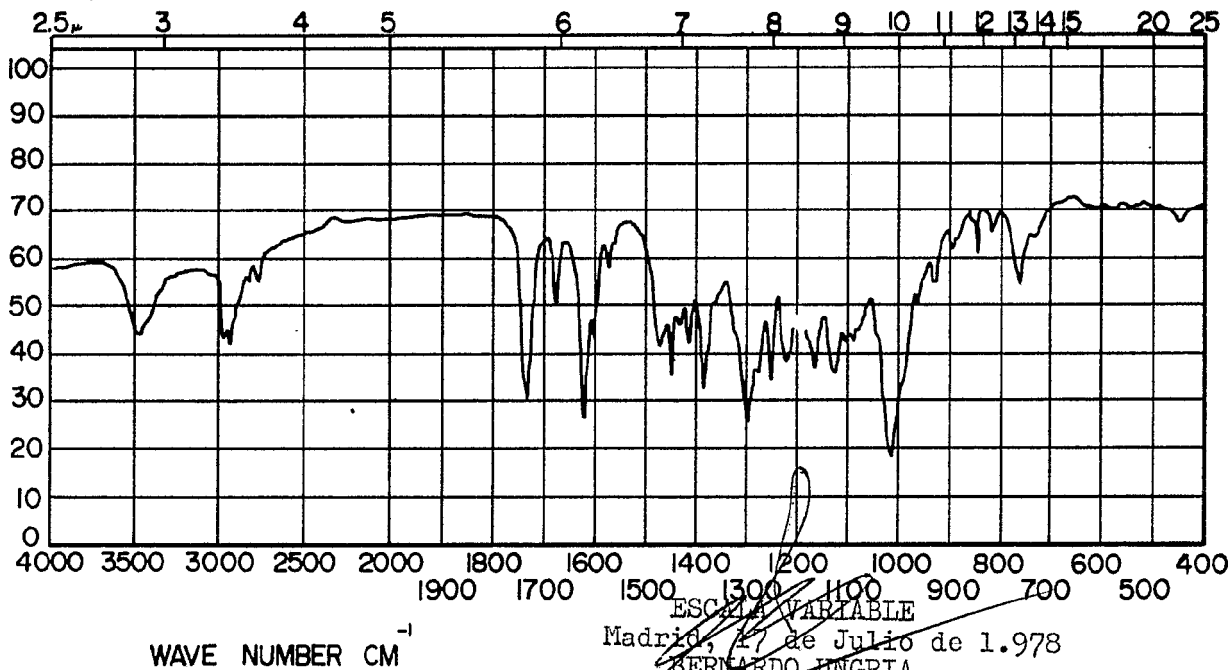
ESCALA VARIABLE
Madrid, 17 de Julio de 1.978
BERNARDO UNGRIA
p.p.

FIG. 9



nm

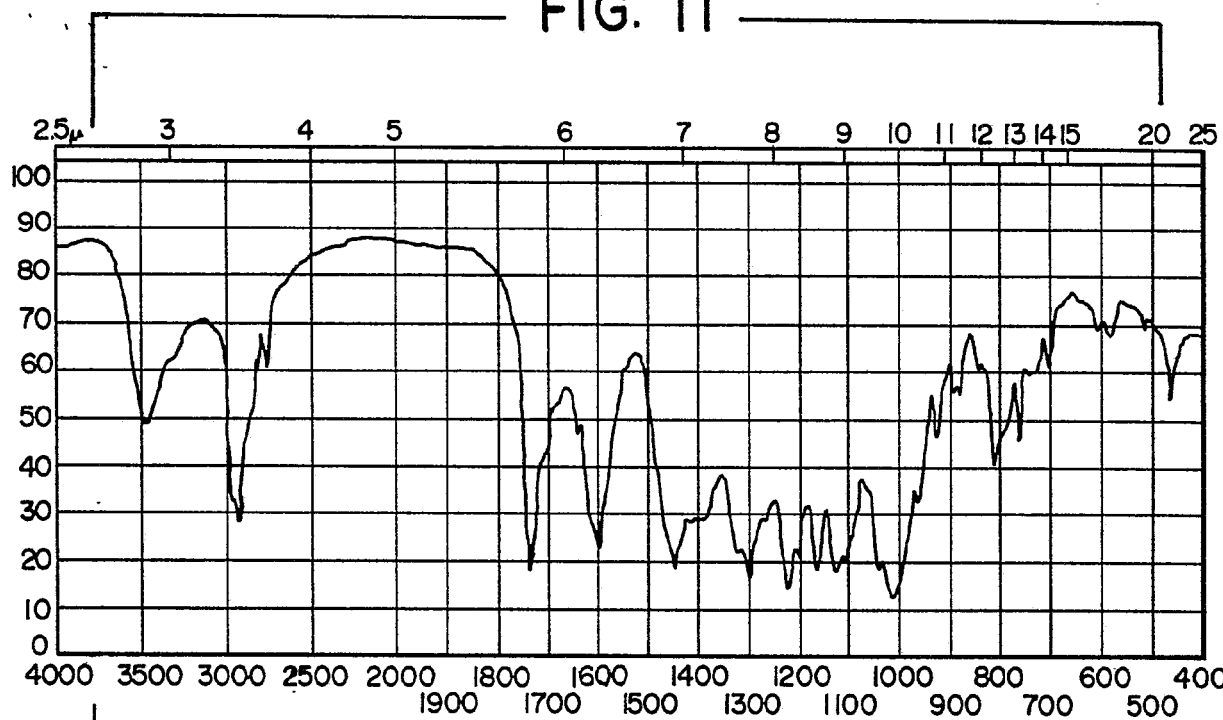
FIG. 10



WAVE NUMBER CM⁻¹

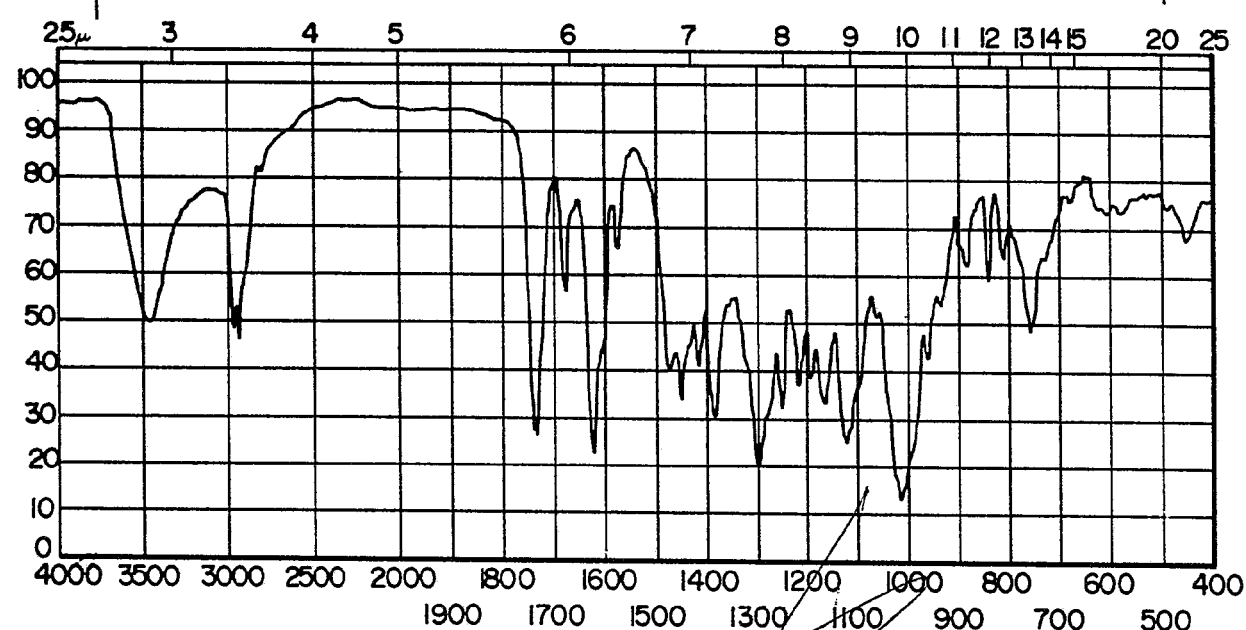
ESCALA VARIABLE
Madrid, 27 de Julio de 1.978
BERNARDO UNGRIA
P.P

FIG. 11



WAVE NUMBER CM^{-1}

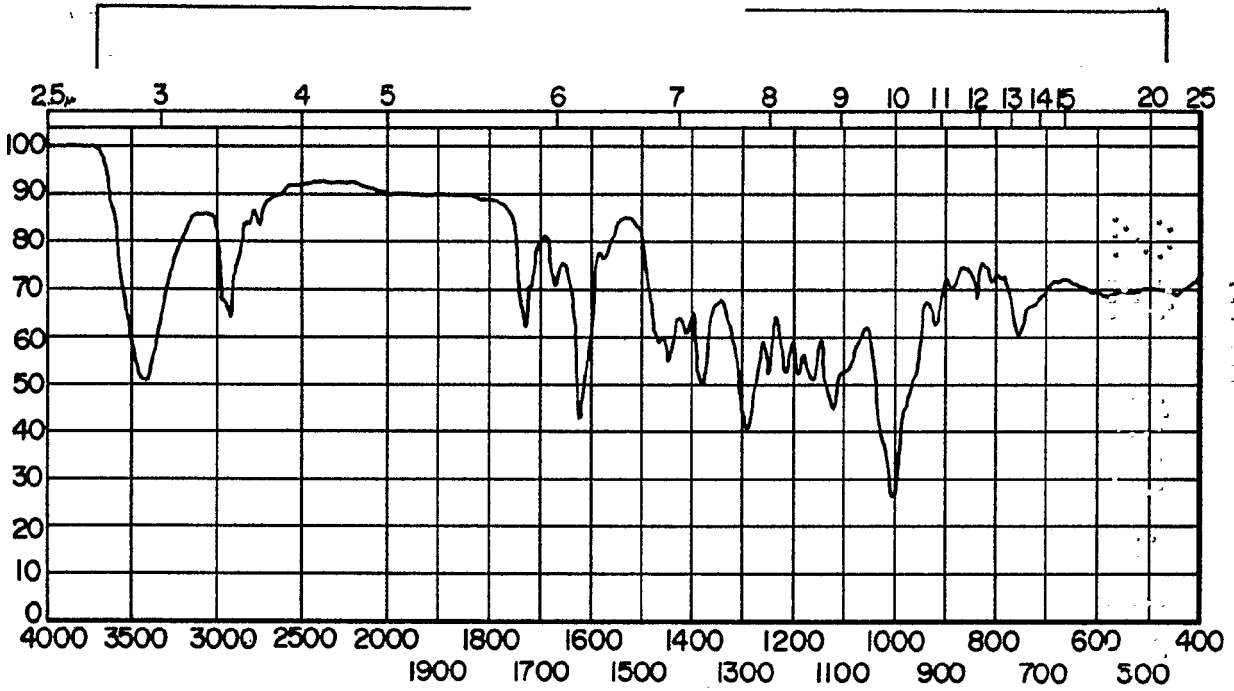
FIG. 12



WAVE NUMBER CM^{-1}

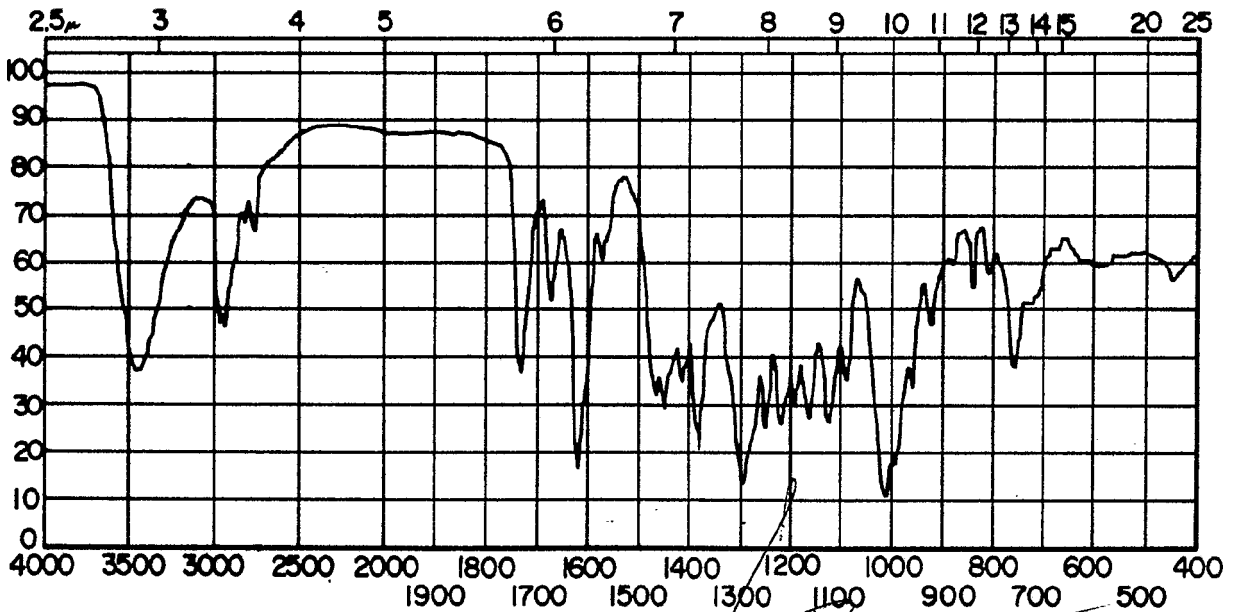
ESCALA VARIABLE
Madrid, 17 de Julio de 1.978
BERNARDO UNGRIA
P.P.

FIG. 13



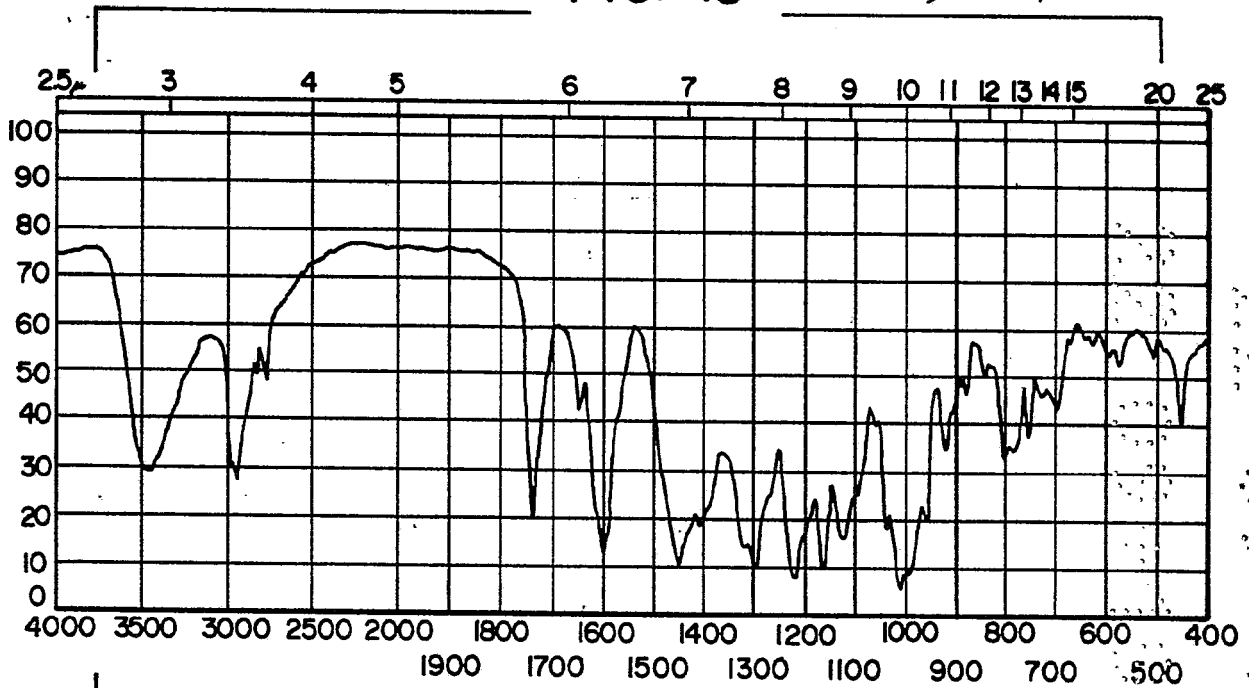
WAVE NUMBER CM⁻¹

FIG. 14



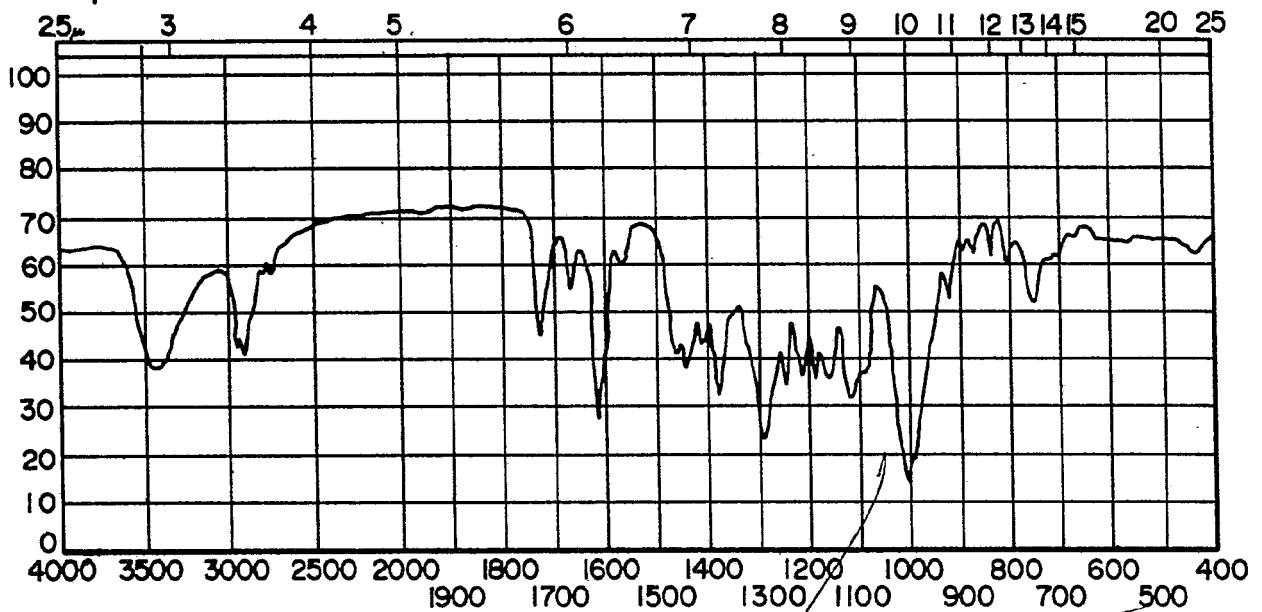
WAVE NUMBER CM⁻¹

ESCALA VARIABLE
Madrid, 17 de Julio de 1.978
BERNARDO UNGRIA
P.P



WAVE NUMBER CM^{-1}

FIG. 16



WAVE NUMBER CM^{-1}

ESCALA VARIABLE

Madrid, 17 de Julio de 1.978

BERNARDO UNGRIA

p.p

FIG. 17

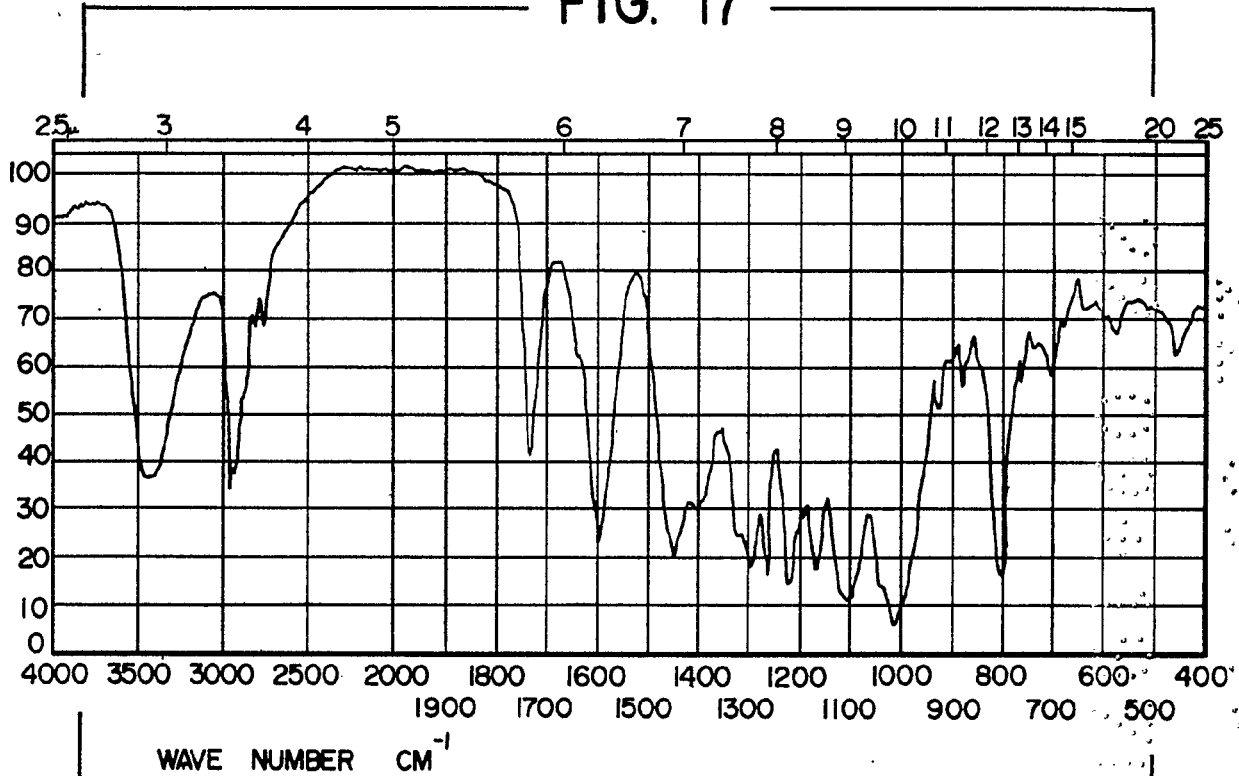
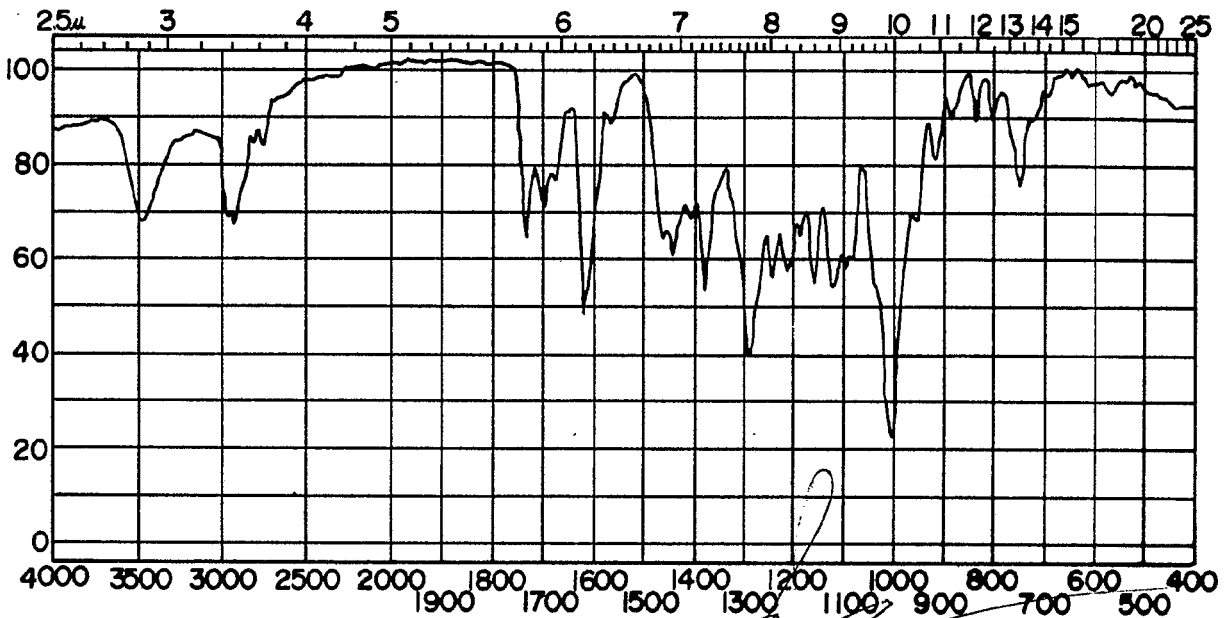


FIG. 18



WAVE NUMBER CM⁻¹

ESCALA VARIABLE
Madrid, 17 de Julio de 1.978
BERNARDO UNGRIA
p.p

FIG. 19

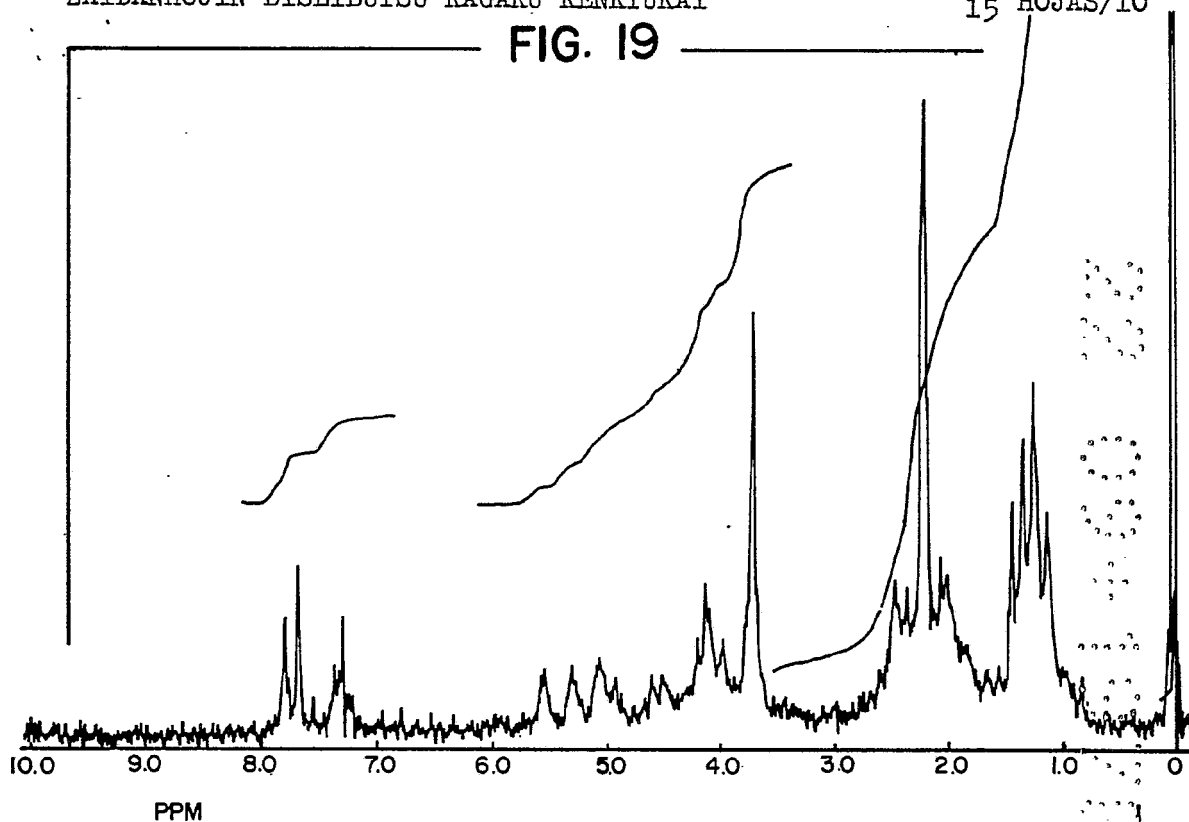
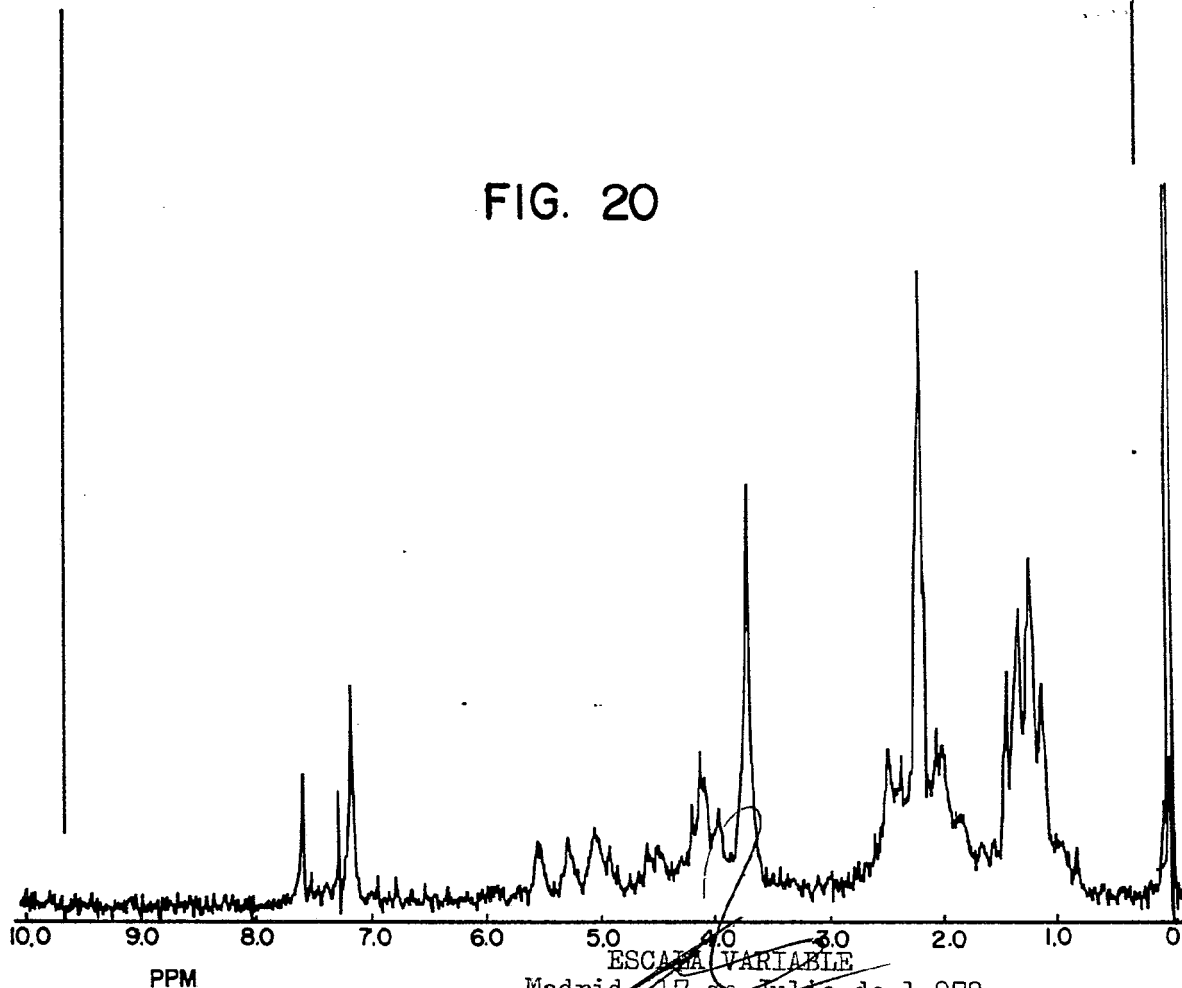


FIG. 20



ESCALA VARIABLE
Madrid, 17 de Julio de 1.978
BERNARDO UNGRIA

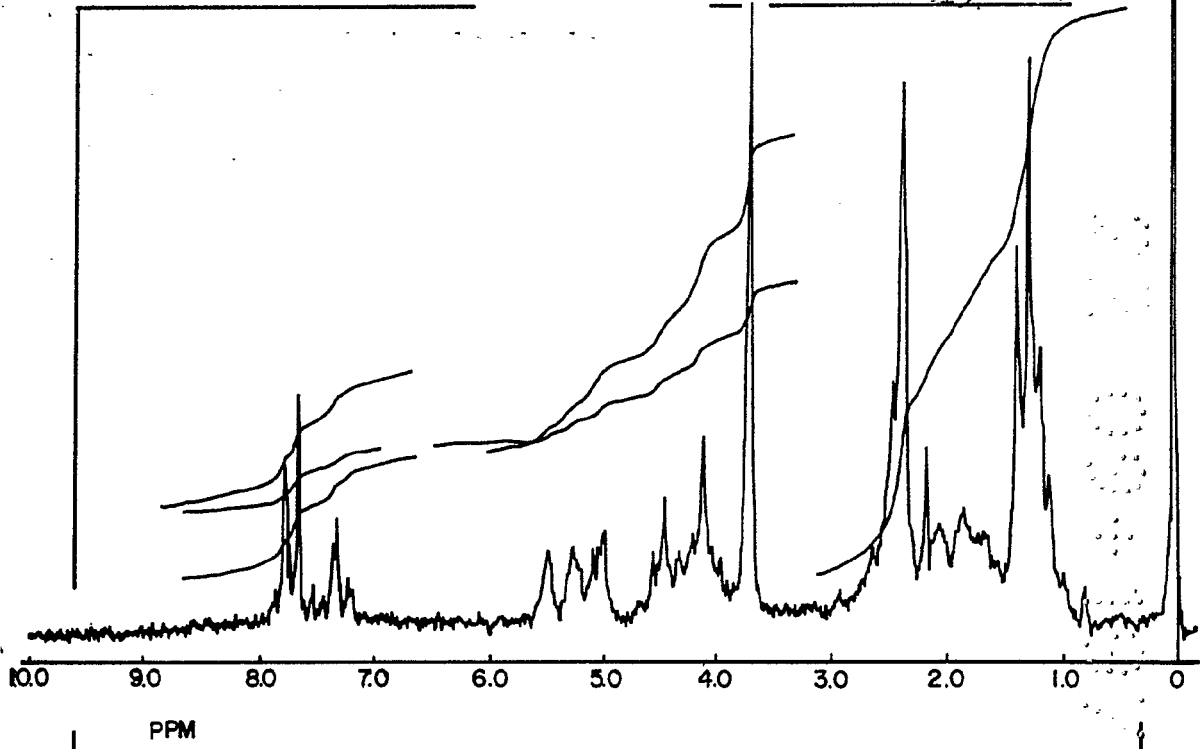
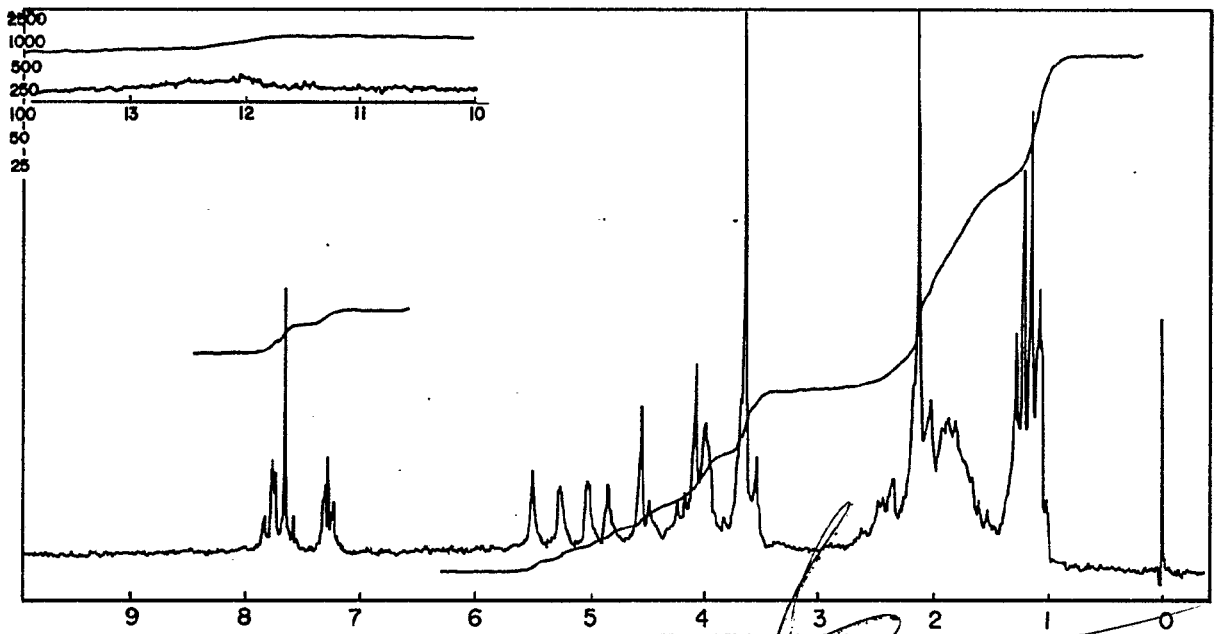


FIG. 22



ESCALA VARIABLE
Madrid, 27 de Julio de 1.978
BERNARDO UNGRÍA
p.p

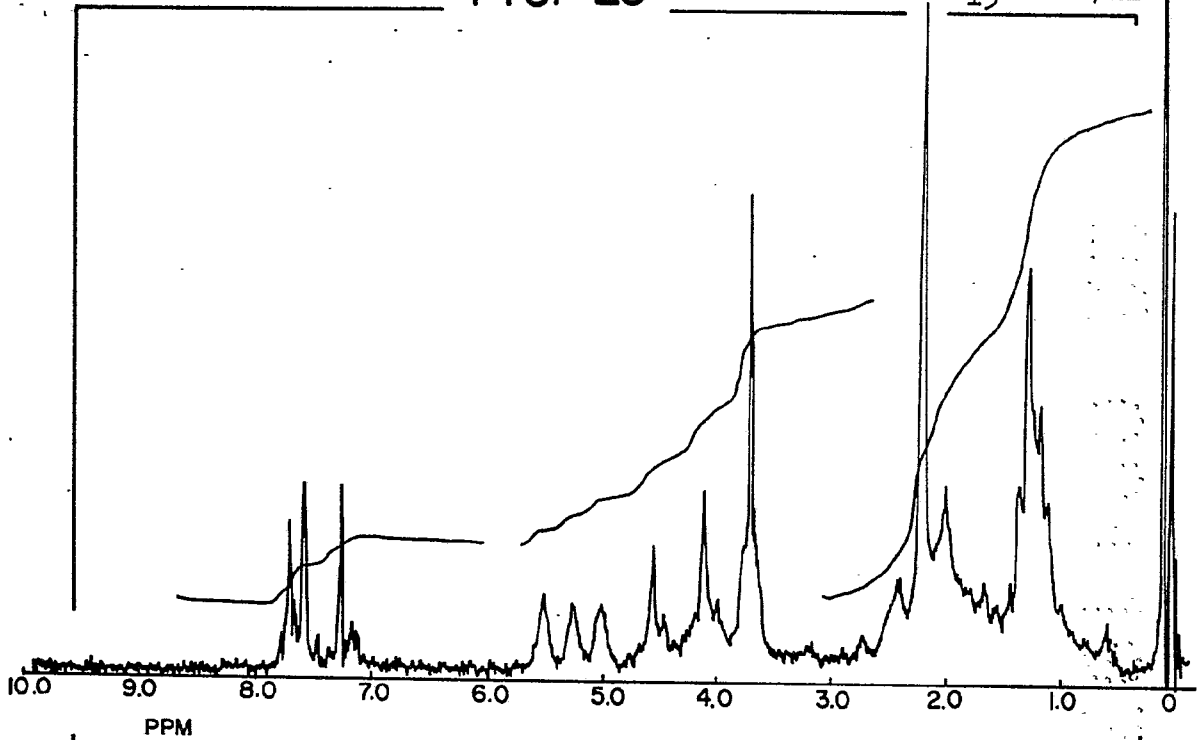
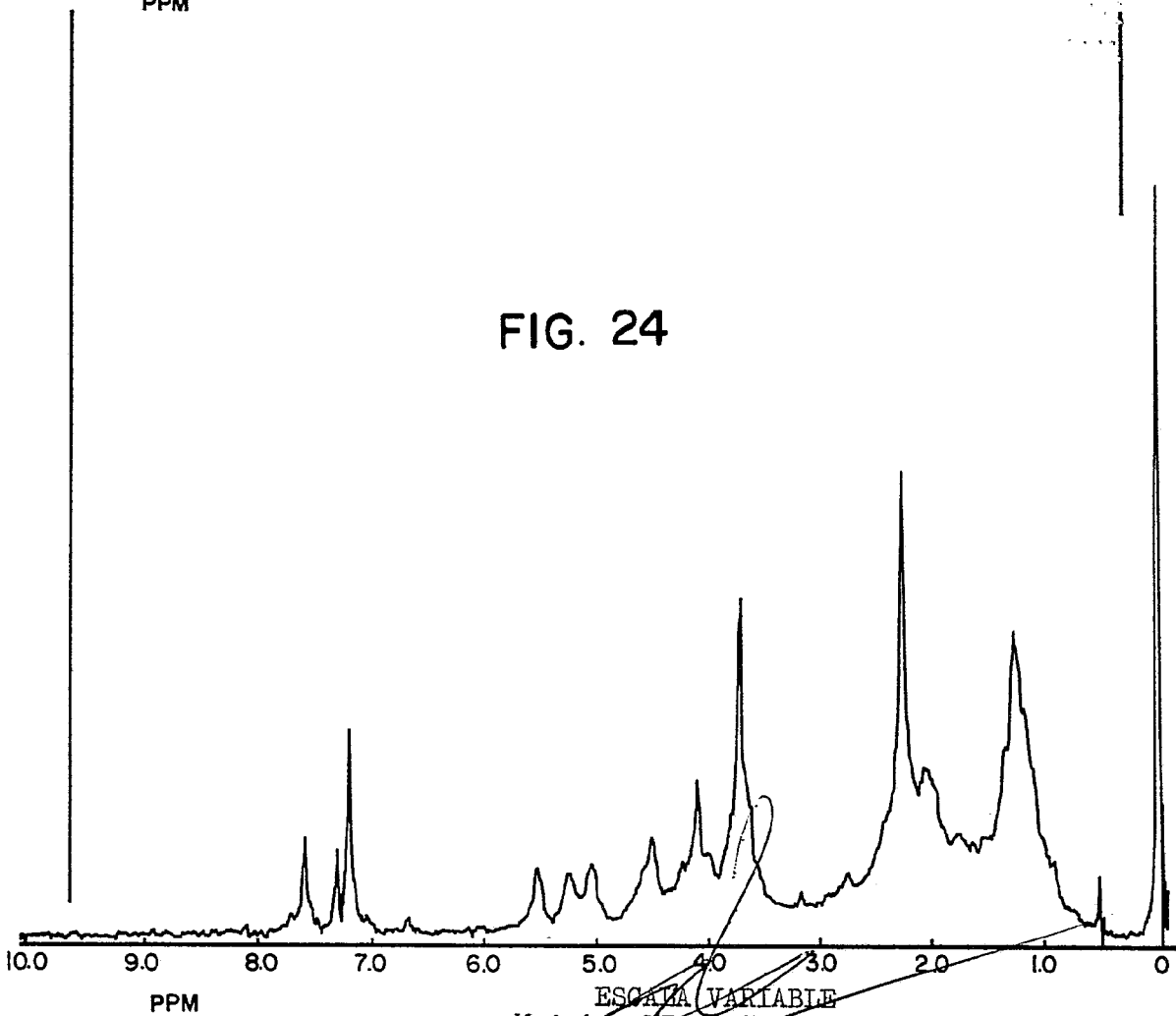


FIG. 24



ESCALA VARIABLE
Madrid, 17 de Julio de 1.978
BERNARDO UNGRIA
p.p

FIG. 25

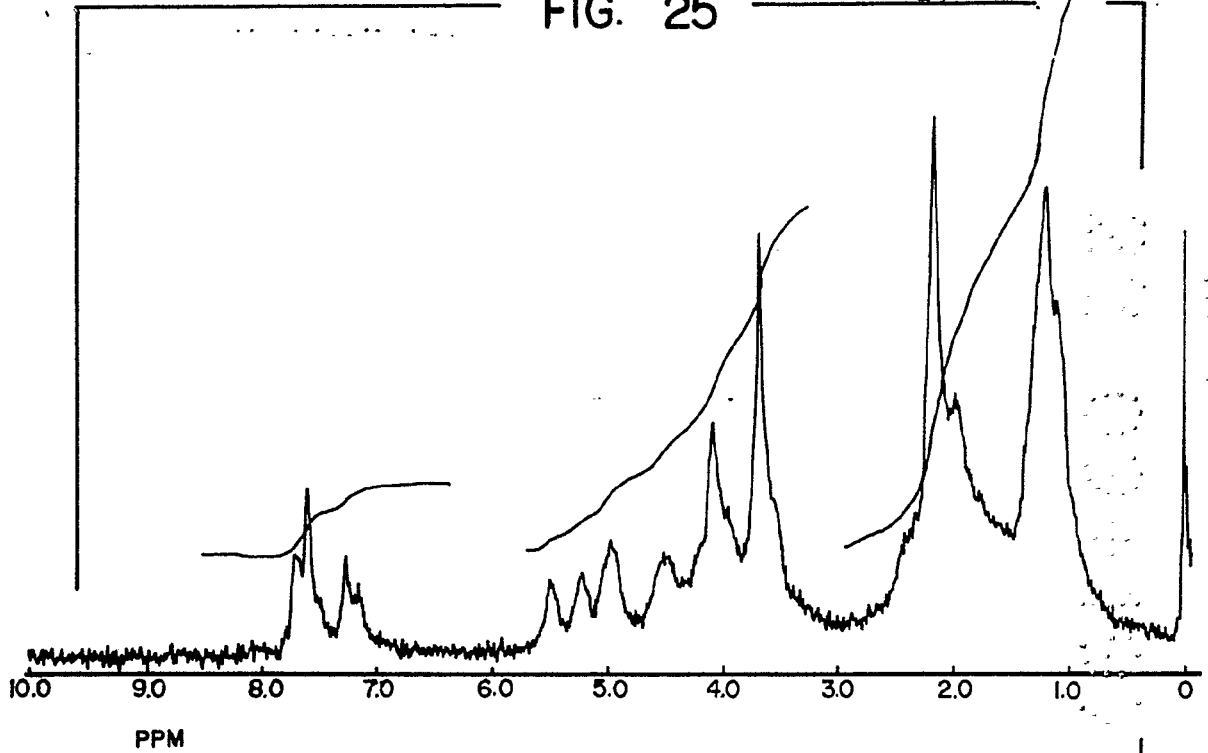
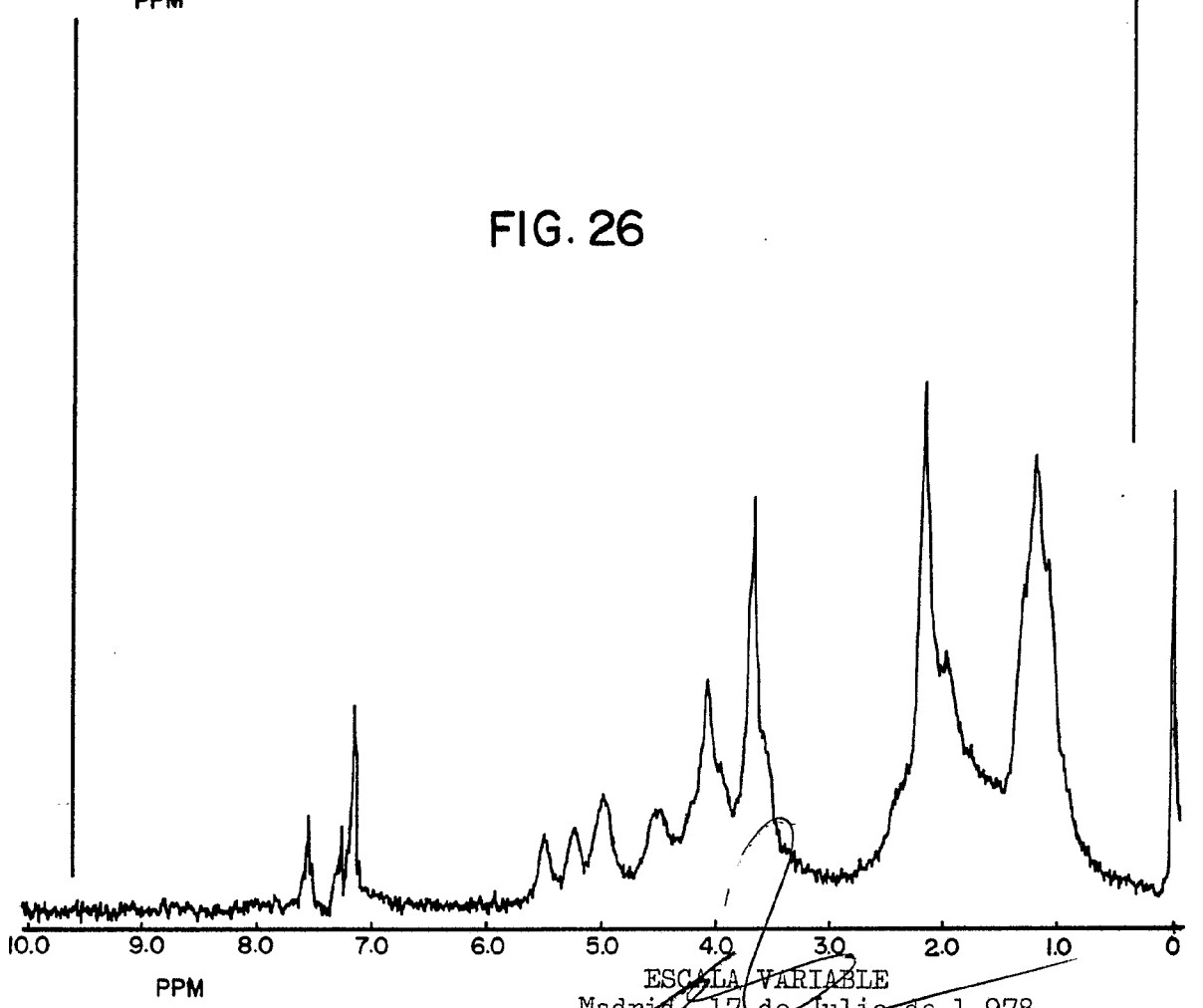


FIG. 26



ESCALA VARIABLE
Madrid, 17 de Julio de 1.978
BERNARDO UNGRIA
P.P

FIG. 27

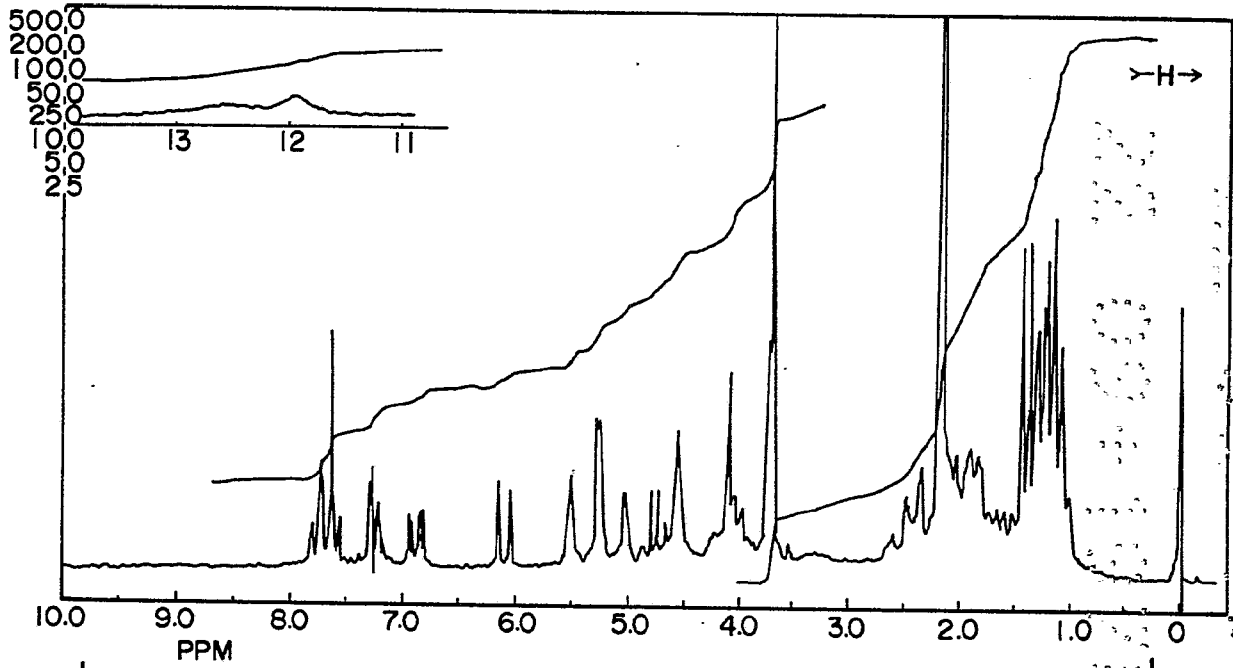
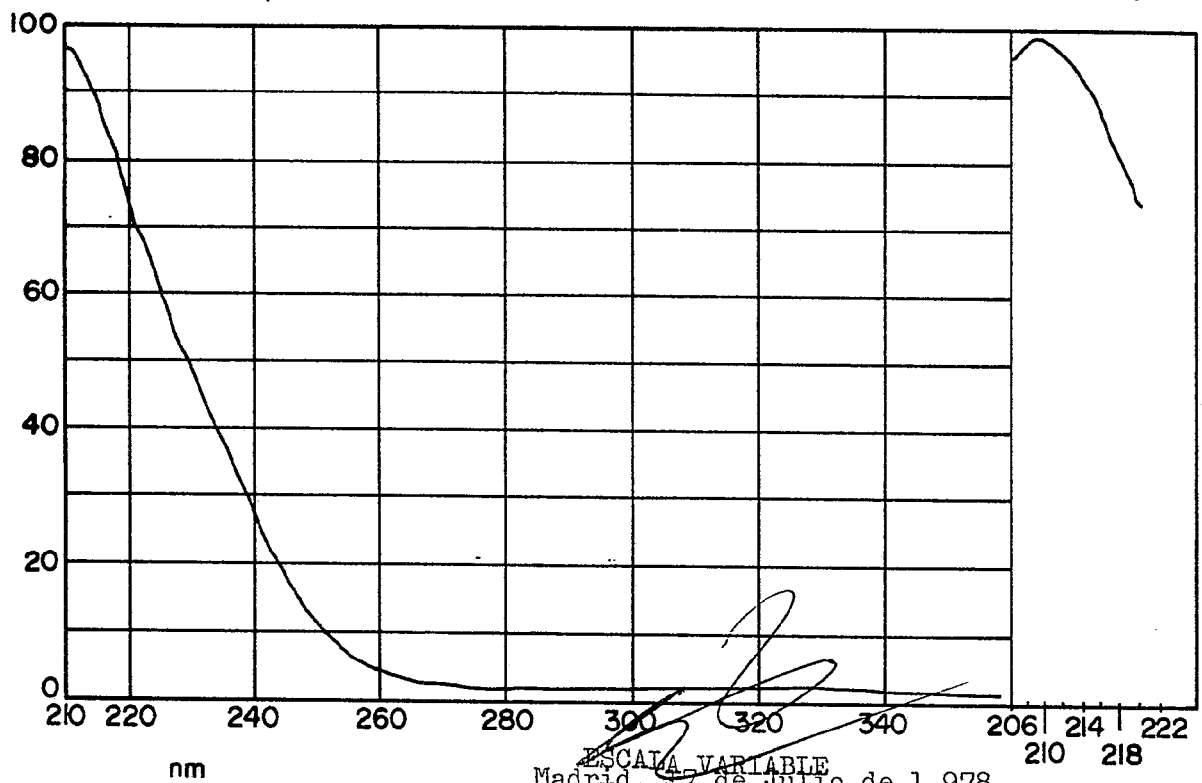


FIG. 28



ESCALA VARIABLE
Madrid, 5 de Julio de 1.978
BERNARDO TORRES

FIG. 29

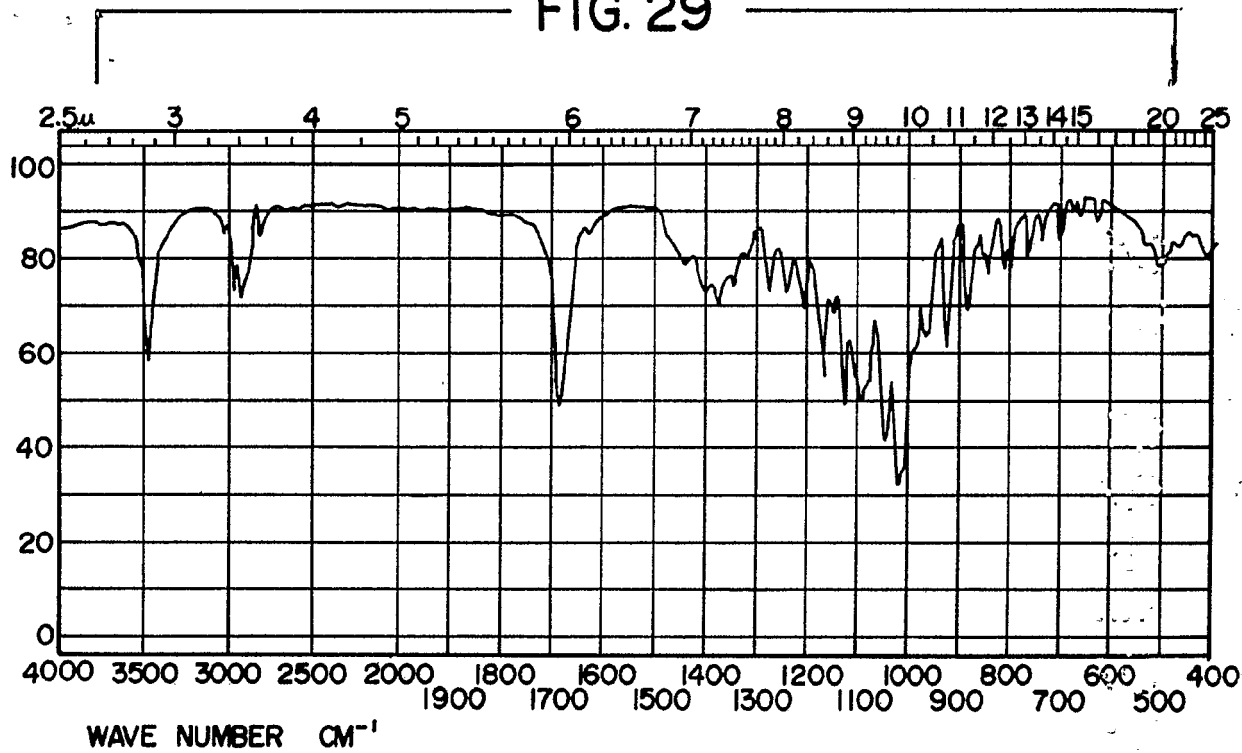


FIG. 30

