



ESPAÑA

(19) ES (21) (22)	(11) NUMERO 472.790	(10) AT
	FECHA DE PRESENTACION 23-8-1978	

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES: (31) NUMERO 102323/77	(32) FECHA 25-8-1977	(33) PAIS Japón
---	-------------------------	--------------------

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
--------------------------	--	--

(64) TITULO DE LA INVENCION

"UN PROCEDIMIENTO PARA OBTENER UN NUEVO ANTIBIOTICO ANTITUMORAL, LA AUROMOMICINA"

(71) SOLICITANTE (ES)

1) KANEGAFUCHI CHEMICAL INDUSTRY COMPANY, LIMITED y
 2) ZAIDAN HOJIN BISEIBUTSU KAGAKU KENKYU KAI
 (Auromomycin)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

1) 2-4, 3-chome, Nakanoshima, Kitaku, Osaka, Japón y
 2) No. 14-23, 3-chome, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo, Japón

(72) INVENTOR (ES) Hamao Umezawa, Tomio Takeuchi, Masaaki Ishizuka, Kiyoshi Watanabe, Toshiaki Yamashita, Noriyuki Naoi y Takayoshi Hidaka

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE

DON OSCAR DE ELZABURU FERNANDEZ
 (P.-69.740)

jga

1

FUNDAMENTOS DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han obtenido un antibiótico contra tumores purificado, a partir de un filtrado de caldo de cultivo de Streptomyces macromomyceticus, una cepa productora de macromomicina, como cristales amarillos que tienen evidentemente propiedades distintas de las de la macromomicina (parente de los EE. UU. nº 3.595.954).

5

10

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a auromomicina, un nuevo antibiótico contra tumores, y a un procedimiento para producirlo. Más específicamente, la invención se refiere a auromomicina, un nuevo antibiótico contra tumores, que se aísla del filtrado de caldo de cultivo de Streptomyces macromomyceticus, una cepa productora de macromomicina, en forma de cristales amarillos, y que tiene evidentemente propiedades distintas de las de la macromomicina y otras sustancias proteicas contra tumores; y a un procedimiento para producirla.

15

20

Los autores de la presente invención obtuvieron una sustancia activa antibacteriana purificada a partir de un filtrado de caldo de cultivo de Streptomyces macromomyceticus, por una combinación de diversos métodos de purificación tales como efecto salino, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de adsorción, y cromatografía de filtración de gel, y la aislaron como cristales amarillos añadiendo sulfato amónico a esta solución. El espectro de absorción ultravioleta de esta sustancia activa muestra una absorción máxima a $270 \sim 275 \text{ m}\mu$ y $350 \sim 360 \text{ m}\mu$, y aparece un valle a $280 \text{ m}\mu$ y $350 \text{ m}\mu$ en su

25

30

1 espectro de dispersión óptica rotatoria. Esta sustancia
inhibe fuertemente tanto a bacterias gram-positivas como
gram-negativas, y en cantidades diminutas inhibe el cre-
5 cimiento de la leucemia L1210, sarcoma ascítico 180 y car-
cinoma ascítico de Ehrlich en ratones. Partiendo de este
hecho, se ha hallado que la presente sustancia tiene pro-
piedades claramente diferentes de las de la macromomicina
(patente de los EE.UU. 3.595.954) y otras sustancias de
estructura de polipéptido. Este antibiótico contra tumo-
10 res, en forma de polipéptido de alto peso molecular, ha
sido identificado como una sustancia nueva, y ha sido de-
nominado auromomicina.

El microorganismo usado en la preparación del
compuesto de la presente invención tiene las mismas pro-
15 piedades microbiológicas (es decir, en morfología, propie-
dades fisiológicas y condiciones de crecimiento en diver-
sos medios de cultivo) que el Streptomyces macromomyceti-
cus descrito en la patente de los EE.UU. nº 3.595.954. Ha
sido depositado en la Colección Americana de cultivos Ti-
20 po y ha sido designado como Streptomyces macromomyceticus
ATCC 29816. Por tanto, las cepas usadas en la presente
invención incluyen el Streptomyces macromomyceticus ATCC
29816 y todos sus mutantes. Además, las cepas, tal como
aquí se alude a ellas, incluyen todas las especies perte-
25 necientes al género Streptomyces y sus mutantes que tie-
nen la capacidad de producir auromomicina.

Para producir el presente antibiótico, el Strep-
tomyces macromomyceticus se cultiva en un medio de culti-
vo que contiene fuentes de nutrientes conocidos que los
30 microorganismos ordinarios pueden utilizar. Por ejemplo,

1 se pueden usar sacáridos disponibles en el comercio, ta-
les como glucosa, glicerina, almidón, dextrina, sacarosa,
maltosa, y otros, y aceites y grasas. Como fuentes de ni-
trógeno se pueden usar materiales orgánicos tales como
5 polvo de soja, residuos de semilla de algodón, extracto
de carne, peptona, levadura seca, extracto de levadura,
líquido de maceración de maíz, polvo de cacahuete, caseí-
na y casaminoácido, y sales amónicas, sales de nitrato y
urea. Si se desea, se pueden añadir sales inorgánicas ta-
10 les como cloruro sódico, cloruro potásico, fosfatos y sa-
les de metal pesado. También se pueden añadir aceites de
silicona, aceite de soja, y sustancias contra la formación
de espuma del tipo de polialcoholenglicol, como se desea,
para inhibir la formación de espuma durante la fermenta-
15 ción. La esterilización del medio de cultivo se efectúa
por esterilización ordinaria con vapor de agua. Tras la
esterilización, el pH adecuado del medio de cultivo es 5
a 8. El cultivo aerobio sumergido es muy adecuado como
método de cultivo, igual que sucede en la producción de
20 antibióticos llevada generalmente a la práctica. El cul-
tivo se efectúa a 20 a 35°C, pero usualmente son deseables
temperaturas de 25 a 30°C. Según este método, la produc-
ción de auromomicina alcanza una concentración máxima en
2 a 4 días, en cultivo agitado y cultivo sumergido airea-
25 do.

La auromomicina se determina por un método de
placa cilíndrica, usando Sarcina lutea PCI 1001. Un agar
nutriente para una capa de siembra y una capa de base con-
tiene 0,6% de peptona, 0,3% de extracto de levadura, 0,15%
30 de extracto de carne, 0,1% de glucosa y 1,5% de agar, y

1 su pH se ajusta a 6,7. El medio de agar para la capa de
base (16 ml) se dispone en cada placa Petri con un diáme-
tro interior de aproximadamente 90 mm, y sobre él se ex-
tienden 8 ml del agar inoculado como capa de siembra. El
5 agar inoculado se prepara mezclando 0,5 ml de suspensión
de un microorganismo con 100 ml del agar nutriente usado
para la capa de siembra.

La auromomicina producida por el cultivo está
presente principalmente en la porción líquida, y el líqui-
do de cultivo que contiene auromomicina se separa de los
10 sólidos de las células por un método conocido, tal como
filtración o separación centrífuga. Según se requiera,
se puede añadir peróxido de hidrógeno para mantener el cal-
do de cultivo en estado aerobio durante la separación del
15 líquido de cultivo. Se añade al filtrado resultante un
agente conocido de separación por efecto salino, tal como
sulfato amónico. El precipitado que contiene auromomici-
na, que se obtiene por efecto salino, se separa por centri-
fugación, o se recoge por filtración tras añadir un coad-
yuvante de filtración, tal como tierra de diatomeas.
20

Para facilitar la recuperación del precipitado
obtenido por efecto salino, se puede añadir un coagulante
tal como sulfato férrico, cloruro férrico o sulfato de
aluminio. Cuando la adición del coagulante tiene como re-
25 sultado un cambio drástico del pH de la solución, se pue-
de añadir inmediatamente antes de la adición del coagulan-
te un agente neutralizador tal como carbonato sódico, car-
bonato cálcico, fosfato monosódico o fosfato disódico; pa-
ra mantener el pH de la solución a 5 a 8.

30 El precipitado resultante se disuelve en agua o

1 un tampón adecuado, tal como tampón tris-HCl o un tampón de fosfato.

La separación por efecto salino se puede repetir.

5 Tras separar la sal usando un tubo de celofán o ultrafiltración, o directamente, la solución acuosa que contiene auro-momicina se pasa por una resina intercambiadora de iones conocida, tal como los tipos Cl de resinas intercambiadoras de iones del tipo de base fuerte, tales como Dowex 1 o Amberlite IRA-400, o tipos Cl de resinas intercambiadoras de iones del tipo de base débil, tales como Amberlite IR-45 o Amberlite IRA-93, o un adsorbente conocido tal como carbón activado, hidroxapatito, o supercell de alto flujo, para causar la adsorción de muchas de las impurezas, permitiendo así el paso de la auro-momicina. La solución resultante que contiene auro-momicina se concentra por ultrafiltración, etc, y se purifica por filtración de gel, por ejemplo por cromatografía con Sephadex G-50 o Sephadex G-75. Luego se hace que la auro-momicina se absorba en Sephadex intercambiador de iones o celulosa intercambiadora de iones, y se eluye con una sal neutra tal como cloruro sódico, o un tampón adecuado tal como un tampón tris-HCl o un tampón fosfato, con lo que se puede purificar más la auro-momicina.

25 Los presentes autores han hallado que además de los métodos frecuentemente usados antes de ahora para la purificación de proteínas, tales como efecto salino, filtración de gel o intercambio de iones, como se ha descrito antes, la llamada cromatografía hidrófuga usando Octil-Sephalose CL-4B (marca registrada de un producto de Phar-

30

1 macia Company) o Fenil-Sephalose CL-4B (marca registrada
de un producto de Pharmacia Company) es un método eficaz
para la purificación de auromomicina. Se añade una sal
5 tal como sulfato amónico o cloruro sódico a la solución
que contiene auromomicina, en una concentración alta en
el intervalo que no cause la precipitación de la auromo-
micina. Tras disolver, la solución obtenida se pasa por
una columna rellena con Octil-Sephalose CL-4B o Fenil-Se-
10 phalose CL-4B, para causar la adsorción de la auromomici-
na. La columna se eluye con una solución acuosa de sul-
fato amónico que tiene la misma concentración, y gradual-
mente con soluciones acuosas de sulfato amónico que tie-
nen menores concentraciones de sulfato amónico. Alternativa-
15 tivamente, la columna se puede eluir con una solución de
sulfato amónico que contiene un disolvente orgánico tal
como metanol, etanol o etilenglicol, o con agua que con-
tiene cualquiera de estos disolventes orgánicos. Utili-
zando la diferencia de poder de adsorción de la resina de
esta manera, se pueden separar proteínas impuras que no
20 han podido ser separadas por métodos usuales de purifica-
ción, tales como efecto salino, intercambio de iones, etc,
y obtener una fracción que contiene auromomicina en gran
concentración. La cromatografía hidrófuga se puede apli-
car a un filtrado del caldo de fermentación de auromomici-
25 na, a una solución en cualquier etapa de un procedimiento
de purificación por una combinación de efecto salino, fil-
tración de gel, intercambio de iones, etc, o a una solu-
ción acuosa de un polvo purificado obtenido por esos méto-
dos de purificación. Cuando se aplica este método a una
30 solución que contiene auromomicina en una etapa temprana

1 de la purificación, que contiene cantidades grandes de
proteínas impuras, se elimina la mayoría de las proteínas
impuras, que tienen una afinidad diferente para la resi-
na. Por tanto, este método tiene una eficacia de purifi-
5 cación extremadamente grande. Tras este tratamiento se
puede obtener auromomicina muy pura por purificación adi-
cional de la fracción que contiene auromomicina, por una
combinación de efecto salino, filtración de gel, intercam-
bio de iones, etc.

10 Cuando hay sales contenidas en la solución que
contiene auromomicina purificada que se obtiene finalmen-
te, las sales se pueden eliminar por cromatografía con Se-
phadex G-25 y Sephadex G-50, ultrafiltración, diálisis,
etc, para obtener una solución acuosa que solo contiene
15 la auromomicina purificada.

La repetición de los diversos procedimientos
cromatográficos antes descritos es útil para eliminar can-
tidades diminutas de impurezas.

20 Liofilizando la solución que contiene auromomi-
cina, obtenida por purificación mediante diversas combina-
ciones de los métodos anteriores, se puede obtener un pol-
vo amarillo. Alternativamente, se pueden precipitar cris-
tales amarillos añadiendo un agente conocido de efecto sa-
lino, tal como sulfato amónico, a la solución de auromomi-
25 cina, y dejando reposar la mezcla en sitio oscuro frío.

Se demuestra que la auromomicina resultante es
una sustancia homogénea por una sola banda en electrofore-
sis en disco de gel de poliacrilamida, un solo pico nítido
en cromatografía en columna con Sephadex G-50, un solo
30 pico en electroforesis de punto isoceléctrico usando IKB

1 Ampholine 8101 (el pH del anfólito vehículo está comprendido entre 5 y 8), y un solo pico en una pauta de sedimentación de análisis ultracentrífugo. A continuación se describirán las características de la auro-momicina.

5 1. Características:

Se obtiene como cristales amarillos tipo placa. Es débilmente ácida a un punto isoeléctrico de pH 5,4. Es fácilmente soluble en agua, pero apenas soluble en disolventes orgánicos tales como metanol, etanol, acetona y acetato de etilo.

10

2. Punto de fusión (punto de descomposición):

No muestra punto de fusión ni punto de descomposición definidos. Se oscurece y carboniza con formación de espuma, y se carboniza completamente a 260°C.

15

3. Rotación óptica:

$[\alpha]_D^{20}$ medida en solución acuosa al 1% es -280°

4. Espectro de absorción ultravioleta:

Como se muestra en la Figura 1, el espectro muestra un máximo de absorción ultravioleta a 273 m μ ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 13,3) y 357 m μ ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 4,6) en solución acuosa, a 270 ~ 274 m μ ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 14,0) y 340 m μ ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 5,9) en solución en hidróxido sódico 0,01N, y 272 m μ ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 13,2) y 356 m μ ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 4,4) en solución en ácido clorhídrico 0,01N. En cualquiera de esas soluciones, el espectro de absorción ultravioleta tiene una meseta en 290 m μ .

25

5. Espectro de absorción infrarroja:

El espectro de absorción infrarroja de la auro-momicina, medido en una tableta de bromuro potásico, se muestra en la Figura 2. Los números de onda (cm^{-1}) a los que hay bandas principales de absorción son 3300, 2980,

30

1 1650, 1540, 1460, 1400 y 1240. Se muestra una ligera absorción a 3100, 1160, 1100 y 930 cm^{-1} .

6. Espectro de dispersión óptica rotatoria:

5 El espectro de dispersión óptica rotatoria de la auromomicina, medido en solución acuosa (2 mg/ml), se muestra en la Figura 3. Se muestra un valle a 280 m μ y 350 m μ .

7. Reacciones de color:

10 La auromomicina decolora una solución de permanganato potásico, es positiva en las reacciones de Folin-Lowry, xantoproteica, Ehrlich, biuret y ninhidrina, y es negativa en las reacciones de fenol ácido sulfúrico, antrona, orcina, Elson-Morgan y Molisch.

8. Peso molecular:

15 El peso molecular es 12.500, como se demuestra por el hecho de que en un método de filtración de gel -- usando Sephadex G-50 se eluye en la misma fracción que el citocromo C (peso molecular 12.500).

9. Análisis elemental:

20 Carbono 47,06%, hidrógeno 6,62%, nitrógeno -- 14,66%, azufre 3,25%, oxígeno 25,80%. No contiene halógeno ni fósforo.

10. Fórmula molecular:

25 A partir de su peso molecular calculado por el resultado de la filtración de gel, se da como fórmula su- puesta ($\text{C}_{39}\text{H}_{65}\text{O}_{16}\text{N}_{10}\text{S}$)₁₂₋₁₄.

11. Aminoácidos constituyentes:

30 Se disolvió en ácido clorhídrico 6N y se hidrolizó a 110°C durante 22 horas. Los resultados se muestran en la Tabla 1. El valor analítico de la cistina es el ob-

1 tenido tras oxidación con ácido perbórmico, y el valor analítico del triptófano es el obtenido tras hidrólisis con hidróxido bórico.

Tabla 1

5 Composición de aminoácidos

	<u>Aminoácido</u>	<u>% en peso</u>
	Acido aspártico	8,04
	Treonina	15,29
	Serina	7,44
10	Acido glutámico	8,79
	Prolina	4,26
	Glicina	10,76
	Alanina	12,14
	Cistina	3,52
15	Valina	14,01
	Metionina	0
	Isoleucina	2,99
	Leucina	4,73
	Tirosina	1,51
20	Fenilalanina	2,86
	Triptófano	2,03
	Lisina	3,78
	Histidina	2,47
	Arginina	0

25 12. Aminoácido terminal en N:

Se detecta alanina por un método de formación de DNP.

13. Estabilidad a la proteasa:

30 Cuando se hizo reaccionar con tripsina, α -quemotripsina, papaína, termolisina, peptidasa, alcalinopro-

1 teasa y pronasa, a un pH de 7,5 a 30°C durante 1 hora, no se notó reducción de la actividad antibacteriana.

14. Estabilidad a pH, temperatura y luz:

5 Es relativamente estable a un intervalo de pH de 5 a 9, pero pierde rápidamente su actividad en acidez fuerte y alcalinidad fuerte. Por reposo a temperatura ambiente, su actividad disminuye gradualmente. Su actividad se pierde casi enteramente por exposición a luz ultravioleta durante varios minutos.

10 15. Acción antibacteriana:

La Tabla 2 muestra que inhibe fuertemente a las bacterias gram-positivas y bacterias gram-negativas.

Tabla 2

Espectro antimicrobiano

15	Organismo de ensayo	Mínima concentración inhibidora (µg/ml)
	Staphylococcus aureus 209P	0,1
	Staphylococcus aureus Smith	0,1
	Micrococcus flavus FDA16	0,05
20	Sarcina lutea PCI 1001	0,1
	Bacillus anthracis	0,2
	Bacillus subtilis NRRL 558	0,2
	Bacillus subtilis PCI 219	0,1
	Bacillus cereus	0,2
25	Escherichia coli NIHJ	3,12
	Escherichia coli K-12	6,25
	Shigella dysenteriae	1,56
	Shigella flexneri 46JS 11811	6,25
	Salmonella enteritidis 1891	25
30	Proteus vulgaris OX-19	3,12

1	Proteus rettgeri GN 311	6,25
	Proteus rettgeri GN 466	0,78
	Serratia marcescens	50
	Pseudomonas aeruginosa A3	>100
5	Klebsiella pneumoniae PCI 602	3,12
	Mycobacterium 607 (•)	3,12
	Mycobacterium phlei (•)	3,12
	Candida albicans 3147 strain (• •)	>100

(•) en agar nutriente que contiene 1% de glicerina

10 (• •) en agar nutriente que contiene 1% de glucosa

Para los demás se usó agar nutriente.

16. Actividad contra tumores y toxicidad aguda:

Es eficaz contra el carcinoma ascítico de Ehrlich y el sarcoma ascítico 180, en ratones, cuando se administra intraperitonealmente durante 5 días consecutivos, en dosis de 0,01 a 1,0 mg/kg/día. A una dosis óptima de 0,025 a 0,25 mg/kg/día, los ratones sobreviven durante más de 60 días. También es eficaz contra la leucemia L1210 en ratones, cuando se administra intraperitonealmente durante 5 días consecutivos, en dosis de 0,03 a 1,0 mg/kg/día, y muestra un aumento máximo de la duración de vida de 148%. Su DL₅₀ en una inyección intravenosa a ratones es 2,5 a 3,5 mg/kg.

Es notable, como se ha descrito antes, que la auroomicina inhibe fuertemente a bacterias gram-positivas y gram-negativas, y en cantidades diminutas tiene actividad contra tumores.

La sustancia de la presente invención es muy similar a la macromomicina (patente de los EE.UU. 3.595.954) entre los antibióticos proteicos contra tumores, pero es

1 una sustancia nueva que tiene propiedades evidentemente
diferentes de las de la macromomicina. Para resaltar es-
to, se resumen en la Tabla 3 las diferentes característi-
cas entre ellas, en propiedades fisicoquímicas y biológi-
cas.

5

Tabla 3

Comparación entre las características de la auromomicina y las de la macromomicina

	Auromomicina	Macromomicina
Propiedad del producto purificado	Cristales amarillos tipo placa	Polvo blanco
λ máx. ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$) en el espectro de absorción UV	273 m μ (13,3) y 357 m μ (4,6)	280 m μ (6,5)
Valle del espectro DOR	280 m μ y 350 m μ	280 m μ
Actividad antibacteriana	Inhibe a bacterias gram-positivas y gram-negativas	Inhibe a bacterias gram-positivas
Actividad contra tumores (dosis eficaz contra leucemia L1210)	0,03 - 1,0 mg/kg/día, administrados durante 5 días	0,2 - 10 mg/kg/día administrados durante 5 días
DL ₅₀ (una administración intravenosa a ratones)	2,5 - 3,5 mg/kg	25 - 50 mg/kg

1 Además, la auromomicina difiere en aminoácidos constituyentes de la neocarcinostatina (J. Antibiotics, Ser. A, Tokio, 18(2), 68-76 (1965)), un antibiótico proteico típico contra tumores.

5 Específicamente, la auromomicina no contiene arginina, pero la neocarcinostatina contiene arginina pero no histidina, contenida en la auromomicina. Además, la auromomicina muestra claras diferencias en propiedades de la neocarcinostatina tales como punto isoeléctrico (pH 10 3,5) y actividad antibacteriana (solo inhibe bacterias gram-positivas).

DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Se dan ejemplos a continuación.

Ejemplo 1

15 Se preparó un medio de cultivo que contenía 1% de glucosa, 1% de almidón soluble, 1,5% de polvo de soja (carne Esusan, producto de Ajinomoto Co., Ltd.), 0,1% de fosfato dipotásico, 0,3% de cloruro sódico, 0,1% de sulfato de magnesio, 0,0007% de sulfato de cobre, 0,0001% de sulfato ferroso, 0,0008% de cloruro de manganeso, 0,0002% 20 de sulfato de cinc y 0,05% de una sustancia contra la formación de espuma (Disfoam CC-118, producto de Nippon Oils and Fats, Co., Ltd.). El pH de este medio se ajustó a 7,2 usando hidróxido sódico al 10%. Cada uno de cuatro 25 fermentadores de jarra, de 30 litros, se cargaron con 18 litros del medio de cultivo y se esterilizaron a 120°C durante 30 minutos. Como cultivo de siembra se pusieron 100 ml del mismo medio de cultivo que antes en un matraz Sakaguchi de 500 ml, y se esterilizaron a 120°C durante 30 minutos. Se inculó Streptomyces macromyceticus en 30

1 el medio esterilizado, a partir de un cultivo inclinado
en agar, por bucle de platino, y se cultivó a 28°C duran-
te 2 días en un agitador alternativo. Luego se inocula-
ron 90 ml del caldo de cultivo de siembra resultante, en
5 cada uno de los fermentadores de jarra, y la fermentación
transcurrió bajo aireación de 18 litros de aire estéril
por minuto, con agitación a 500 rpm, a 28°C, durante 3
días. Así se obtuvieron 16 litros de caldo de fermenta-
ción por fermentador. Se añadieron a los caldos de fer-
mentación 1,3 kg de un coadyuvante de filtración (Dicali-
10 te 4159) en cuatro fermentadores (un total de 64 litros),
y simultáneamente se añadió peróxido de hidrógeno al 15%.
La mezcla se filtró en un filtro prensa. Durante la fil-
tración se añadió continuamente peróxido de hidrógeno al
15%, en cantidad total de 1,3 litros. A 53 litros del fil-
15 trado resultante se añadieron 37 kg de sulfato amónico.
Tras disolver, la solución se dejó reposar a 5°C durante
4 horas. Se añadieron a la solución 600 ml de una solu-
ción acuosa que contenía 265 g de carbonato sódico anhi-
dro, e inmediatamente después se añadieron 600 ml de una
20 solución acuosa que contenía 265 g de cloruro férrico hexa-
hidratado. El precipitado resultante se recogió continua-
mente por separación centrífuga a 5°C y 10.000 rpm. Se
disolvieron 2,2 kg del precipitado obtenido en 13 litros
de agua desionizada. La materia insoluble en agua se eli-
minó por separación centrífuga continua a 5°C y 10.000
25 rpm, obteniendo 12,1 litros de un líquido que sobrenadaba,
que contenía auromomicina.

30 Luego se pasó la solución por una columna relle-
na con 3 litros de Amberlite IRA-93 (tipo Cl), proporcio-

1 nando 13,2 litros de un efluente. El efluente se concen-
tró a un volumen de 200 ml por ultrafiltración, usando
ultrafiltro UH-1 (producto de Toyo Filter Paper Co., Ltd.).
Una materia turbia que se formó ligeramente se eliminó
5 por separación centrífuga a 5°C y 10.000 rpm. El líquido
resultante que sobrenadaba se cromatografió en una colum-
na rellena con 5 litros de Sephadex G-50, usando agua des-
ionizada como revelador, proporcionando 400 ml de una --
fracción activa. Se añadió sulfato amónico (80 g) a esta
10 solución, y tras disolver se pasó la solución por una co-
lumna rellena con 300 ml de Octil-Sephalose CL-4B. La co-
lumna se eluyó subsiguientemente con una solución acuosa
saturada al 35% de sulfato amónico, tras lo cual se obtu-
vieron 600 ml de una fracción amarilla que contenía auro-
15 momicina, tras un pico de proteínas impuras. Esta frac-
ción se sometió a eliminación total de sales con ultrafil-
tro UH-1. Se pasaron 600 ml de la solución de la que se
habían eliminado las sales, por una columna de 300 ml de
DEAE-Sephadex A-25 (tipo OH), y la columna se eluyó con
20 un tampón tris-HCl 0,2M (pH 7,0). Se concentraron 180 ml
de la fracción activa, con ultrafiltro UH-1, a un volumen
de 70 ml. La solución se añadió a una columna rellena
con 2 litros de Sephadex G-50, y se cromatografió con agua
desionizada como revelador, proporcionando 150 ml de una
25 fracción activa. Esta solución se concentró a un volumen
de 20 ml usando ultrafiltro UH-1. Se añadieron gradual-
mente al concentrado 2,7 g de sulfato amónico. La mezcla
se dejó reposar en sitio oscuro, a 5°C, durante 3 a 4 días,
con lo cual precipitaron cristales amarillos tipo placa.
30 Las aguas madres eran casi incoloras. Los cristales se

1 recogieron en un filtro de vidrio, se lavaron con 10 ml
de una solución acuosa de sulfato amónico al 15%, y se
disolvieron en 10 ml de agua desionizada. La solución se
pasó por una columna rellena con 200 ml de Sephadex G-25,
5 proporcionando 15 ml de una fracción activa. La fracción
se liofilizó, proporcionando 430 mg de un polvo amarillo.
El rendimiento de la actividad antibacteriana del polvo
amarillo resultante, basado en el filtrado del caldo de
cultivo, fue 3,5%.

10 Ejemplo 2

De la misma manera que en el Ejemplo 1, el mi-
croorganismo se cultivó en cuatro fermentadores de jarra,
y se obtuvo un precipitado del filtrado del caldo de fer-
mentación, por efecto salino.

15 Se pasó una solución acuosa del precipitado por
Amberlite IRA-93 (tipo Cl), y el efluente se concentró
usando ultrafiltro UH-1. El concentrado se añadió a una
columna rellena con 5 litros de Sephadex G-50, y se cro-
matografió con agua desionizada como revelador, proporcio-
20 nando 380 ml de una fracción activa. Se añadió sulfato
amónico (90 g) a esta fracción, de manera que la concen-
tración de sulfato amónico era 40% de saturación. Tras
disolver, la solución se pasó por una columna rellena con
400 ml de Fenil-Sephalose CL-4B. La columna se eluyó ha-
25 ciendo fluir en gradiente soluciones acuosas de sulfato
amónico, desde 40% de saturación hasta 10% de saturación.
Así se obtuvieron 400 ml de una fracción activa. Se con-
centró hasta 100 ml con ultrafiltro UH-1. El concentrado
se añadió a una columna rellena con 2,5 litros de Sepsa-
30 dex G-50, y se cromatografió con agua desionizada. La frac

1 ción activa resultante (200 ml) se concentró con ultrafil-
tro UH-1, hasta 20 ml. Subsiguientemente, de la misma ma-
nera que en el Ejemplo 1, se añadió sulfato amónico para
precipitar cristales amarillos, que se disolvieron en agua
5 desionizada. La solución se sometió a eliminación de sa-
les con Sephadex G-25. La fracción activa resultante se
liofilizó, proporcionando 380 mg de un polvo amarillo.

El rendimiento de la actividad antibacteriana
del polvo amarillo resultante, basado en el filtrado del
10 caldo de cultivo, fue 3,3%.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra las curvas espectrales de
absorción ultravioleta y en la región visible, de la auro-
momicina en solución acuosa (línea continua), solución en
15 hidróxido sódico 0,01N (línea de puntos) y solución en
ácido clorhídrico 0,01N, (línea de puntos y rayas).

La Figura 2 muestra la curva espectral de absor-
ción infrarroja de la auromomicina, determinada usando ta-
bleta de bromuro potásico.

20 La Figura 3 muestra la curva espectral de dis-
persión óptica rotatoria de la auromomicina, en solución
acuosa (2 mg/ml).

1

REIVINDICACIONES

5

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

10

1^a.- Un procedimiento para obtener un nuevo antibiótico antitumoral, la auromomicina, que comprende las operaciones de cultivar de forma aerobia un microorganismo del género *Streptomyces macromomyceticus* en un medio nutriente asimilable; someter el caldo de cultivo a una serie de tratamientos que comprenden intercambio de iones, filtración de gel, separación por efecto salino y cromatografía hidrófoba, en donde se hace una solución que contiene auromomicina, saturada en no más del 40% con sulfato amónico, y esta solución se aplica sobre una resina hidrófoba, seguido por elución con soluciones de sulfato amónico acuosas de concentraciones gradientemente decrecientes a partir de la concentración en dicha etapa de adsorción, con lo que se obtienen fracciones de auromomicina antes de que se eluyan fracciones de macromomicina; y recuperar auromomicina en forma pura a partir de las fracciones de auromomicina.

15

20

25

2^a.- Un procedimiento según la reivindicación 1^a, en el que la resina hidrófoba es Octil-Sephalose CL-4B o Fenil-Sephalose CL-4B.

30

3^a.- "UN PROCEDIMIENTO PARA OBTENER UN NUEVO

1 ANTIBIOTICO ANTITUMORAL, LA AUROMOMICINA".

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y con los fines que se han especificado.

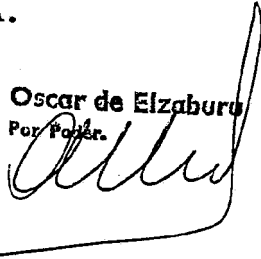
5 Esta Memoria consta de veintiuna hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 09.ABR.1979

10

P.A.

Oscar de Elzaburu
Por Poder.



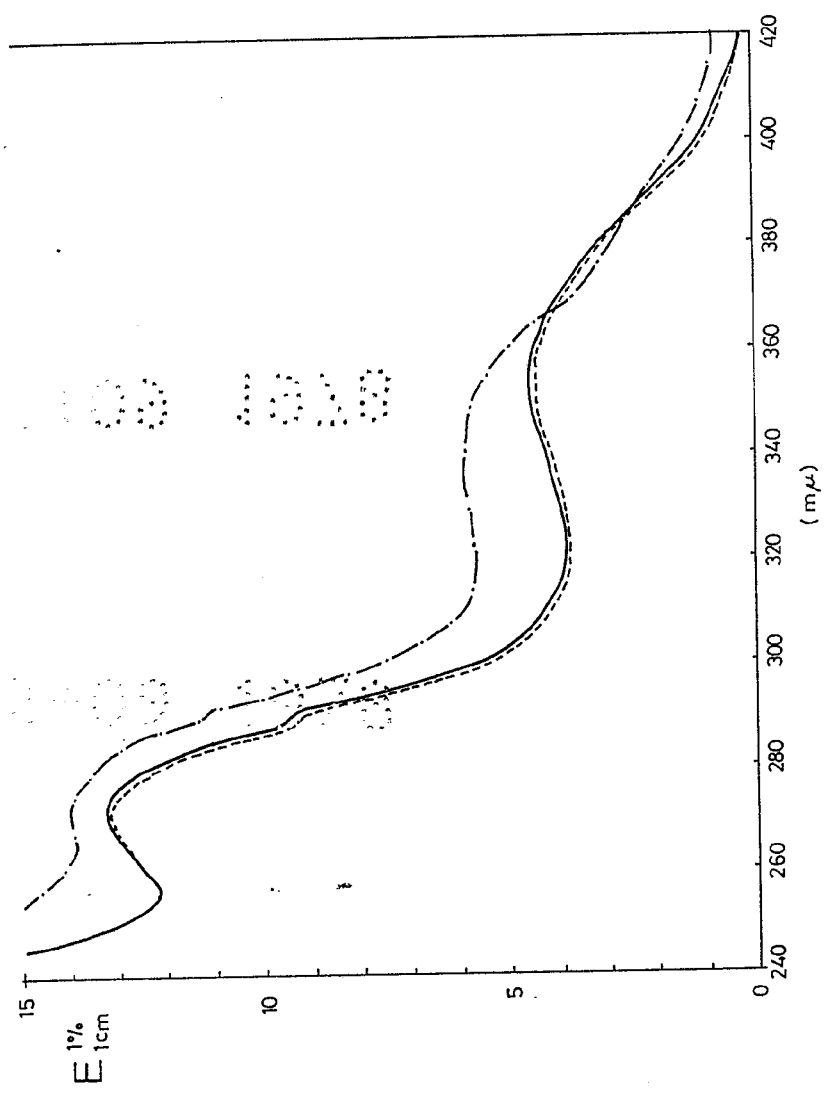
15

20

25

30

FIG-1



OSCAR DE ELIZABURRI
Per Page
GA

FIG.- 1

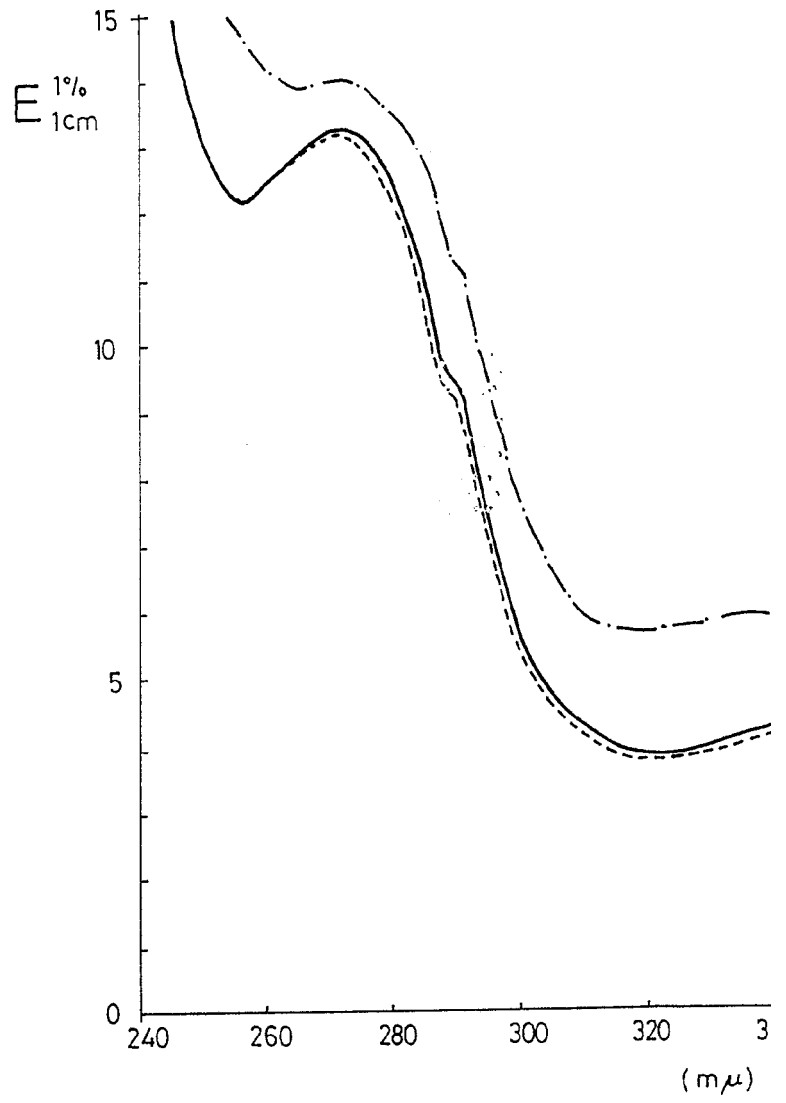
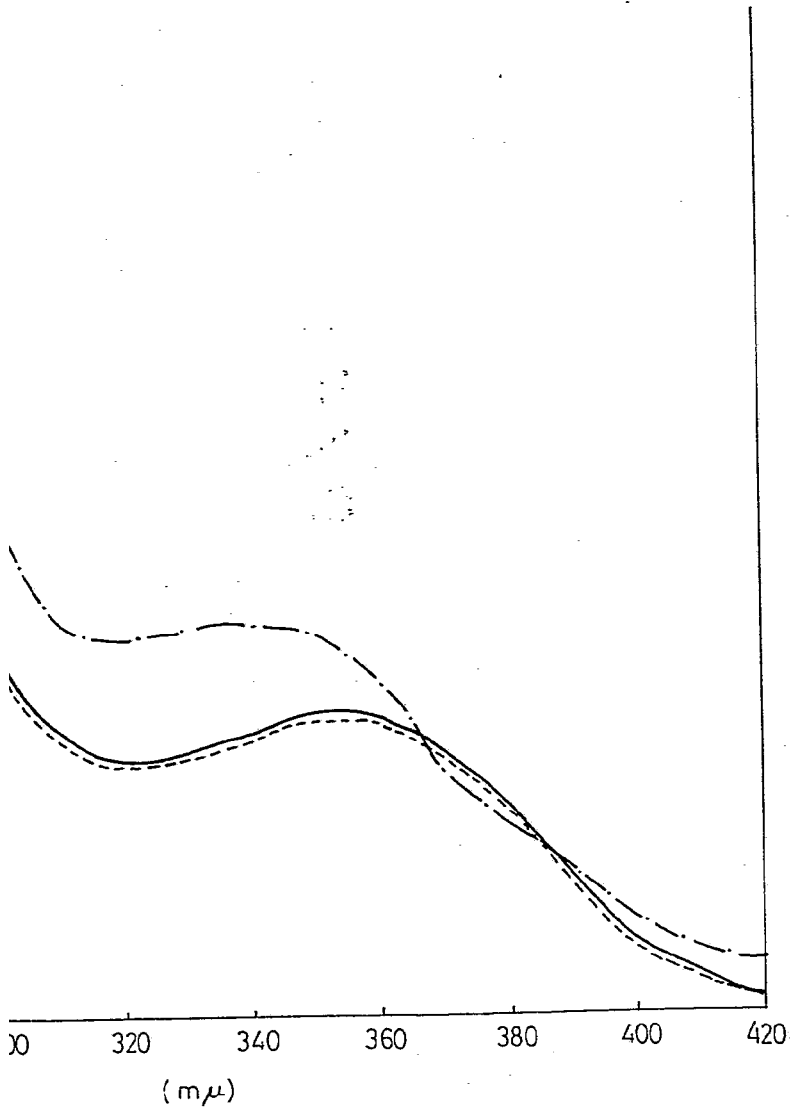
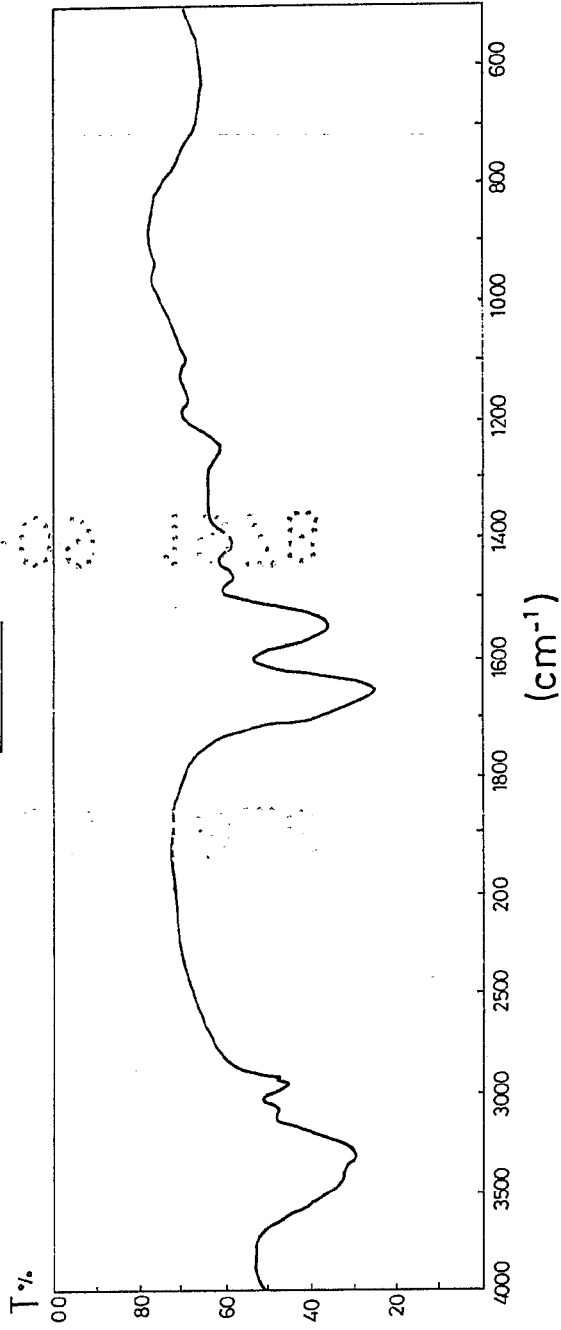


FIG.- 1



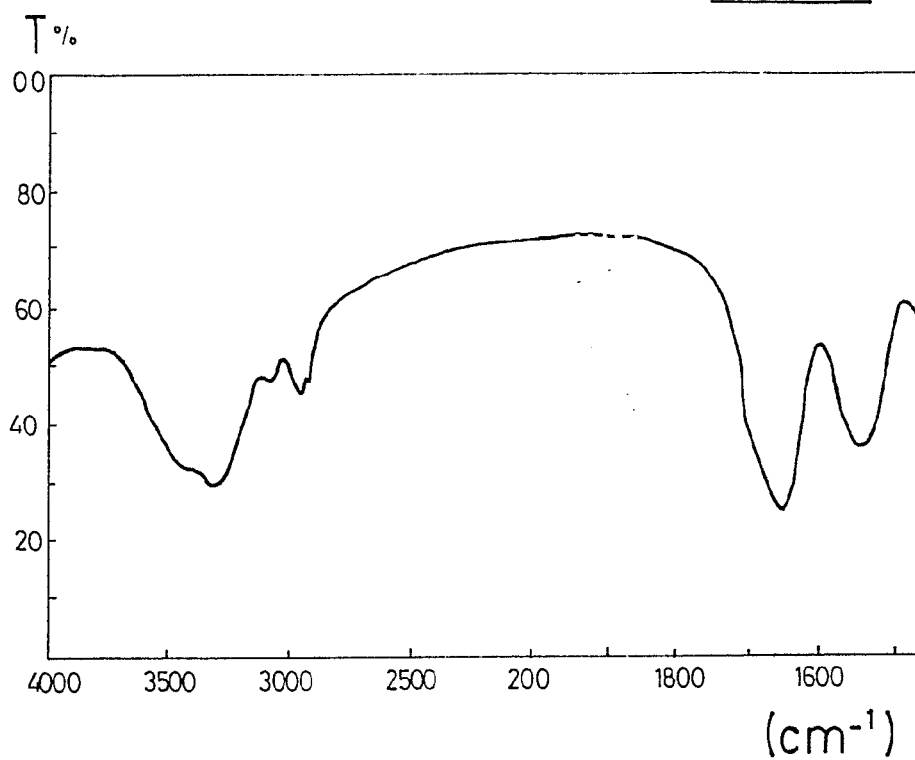
Osceola Electric
Per Electric

FIG- 2



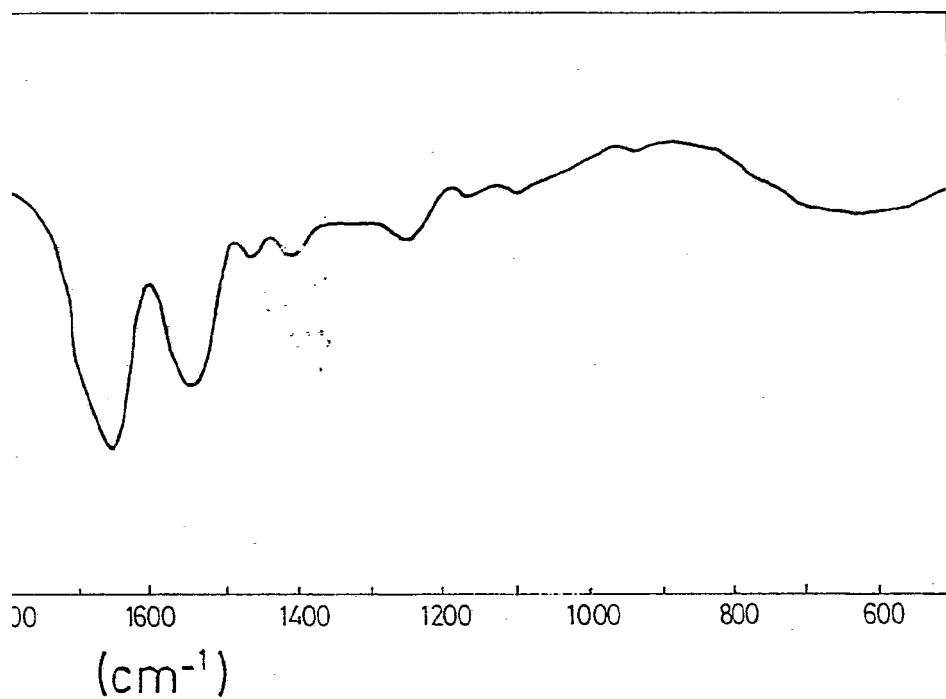
Geoffrey Eitzberg
10/1/80
GA

FIG- 2



P- 69740

FIG- 2



Copyright © 1987
PerkinElmer

P-69740

