

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

Concorda el número de patente con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la memoria adjunta.

19 ES	11	485962	10 A1
	21		
	22	FECHA DE PRESENTACION	
		14-NOVIEMBRE-1979	

PATENTE DE INVENCION

50 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	52 FECHA	53 PAIS
44346/78	14-11-1978	GRAN BRETAÑA
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	E12D 9/16 // A61K 31/71	
54 TITULO DE LA INVENCION		
" UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE SUSTANCIA FR-900156 "		
71 SOLICITANTE (S)		
FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
No. 3, 4-chome, Doshomachi - Higashi-ku, Osaka-shi - JAPON		
72 INVENTOR (ES)		
Yoshio Kuroda; Eiko Iguchi; Masanobu Kohsaka; Hatsuo Aoki y Hiroshi Imanaka, todos de nacionalidad japonesa.		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU		

CM.-

1 Esta invención se refiere a un nuevo compuesto
con actividad biológica, el cual de ahora en adelante se ci-
tará como sustancia FR-900156, y a sus sales farmacéuticamen-
te aceptables, junto con un procedimiento de preparación de
5 los mismos y junto con una composición farmacéutica que los
contenga. Más particularmente se refiere a una nueva sustan-
cia FR-900156 y a su sales farmacéuticamente aceptables que
tienen actividades potenciadoras de la respuesta inmune y
sistema reticuloendotérico y por tanto son útiles para, por
10 ejemplo, el tratamiento terapéutico de enfermedades infeccio-
sas causadas por microorganismo patógenos y del cancer en
seres humanos y animales, junto con un procedimiento de pre-
paración del mismo y con composiciones farmacéuticas que lo
contienen.

15 Según esto, un objeto de esta invención es pro-
porcionar un nuevo compuesto, sustancia FR-900156, y sus sa-
les farmacéuticamente aceptables que son útiles para el tra-
tamiento terapéutico de enfermedad infecciosa causada por
microorganismos patógenos, especialmente bacterias gram-ne-
20 gativas y bacterias gram-positivas y hongos, y de cancer en
seres humanos y animales.

Otro objeto de esta invención es proporcionar un
procedimiento para la preparación de la sustancia FR-900156
por fermentación de una estirpe que produce sustancia FR-
25 900156 perteneciente al género Streptomyces en un medio nu-
triente.

Es además otro objeto de esta invención propor-
cionar una composición farmacéutica que contiene un ingre-
diente eficaz, la sustancia FR-900156 o sus sales farmacéu-
30 ticamente aceptables.

1 Aún otro objeto de esta invención es proporci-
nar un método de uso de la sustancia FR-900156 o sus sales
farmacéuticamente aceptables para el tratamiento terapéutico
de enfermedades infecciosas causadas por bacterias y del
5 cáncer en mamíferos.

La sustancia FR-900156 de esta invención puede
producirse por fermentación de una estirpe productora de
sustancia FR-900156 que pertenece al género Streptomyces tal
como Streptomyces olivaceogriseus, Streptomyces violaceus y
10 similares en un medio nutriente.

LOS MICROORGANISMOS

El microorganismo que puede emplearse para la
producción de la sustancia FR-900156 es una estirpe que per-
tenece al género Streptomyces, entre los cuales ha sido ais-
15 lada recientemente una estirpe de Streptomyces olivaceogri-
seus y Streptomyces violaceus a partir de una muestra del
suelo como estirpe adecuada de producción de sustancia FR-
900156 que pertenece al género Streptomyces.

Ha de entenderse que, para la producción de la
20 sustancia FR-900156, esta invención no queda limitada al
empleo de un organismo particular como el aquí descrito, que
se da solamente con propósitos ilustrativos. Esta invención
también incluye el empleo de cualquier mutante que sea ca-
paz de producir la sustancia FR-900156, incluyendo los mu-
25 tantes naturales que se producen por mutación natural de
los organismo así como los mutantes artificiales que pueden
producirse a partir de los organismos descritos por medios
convencionales tales como rayos-X, radiación ultravioleta,
aceites de mostazas nitrogenadas y similares.

30 I. Re. Streptomyces olivaceogriseus nov. sp.C-353:

1

El *Streptomyces olivaceogriseus* nov. sp.C-353 se ha aislado de una muestra de suelo recogida en la Prefectura de Kochi, Japón, y depositada y añadida a una colección de cultivo que forma un material permanente de la America Type Culture Collection con el número ATCC 31427.

5

El *Streptomyces olivaceogriseus* nov. sp.C-353 (ATCC 31427) tiene las siguientes características morfológicas, de cultivo y fisiológicas.

(1) Características morfológicas:

10

Se han realizado observaciones microscópicas sobre cultivos que han crecido de 10 a 14 días sobre agar nitrato de sacarosa, agar glicerina-asparagina, agar extracto de levadura de cerveza, agar harina de avena, agar sales inorgánicas de almidón y agar Bennett. La morfología de los esporoforos se ha observado sobre cultivos en placas no perturbadas.

15

1. Tipo de cepas de hifas que forman esporas:

Cepas monopódicas

2. Forma de hifas que forman esporas:

Reticuloabiertas

(espirales cerradas, lazos)

20

3. Número de esporas:

5 - 20 esporas

4. Apariencia de la superficie y tamaño de esporas

25

Lisa

0,6 - 1,2 x 1,0 - 1,9 micras

5. Existencia de zoosporas:

No se ha observado

30

1

6. Existencia de esporangio:

No se ha observado.

7. Formación de esporas:

En micelio aéreo

5

8. Fragmentado del micelio substrato:

No se ha observado

(2) Características del cultivo:

Las observaciones siguientes se han realizado sobre cultivos sesgados que han crecido en diversos medios a 30°C durante 10-14 días.

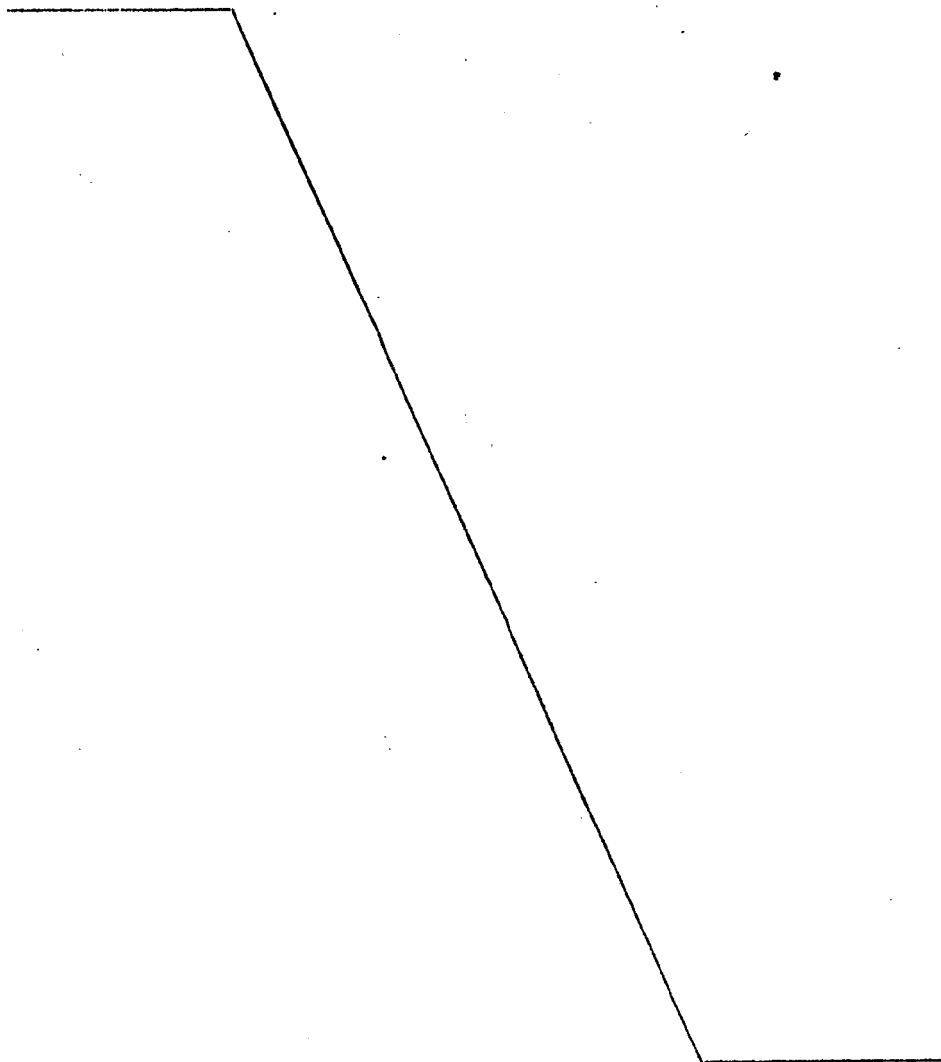
10

15

20

25

30



Medio	Color de la masa aérea	Lado reverso de la colonia	Pigmento soluble
Agar Nitrato de sacarosa	ninguno o muy tenue, polvoriento	amarillo pálido pequeñas colonias	ninguno
Agar Glucosa- asparagina	gris claro a gris verdoso, polvoriento	amarillo pálido a pardo amarillento, pequeñas colonias	ninguno
Agar Glicerina- asparagina	tenue, polvoriento gris claro	pardo amarillento pálido, pequeñas colonias	ninguno o trazas
Agar Sales inorgánicas de almidón	gris oliva, polvoriento	pardo amarillo, grisáceo, pequeñas colonias	ninguno
Agar Tirosina	gris oliva claro, tenue polvoriento	pardo amarillento, pequeñas colonias	pardo claro
Agar Nutriente	ninguno	amarillo pálido, plano	ninguno
Agar Extracto de levadura de cerveza	gris verdoso polvoriento	pardo amarillento, colonias con surcos	ninguno
Agar Harina de avena	gris claro a gris verdoso, polvoriento	incoloro, pequeñas colonias	ninguno
Agar con hierro Peptona- levadura	ninguno	incoloro a amarillo pálido con ligeros surcos	pardo claro
Glucosa-peptona puzada de gelatina	blanco, polvoriento tenue	incoloro a amarillo pálido colonias con surcos	pardo
Leche	blanco muy tenue polvoriento	incoloro, crecimiento en anillos superficiales	ninguno

1
5
10
15
20
25
30

Medio	Color de la masa aérea	Lado reverso de la colonia
Agar Nitrato de sacarosa	ninguno o muy tenue, polvoriento	amarillo pálido pequeñas colonias
Agar Glucosa-asparagina	gris claro a gris verdoso, polvoriento	amarillo pálido a pardo amarillento, pequeñas colonias
Agar Glicerina-asparagina	tenue, polvoriento gris claro	pardo amarillento pálido, pequeñas colonias
Agar Sales inorgánicas de almidón	gris oliva, polvoriento	pardo amarillo grisáceo, pequeñas colonias
Agar Tirosina	gris oliva claro, tenue polvoriento	pardo amarillento, pequeñas colonias
Agar Nutriente	ninguno	amarillo pálido, plano
Agar Extracto de levadura de cerveza	gris verdoso polvoriento	pardo amarillento, colonias con surcos
Agar Harina de avena	gris claro a gris verdoso, polvoriento	incoloro, pequeñas colonias
Agar con hierro Peptona-levadura	ninguno	incoloro a amarillo pálido con ligeros surcos
Glucosa-peptona punzada de gelatina	blanco, polvoriento tenue	incoloro a amarillo pálido colonias con surcos
Leche	blanco muy tenue polvoriento	incoloro, crecimiento en anillos superficiales

	Lado reverso de la colonia	Pigmento soluble
	amarillo pálido pequeñas colonias	ninguno
a o,	amarillo pálido a pardo amarillen to, pequeñas colonias	ninguno
o-	pardo amarillen- to pálido, pequeñas colonias	ninguno o trazas
	pardo amarillo grisáceo, pequeñas colonias	ninguno
e	pardo amarillen to, pequeñas colonias	pardo claro
	amarillo páli- do, plano	ninguno
o	pardo amarillen to, colonias con surcos	ninguno
a o,	incoloro, pequeñas colonias	ninguno
	incoloro a amarillo pálido con ligeros surcos	pardo claro
)	incoloro a amarillo pálido colonias con surcos	pardo
)	incoloro, crecimiento en anillos super- ficiales	ninguno

- 1 (3) Propiedades biológicas y fisiológicas:
1. Requerimientos de temperatura (sobre sesgados de agar Bennett) crecimiento de 15°C a 40°C, óptimo 28°C.
- 5 2. Hidrólisis de almidón (sobre agar sales inorgánicas de almidón) debilmente hidrolizado
3. Licuefacción de gelatina (sobre glucosa-peptona punzada de gelatina) negativo
- 10 4. Acción sobre la leche
sin coagulación
sin peptonización
5. Producción de melanina (sobre agar tirosina, peptona-levadura agar con hierro y triptona-caldo de levadura)
- 15 positivo
6. Utilización de diversos compuestos carbonados
(sobre un medio de agar basal Pridham-Gottlieb)
- 20 L-Arabinosa -
D-Xilosa +
D-Glucosa +
D-Fructosa +
- 25 D-Galactosa +
Sacarosa +
Glicerina +
Inositol +
Lactosa +
- 30 L-Ramnosa -

1	Maltosa	+
	Rafinosa	-
	D-Manitol	+
	D-Manosa	+
5	Salicina	

Símbolos : +, buena utilización; \pm utilización dudosa;
-, sin utilización.

7. Modelo de pared celular I (ácido LL-diamino
pimérico)

10 Como resultado del examen de la estirpe que posee
las características mencionadas antes con referencia a la
bibliografía esto es "Bergey's Manual of Determinative Bac-
teriology" octava edición (1975) y "The International Strep-
15 tomyces Project Reports" escrito por E.B. Shirling y D. Gott-
lieb Cf. Internacional Journal of Systematic Bacteriology
Vol. 18, páginas 69 y 279 (1968) Vol. 19, páginas 391 (1969)
y Vol. 22, páginas 265 (1972), se han detectado el Strepto-
myces eurythermus y el Streptomyces galbus (Okami) como espe-
cies que tienen características relativamente análogas a las
20 de la estirpe ATCC 31427.

La estirpe ATCC 31427, sin embargo, es diferente
de esas especies análogas en lo siguiente:

Streptomyces eurythermus (Okami) :

25 Una estirpe de la especie puede asimilar arabi-
noca y puede no asimilar inositol. La asimilación de ramnosa
y rafinosa por una estirpe de la especie es indefinida. No
se forman lazos. A veces se observan micelios rectos o fle-
xuosos.

Streptomyces galbus :

30 Se forman por lo general espirales abiertas. Una

1 estirpe de la especie produce un pigmento soluble amarillo-
verde amarillento, y puede no, asimilar sacarosa.

5 A la vista del resultado de la observación, la
estirpe ATCC 31427 puede ser juzgada como una nueva especie
que pertenece al género *Streptomyces* y ha sido designada como
Streptomyces olivaceogriseus nov. sp.C-353.

II. Re. *Streptomyces violaceus* N° 6724

10 El *Streptomyces violaceus* N° 6724 ha sido aisla-
do de una muestra del suelo recogida en la isla de Ishigaki,
en la Prefectura de Okinawa, Japón, y depositada y añadida
a una colección de cultivos de material permanente de la Ame-
rican Type Culture Collection, con el número ATCC 31481.

15 *Streptomyces violaceus* N° 6724 tiene las siguien-
tes características morfológicas, de cultivo y fisiológicas.

(1) Características morfológicas:

20 Se han hecho observaciones microscópicas so-
bre cultivos que han crecido sobre agar nitrato de sacarosa,
agar glicerina-asparagina, agar sales inorgánicas de almidón,
agar extracto de levadura de cerveza y agar harina de avena
a 30°C durante 10 a 14 días.

1. Tipo de ramificación de las hyfas que for-
man esporas:

Ramificación monopódica

2. Forma de las hyfas que forman esporas:

Espirales

3. Número de esporas

10 - 50

4. Apariencia de la superficie y tamaño de
espora

Espinoso

30

1

0,3 - 0,7 x 0,6 - 1,1 μ

5. Existencia de zoospora y esporangio

No se observa

6. Formación de esporas

En micelio aéreo

5

7. Fragmentado de micelio substrato:

No se observa

(2) Características del cultivo:

10

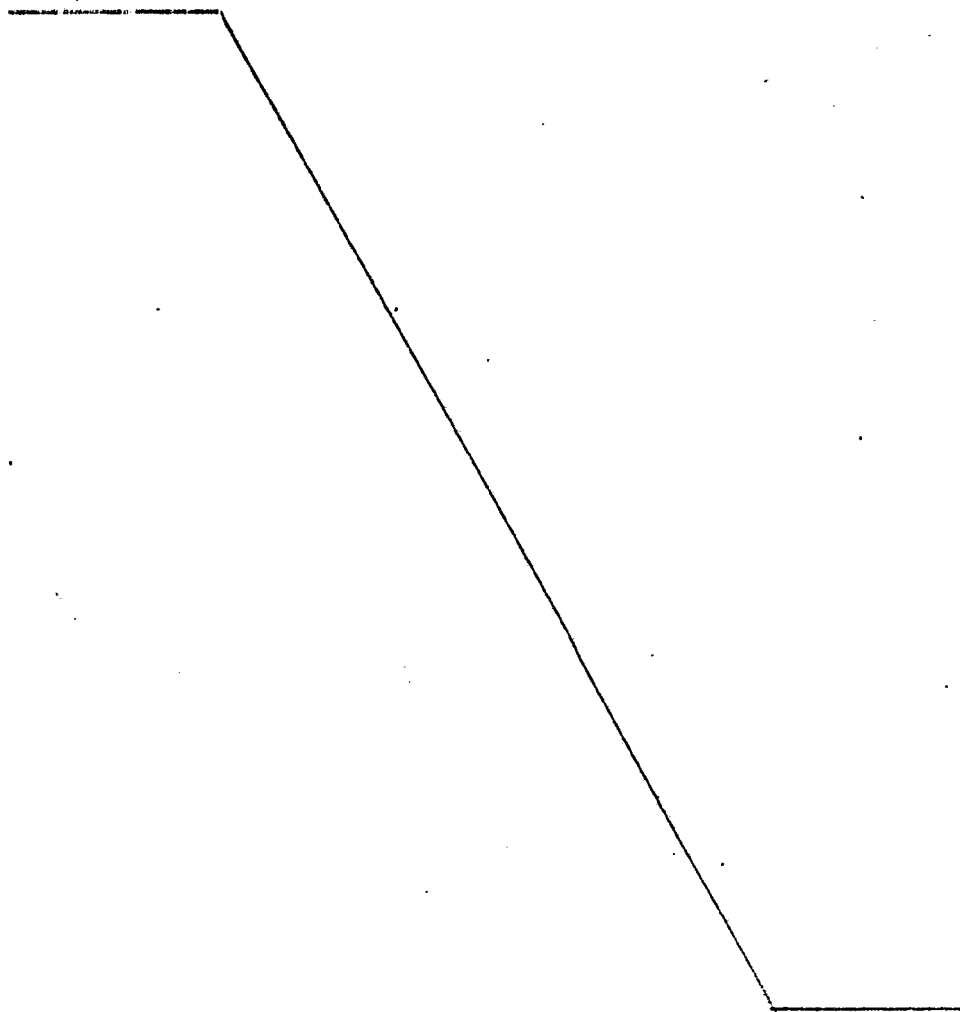
Las observaciones siguientes se han hecho sobre cultivos que crecen en diversos medios a 30°C durante 10 a 14 días.

15

20

25

30



Medio	Color de la masa aérea	Lado reverso de la colonia	Pigmento soluble
Agar Nitrate de sacarosa	Blanco purpurino, polvoriento	Pequeñas colonias	púrpura
Agar Glucosa-asparagina	Blanco purpurino, polvoriento	rojo amarillento pequeñas colonias	rosa
Agar Glicerina asparagina	Blanco rosado -rosa, polvoriento	rojo amarillento pequeñas colonias ligeramente con surcos	rosa-rojo
Agar Sales inorgánicas de almidón	rojo blanquecino, algodonoso corto	rojo amarillento, ligeramente con surcos	rojo
Agar Tirosina	ninguno	rojo colonias con surcos	ninguno o trazas
Agar Nutriente	ninguno o muy tenue polvoriento	incoloro-púrpura, plano	rojizo púrpura
Agar Extracto de levadura de cerveza	rosa-púrpura rosa algodonoso corto	pardo rojizo -pardo púrpura, colonias con surcos	rojizo púrpura
Agar harina de avena	rosa-púrpura rosa, polvoriento	incoloro-rosa púrpura, pequeñas colonias	rosa-púrpura
Agar con hierro peptona-levedura	ninguno	incoloro colonias con surcos	pardo
Panzado de gelatina Glucosa-peptona	blanco, tenue polvoriento	rojo, colonias con surcos	pardo
Leche	polvoriento tenue	rojo crecido sobre superficie	amarillo rojizo

1
5
10
15
20
25
30

Medio	Color de la masa aérea	Lado reverso de la colonia
Agar Nitrato de sacarosa	Blanco purpurino, polvoriento	Pequeñas colonias
Agar Glucosa-asparagina	Blanco purpurino, polvoriento	rojo amarillo pequeñas color
Agar Glicerina asparagina	Blanco rosado-rosa, polvoriento	rojo amarillo pequeñas color ligeramente con surcos
Agar Sales inorgánicas de almidón	rojo blanquecino, algodonoso corto	rojo amarillo ligeramente con surcos
Agar Tirosina	ninguno	rojo colonias con surcos
Agar Nutriente	ninguno o muy tenue polvoriento	incoloro-púrpura, plano
Agar Extracto de levadura de cerveza	rosa-púrpura rosa algodonoso corto	pardo rojiza -pardo púrpura colonias con surcos
Agar harina de avena	rosa-púrpura rosa, polvoriento	incoloro-rosa púrpura, pequeñas color
Agar con hierro peptona-levadura	ninguno	incoloro colonias con surcos
Panzado de gelatina glucosa-peptona	blanco, tenue polvoriento	rojo, colonias con surcos
Leche	polvoriento tenue	rojo crecido sobre superficie

	Lado reverso de la colonia	Pigmento soluble
urri- lento	Pequeñas colonias	púrpura
urri- lento	rojo amarillento pequeñas colonias	rosa
do o-	rojo amarillento pequeñas colonias ligeramente con surcos	rosa-rojo
eci- oso	rojo amarillento, ligeramente con surcos	rojo
	rojo colonias con surcos	ninguno o trazas
uy	incoloro- púrpura, plano	rojizo púrpura
a corto	pardo rojiza -pardo púrpura, colonias con surcos	rojizo púrpura
a	incoloro- rosa púrpura, pequeñas colonias	rosa- púrpura
	incoloro colonias con surcos	pardo
	rojo, colonias con surcos	pardo
	rojo crecido sobre superficie	amarillo rojizo

1 El pigmento del micelio invertido es un indicador de pH, que cambia de rojo a violeta (púrpura) al añadir NaOH 0,05N o de violeta a rojo (rosa) al añadir HCl 0,05N.

5 El pigmento soluble es también sensible al pH, mostrando los mismos cambios señalados para el pigmento del micelio invertido.

(3) Propiedades biológicas y fisiológicas:

1. Requerimientos de temperatura (sobre sesgados de agar Bennett)

crecimiento de 15°C a 40°C (óptimo 28°C)

2. Licuefacción de gelatina (sobre punzadas de gelatina glucosa-peptona)

negativo

3. Hidrólisis de almidón (sobre agar sales inorgánicas de almidón)

positivo

4. Acción sobre leche

coagulación, sin peptonización

5. Producción de pigmento melanoide (sobre agar tirosina, agar con hierro levadura-peptona y caldo de extracto de levadura-triptona)

positivo

muy débil o nada sobre agar tirosina

6. Utilización de diversos compuestos carbonados

(sobre medio agar basal de Pridham-Gottlieb)

L-Arabinosa +

D-Xilosa +

30

1	L-Rammosa	+
	D-Glucosa	+
	D-Fructosa	+
	D-Manosa	+
5	D-Galactosa	+
	Sacarosa	+
	Lactose	+
	Maltosa	+
	Rafinosa	+
10	Inulina	±
	Celulosa	-
	Quitina	-
	Glicerina	+
	D-Manita	+
15	Salicina	+
	Inosita	+
	Acetato-Na	-
	Citrato-Na	+
	Succinato-Na	+

20 Símbolos: +, buena utilización
±, utilización dudosa
-, sin utilización.

LA SUSTANCIA FR-900156

25 La sustancia FR-900156 de esta invención se produce cuando la estirpe productora de sustancia FR-900156 que pertenece al género *Streptomyces* (por ej. *Streptomyces oliveogriseus* nov. sp.C-353 y *Streptomyces violaceus*, etc.) se hace crecer en un medio nutriente que contiene fuentes de carbono y nitrógeno asimilables en condiciones aerobias (por
30 ej. cultivo con agitación, cultivo sumergido, etc.).

1 Las fuentes de carbono preferidas en el medio
nutriente son carbohidratos tales como glucosa, fructosa,
glicerina, almidón y similares. Otras fuentes que pueden in-
cluirse son lactosa, arabinosa, xilosa, dextrina, molasas y
5 similares.

Las fuentes preferidas de nitrógeno son extracto
de levadura, peptona, harina de gluten, harina de semillas
de algodón, harina de soja, licor de maceración de maíz, le-
vadura seca, germen de trigo, etc., así como compuestos ni-
10 trogenados orgánicos o inorgánicos tales como sales de am-
nio (por ej. nitrato amónico, sulfato amónico, fosfato amóni-
co, etc.), urea, aminoácidos y similares.

Las fuentes de carbono y nitrógeno, aunque se em-
plean ventajosamente combinadas, no necesitan utilizarse en
15 su forma pura porque también es adecuada la utilización de
materiales menos puros, que contienen trazas de factores de
crecimiento y cantidades considerables de nutrientes minera-
les. Cuando se desee, se pueden añadir al medio sales minera-
les tales como carbonato cálcico, fosfato sódico o potásico,
20 cloruro sódico o potásico, sales de magnesio, esquistos de co-
bre y similares. Si se necesita, especialmente cuando el me-
dio de cultivo forma espuma en cantidad, puede añadirse un
agente desespumante, tal como parafina líquida, aceite gra-
so, aceite vegetal, aceite mineral o silicona.

25 Como ocurre en el caso de los métodos preferible-
mente utilizados para producir otros antibióticos en canti-
dades masivas se prefieren las condiciones de cultivo aero-
bio sumergido para la producción de la sustancia FR-900156 a
gran escala. Para la producción en pequeñas cantidades se em-
30 plea el cultivo con agitación de superficie en un matraz o

1 botella. Además cuando el crecimiento se lleva a cabo en
grandes depósitos, es preferible utilizar la forma vegetati-
va del organismo para su inoculación en los depósitos de pro-
5 ducción con objeto de evitar retardo del crecimiento en el
proceso de producción de la sustancia FR-900156. Según esto,
es deseable producir primero un inóculo vegetativo del orga-
nismo por inoculación de una cantidad relativamente pequeña
del medio de cultivo con esporas o micelios del organismo y
cultivarlos y despues transportar asepticamente el inóculo
10 vegetativo cultivado a depósitos grandes. El medio, en el
que se produce el inóculo vegetativo es sustancialmente
igual, o diferente, que el medio utilizado para la produc-
ción de la sustancia FR-900156.

15 La agitación y aireación de la mezcla de cultivo
puede llevarse a cabo por diversidad de caminos. La agitación
se puede obtener con una hélice o equipo mecánico similar de
agitación, por giro o sacudida del fermentador, por diversos
equipos de bombeo o por el paso de aire esteril a través del
medio. La aireación puede efectuarse por paso de aire esté-
20 ril a través de la mezcla de fermentación.

La fermentación se lleva a cabo usualmente a
una temperatura entre aproximadamente 20°C y 40°C, preferi-
blemente 30°C, durante un periodo de tiempo de aproximada-
mente 50 horas a 100 horas.

25 La sustancia FR-900156 puede recuperarse del me-
dio de cultivo por los medios convencionales que se utili-
zan comunmente para la recogida de otros antibióticos cono-
cidos.

30 En general, la mayor parte de la sustancia FR-
900156 se encuentra en el caldo de cultivo y consiguiento-

1 mente la sustancia FR-900156 puede separarse del filtrado
que se obtiene por filtración de centrifugado del caldo de
cultivo por un método convencional tal como concentración a
5 presión reducida, liofilización, ajuste de pH, tratamiento
con una resina (por ej. resina de intercambio de anión o ca-
tión, resina de adsorción no iónica, etc.) tratamiento con
un adsorbente (por ej. carbón activado, ácido silícico, gel
de sílice, celulosa, alúmina, etc.) cristalización, recris-
talización y similares.

10 La sustancia FR-900156 así producida en el caldo
de cultivo puede aislarse en la forma libre, es decir, sus-
tancia FR-900156 por sí misma o bien cuando la solución o su
concentrado que contiene la sustancia FR-900156 se trata con
una base, por ej. con una base inorgánica tal como un com-
15 puesto de metal alcalino (por ej. hidróxido sódico, carbona-
to sódico, bicarbonato sódico, hidróxido potásico, etc.), un
compuesto de metal alcalinotérreo (por ej. hidróxido cálcico,
hidróxido magnésico, etc.) amoníaco y similares, con una
base orgánica (por ej. etanolamina, trietilamina, dicitclo-
20 hexilamina, etc.); o con un ácido, ya sea con un ácido inor-
gánico (como por ej. ácido clorhídrico, ácido sulfúrico,
ácido fosfórico, etc.); o con un ácido orgánico (por ej. áci-
do fórmico, ácido acético, ácido p-toluensulfónico, ácido
cítrico, ácido tartárico, etc.) durante la operación de los
25 procesos, por ej. procesos de extracción, aislamiento o puri-
ficación, la sustancia FR-900156 puede transformarse y ais-
larse en forma de las correspondientes sales de la misma.
Alternativamente, las sales de la sustancia FR-900156 así
preparadas pueden convertirse fácilmente en la forma libre,
30 es decir, en la propia sustancia FR-900156 de una manera con

1 vencial.

Además, la sustancia FR-900156 obtenida en la forma libre puede convertirse en las correspondientes sales de la misma con una base o un ácido tal como se ha mencionado antes, de una forma convencional.

Según esto, ha de entenderse que esta invención incluye dentro del marco de la misma la sustancia FR-900156 así como las sales de la misma tal como se han mencionado antes.

10 La sustancia FR-900156 posee las siguientes propiedades físicas y químicas (Los datos siguientes son los del producto obtenido por ejemplo por fermentación (3)):

1) Forma y color:

Polvo blanco

15 2) Naturaleza de la sustancia

Anfótera

3) Reacción del color

Positiva; la reacción con ninhidrina, con permanganato potásico y con ácido sulfúrico

20 Negativa; reacción de Dragendorff y reacción de Ehrlich

4) Solubilidad:

Soluble; agua

Difícilmente soluble; metanol

25 Insoluble; etanol, acetona, acetato de etilo, benceno, hexano, cloroformo

5) P.F.

143° - 148° (desc.)

6) Rotación específica

30

$[\alpha]_D^{25} = -27,1$ (c=0,4 en agua)

- 1 7) Espectro de absorción ultravioleta:
absorción en el final
- 5 8) Espectro de absorción infrarrojo (KBr):
1050, 1130, 1235, 1340, 1400, 1450, 1535,
1660, 1735, 2950, 2980, 3080, 3350 cm^{-1}
- 9) Análisis elemental:
El análisis cualitativo revela que la sustancia FR-900156
contiene los siguientes elementos:
Carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno

10 10) Cromatografía en capa fina:

Fase estacionaria	Disolvente del revelado	Valor del Rf
Lámina de celulosa Eastman ¹	BuOH, ácido acético, agua (4:1:2)	0,35
Lámina de gel de sílice Merck ²	i-propanol-agua 60%	0,65

15

Nota: ¹: marca registrada, de Eastman Kodak Co.

²: marca registrada, de Merck & Co.

- 20 11) Peso molecular:
Espectrometría de masas (método de desorción de campo)
M=519 (pico base: M+1=520)
- 12) Espectro de absorción de resonancia magnética nuclear:
Como se muestra en la Figura del diseño adjunto.
(Disolvente: D₂O, Referencia: TMSP)

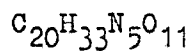
25 13) Análisis de aminoácidos:

	<u>Relación molar</u>
Glicina	1,00
Acido glutámico	1,06
Alanina	1,04
Acido α , ϵ -diaminopimélico	1,03

30

1 (la relación molar se expresa considerando glicina =
1,00)

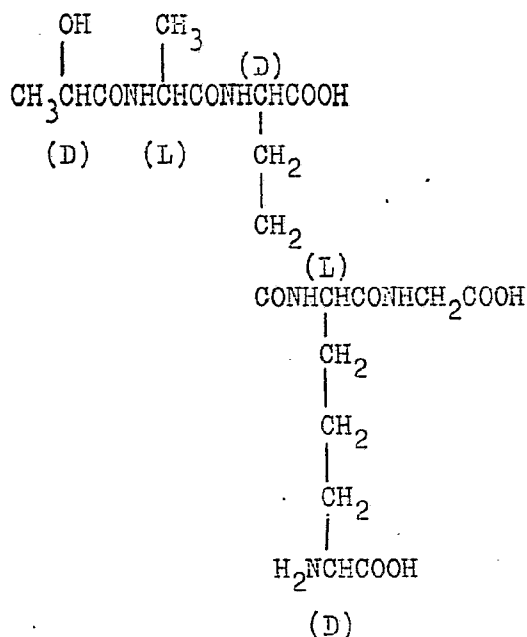
14) Fórmula molecular:



5 Además se miden las propiedades físicas y químicas de la muestra más purificada de la sustancia FR-900156 (es decir un producto obtenido por Ejemplo por fermentación (4)), como resultado de lo cual el P.F. de dicha muestra es 147 - 153°C (desc.) y otras propiedades de la misma son iguales a las anteriores.

10 Del análisis de las anteriores propiedades físicoquímicas y de la posterior investigación para dilucidar la estructura química, se ha llegado a que la estructura química de la sustancia FR-900156 es como sigue:

15



20

25

(D-Lactil-1-alanil-γ-D-glutamil-(L)-meso-diaminopimelil(L)-glicina)

30

PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LA SUSTANCIA FR-900156

1 La sustancia FR-900156 y sus sales farmacéuti-
camente aceptables de esta invención han demostrado poseer
5 actividades potenciadoras de la respuesta inmune (es decir
actividades potenciadoras de la inmunidad celular y de la
producción humoral de anticuerpos) y sistema reticuloendoté-
rico, actividad potenciadora de la corriente del carbono en
sangre, actividad nitrogenada, actividad inductora de interfe-
ron, eficacia protectora en infección experimental y activi-
dad anticancerosa.

10 Según esto la sustancia FR-900156 y sus sales
farmacéuticamente aceptables son útiles para el tratamiento
terapéutico de las enfermedades infecciosas causadas por
microorganismos patógenos, especialmente bacterias gram-ne-
15 gativas y bacterias gram-positivas y hongos, y del cáncer en
seres humanos y animales.

Con propósito de mostrar la utilidad farmacéuti-
ca de la sustancia FR-900156, se dan los datos de ensayo
farmacológico a continuación.

20 1. ACTIVIDADES POTENCIADORAS DE LA INMUNIDAD CE-
LULAR Y PRODUCCION HUMORAL DE ANTICUERPOS.

A cobayas (grupos de cinco) se les da 0,1 ml de
emulsión FIA (Coadyuvante Incompleto de Freund) que contiene
500 µg de ovalbúmina en ambas plantas de las patas posterio-
res. Los grupos control reciben antígeno en FIA solamente
25 mientras que los grupos de ensayo reciben el antígeno con
sustancia FR-900156 en FIA. Los animales se examinan en un
ensayo de piel a los 14 días y se sangran a los 16 días.

Los resultados son tales como se muestran en la
30 tabla 1.

TABLA 1

Dosis (µg/lado)	Reacciones ¹	Inmunidad humoral	
	de inmunidad celular (mm diámetro, M ¹ S.E.)	Título de hemaglutinación (M ¹ S.E.) (log ₂) ²	Título de hemo lisina (M ¹ S.E.) (log ₂) ²
0	0	9,1 ± 0,19	4,5 ± 0,45
0,1	8,2 ± 2,8 ³	9,9 ± 0,10 ³	6,4 ± 0,76
1	14,5 ± 2,1 ³	11,5 ± 0,61 ³	7,7 ± 0,64 ³
10	11,0 ± 1,3 ³	12,2 ± 0,56 ³	7,1 ± 0,58 ³
100	4,2 ± 1,7 ³	10,0 ± 1,01	5,9 ± 0,89

Nota: ¹ : El ensayo de piel se realiza sobre la parte trasera por inyección intradérmica de 5 µg de antígeno disueltos en 0,1 ml de solución salina. La reacción de la piel en el lado del ensayo se mide a las 48 horas.

² : El cálculo de anticuerpos se lleva a cabo como sigue:

Se hace una preparación de células de sangre roja de oveja recubiertas de ovalbúmina con cloruro de cromo. El índice de anticuerpo se expresa como el inverso de la dilución más alta de suero que provoca un umbral de hemoaglutinación y hemolisina.

Los resultados se convierten a unidades log₂.

³ : La significación se calcula por el ensayo t de Student's; p < 0,05.

2. ACTIVIDADES NITROGENAS PARA CELULAS DE BAZO DE RATON

(Materiales y Métodos)

(1) Animal :

1

Los ratones utilizados para este experimento son ratones macho estirpe BALB/C, de 13 semanas de edad (Ensayo 1) o estirpe BALB/C hembras, de 9 semanas de edad (Ensayo 2).

5

(2) Medio de cultivo tisular :

El medio de cultivo tisular empleado es un medio completo designado como (RPMI)-1640 de Roswell Park Memorial Institute. Todos los medios empleados contienen 100 unidades/ml de penicilina G y 100 µg/ml de sulfato de estreptomina y 10% de suero de ternera fetal.

10

(3) Preparación de células :

Se separan los bazos en condiciones estériles, se lavan con solución de Hanks y después se trituran en el medio de cultivo tisular. Se suspenden las células en el medio de cultivo tisular hasta contener 8×10^6 células/ml.

15

(4) Condiciones de cultivo :

En cada orificio de la placa de cultivo tisular Microtest II (orificio 8 x 12) (fabricante: Falcon Plastics Co.) se vierten 0,1 ml de la suspensión de células anterior y 0,1 ml del concentrado prescrito del compuesto de ensayo como se describe abajo y después se incuban los cultivos por triplicado a 37°C en atmósfera humedecida (aire 95%, CO₂ 5%) durante 48 horas.

20

El cultivo de control contiene 0,1 ml del medio de cultivo en lugar del medio que contiene el compuesto de ensayo.

25

30

(5) [3H] Admisión de Timidina :

1
5
10
15
20
25
30

En todos los ensayos se añaden 20 µl de 10 micro-cur (µ Ci)/ml de timidina tritiada (3H-timidina) a cada orificio durante las 24 horas finales del cultivo. Después de que el cultivo se ha completado se filtran las células resultantes con un papel de filtro, Whatman GF83, y se lavan sucesivamente con solución salina y con ácido tricloroacético al 5%. Se seca el papel de filtro y se coloca en un medio de centelleo (1l de tolueno que contiene 0,1g del p-bis[5-feniloxazol]benceno y 4g de 2,5-difeniloxazoilo), y se mide la 3H-timidina incorporada al DNA.

(6) Índice de estimulación :

$$\text{Índice de estimulación} = \frac{\text{admisión de 3H-timidina (cpm netos) en el tratamiento}}{\text{Admisión de 3H-timidina (cpm netos) en el control}}$$

(7) Compuesto de ensayo :

Sustancia FR-900156

(Resultados)

TABLA 2

	Concentración (µg/ml)	Admisión de 3H-timidina cpm netos: av ± S.E.	Índice de estimulación
Ensayo 1	100	2,028 ± 89	4,9
	10	1,486 ± 120	3,6
	1	835 ± 64	2,0
	0	417 ± 13	1,0
Ensayo 2	100	3,666 ± 42	4,1
	10	3,223 ± 402	3,6
	1	2,741 ± 319	3,0
	0	901 ± 105	1,0

3. EFICACIA PROTECTORA EN LA INFECCION EXPERIMENTAL DE RATONES

Para determinar la eficacia protectora frente a las infecciones experimentales en ratones, la sustancia FR-900156 se disuelve y diluye en agua esteril hasta conseguir concentraciones triples del fármaco de ensayo.

Los ratones macho de la estirpe DDY, de 6 semanas de edad y de un peso medio de 24-26 g se utilizan en grupos de 4 ratones cada grupo.

Los cultivos de toda la noche de Escherichia Coli nº 22 en Difco Nutrient Broth se diluyen a 1/100 en medio reciente y se incuban a 30°C con agitación. Cuando se obtiene la densidad celular de 1×10^8 /ml, se inyecta 0,2 ml del cultivo intraperitonealmente. Todos los animales reciben la oportunidad y los no tratados con el fármaco mueren dentro de las 48 horas de la infección.

Se inyecta subcutáneamente un quinto de ml de la solución de sustancia FR-900156, 1,4.5 y 6 días antes de la infección.

Dos días después de la infección se considera completo el ensayo y se hacen los registros de supervivientes de ese día. Los resultados se muestran en la tabla 3.

TABLA 3

Dosis (mg/ratón/día)	Supervivencia/infectado
0,0,1	10/10
0,003	10/10
0,001	10/10
0,0003	8/10
0,0001	4/10
Control	0/10

1

4. ACTIVIDAD ANTICANCEROSA

Se emplean ratas hembras de estirpe Donru de 6 semanas de edad, en grupos de tres ratas cada una.

5

Se transplanta intraperitonealmente una suspensión de hepatoma ascítico AH 66 en 0,5 ml de solución de Hank, (5×10^4 células/rata). Unos 13 días más tarde todos los animales de control están muertos de ascites. La prolongación del tiempo de supervivencia en comparación con los controles se toma como criterio de eficacia.

10

La terapia se lleva a cabo 5,6,7,8,9 días antes del trasplante del tumor. La sustancia FR-900156 se disuelve y diluye en agua salina esteril para obtener diluciones triples para ensayo y dicha solución salina esteril de la sustancia FR-900156 se da intraperitonealmente a los animales. Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 4.

15

TABLA 4

Dosis (mg/rata/día)	Prolongación de vida (días)		
1,0	14,	>30,	>30
0,3	13,	>30,	>30.
0,1	13,	>30,	>30
0,03	13,	13,	13
Control (sol.salina)	13,	13,	13

20

25

5. ELIMINACION DE CARBONO EN LA CORRIENTE SANGUINEA

Reactivos :

30

1. Suspensión de carbono. Se diluye tinta de dibujo de rotulador (170 mg carbono/ml) a 1/5 de la concentración original en sol. salina que contiene 1% de gelatina.

1

solución acuosa del fármaco dado. Veinticuatro horas despues se mide la eliminación de carbono en la corriente sanguínea. Se compara el valor K obtenido con los ratones tratados con el de los ratones de control. En la tabla 5 se muestran

5

los resultados del ensayo.

EFFECTO DE DIVERSOS FARMACOS SOBRE LA ELIMINACION DE CARBONO

TABLA 5

10

Fármaco	Dosis (mg/ratón)	$K_{\text{tratado}}/K_{\text{control}}$
Krestin	10	1,1
	1	1,0
Levamisol	10	- (muerto)
	1	0,5
Tuftsín	400	1,4
	125	1,0
Sustancia FR-900156	0,25	2,9
	0,06	1,5
Control (sol.salina)		1,0

15

6. ACTIVIDAD INDUCTORA DE INTERFERON

20

En estos experimentos se utilizan ratones machos de estirpe ICR de 4 a 6 semanas de edad. Se separan los bazo de estos ratones y se ensaya la capacidad de las células del bazo para producir interferon in vitro por el tratamiento con sustancia FR-900156.

25

Se preparan suspensiones de células del bazo aislado en medio RPMI-1640 suplementado con estreptomycin (100 γ /ml), penicilina G (100 γ /ml), 1% de glutamina y 2-mercaptoetanol (5×10^{-5} M).

30

Estas se cultivan a 37°C a una concentración de 4×10^7 células/ml con o sin sustancia FR-900156 disuelta

1 con un medio de cultivo (dosis: 100, 10, 1 µg/ml). Después
de 24 horas, se recogen los sobrenadantes de estos cultivos
y se valoran las actividades de interferon por ensayo de in-
hibición del efecto citopático (CPE) en el sistema L célula-
5 VSV. El título antivirásico se expresa en IU/ml sobre la ba-
se de interferon patrón.

Los resultados se dan en la siguiente tabla 6.

TABLA 6

10

Dosis (µg/ml)	Título IF (IU/ml)
100	14
10	16
1	10
0	<6,5

15 7. TOXICIDAD AGUDA EN RATONES

1 g/kg (i.v.) : sin toxicidad

8. TOXICIDAD CELULAR (célula L ratón)

500 µg/ml : sin efecto tóxico

20 Para la administración terapéutica, la sustan-
cia FR-900156 y sus sales farmacéuticamente aceptables de
esta invención se pueden formular por administración por
cualquier vía convencional, por ejemplo, en forma de compo-
sición farmacéutica que comprende una sustancia activa de
esta invención en mezcla con un vehículo no tóxico farmaceú-
25 ticamente aceptable.

30 Una sal farmacéuticamente aceptable de la sus-
tancia FR-900156 puede incluir una sal con una base inorgá-
nica u orgánica tal como una sal de sodio, sal de potasio,
sal de calcio, sal de amonio, sal de etanolamina, sal de

1 trietilamina, sal de dicitclohexilamina y similares, y una
sal de adición de ácido con un ácido orgánico o inorgánico
tal como sal de ácido fórmico, sal de ácido acético, sal de
ácido p-toluensulfónico, sal de ácido cítrico, sal de ácido
5 tartárico, sal de ácido clorhídrico, sal de ácido sulfúrico,
sal de ácido fosfórico y similares.

La composición farmacéutica de esta invención
puede emplearse en la forma de una preparación farmacéutica,
por ej. en forma sólida, semisólida o líquida, que contiene
10 una sustancia activa de esta invención en mezcla con un vehí-
culo orgánico o inorgánico o con un excipiente adecuado para
aplicaciones externas entéricas o parenterales. Este ingre-
diente activo puede combinarse, por ejemplo, con los vehícu-
los usuales no tóxicos farmacéuticamente aceptables para ta-
15 bletas, píldoras, cápsulas, supositorios, soluciones, emul-
siones, suspensiones, y cualquier otra forma adecuada para
su uso. Los vehículos que pueden utilizarse son agua, glu-
cosa, lactosa, goma de acacia, gelatina, manita, pasta de al-
midón, trisilicato magnésico, talco, almidón de maiz, quera-
20 tina, sílice coloidal, almidón de patata, urea y otros vehí-
culos adecuados para su empleo en la fabricación de prepa-
raciones en forma sólida, semisólida o líquida, y además
se pueden utilizar agentes auxiliares, estabilizadores, es-
pesantes, y colorantes así como perfumes. Las composiciones
25 farmacéuticas pueden asimismo contener agentes preservantes
y bacteriostáticos para mantener al ingrediente activo en
las preparaciones deseadas estable en su actividad. El com-
puesto objeto activo se incluye en la composición farmacéu-
tica en una cantidad suficiente para producir el deseado
30 efecto terapéutico sobre el proceso o estado de las enferme

1 dades.

Al aplicar esta composición a seres humanos es preferible aplicarla por administración intravenosa, intramuscular u oral. Mientras que la dosificación o cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto objeto de esta invención varía y depende también de la edad y estado de cada pa-
5 ciente individual que va ser tratado, generalmente se da una dosis diaria de aproximadamente 2-100 mg de ingrediente ac-
10 tivo/kg de la persona o animal para el tratamiento de las enfermedades, y por lo general se administra una dosis única media de aproximadamente 50 mg, 100 mg, 250 mg y 500 mg.

Los siguientes ejemplos se dan con el propósito de ilustrar la presente invención:

Ejemplo: Para fermentación:

15 (1) Se prepara un medio vegetativo 1 (pH 7,0) a partir de los siguientes ingredientes:

Medio vegetativo 1

20	Almidón soluble	2% en peso
	Harina de gluten	1% en peso
	Levadura seca	1% en peso
	Licor de maceración de maíz	1% en peso
	Agua del grifo	c.s.

Se esterilizan 100 ml del medio 1 en cada uno de los diez matraces de 500 ml de manera convencional y se
25 inoculan despues con un cultivo en forma de lazos de una placa sesgada de material de Streptomyces olivaceogriseus ATCC 31427. Se hacen crecer los organismos en el medio a 30°C durante 48 horas sobre un sacudidor.

30 En un fermentador Jar de 30 l, se colocan 20 li-

1 tros del medio vegetativo 2 preparado a partir de los siguientes ingredientes:

Medio vegetativo 2

	Almidón soluble	2% en peso
5	Harina de algodón	0,5% en peso
	Harina de gluten	0,5% en peso
	Levadura seca	0,5% en peso
	Licor de maceración de maiz	0,5% en peso
10	Agua del grifo	c.s.

El medio vegetativo 2 (pH 7,0) se esteriliza de una manera convencional y despues se inocula asepticamente con el volumen completo del cultivo del inóculo vegetativo preparado antes. El organismo se hace crecer en el medio 2 a 30°C durante 24 horas.

15 Se inocula asepticamente el volumen total del inóculo vegetativo así preparado en un fermentador de 2000 litros, que contiene 1600 litros del medio de fermentación preparado a partir de los siguientes ingredientes:

20 Medio de fermentación

	Almidón soluble	2% en peso
	Harina de semilla de algodón	0,5% en peso
	Germen de trigo	0,5% en peso
	Levadura seca	0,25% en peso
25	Licor de maceración de maiz	0,25% en peso
	KH_2PO_4	0,5% en peso
	$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	0,5% en peso
	$CoCl_2 \cdot 6 H_2O$	1,25 mg/l
30	Agua del grifo	c.s.

1 Se cultiva el organismo en el medio de fermenta
ción durante 72 horas a 30°C. Durante el periodo de creci-
miento, se agita el caldo con una hélice que trabaja a
5 170 r.p.m. y se pasa aire esteril a través del caldo a una
velocidad de 1600 litros por minuto.

Despues de haberse completado la fermentación,
se añaden 20 kg de "Radiolite" (nombre registrado de un ma-
terial auxiliar de filtrado de Showa Chemical Company, Ja-
pón) al caldo de cultivo y se filtra la mezcla para separar
10 los micelios. Se pasan 1600 litros de filtrado a través de
una columna de carbón activado (800 litros) y despues se la-
va con 1600 litros de agua. La elución se lleva a cabo con
3000 litros de acetona acuosa al 50% y despues se concentra
el eluato hasta un volumen de aproximadamente 600 litros.

15 Se pasa el concentrado a través de una columna
de DEAE-Sephadex (nombre comercial, fabricado por Pharmacia
A.B.) (200 litros) que previamente se ha tamponado con tam-
pón fosfato (pH 6,0). La columna se lava sucesivamente con
20 200 litros de agua y 200 litros de solución de cloruro sódico
0,1 M y despues se eluye con 400 litros de solución de
cloruro sódico 0,3 M. El eluato acuoso se pasa a través de
una columna de un carbón activado (200 l), se lava con 200
litros de agua y se eluye despues con 400 litros de acetona
acuosa al 50%. Se concentra el eluato y despues se seca por
25 congelación para dar 800 g de un polvo blanco. El polvo se
disuelve en 25 litros de agua y la solución se pasa a tra-
vés de una columna de CM-Sephadex (forma H⁺) (25 l). Se elu-
ye la columna con 25 litros de agua y el eluato se concen-
tra y despues se seca por congelación para dar 35 g de polvo
30 blanco amarillento. El polvo se coloca en la parte superior

1 de una columna de celulosa (1,2 l). La columna se lava con
1000 ml de propanol acuoso al 70% y despues se eluye con 1000
ml de propanol acuoso al 60%. Se concentra el eluato y se se
ca por congelación para dar 4g de polvo blanco. El polvo se
5 disuelve en 150 ml de agua y la solución se somete despues a
cromatografía sobre columna sobre Sephadex G-15 (2,8 l).

La columna se revela y eluye con agua. Las frac-
ciones activas se recogen y concentran y despues se secan
por congelación para dar 4 g de un polvo blanco. El polvo se
10 disuelve en 25 ml de agua y la solución se somete a cromato-
grafía sobre columna sobre CM-Sephadex (forma H⁺) (400 ml).
La columna se revela y eluye con agua. Las fracciones acti-
vas se recogen, se concentran y se secan por congelación
para dar 40 mg de la sustancia FR-900156 en la forma de pol-
vos blancos (pureza: aproximadamente 70%).

15 (2) La fermentación se lleva a cabo de la misma ma-
nera que la descrita en el Ejemplo (1). Despues de completar
se la fermentación se añaden 20 kg de "Radiolite" (nombre
registrado, un material filtrante vendido por Showa Chemical
20 Company) al caldo de cultivo y se filtra la mezcla para se-
parar los micelios. Se pasan 1600 litros del filtrado a tra-
vés de una columna de carbón activado (800 litros) y des-
pues se lava con 1600 litros de agua. La elución se lleva a
cabo con 3000 litros de acetona acuosa al 50% y despues se
25 concentra el aluato hasta un volumen de aproximadamente 600
litros. Se pasa el concentrado a través de una columna de
DEAE-Sephadex (marca registrada, fabricado por Pharmacia
A.B.) (200 litros) que han sido previamente tamponados con
tampón fosfato (pH 6,0). La columna se lava sucesivamente
30 con 200 litros de agua y 200 litros de solución de cloruro

1 sódico 0,1 M y despues se eluye con 400 litros de solución
de cloruro sódico 0,3 M. El eluato acuoso se pasa a través
de una columna de carbón activado (200 litros) se lava con
5 200 litros de agua y despues se eluye con 400 litros de ace-
tona acuosa al 50%. Se concentra el eluato y despues se seca
por congelación para dar 800 g de polvo blanco. El polvo se
disuelve en 25 litros de agua y la solución se pasa a través
de una columna de CM-Sephadex (forma H^+) (25 litros). La co-
10 lumna se eluye con 25 litros de agua y el eluato se concen-
tra y despues se seca por congelación para dar 33 g de pol-
vos blanco amarillento. Los polvos se colocan en la parte su-
perior de una columna de celulosa (1,2 litros). La columna
se lava con 1000 ml de propanol acuoso al 70% y despues se
eluye con 1000 ml de propanol acuoso al 60%. Se concentra el
15 eluato y se seca por congelación para dar 4 g de polvo blan-
co. Se disuelve el polvo en 300 ml de agua y despues se pa-
sa a través de una columna de DEAE-Sephadex (nombre comer-
cial, fabricado por Pharmacia A.B.) (1,4 litros) que ha sido
previamente tamponado con tampón fosfato (pH 6,0). La colum-
20 na se lava con 1,5 litros de solución de cloruro sódico 0,1M
y despues se eluye con 3 litros de solución de cloruro sódico
0,2 M. Se recogen las fracciones activas y se pasan des-
pues a través de una columna de carbón activado (300 ml).
La columna se lava con agua y despues se eluye con 800 ml de
25 acetona acuosa al 50%. Se concentra el eluato y despues se
seca por congelación para dar 700 mg de polvos blancos. Los
polvos se disuelven en 20 ml de agua y despues se pasan a
través de una columna de CM-Sephadex (forma H^+) (500 ml). Se
eluye la columna con agua y las fracciones activas se reco-
30 gen y despues se concentran para dar 10 ml de concentrado.

1 El concentrado se somete a cromatografía en columna sobre
Sephadex G 15 (500 ml) y se revela con agua. Las fracciones
activas se recogen y concentran y despues se secan por conge-
5 lación para dar 70 mg de polvos blancos. Los polvos se di-
suelven en 25 ml de agua y se someten a cromatografía en ca-
pa fina preparativa sobre celulosa (fabricada por Eastman
Kodak Co.): un disolvente de revelado es una mezcla de buta-
nol, ácido acético y agua (4:1:2). La elución se lleva a ca-
bo con 50 ml de agua y el aluato se concentra y despues se
10 seca por congelación para dar 20 mg de sustancia FR-900156
en la forma de un polvo blanco.

(3) La fermentación se lleva a cabo de la misma ma-
nera que la descrita en el Ejemplo (1). Después de comple-
tarse la fermentación, se añaden 20 kg de "Radiolite" (nom-
15 bre registrado, material filtrante vendido por Showa Chemi-
cal Company) al caldo de cultivo y se filtra la mezcla para
separar los micelios. Se pasan 1600 litros del filtrado a
través de una columna de carbón activado (800 litros) y des-
pues se lava con 1600 litros de agua. La elución se lleva a
20 cabo con 3000 litros de acetona acuosa al 50% y despues se
concentra el eluato a un volumen de aproximadamente 600 li-
tros. El concentrado se pasa a través de una columna de
DEAE-Sephadex (nombre registrado, fabricado por Pharmacia
A.B.) (200 litros) que previamente se ha tamponado con tam-
pón fosfato (pH 6,0). La columna se lava sucesivamente con
25 200 litros de agua y 200 litros de solución de cloruro só-
dico 0,1 M y despues se eluye con 400 litros de solución de
cloruro sódico 0,3 M. Se pasa el eluato acuoso a través de
una columna de carbono activado (200 litros), se lava con
30 200 litros de agua y despues se eluye con 400 litros de ace-

1 tona acuosa al 50%. Se concentra el eluato y despues se seca
por congelación para dar 800 g de polvo blanco. El polvo se
disuelve en 25 litros de agua y la solución se pasa a través
5 de una columna de CM-Sephadex (forma H^+) (25 litros). La co-
lumna se eluye con 25 litros de agua y el eluato se concen-
tra y despues se seca por congelación para dar 33 g de un
polvo blanco amarillento. Se coloca el polvo en la parte su-
perior de una columna de celulosa (1,2 litros). La columna
se lava con 1000 ml de propanol acuoso al 70% y despues se
10 eluye con 1000 ml de propanol acuoso al 60%. El eluato se
concentra y se seca por congelación para dar 4 g de polvo
blanco. Se disuelve el polvo en 300 ml de agua y despues se
hace pasar a través de una columna de DEAE-Sephadex (nombre
registrado, fabricado por Pharmacia A.B.) (1,4 litros) que
15 previamente ha sido tamponado con tampón de fosfato (pH 6,0).
Se lava la columna con 1,5 litros de solución de cloruro só-
dico 0,1 M y despues se eluye con 300 litros de solución de
cloruro sódico 0,2 M. Se recogen las fracciones activas y des-
pues se pasan a través de una columna de carbón activado
20 (300 ml). La columna se lava con agua y despues el eluato
con 800 ml de acetona acuosa al 50%. Se concentra el eluato
y despues se seca por congelación para dar 700 mg de polvos
blancos. Se disuelven los polvos en 20 ml de agua y despues
se hacen pasar a través de una columna de CM-Sephadex (for-
25 ma H^+) (500 ml). Se eluye la columna con agua y se recogen
las fracciones activas y despues se concentran para dar 10
ml de concentrado. El concentrado se seca por congelación
para dar 400 mg de un polvo. Se coloca el polvo sobre la
parte superior de una columna de celulosa (500 ml). La elu-
30 ción se lleva a cabo con una mezcla de n-butanol, ácido acé

1 tico y agua (4:1:2). Se recogen las fracciones activas y se
secan por congelación para dar 200 mg de un polvo. Se di-
suelve el polvo en 7 ml de agua y despues se coloca sobre
Sephadex G 15 (250 ml) . Se recogen las fracciones activas,
5 se concentran y despues se secan por congelación para dar
100 mg de la sustancia FR-900156 en forma de polvo blanco.

(4) Un polvo blanco de sustancia FR-900156 obtenido
según el Ejemplo (3) se purifica despues realizando repeti-
damente los anteriores métodos de purificación para dar un
10 producto más puro de sustancia FR-900156.

(5) Se vierten 100 ml de un medio que contiene almi-
dón de maiz 2% (en peso), harina de gluten 1%, levadura se-
ca 1% y licor de maceración de maiz 1% en cada uno de diez
matraces de 500 ml y se esterilizan de manera convencional
15 y despues se inoculan con una forma enlazada de cultivo a
partir de una placa sesgada de material de Streptomyces vio-
laceus ATCC 31481.

El organismo se hace crecer en el medio a 30°C
durante 48 horas sobre un sacudidor.

20 En un fermentador Jar de 30 litros se colocan
20 litros del mismo medio como antes. El medio se esteriliza
de una manera convencional y despues se inocula asepticamen-
te con el volumen total del cultivo de inóculo preparado an-
tes. Se hace crecer el organismo en el medio a 30°C durante
25 30 horas.

El volumen total del inóculo así preparado se
inocula asepticamente en un fermentador de 400 litros, que
contiene 320 litros del medio (pH 6,5) que contiene almidón
soluble 2% (en peso), harina de gluten 1%, harina de semi-
30 llas de algodón 1% y sulfato sódico (10 hidratado) 2%.

1 El organismo se cultiva en el medio a 30°C duran
te 72 horas. Durante el periodo de crecimiento se agita el
caldo con una hélice que trabaja a 170 r.p.m. y se hace pa-
5 sar aire estéril a través del caldo a una velocidad de 320
litros por minuto. Después de haberse completado la fermen-
tación, se añaden 4 kg de "Radiolite" al caldo de cultivo y
se filtra la mezcla para separar los micelios. Se hacen pa-
sar 300 litros del filtrado a través de una columna de car-
bón activado (150 litros) y después se lava con 300 litros
10 de agua. La elución se lleva a cabo con 600 litros de aceto-
na acuosa al 50% y después el eluato se concentra a un volu-
men de aproximadamente 120 litros.

Se hace pasar el concentrado a través de una co-
luna de DEAE-Sephadex (30 litros) que se ha tamponado pre-
15 viamente con tampón fosfato (pH 6,0). La columna se lava su-
cesivamente con 30 litros de agua y 30 litros de cloruro só-
dico 0,1 M y después se eluye con cloruro de sodio 0,3 M.
El eluato (60 litros) se hace pasar a través de una columna
de un carbón activado (30 litros), se lava con 60 litros de
20 agua y se eluye después con 60 litros de acetona acuosa al
50%. El eluato se seca por congelación para dar 120 g de un
polvo blanco. Se disuelve el polvo en 4 litros de agua y la
solución se pasa a través de una columna de CM-Sephadex (for-
ma H⁺) (14 litros). Se eluye la columna con agua y el eluato
25 se concentra y después se seca por congelación para dar 20 g
de un polvo. El polvo se coloca en la parte superior de la
columna de celulosa. La elución se lleva a cabo con propanol
acuoso y las fracciones activas se recogen y secan por conse-
lación para dar 5 g de un polvo. El polvo se disuelve en 500
30 ml de agua y la solución se pasa a través de una columna de

1 DEAE-Sephadex (1,3 litros) que previamente ha sido tamponada con tampón fosfato (pH 6). La columna se lava con cloruro
5 sódico 0,1 M y se eluye con cloruro sódico 0,2 M. Las fracciones activas se recogen y se hacen pasar a través de una columna de un carbón activado (900 ml). Se lava la columna con agua y se eluye con acetona acuosa al 50% (200 ml). Se concentra el eluato y se seca por congelación para dar 1 g de un polvo.

10 Se disuelve el polvo en 300 ml de agua y la solución se hace pasar a través de una columna de CM-Sephadex (forma H⁺) (250 ml). La columna se revela y eluye con agua. Las fracciones activas se recogen, se concentran y después se secan por congelación para dar 800 mg de un polvo. El
15 polvo se disuelve en 20 ml de agua y la solución se mezcla con una pequeña cantidad de celulosa. Se somete la mezcla a cromatografía en columna sobre celulosa. Se lava sucesivamente la columna con 100 ml de acetona y 300 ml de mezcla de
20 n-butanol: ácido acético:agua (4:1:1) y después se revela y eluye con una mezcla de n-butanol:ácido acético:agua (4:1:2) (1 litro). Se recogen las fracciones activas y se secan por congelación para dar 30 mg de un polvo. Se disuelve el polvo en 20 ml de agua y se hace pasar la solución a través de una
25 columna de Sephadex G 15 (250 ml). Se revela y eluye con agua la columna y las fracciones activas se recogen y se secan por congelación para dar 5 mg de sustancia FR-900156.

Ejemplo : para la composición farmacéutica:

(1) Preparación para inyección

30 Las cantidades requeridas de sustancia FR-900156 se distribuyen en viales, conteniendo cada uno de los cuales 500 mg de ingrediente activo. Los viales se cierran herméticamente.

1 camente para evitar las bacterias. Cuando se necesita usar un vial, se añade 2 ml de agua destilada estéril para inyección al vial y despues se administra la solución acuosa por inyección.

5 (2) Preparación de tabletas
Una formulación adecuada para una tableta consiste en la siguiente mezcla

Sustancia FR-900156	200 mg
Manita	400 mg
Almidón	50 mg
Estearato magnésico	10 mg

10

(3) Preparación de una cápsula
Sustancia FR-900156 300 mg
Estearato magnésico 15 mg

15

Los ingredientes anteriores se mezclan y se insertan en una cápsula de gelatina dura, de una manera convencional.

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

20

REIVINDICACIONES

25

1. Un procedimiento para la producción de sustancia FR-900156 que comprende el cultivo bajo condiciones aerobias de una estirpe productora de sustancia FR-900156 que pertenece al género Streptomyces en un medio de cultivo que contiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y sal inorgánica.

30
Handwritten signature/initials

2. Un procedimiento, según la reivindicación 1, donde la estirpe productora de sustancia FR-900156 que pertenece al género Streptomyces es una estirpe seleccionada de Streptomyces olivaceogriseus y Streptomyces violaceus.

1 3. Un procedimiento, según la reivindicación
1, donde la estirpe productora de sustancia FR-900156 que
pertenece al género Streptomyces es una estirpe de Strepto-
myces olivaceogriseus.

5 4. Un procedimiento, según la reivindicación
1, donde la estirpe productora de sustancia FR-900156 que
pertenece al género Streptomyces es una estirpe de Strepto-
myces violaceus.

10 5. Un procedimiento, según la reivindicación
3, en el que la estirpe productora de sustancia FR-900156
pertenece al género Streptomyces es Streptomyces oliva-
ceogriseus ATCC 31427.

15 6. Un procedimiento, según la reivindicación
4, en el que la estirpe productora de sustancia FR-900156
pertenece al género Streptomyces es Streptomyces viola-
ceus ATCC 31481.

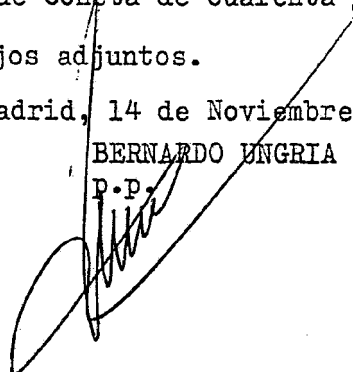
20 7. Se reivindica por último como objeto sobre
el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
" UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE SUSTANCIA FR-900156.

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente memoria descriptiva que consta de cuarenta y una
páginas mecanografiadas y dibujos adjuntos.

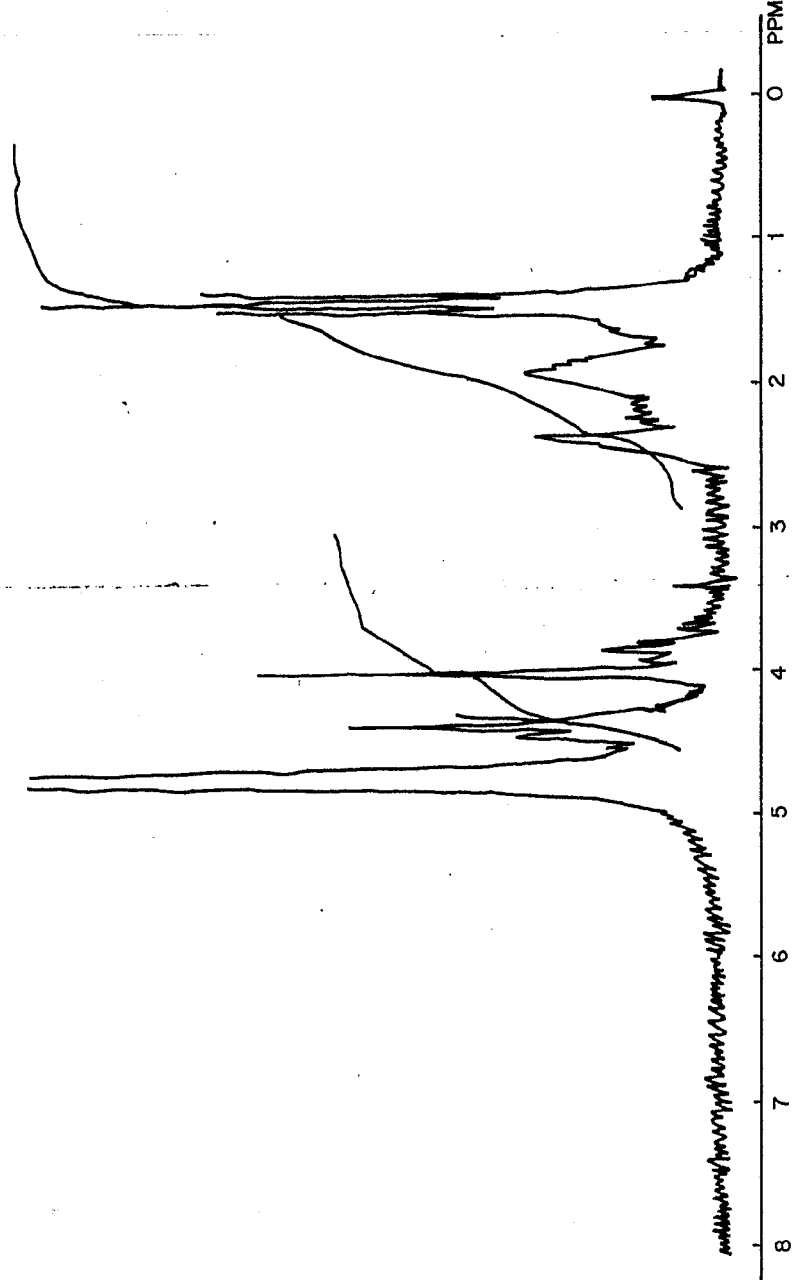
Madrid, 14 de Noviembre 1979

BERNARDO UNGRIA

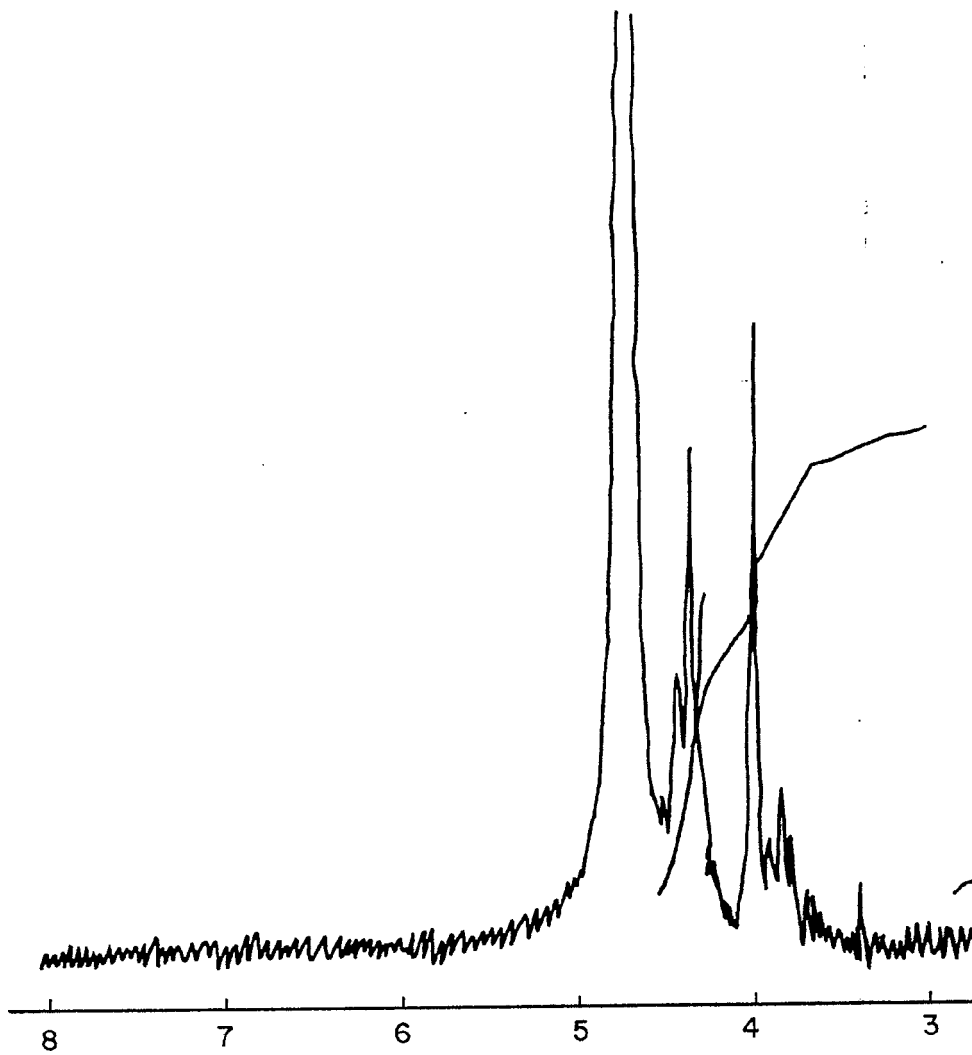
P.P.

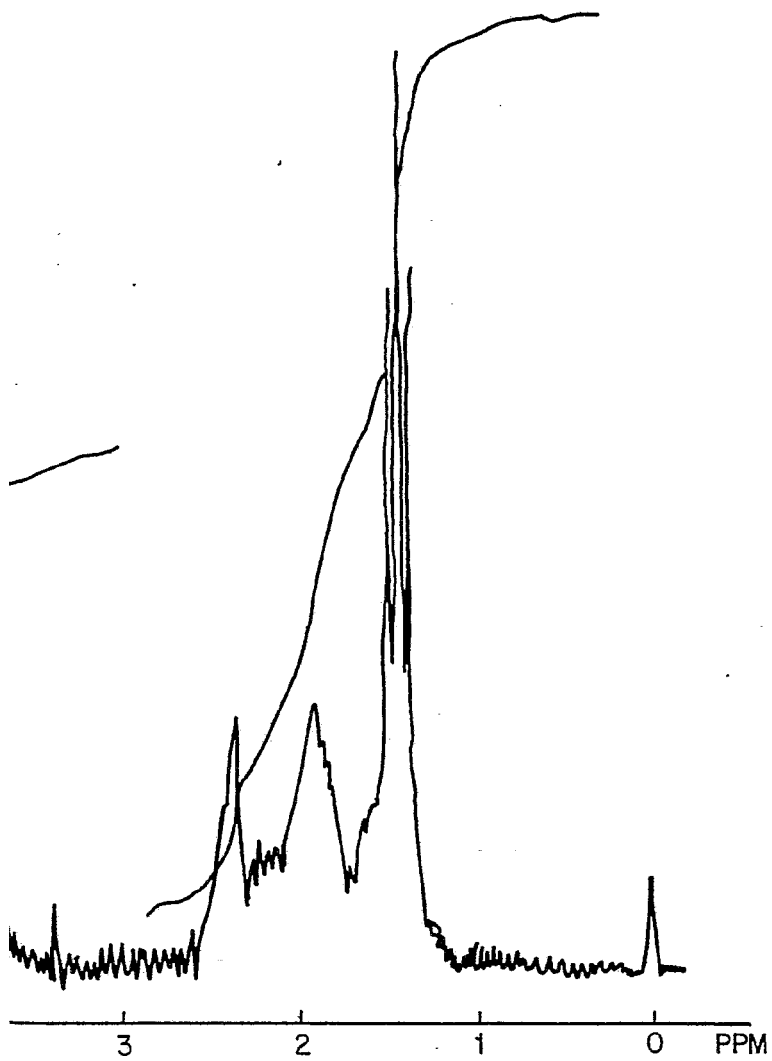


30 



ESCALA VARIABLE
Madrid, 14 de Noviembre de 1979
BERNARDO UNGRIA
P. U.





ESCALA VARIABLE
Madrid, 14 de Noviembre de 1979
BERNARDO UNGRIA

P. P.