



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N.º de publicación: ES 2 038 077
② Número de solicitud: 9102213
⑤ Int. Cl.⁵: C07D 471/04, C12P 17/18
//A61K 31/47 (C07D 471/04
C07D 221:00, C07D 231:00)
(C12P 17/18, C12R 1:625)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **07.10.91**
⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.93**
Fecha de concesión: **20.12.93**
⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **01.02.94**
⑮ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.02.94

⑰ Titular/es: **Universidad de Alcala de Henares
Carretera de Madrid-Barcelona, Km. 33,5
28871 Alcala de Henares, Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Fidalgo García, M. Luz;
Arias Pérez, M. Selma;
Alonso Castellano, José Luis;
Soliveri de Carranza, Juan y
Arias Fernández, M. Enriqueta**

⑲ Agente: **No consta**

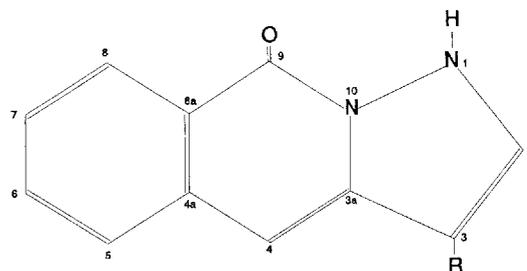
⑳ Título: **Procedimiento de obtención de antibióticos y citostáticos pirazoloisoquinolínicos.**

㉑ Resumen:

Procedimiento de obtención de antibióticos y citostáticos pirazoloisoquinolínicos.

Se describe la producción, en un medio de cultivo líquido, de un grupo de antibióticos y citostáticos por un microorganismo perteneciente al género *Streptovorticillium* (número de registro NCIMB 40447).

Los nuevos compuestos, que se diferencian en que el radical R es un grupo etilo o propilo, presentan un amplio espectro de actividad frente a bacterias gram-positivas, hongos filamentosos y levaduras, así como actividad citostática frente a células tumorales de distinto origen.



Aviso: Se puede realizar la consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Obtención de pirazolo-isoquinolinas con actividad biológica aisladas de cepas de *Streptoverticillium* sp.

5 En la búsqueda de compuestos de estructura química similar a los que se describen en la patente de invención, se han utilizado bases de datos estructurales (EURECAS) y bibliográficas (CAS, PHARM, WPI, WPIL y CIBEPAT). En la bibliografía consultada no se han encontrado descripciones relativas a pirazolo-isoquinolinas de fórmula idéntica a los compuestos objeto de esta invención.

10 Se han encontrado algunos documentos que hacen referencia a pirazolo-isoquinolinas con condensación en a (ES442864, ES416971, J52151320, BE801668, DE3804421, EP215445), en c (US4113731, FR2595096, EP5745) y en g (EP375210). No se ha encontrado ninguna referencia relativa a pirazolo-isoquinolinas con condensación en b. Es de destacar que todos los compuestos a que hacen referencia las patentes citadas, han sido obtenidos por síntesis química y no se ha descrito en ninguno de ellos actividad antitumoral.

De los compuestos descritos producidos por *Streptoverticillium*, aunque algunos presentan actividad antitumoral, ninguno de ellos responde a la estructura pirazolo-isoquinolina de la presente invención.

20 La presente invención se refiere a compuestos orgánicos producidos por una cepa de *Streptoverticillium* (NCIMB 40447) cuyo cultivo se realiza por procedimientos convencionales.

Los compuestos, que en lo sucesivo se denominarán APHE-1 y APHE-2, se pueden obtener tanto a partir del medio de cultivo, como del micelio, purificándose posteriormente.

25 APHE-1 y APHE-2 son producidos por una cepa de *Streptoverticillium* aislada de una muestra de tierra de Perales de Tajuña (Madrid). El microorganismo productor presenta las siguientes características taxonómicas:

30 a) *Características morfológicas*

El microorganismo crece bien y forma un abundante micelio en los medios de cultivo siguientes: Agar-triptona-extracto de levadura (ISP-1), Agar-extracto de malta-extracto de levadura (ISP-2), Agar-avena (ISP-3) y Agar-tirosina (ISP-7).

35 En observaciones realizadas mediante microscopía óptica de contraste de fases y electrónica de barrido, no se apreciaron septos en el micelio vegetativo. Las cadenas de esporas son de tipo biverticiladas y presentan más de 10 esporas por cadena.

40 Las esporas son de forma cilíndrica, superficie lisa y tienen unas dimensiones de 1.5 x 1.9 nm. No se observan gránulos escleróticos, ni esporangios, ni esporas flageladas.

b) *Características culturales*

45 Se resumen en la tabla I

c) *Características fisiológicas*

Se resumen en la tabla II

50 d) *Utilización de carbohidratos*

Se resumen en la tabla III

55 d) *Temperatura de crecimiento*

El microorganismo crece bien entre 20° y 35°C, y el crecimiento óptimo se obtiene a 28 °C.

60

Tabla I

Medio de cultivo	Crecimiento	Color del micelio aéreo	Color del micelio sustrato
ISP-1	Bueno	Blanco	Amarillo pálido
ISP-2	Bueno	Rosa	Marrón amarillento
ISP-3	Bueno	Rosa	Marrón amarillento
ISP-4	Pobre	Blanco	Amarillo pálido
ISP-5	Moderado	Rosado	Amarillo pálido
ISP-6	Pobre	Gris	Marrón
ISP-7	Bueno	Blanco	Marrón
CC	Moderado	Beige	Marrón
CN	Pobre	Beige	-
PA	Bueno	Rosa	Marrón
EA	Moderado	Blanco	Marrón
BA	Bueno	Blanco	Marrón
NA	Pobre	Blanco	Marrón
NB	Moderado	-	Amarillo pálido
CB	Pobre	-	Beige

Tabla II

Formación de melanina	Negativo
Producción de SH ₂	Negativo
Licuefacción de gelatina	Débilmente positiva
Peptonización de la leche	Positiva
Coagulación de la leche	Negativa
Hidrólisis del almidón	Débilmente positiva
Reducción de nitratos	Negativa
Crecimiento en medio hipersalino 5%	Positivo

Tabla III

Carbohidrato	Crecimiento
D-glucosa	++
D-xilosa	+/-
L-arabinosa	-
L-ramnosa	-
D-fructosa	+
D-galactosa	+/-
Rafinosa	-
D-manitol	-
i-inositol	++
Sacarosa	+

++ = utilización fuertemente positiva

+ = utilización positiva

+/- = utilización dudosa

5 - = no utilización

e) *Composición de la pared celular.*

En la pared celular se detectó la presencia de ácido L -diaminopimérico.

10 En base a las propiedades anteriormente descritas el microorganismo se identificó como perteneciente al género *Streptovercillium* [E.B. Shirling y D. Gottlieb. *International Journal of Systematic Bacteriology* (1966) 16: 313-340; R. Locci, E. Baldacci y B. Petrolini-Baldan. *Microbiología* (1969) 17: 1-60; R. Locci, G.M. Schofield. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 4, pp. 2492-2509. Edita S.T. Williams, M.E. Sharpe and J.G. Holt. Williams and Williams, 1989].

Con objeto de clasificar la cepa de *Streptovercillium* aislada, se aplicó taxonomía numérica, comparándose los resultados obtenidos para esta cepa con los descritos para distintos grupos de especies de *Streptovercillium*. En base a estos datos, la cepa presenta gran similitud con los "Clusters":

20 -*Streptovercillium* griseocarneum

-*Streptovercillium* cinnamoneum

25 -*Streptovercillium* mobaraense

El microorganismo se comparó con las especies citadas y se identificó como *Streptovercillium* griseocarneum. La cepa productora de APHE-1 y APHE-2, denominada *Streptovercillium* griseocarneum AL7791, se diferencia con respecto a la cepa tipo en las características que se muestran en la tabla IV.

30

Tabla IV

Utilización de:	<i>Streptovercillium</i> griseocarneum C.E.C.T 3250	<i>Streptovercillium</i> griseocarneum AL7791
D-ribosa	+	-
Aesculina	-	+
Citrato	+	-
Tween 20	-	+

45

La cepa se ha depositado en The National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited, 23 St Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Scotland, U.K., con el número de registro NCIMB 40447.

50 f) *Obtención de los antibióticos*

El proceso de obtención de APHE-1 y APHE-2 se debe llevar a cabo según un procedimiento tradicional de obtención de antibióticos. El cultivo del microorganismo productor de APHE-1 y APHE-2 se puede realizar en las condiciones empleadas convencionalmente para el cultivo de las especies de actinomicetos, preferiblemente en cultivo líquido, y deseablemente con sacudidas ó agitación y aireación. El medio de cultivo utilizado es completamente convencional y contiene constituyentes tales como los que se utilizan comúnmente en el cultivo de actinomicetos. Generalmente, el medio contiene fuentes de carbono, de nitrógeno y sales inorgánicas. Opcionalmente, se pueden añadir metales traza, precursores y factores de crecimiento.

60 Ejemplos de fuentes de carbono asimilables son glucosa, galactosa, glicerol, almidón, aceite de soja y sacarosa, que pueden añadirse solas ó combinadas entre sí. Ejemplos de fuentes de nitrógeno asimilables son aminoácidos como: valina, arginina, leucina, isoleucina, prolina, treonina, cisteina y alanina, así como

extracto de levadura, extracto de carne, peptona y licor de maceración de maíz, que pueden adicionarse solos ó combinados. Ejemplos de sales inorgánicas que pueden adicionarse al medio son las sales de sodio, potasio, calcio, amonio, sulfatos, fosfatos, cloruros y carbonatos. Ejemplos de metales traza asimilables son el cobalto, manganeso, cobre, zinc y hierro. Cuando el cultivo se realiza en medio líquido, es preferible
5 adicionar al medio un agente antiespumante tal como un aceite vegetal ó un tensioactivo adecuado.

La fermentación se lleva a cabo según métodos convencionales. En esta invención, el cultivo se realiza adecuadamente a un valor de pH comprendido entre 5.5 y 8.5 y a una temperatura entre 20 y 40 °C, preferiblemente entre 27 y 33 °C. El tiempo de incubación depende, de la escala a la que se realice el
10 cultivo, siendo idóneo un valor entre 48 y 106 horas. Sin embargo, este período puede variar, dependiendo de las condiciones y técnicas de cultivo, y pueden ser apropiados períodos más cortos ó más largos, dependiendo de las circunstancias. El tiempo de cultivo correcto se puede estimar fácilmente para cada caso por experimentación de rutina, utilizando una técnica de monitorización adecuada, como la que se describe a continuación.

La producción de APHE-1 y APHE-2 a medida que transcurre el cultivo, se puede monitorizar por una variedad de técnicas de ensayo microbiológicas convencionales para monitorizar la producción de antibióticos y que requieren poca elaboración. Una técnica adecuada puede ser el ensayo de dilución en medio líquido, utilizando por ejemplo caldo nutritivo como medio de cultivo y *Bacillus subtilis* C.E.C.T. 35 ó *Micrococcus luteus* C.E.C.T. 241, por ejemplo, como microorganismos de ensayo.
20

APHE-1 y APHE-2 se liberan al medio de cultivo líquido, y de ahí se pueden obtener separando el micelio, lo que se puede hacer por filtración ó por centrifugación. Después se puede recuperar de la parte líquida, ya sin materia sólida, por técnicas convencionales, pudiendo purificarla posteriormente.
25

APHE-1 y APHE-2 se pueden separar de otros productos que también están presentes en dicha parte líquida por medio de un agente precipitante. Muchos agentes precipitantes pueden ser útiles, siendo especialmente de interés el ácido tánico, el sulfato amónico y la acetona, y el precipitado que se obtiene se puede eliminar de la parte líquida bien por centrifugación ó por filtración.
30

APHE-1 y APHE-2 así obtenidos se pueden purificar posteriormente por diversos procedimientos. Entre estos métodos se pueden incluir las extracciones líquido-líquido, que permiten separar APHE-1 y APHE-2 de sus impurezas por sus diferentes distribuciones en ambos líquidos y las técnicas cromatográficas. Entre estas últimas, se incluyen: cromatografía en columna de adsorción utilizando silicagel (Merck) ó carbón activo (Merck), cromatografía en columna de partición con Sephadex LH-20 (Pharmacia) ó cromatografía de filtración en gel con silicagel (Merck). Estas técnicas de purificación se pueden utilizar solas ó combinadas y, sí es necesario, repetir una ó más veces.
35

Si se desea, APHE-1 y APHE-2 se pueden separar entre sí por cromatografía líquida de alta resolución, por ejemplo con una columna de fase reversa, como la μ Bondapak C₁₈, y un eluyente adecuado.
40

APHE-1 y APHE-2 frecuentemente se localizan también en el micelio del microorganismo presente en el medio de cultivo, y se pueden extraer de él por técnicas convencionales. Entre ellas, se pueden utilizar, por ejemplo, las extracciones con un disolvente orgánico miscible con agua en el que se disuelvan APHE-1 y APHE-2, como puede ser un alcohol de cadena corta ó la acetona, del que se pueden extraer y purificar por la forma previamente descrita para el sobrenadante de cultivo.
45

g) *Propiedades físico-químicas de los productos obtenidos.*

Las propiedades físico-químicas de los antibióticos APHE-1 y APHE-2 de esta invención son las siguientes:
50

Producto APHE-1:

(a) análisis elemental:
55

calculado para: C₁₃H₁₂N₂O.1/2H₂O

(%) C 70.59; H 5.88; N 12.67
60

encontrado (%) C 70.33; H 5.56; N 12.32

(b) peso molecular:

5

el peso molecular, medido por FAB-MS fue de 212 (M^+)

(c) punto de fusión:

10

157 - 159 °C

(d) espectro de absorción ultravioleta (Figura 1):

15

$\mu_{máx.}$ (MeOH)nm 265, 280 y 296

(e) espectro de absorción infrarroja (Figura 2):

20

$\mu_{máx.}$ (KBr) cm^{-1} 3134, 3038, 2938, 1640, 1579, 1451, 1376, 1254, 1190, 1121, 1001, 798, 770, 143.

(f) solubilidad:

25

soluble en metanol, etanol, acetona, acetato de etilo y cloroformo; poco soluble en benceno e insoluble en hexano, éter de petróleo y agua.

30

(g) reacción de color:

reacción con ninhidrina, negativa.

35

(h) aspecto:

polvo amarillento

40

(i) 1H -NMR (300 MHz, en cloroformo deuterado y utilizando tetrametilsilano como patrón interno) (Figura 3):

45

δ_{ppm} (J=Hz) 1.42 (3H,t,J=7.6), 2.90 (2H,q,J=7.6), 7.17 (1H,s), 7.23 (1H,dd,J=1.5,7.1 Hz), 7.31 (1H,dd,J=1.5,7.1 Hz), 7.44 (1H,dd,J=1.5,6.7), 7.53 (1H,d,J=2.6), 7.83 (1H,dd,J=1.5,6.7), 8.53 (1H,s).

(j) ^{13}C -NMR (75 MHz, en cloroformo deuterado y utilizando tetrametilsilano como patrón interno) (Figura 4):

50

δ_{ppm} 11.22(q), 21.61(f), 105.82(s), 111.46(d), 119.36(d), 119.87(d), 120.79(d), 121.53(d), 122.94(d), 124.00(s), 136.14(s), 147.21(s), 163.69(s).

55

(k) cromatografía en capa delgada:

valor de $R_f=0.63$, utilizando cromatofolios de silicagel con indicador de fluorescencia Stratocrom SIF como fase estacionaria, y una mezcla de cloroformo-metanol (97:3) como fase móvil.

60

Producto APHE-2:

(a) análisis elemental:

calculado para $C_{14}H_{14}N_2O \cdot 1/2H_2O$

(%) C 71.49; H 6.38; N 11.91

encontrado (%) C 71.80; H 6.54; N 12.02

(b) peso molecular:

el peso molecular medido por FAB-MS, fue de 226 (M^+)

(c) punto de fusión:

130 - 132 °C

(d) espectro de absorción ultravioleta (Figura 5):

máx. (MeOH) nm 265, 280 y 296 nm

(e) espectro de absorción infrarroja (Figura 6):

$\mu_{máx.}$ (KBr) cm^{-1} 3167, 2930, 1635, 1575, 1452, 1382, 1252, 1121, 1005, 777, 738.

(f) solubilidad:

soluble en metanol, etanol, acetona, acetato de etilo y cloroformo; poco soluble en benceno e insoluble en hexano, éter de petróleo y agua.

(g) reacción de color:

reacción con ninhidrina, negativa

(h) aspecto:

polvo amarillento

(i) 1H -NMR (300 MHz, en cloroformo deuterado y utilizando tetrametilsilano como patrón interno) (Figura 7):

δ ppm 1.05 (3H,t,J=7.4), 1.88 (2H,m), 2.83 (2H,t,J=7.5), 7.17 (1H,s), 7.23 (1H,dd,J=1.5,7.1), 7.31 (1H,dd,J=1.5,7.1), 7.44 (1H,dd,J=1.5,6.7), 7.53 (1H,d,J=2.6), 7.83 (1H,dd,J=1.5,6.7), 7.83 (1H,dd,J=1.5,6.7), 8.60 (1H,s).

(j) ^{13}C -NMR (75 MHz, en cloroformo deuterado y utilizando tetrametilsilano como patrón interno) (Figura 8):

δ ppm 13.70(q), 20.58(t), 30.06(t), 105.99(s), 11.44(d), 119.72(d), 119.92(d), 120.75(d), 121.46(d), 122.90(d), 124.06(s), 136.18(s), 147.00(s), 163.00(s).

(k) cromatografía en capa delgada:

valor de $R_f=0.66$, utilizando cromatofolios de silicagel con marcador de fluorescencia Stratocrom SIF y una mezcla de cloroformo-metanol (97:3) como fase móvil.

En base a las propiedades físico-químicas descritas, APHE-1 y APHE-2 tienen la estructura que se muestra en la figura 9, donde R es un grupo etilo ó propilo, APHE-1 es 3-etil-pirazol(2,3-b)isoquinolin-9(1H)-ona y APHE-2 es 3-propil-pirazol(2,3-b)isoquinolin-9(1H)-ona.

Figura 1: Espectro de absorción ultravioleta de APHE-1

Figura 2: Espectro de absorción infrarroja de APHE-1

Figura 3: $^1\text{H-NMR}$ de APHE-1

Figura 4: $^{13}\text{C-NMR}$ de APHE-1

Figura 5: Espectro de absorción ultravioleta de APHE-2

Figura 6: Espectro de absorción infrarroja de APHE-2

Figura 7: $^1\text{H-NMR}$ de APHE-2

Figura 8: $^{13}\text{C-NMR}$ de APHE-2

Figura 9: Fórmula estructural propuesta para los productos correspondientes a la presente invención.

Ejemplos

A continuación, se exponen ejemplos aplicables a la producción y obtención de los compuestos de esta invención, APHE-1 y APHE-2.

Ejemplo 1

Fermentación de Streptovercillium griseocarneum AL7791.

Se inocularon esporas de *Streptovercillium griseocarneum* AL7791, depositado en la colección NCIMB, en un matraz Erlenmeyer de 500 ml que contiene 100 ml de medio A (dextrosa 2.5 g/l; fosfato monopotásico 2.5 g/l; cloruro sódico 5 g/l; peptona de soja 3 g/l; peptona de caseína 17 g/l y 1000 ml de agua destilada; el pH se ajusta a 7.0 antes de la esterilización), El medio ya inoculado se incubó durante 48 horas en un agitador orbital a 200 rpm y 28 °C. Se inoculan 10 ml del cultivo resultante en cada uno de los diez matraces Erlenmeyer de 1 litro de capacidad, que contienen 400 ml de medio B (glucosa 3 g/l; peptona de soja 20 g/l; extracto de levadura 0.5 g/l; fosfato monopotásico 3 g/l; cloruro sódico 6 g/l; peptona de caseína 17 g/l y 1000 ml de agua destilada; el pH se ajusta a 7.0 antes de la esterilización). Este medio, una vez inoculado, se somete a agitación a 250 rpm y a una temperatura de 28 °C durante 3 a 6 días.

Ejemplo 2

Los 4 litros del medio de cultivo obtenidos según el ejemplo 1, se hicieron pasar a través de papel Whatman N° 1 al objeto de retirar la masa micelial del medio de cultivo. El filtrado resultante se mezcló con ácido tánico al 1%, que posteriormente se retiró junto con el precipitado resultante por centrifugación. El líquido obtenido se concentra a baja presión hasta 400 ml y posteriormente se somete a extracciones sucesivas con cloroformo para eliminar impurezas. Los extractos se concentran hasta dar un residuo marrón de 700 mg. A continuación, estos 700 mg de residuo crudo se adsorbieron a una columna de 300 g de carbón activo, eluyendo las fracciones activas con acetona, que se eliminó a baja presión. Se obtuvieron 300 mg de residuo marrón amarillento que contiene el ingrediente activo, y se disolvieron en un pequeño volumen de metanol, aplicándolo a una columna de 400 ml de Sephadex LH-20 empaquetada en metanol. Las fracciones eluidas que mostraron actividad se juntaron y se llevaron a sequedad en vacío. El residuo resultante (200 mg) se volvió a disolver en una pequeña cantidad de metanol y se pasó a través de una columna de 200 ml de Silicagel, eluyendo con cloruro de metileno-metanol (90:5). Se recogió una fracción activa, que tras concentrar a sequedad, resultó contener 60 mg de residuo amarillo. Finalmente,

este residuo se separó en APHE1 y APHE-2 mediante cromatografía líquida de alta eficacia utilizando una columna de fase reversa μ Bondapak C₁₈ y una fase móvil de acetonitrilo-agua (2:1) con un flujo de 4 ml/minuto. Para detectar los compuestos activos se empleó un detector ultravioleta a 254 nm. Las fracciones eluidas se desecaron a vacío para dar 2.4 mg y 4.8 mg de polvo amarillento de APHE-1 y APHE-2, respectivamente.

Actividad antibiótica

APHE-1 y APHE-2 muestran actividad frente a bacterias grampositivas, hongos filamentosos y levaduras.

Para determinar la actividad, las bacterias gram-positivas se inocularon en 1 ml de medio de caldo nutritivo, y las levaduras y los hongos filamentosos en 1 ml de un medio líquido de Sabouraud, determinándose la concentración mínima inhibitoria (CMI, μ g/ml) de APHE-1 y APHE-2 por el método de las diluciones sucesivas. La temperatura de incubación fue de 37 °C para las bacterias y de 28 °C para las levaduras y los hongos filamentosos. En la tabla V se muestran los resultados obtenidos.

Tabla V

Microorganismo test	CMI (μ g/ml)	
	APHE-1	APHE-2
Bacillus subtilis	125	50
Staphylococcus epidermidis (MLS)	125	50
Micrococcus luteus	62	37
Escherichia coli resistente al ácido nalidíxico	-	-
Enterobacter aerogenes	-	-
Shigella flexnerii	-	-
Klebsiella pneumoniae	-	-
Penicillium oxalicum	-	-
Fusarium culmorum	37	37
Cunninghamella echinulata	25	25
Aspergillus niger	-	-
Candida utilis	37	37

Actividad Citostática

Los productos APHE-1 y APHE-2 han sido ensayados in vitro sobre una amplia variedad de líneas celulares transformadas procedentes de distintos orígenes, determinándose su carácter citostático y citolítico.

A partir de los resultados experimentales, se han calculado los índices CT-ID50 y CL-ID50 los cuales han sido definidos, respectivamente, como aquellas concentraciones de los productos capaces de inhibir el 50% del crecimiento celular o de dañar letalmente a la mitad de las células viables. En la tabla VI se muestran los resultados obtenidos.

Tabla VI

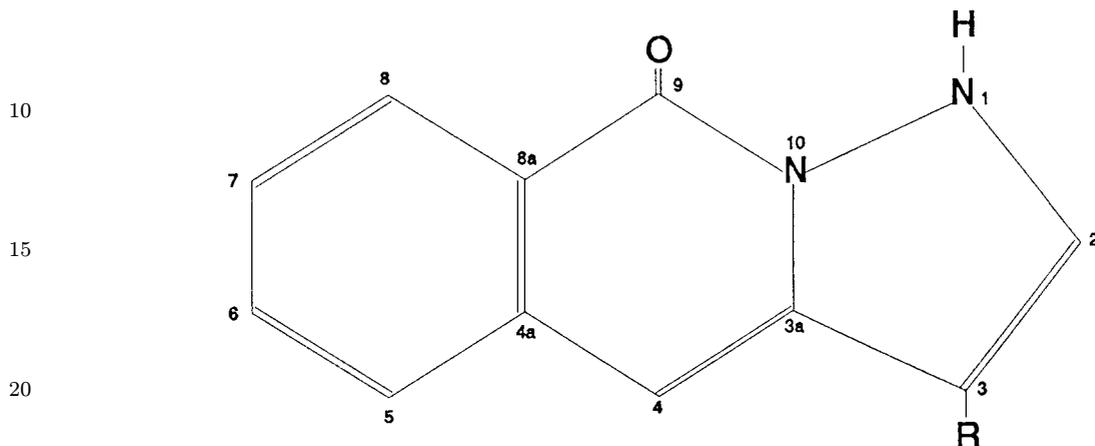
Línea celular	Origen	APHE-1		APHE-2	
		CT-ID50	CL-ID50	CT-ID50	CL-ID50
EL4	Ratón	6.5	20	14.0	34
LO-1	Ratón	2.6	20	9.4	25
L929	Ratón	19.9	>50	14.5	>50
HL-60	Humano	30.1	>50	-	>50
3LL	Ratón	25	>50	22.9	>50
P388D1	Ratón	11.5	>50	19.0	>50
HeLA	Humano	7.4	36	18.2	40
B16	Ratón	19.0	>50	22.9	>50
1591-RE-S	Ratón	8.7	>50	10.5	>50

* Los valores de los índices CT-ID50 y CL-ID50 están expresados en $\mu\text{g/ml}$.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de antibióticos y citostáticos pirazoloisoquinolínicos, denominados APHE-1 y APHE-2, correspondientes a la siguiente fórmula estructural:

5



10

donde R es un radical etilo en APHE-1 y propilo en APHE-2, **caracterizados** porque son producidos por un microorganismo del género *Streptoverticillium* cultivado en condiciones adecuadas.

15

2. Procedimiento de obtención de antibióticos y citostáticos pirazoloisoquinolínicos, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el microorganismo empleado es una cepa del *Streptoverticillium griseocarneum* denominada AL7791 (NCIMB 40447), diferente de la registrada como CECT 3250 por su diferencia en la utilización de fuentes hidrocarbonadas según se muestra en la Tabla IV.

20

3. Procedimiento de obtención de antibióticos y citostáticos pirazoloisoquinolínicos, según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque el microorganismo empleado es una cepa del *Streptoverticillium griseocarneum* (NCIMB 40447) o cualquier variedad espontánea del mismo.

25

4. Procedimiento de obtención de antibióticos y citostáticos pirazoloisoquinolínicos, según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque el medio de cultivo utilizado para la producción de APHE-1 y APHE-2 es un medio líquido, cuyo pH está comprendido entre 5,5 y 8,5, en el que el microorganismo se incubaba para su cultivo a una temperatura comprendida entre 20 y 40°C.

30

5. Procedimiento de obtención de antibióticos y citostáticos pirazoloisoquinolínicos, según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque el medio de cultivo utilizado es completamente convencional y contiene constituyentes tales como lo que se utilizan comúnmente en el cultivo de actinomicetos. Generalmente, el medio contiene fuentes de carbono, de nitrógeno y sales inorgánicas. Opcionalmente, se pueden añadir metales traza, precursores y factores de crecimiento.

35

40

45

50

55

60

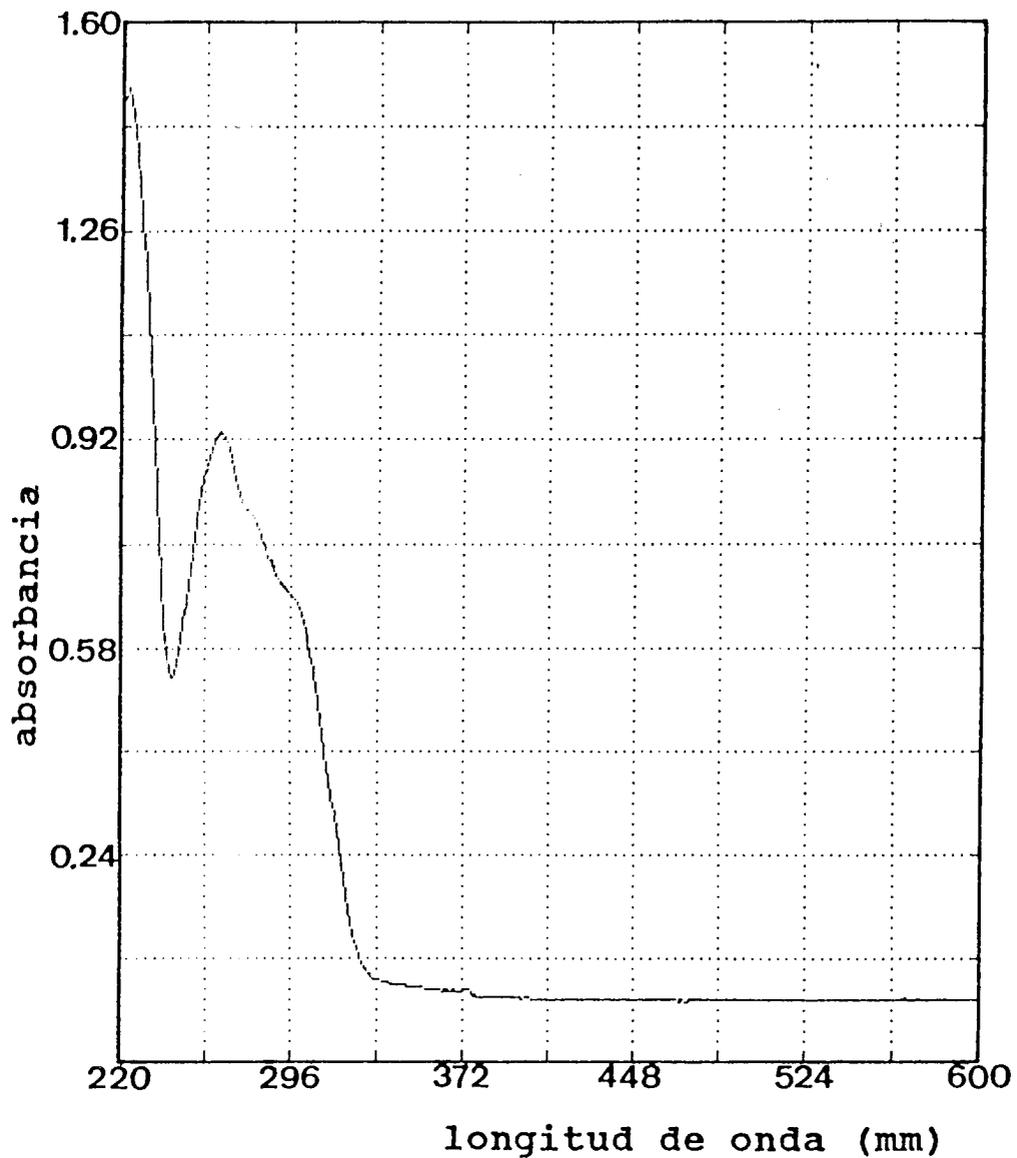


Figura 1

2 038 077

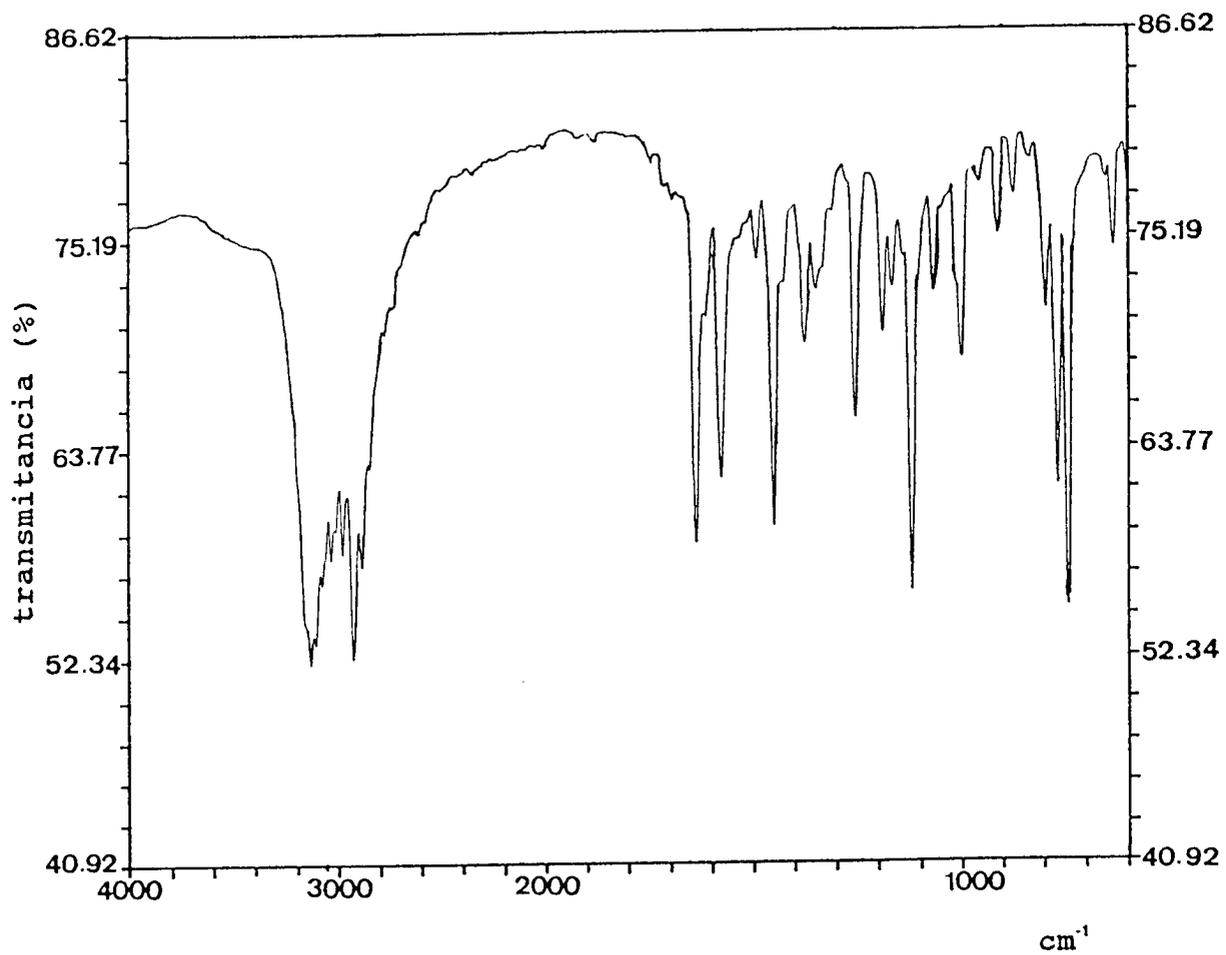


Figura 2

2 038 077

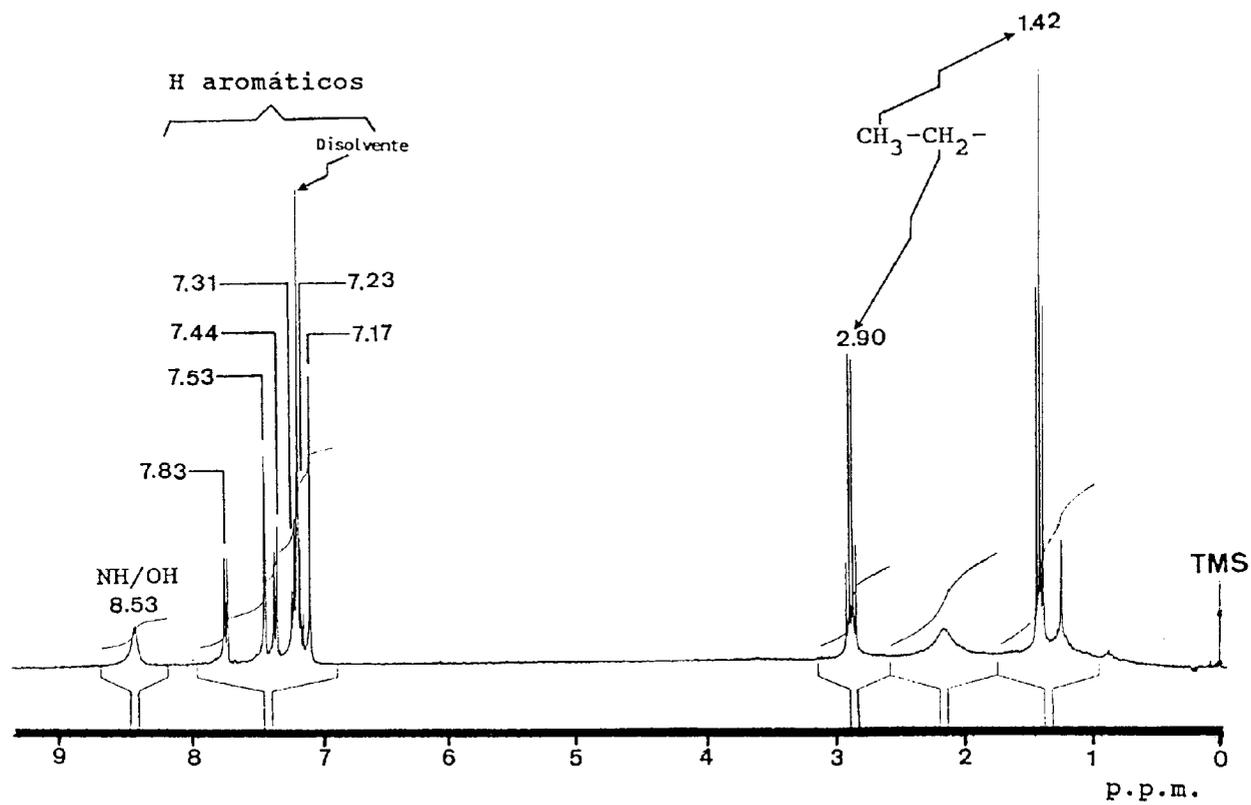


Figura 3

2 038 077

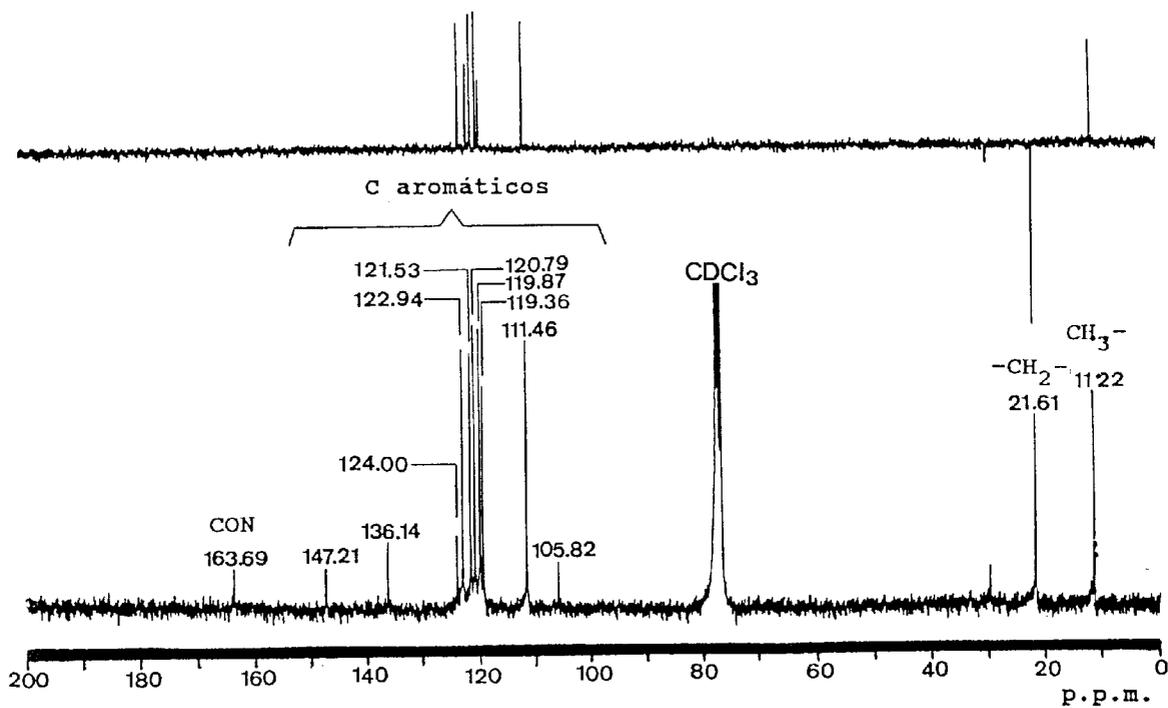


Figura 4

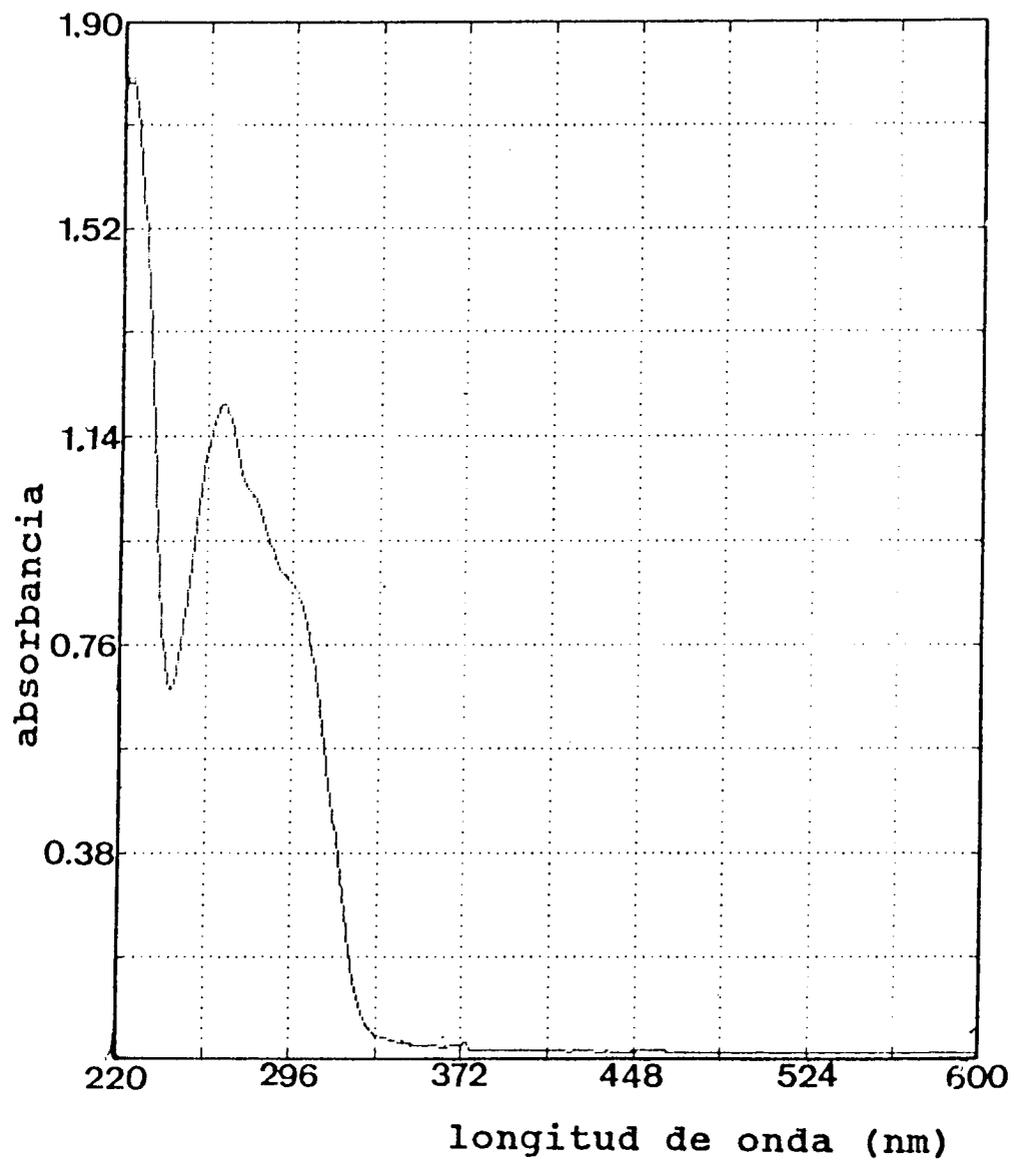


Figura 5

2 038 077

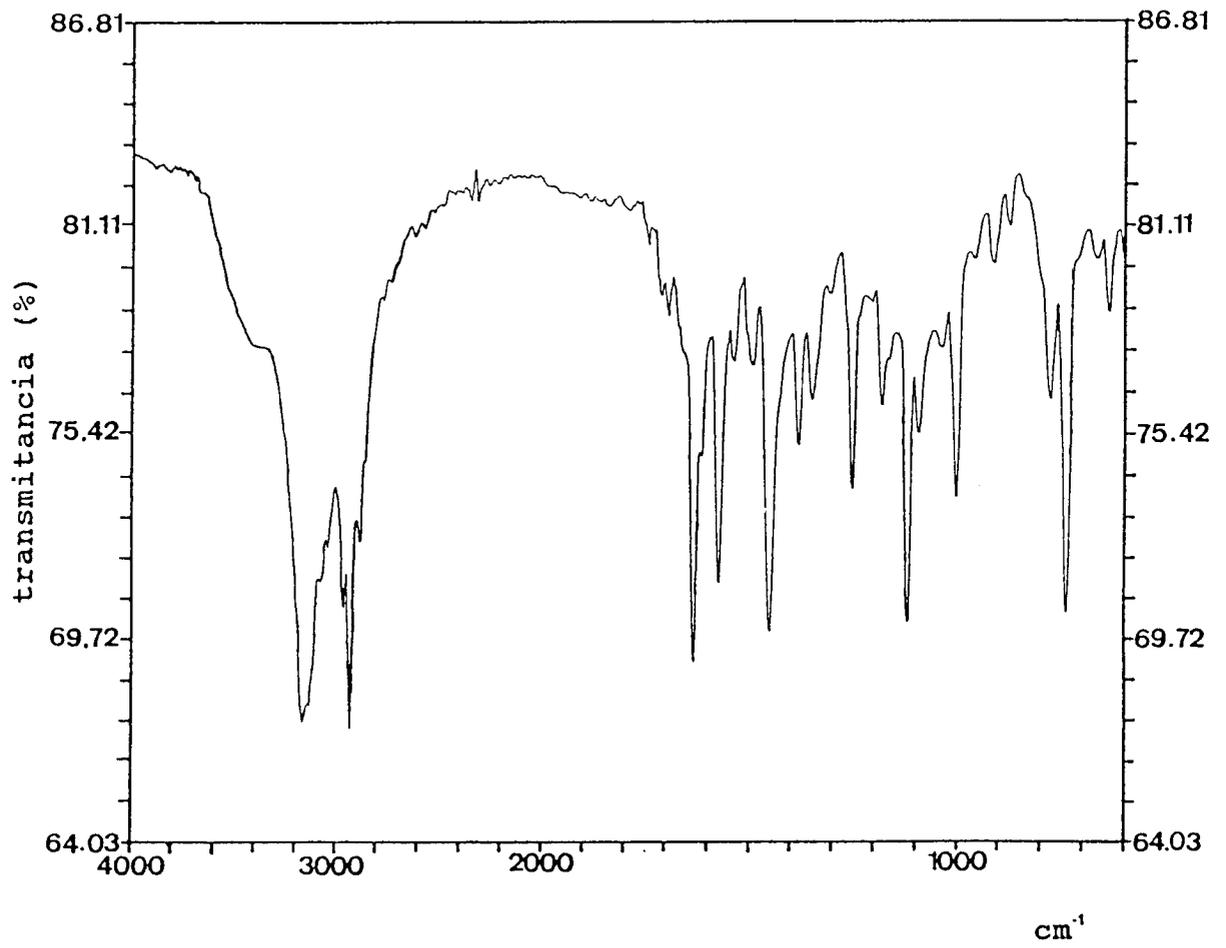


Figura 6

2 038 077

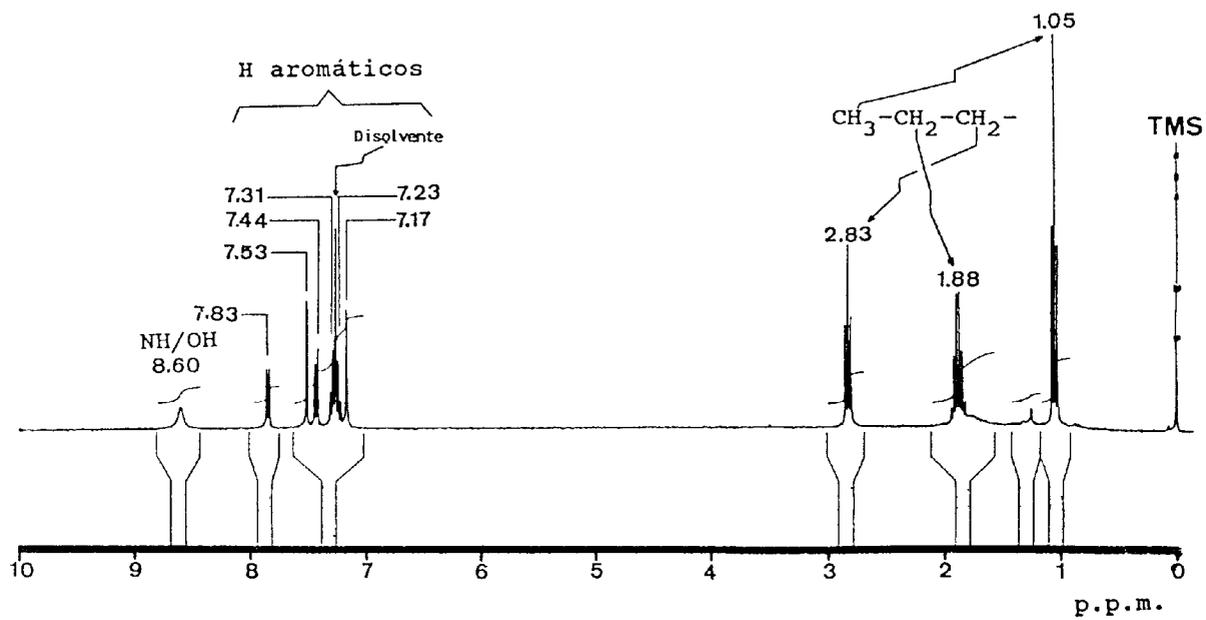


Figura 7

2 038 077

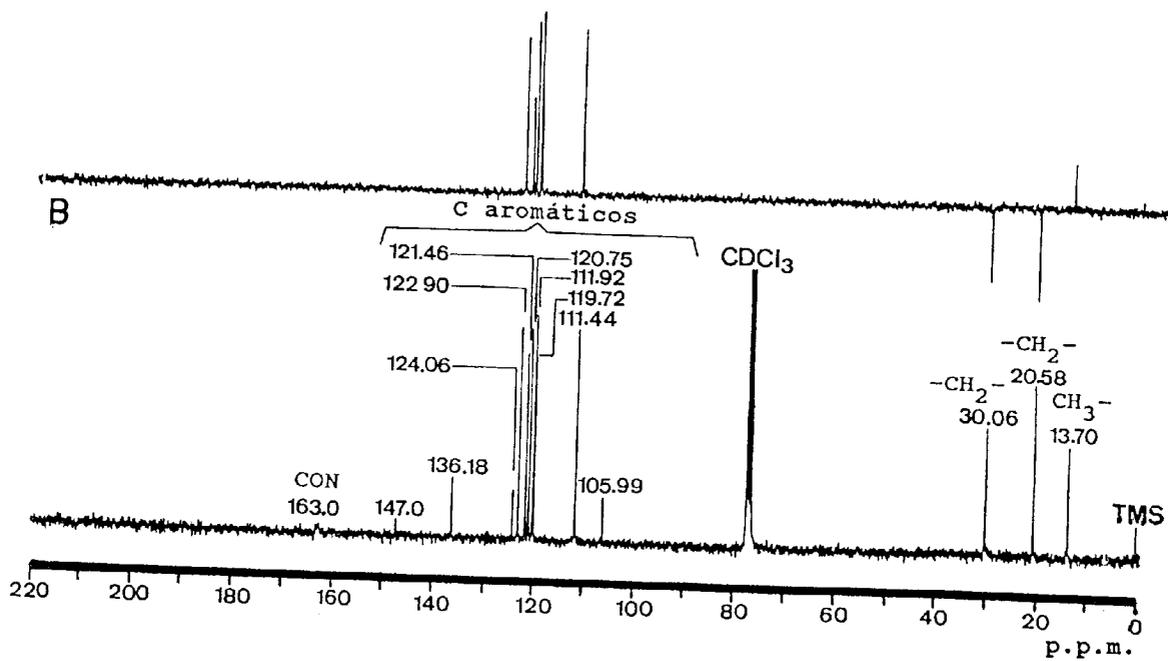


Figura 8

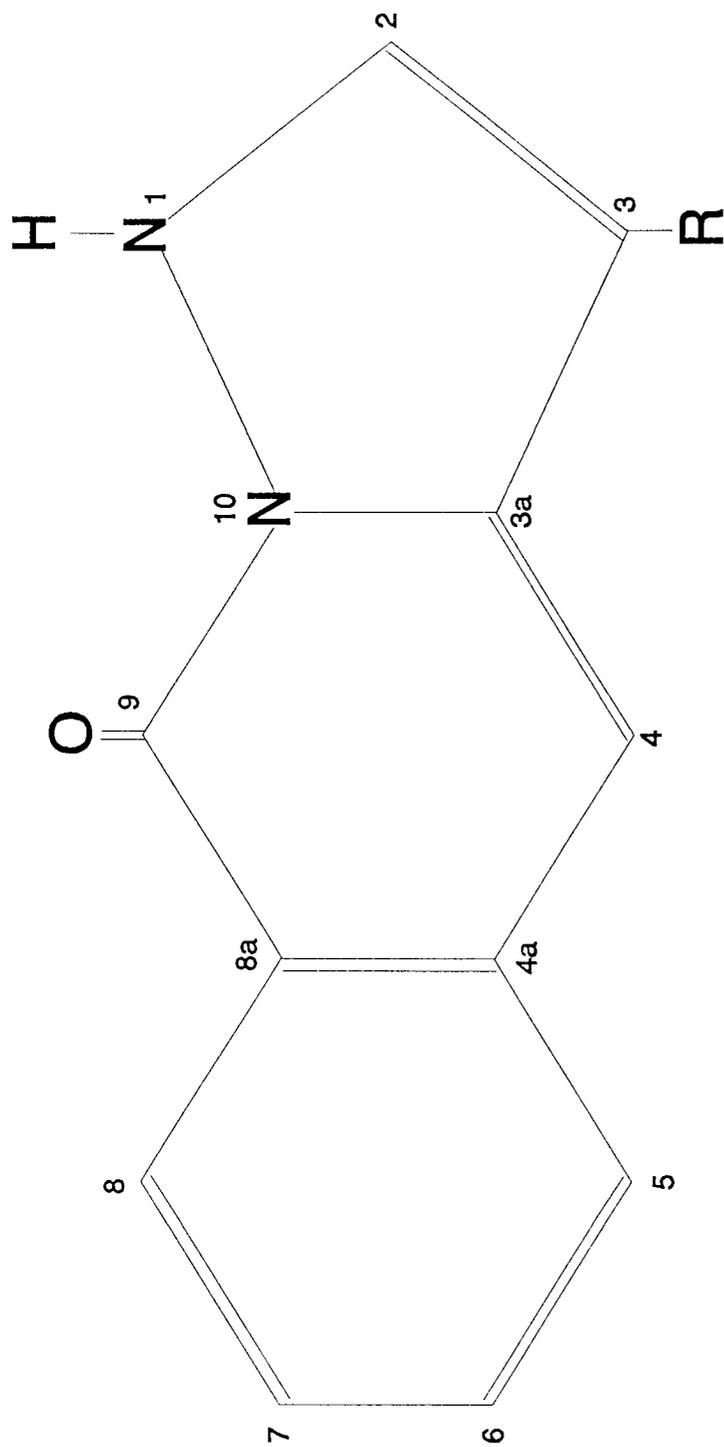


Figura 9



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ① ES 2 038 077
② N.º solicitud: 9102213
③ Fecha de presentación de la solicitud: 07.10.91
④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁵: C07D 471/04, C12P 17/18 // A61K 31/47 (C07D 471/04, 221:00, 231:00)
(C12P 17/18, C12R 1:625)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US-A-4113731 (GRUPPO LEPETIT S.p.A.) * Reivindicaciones 1,10,16,19-21 *	1,6
A	EP-A-375210 (LILLY IND. LTD.) * Páginas 15-17; Reiv. 1,4,6 *	1,6
A	EP-A-005745 (GRUPPO LEPETIT S.p.A.) * Reiv. 1,6-8 *	1,6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

15.04.93

Examinador

I. Galíndez Labrador

Página

1/1