

284072



PATENTE DE INVENCION

Case 1623.

## Memoria Descriptiva

sobre:

"Procedimiento para la producción de sustancias antibióticamente activas".

=====

*Solicitante:* SANDOZ, A.G., entidad suiza, residente en Basilea, Suiza.

=====

La presente invención se relaciona con nuevas sustancias antibióticamente activas denominadas en la presente memoria descriptiva Verrucarina A, Verrucarina B y Roridina A, y con un procedimiento para su obtención.

5.



- Esta invención proporciona un procedimiento para la producción de Verrucarina A, Verrucarina B y Roridina A, a partir de líquidos de cultivo o micelios de cepas de la especie de hongo *myrothecium verrucaria* (Albertini y Schweinitz) Ditmar ex Fries o *myrothecium roridum* Tode ex Fries, caracterizado porque se somete la mezcla a partición, adsorción cromatográfica y cromatografía de partición.
- 5.
10. Se aislan colonias del hongo *myrothecium-  
verrucaria* y *myrothecium roridum* de muestras de tierra de diversa procedencia. Morfológicamente todas estas cepas concuerdan con las descripciones de la especie dada, por ejemplo, en Gilman, J. C. 1957, A Manual of Soil Fungi, 2ª ed., The Iowa State College Press, Ames, Iowa, EE.UU. Algunas veces las colonias individuales del hongo, aún cuando han sido obtenidas de las mismas muestras de tierra, difieren morfológicamente, por ejemplo por su mayor o menor tendencia a esporular, así como fisiológicamente, por ejemplo en el medio de cultivo requerido para la producción de los antibióticos.
- 15.
- 20.
25. Es posible obtener las sustancias Verrucarina A, Verrucarina B y Roridina A, del líquido de cultivo o micelio de cepas del hongo *myrothecium verrucaria* y *myrothecium roridum* así como del líquido de cultivo y micelio de variantes de estos organismos.
30. El cultivo de los hongos puede llevarse -



a cabo por fermentación en cultivo estático de superficie o por fermentación en cultivo sumergido en tanques provistos de agitadores y mecanismos para introducir aire u oxígeno. Las cepas de *myrothecium verrucaria* y *myrothecium roridum* pueden ser cultivadas en diversos medios de cultivo conteniendo sustancias nutritivas conocidas, por ejemplo glucosa, almidón, dextrina, lactosa o azúcar de caña, como fuente de carbono, peptona, levadura o extracto de carne, sulfato amónico, nitrato amónico o aminoácidos, como fuente de nitrógeno y otras sales minerales y ácidos conocidos.

Se ha encontrado ahora que por lo menos 8 sustancias cristalinas, puras y uniformes pueden ser aisladas de la materia producida por diversas cepas de *myrothecium verrucaria* y *myrothecium roridum*. El que se produzca una sustancia particular y la cantidad que se produzca depende de las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo el cultivo. Las sustancias activas pueden ser extraídas del filtrado de cultivo con cloroformo, diclorometano o acetato etílico. Los extractos resultantes se lavan con una solución de hidróxido sódico y agua después de haber sido concentrados a un pequeño volumen a 0°; si el valor pH del líquido de cultivo inicial es mas de 3.5, se lavan los extractos adicionalmente con ácido clorhídrico 2 N. Esto permite la eliminación de impu



- rezas coloreadas, inactivas. Después de la evaporación del disolvente, se obtiene un aceite en bruto de color amarillo a pardo, del cual es posible obtener un cristalizado en bruto por medio de la adición de éter. La cromatografía en capa delgada revela que la Verrucarina A es el elemento principal, estando también presente la Verrucarina B y en algunos casos la Roridina B cuando se utilizan cultivos de M. verrucaria. En el caso de cultivos de M. roridum el elemento principal del cristalizado en bruto resultante es la Roridina A, la que generalmente contiene Roridina B, Verrucarina A y Verrucarina B. La separación en sus componentes homogéneos se lleva a cabo por medio de la cromatografía de adsorción, efectuada una o más veces, sobre una columna de óxido de aluminio o gel de sílice y por recristalización repetida a partir de mezclas de acetona/éter, metanol/éter, cloroformo/éter/éter de petróleo y diclorometano/éter; es necesario cerciorarse de la pureza de las fracciones por medio de la cromatografía en capa delgada. Por lo general es posible obtener Verrucarina C, D y E, Roridina A y B, puras y cristalinas, de los filtrados de cultivo de M. verrucaria a partir de las fracciones eluidas con cloroformo y cloroformo/metanol (99:1) y (98:2), pero el producto principal, la Verrucarina A, no puede ser obtenido en forma pura de esta manera y contiene impure
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

284072



zas de Verrucarina B; esta última, sin embargo, puede ser aislada de la anterior, según descripción que se dará más adelante.

- 5. La Roridina A pura y cristalina puede ser obtenida como producto principal y la Roridina B y C así como la Verrucarina A y B como subproductos puros y cristalinos, del filtrado de cultivo de *M.roridum* en forma análoga. Los elementos oleosos indeseables se eliminan de las fracciones de cromatografía por elución con benceno.

- 10. Se obtiene un producto amorfo de las fracciones posteriores por elución con cloroformo/metanol (98:2), (95:5), (9:1), (4:1) y (1:1).
- 15. La separación de la Verrucarina A y B en los elementos homogéneos se lleva a cabo por medio de la cromatografía, utilizando agua como fase estacionaria y mezclas de benceno/cloroformo, saturadas con agua, como fase móvil. Se puede usar tierra de diatomeas como soporte de la fase estacionaria. Puede separarse Verrucarina B pura de las primeras fracciones y Verrucarina A pura de las fracciones posteriores.

- 20. La tabla I indica los compuestos aislados de las diversas cepas de *M.verrucaria* y *M.roridum*.

TABLA I

Myrothecium verrucaria

- 30. (a) Cepa S 118: Verrucarina A  
Verrucarina B

284072



- Verrucarina C  
Roridina B
5. (b) Cepa S 750: Verrucarina A  
Verrucarina B  
Roridina A
- (c) Cepa S 833: Verrucarina A  
Verrucarina B  
Verrucarina D  
Verrucarina E
10. Myrothecium roridum
- (a) Cepa S 973: Roridina A  
Substancia A (no aislada en  
forma pura)
15. (b) Cepa S 1135: Roridina A  
Roridina B  
Roridina C  
Verrucarina A  
Verrucarina B  
Substancia A (no aislada en  
forma pura)
- 20.

25. Cuando se utilizan cultivos de cepas S 973 y -  
S 1135 de *M.roridum*, puede descubrirse un com-  
puesto adicional por medio de la cromatografía.  
Este compuesto es denominado substancia A y no  
ha sido aislado hasta ahora en forma pura; se  
encuentra mezclado con Roridina A.

30. La extracción del micelio de un culti-  
vo de la cepa S 118 de *M.verrucaria* con meta -  
nol acuosa, después de ulterior purificación -  
del extracto por partición entre agua y aceta-



to etílico, proporciona un producto en bruto del material soluble en acetato etílico. Este producto en bruto puede ser separado en Verrucarina A cristalina en bruto (conteniendo Verrucarina B)

5. y Roridina B, después de ulterior purificación sobre una columna de gel de sílice.

Además de los métodos clásicos para la caracterización de las sustancias cristalinas aisladas de la invención, se ha encontrado que

10. la cromatografía en capa delgada es muy útil para la verificación de la homogeneidad de fracciones amorfas y sustancias cristalinas. Un modo particularmente ventajoso de aplicar este método está descrito detalladamente en el ejemplo 13.

15. Es muy difícil cerciorarse de la homogeneidad de por ejemplo Verrucarina A y B sin la ayuda de la cromatografía.

Las sustancias aisladas pueden caracterizarse como sigue:

20. (i) Verrucarina A.

Después de recristalizar a partir de mezclas de metanol/éter o acetona/éter o cloroformo/éter/éter de petróleo, la Verrucarina A forma láminas rectangulares, incoloras, que no funden por debajo de 360°. A aproximadamente 280° los cristales empiezan a tornarse de color amarillo y pardo al iniciarse la descomposición. Son insolubles en agua, éter dietílico, éter diisopropílico y en hidrocarburos líquidos saturados (por ejemplo pentano, hexano, heptano o ciclohexano),

- 30.

284072

11E



- siendo solubles en cetonas de peso molecular bajo (por ejemplo acetona o cetona metilética), en alcoholes de peso molecular bajo (por ejemplo metanol, etanol o propanol), en dioxano, en hidrocarburos halogenados de peso molecular bajo (por ejemplo diclorometano, cloroformo o tetracloruro de carbono), en piridina, benceno y en tolueno) Rotación específica:  $[\alpha]_D^{22} = + 206^{\circ} \pm 2^{\circ}$  (cloroformo) y  $[\alpha]_D^{22} = + 208^{\circ} \pm 2^{\circ}$  (dioxano). El análisis elemental dá los valores siguientes: C: 64.5; 64.7; 64.2%. H: 6.9; 7.0; 6.7% y O: 29.0; 28.4; 28.7%. La Verrucarina A está exenta de nitrógeno, azufre y halógeno. La determinación del peso molecular de acuerdo con Rast (alcanfor) indicó un peso molecular de 517 y la microdeterminación termoelectrica un peso molecular de 527. El peso molecular calculado de 520, determinado en la radioactividad del compuesto acetílico producido con anhídrido <sup>14</sup>C-acético, concuerda con las dos determinaciones del peso molecular antes mencionadas e indica que la fórmula empírica probablemente es  $C_{27}H_{34}O_9$  (502.5). El especto de absorción ultravioleta en etanol indica un máximo a 260 mμ ; log ε = 4.25 (calculado sobre un peso molecular de 502.5). El especto infrarrojo de una solución del antibiótico en diclorometano indica bandas a 3540, 2970, 1714, 1635, 1590, 1475, 1410, 1385, 1213, 1190, 1186, 968, 878 y 820 cm<sup>-1</sup> (las bandas más importantes están subrayadas). Este especto es

11ENE



- tá ilustrado en la figura 2 de los dibujos adjun-  
tos. En estado sólido (suspensión en Mujol), pue-  
den reconocerse bandas a 3560-3580, 2930, 2570,  
1709, 1673, 1631, 1587, 1457, 1377, 1275, 1213,  
5. 1195, 1123, 1103, 1085, 1053, 1032, 1023, 975, -  
967, 887, 832 cm<sup>-1</sup>. La Verrucarina A está exenta  
de radicales metoxilo, contiene 5.5% de radica-  
les C-metilo (de acuerdo con Kuhn-Roth), 0.17-0.25%  
de hidrógeno activo (Zerewitinoff), absorbe 3 mo-  
10. léculas-gramo de hidrógeno durante la microhidro-  
genación, no dá una coloración amarilla con te-  
tranitrometano en cloroformo, descoloriza inme-  
diatamente las soluciones de permanganato potási-  
co en acetona y bromuro en cloroformo. Las reac-  
15. ciones de acuerdo con Tollens, Fehling, Molisch,  
Legal, Zimmermann y Liebermann son negativas. La  
Verrucarina A es así un compuesto neutro, liposo-  
luble.

(ii) Verrucarina B.

20. La Verrucarina B tiene propiedades muy -  
similares a las de la Verrucarina A y a menudo -  
cristaliza con la misma. Cristaliza a partir de  
acetona/éter en agujas que no funden por debajo  
de 360°. Los cristales empiezan a tornarse de -  
25. color amarillo y pardo a aproximadamente 280°, -  
lo cual indica descomposición. Son insolubles en  
agua, éter dietílico, éter diisopropílico y en -  
hidrocarburos líquidos saturados, (por ejemplo -  
pentano, hexano, heptano o ciclohexano), pero -  
30. son solubles en cetonas de peso molecular bajo,

284072



- (por ejemplo acetona o cetona metiletílica), en alcoholes de peso molecular bajo (por ejemplo - metanol, etanol o propanol), en dioxano, en hidrocarburos halogenados de peso molecular bajo-
5. (diclorometano, cloroformo o tetracloruro de - carbono), en piridina, benceno y en tolueno. - Los valores de la rotación específica sorpren - dentemente dependen de la naturaleza del disol -
10. vente:  $[\alpha]_D^{23} = + 94^\circ \pm 2^\circ$  (cloroformo), -  $[\alpha]_D^{22} = + 101^\circ \pm 1^\circ$  (dioxano) y  $[\alpha]_D^{23} = + 147^\circ \pm 2^\circ$  (benceno). El análisis elemental dá los siguien - tes valores: C: 65.4 y 64.7%; H: 6.5 y 6.4% y - O: 28.1 y 28.9%. La Verrucarina B está exenta -
15. de nitrógeno, azufre y halógeno. Dos determina - ciones del peso molecular de acuerdo con Rast - (alcanfor) dan valores de 629 y 645 y la micro - determinación termoelectrica un valor de 490. - De estas cifras pueden deducirse una fórmula em -
20. pírica de  $C_{27}H_{32}O_9$  (500.5) o posiblemente  $C_{36}H_{40}O_{12}$  (664.7). El espec - tro de absorción ultravioleta en etanol indica un máximo a 259 mμ :  $\log \epsilon = 4.35$  (calculando - para un peso molecular de 490). El espectro in - frarojo de una solución en diclorometano indica
25. bandas a 2880, 1736, 1701, 1670, 1623, 1584, -1 1419, 1240, 1100, 1080, 1038, 995, 965 y 887 cm . Este espectro está ilustrado en la figura 1 de - los dibujos adjuntos. En estado sólido (suspension en Nujol) las bandas están situadas a: 2930
30. 2885, 1736, 1712, 1675, 1631, 1590, 1460, 1378,



- 1263, 1200, 1104, 1087, 1038, 970, 892, 825, 740 y  $646\text{ cm}^{-1}$ . El compuesto está exento de radicales metoxilo e hidrógeno activo (Zerewitinoff). Durante la microhidrogenación se usan 3 moléculas-gramo de hidrógeno (calculado sobre un peso molecular de 670) o 4 moléculas-gramo (calculado sobre un peso molecular de 490). Contiene 2.9 % de radicales C-metilo (de acuerdo con Kuhn-Roth).
5. La Verrucarina B es un compuesto neutro, liposoluble.
10. (iii) Verrucarina C y D.
- Solo se forman cantidades muy pequeñas de Verrucarina C y no se forma en todos los cultivos.
15. A partir de metanol/éter o acetona/éter el compuesto cristaliza en forma de prismas incoloros con un punto de fusión de  $223-224^{\circ}$ . Igualmente se forman solo cantidades muy pequeñas de Verrucarina D y éstas así mismo no se forman bajo todas las condiciones de cultivo. Cristaliza a partir de éter/éter de petróleo en forma de agujas con un punto de fusión de  $127-128^{\circ}$ .
20. (iv) Roridina A.
- La Roridina A se obtiene a partir de acetona/éter en forma de cristales incoloros que funden a  $198-204^{\circ}$ . Son fácilmente solubles en acetonas de peso molecular bajo (por ejemplo acetona o cetona metiletílica), en alcoholes de peso molecular bajo (por ejemplo metanol, etanol o propanol), en dioxano, en hidrocarburos halogenados.
- 25.
- 30.

284072

11E



- dos de peso molecular bajo (por ejemplo diclorometano, cloroformo o tetracloruro de carbono) y piridina. El compuesto es difícilmente soluble en agua, éter dietílico, éter diisopropílico y en hidrocarburos líquidos saturados (por ejemplo pentano, hexano, heptano, ciclohexano, benceno y tolueno). Rotación específica:  $[\alpha]_D^{22} = +129.1$  (en cloroformo). El análisis elemental da los siguientes valores: C: 65.1; 66.0; 65.4%; H: 7.4; 7.7; 7.7; y O: 27.4; 26.9; 26.9%. La determinación del peso molecular de acuerdo con Rast (alcanfor) da valores de 459 y 503, la microdeterminación termoeléctrica el valor de 543. A raíz de estas determinaciones, la Roridina A puede tener la fórmula empírica  $C_{22}H_{30}O_7$  (406.53),  $C_{27}H_{38}O_8$  (490.6) ó  $C_{29}H_{40-42}O_9$  (533.6-535.6). El espectro de absorción ultravioleta en etanol indica un máximo a 263 m $\mu$ ;  $\log \mathcal{E} = 4.27$  (calculado para un peso molecular de 533.6). El espectro infrarrojo de una solución en diclorometano contiene bandas a: 3680, 3570, 2970, 1721-24, 1706, 1637, 1600, -1180, 1123, 1100, 1085, 1035, 1008, 970, 927, -843, 813 y 650  $cm^{-1}$ . En estado sólido (prensado en KBr) hay bandas intensas situadas a 3470, 2970 2860, 1742, 1704, 1634, 1594, 1482, 1418, 1335, -1170-80, 1135, 1103, 1082, 1037, 972, 815, 755, -y 650  $cm^{-1}$ . Este espectro está indicado en la figura 3 de los dibujos adjuntos. La Roridina A es un compuesto neutro, liposoluble.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
30. (v) Roridina B.



- Después de recristalizar a partir de acetona/cloroformo/metanol se obtiene la Roridina B en forma de agujas u hojas incoloras de un punto de fusión de 143-149°. Los cristales son fácilmente solubles en cetonas de peso molecular bajo (por ejemplo acetona o cetona etilmetílica), alcoholes de peso molecular bajo (por ejemplo metanol, etanol o propanol), hidrocarburos halogenados de peso molecular bajo (por ejemplo diclorometano, cloroformo o tetracloruro de carbono), dioxano, benceno y en piridina. La Roridina B es difícilmente soluble en agua y en hidrocarburos líquidos saturados (por ejemplo pentano, hexano, heptano, o ciclohexano). Rotación específica  $[\alpha]_D^{23} = -123 \pm 2$  (cloroformo) y  $[\alpha]_D^{23} = -126 \pm 2$  (benceno). El análisis elemental dá los siguientes resultados: C: 83.8; H: 11.1 y O: 4.8%. La determinación del peso molecular de acuerdo con Rast (alcanfor) dá un valor de 318 y la microdeterminación termoeléctrica el valor de 426. Basándose en estos resultados es posible una fórmula empírica de  $C_{21}H_{32}O$  (300.5) ó  $C_{28}H_{46}O$  (398.6). El espectro de absorción ultravioleta en etanol es negativo. Se pueden ver bandas en el espectro infrarojo (prensado en KBr) a 3400-3450, 2950, 2860, 1655, 1605, 1460, 1370, 1068, 1040, 985, 970, 833 y 804  $cm^{-1}$ . Se absorben 4-5 moléculas-gramo de hidrógeno (calculado sobre un peso molecular de 318) durante el curso de la microhidrogenación.
5. 10. 15. 20. 25. 30.
- La Verrucarina A tiene un fuerte efecto -



284072

- inhibidor sobre diversos micro-organismos. La actividad de inhibición del crecimiento de la Verru carina A es determinada por el método de dilución que generalmente se usa con este fin. Para cada -
5. germen se determina la menor concentración del - compuesto que produce una inhibición total o por lo menos una fuerte inhibición parcial del crecimiento en una solución nutritiva adecuada. Se usa ron concentraciones de ensayo de  $10^{-4.3}$  a  $10^{-8.3}$
10. ó  $10^{-4}$  a  $10^{-8}$ . Los resultados de los diversos ensayos están compendiosos en la tabla siguiente.

284072

11ENE



-log de la menor concentración que tiene una acción inhibidora del crecimiento.

Organismo de ensayo

| Organismo de ensayo  |       |         | Duración de la incubación en horas |
|--|-------|---------|------------------------------------|
|  | total | parcial |                                    |
| Saccharomyces cerevisiae   | 5,8   | 6,3     | 6                                  |
|  | 5,8   | 6,3     | 20                                 |
|  | 5,3   | 5,8     | 40                                 |
| Candida albicans   | 5,0   | 5,5     | 20                                 |
| Candida albicans cepa Clínica Dermatológica, Universidad de Zürich No.1101 A       | 5,5   | 6,0     | 20                                 |
| Candida tropicalis cepa - Clínica Dermatológica, Universidad de Zürich No. 169/61. | 6,3   | 7,8     | 6                                  |
|  | 5,8   | 6,3     | 20                                 |
|  | 5,3   | 6,3     | 40                                 |
| Candida krusei cepa Instituto tropical médico Londres No.270.                      | 6,3   | 6,8     | 6                                  |
|  | 6,3   | 6,8     | 20                                 |
|  | 6,3   | 6,8     | 40                                 |
| Torulopsis glabrata cepa - CBS No. 138   | 4,0   | 5,0     | 20                                 |
| Absidia lichtheimi cepa - CBS-Lendner  | 5,0   | 5,5     | 20                                 |
| Aspergillus fumigatus  | 5,5   | 6,0     | 20                                 |
| Blastomyces brasiliensis   | 5,5   | 6,0     | 20                                 |

A



284072

Organismo de ensayo

to- par-  
tal cial

Duración  
de la in-  
cubación  
en horas

|     |  |     |                   |              |
|-----|--|-----|-------------------|--------------|
| 5.  | Trichoph. gypseum  | 4,3 | 5,3               | 3<br>7       |
| B5  | Achorin quinikeanum cepa<br>Clínica Dermatológica,<br>Universidad de Zürich<br>No. 964 | 4,3 | 5,3<br>4,3<br>4,3 | 3<br>7<br>14 |
|     | Serratia marcescens  |     | 4,3<br>4,3        | 6<br>20      |
| 10. | Proteus mirabilis cepa<br>NCTC 5887  |     | 4,3<br>4,3        | 6<br>20      |
| C   | Pseudomonas aeruginosa   |     | 4,3<br>4,3        | 6<br>20      |

15. A = hongos de levadura u otros fuera de B      Soluciones nutritivas  
 Caldo nutritivo Difco  
 (excluyendo Saccharomyces cerevisiae; Caldo de Maltosa B Sabouraud; Torulopsis glabrata).

B = hongos de la piel      Agar Maltosa Sabouraud

20. C = gérmenes gramos      Caldo Nutritivo Difco

25. La efectividad de la Verrucarina A, Verrucarina B y Roridina A sobre tumores en animales se ha establecido en ratones y ratas que han sido inoculados con tumores experimentales. Los tumores en animales, sobre los cuales pueden ejercer influencia los compuestos, son el tumor ascítico de Ehrlich, el sarcoma 180, el sarcoma 37 del ratón y el sarcoma Yoshida de la rata. Las tablas siguientes indican la efectividad de la Verrucarina A, Verrucarina B y Roridina A sobre tumores en animales.



Verrucarina A 284072

| Tumor                                 | Dosis - Dura-<br>una vez ción<br>al día días<br>mg/kg | % de<br>inhi<br>bi-<br>ción | Tolerancia  |              |   |
|---------------------------------------|---|-----------------------------|---|--------------|---|
|                                       |   |                             | No. de<br>anima-<br>les so<br>meti -<br>dos a<br>ensayo | muer-<br>tes |   |
| Ascítico de -<br>Ehrlich - ra-<br>tón | 0,38  | 7                           | 94  | 6            | 0 |
| Sarcoma 180<br>ratón                  | 0,125   | 7                           | 23  | 6            | 0 |
| Sarcoma 37 -<br>ratón                 | 0.75  | 7                           | 43  | 6            | 1 |
|                                       | 1.0   | 8                           | 33  | 6            | 0 |
| Sarcoma Yoshi<br>da rata              | 0.05  | 14                          | 35  | 6            | 0 |

Verrucarina B

|                                |     |   |    |   |   |
|--------------------------------|-----|---|----|---|---|
| Ascítico de -<br>Ehrlich-ratón | 1,0 | 6 | 84 | 6 | 0 |
|                                | 3,0 | 7 | 95 | 6 | 1 |
| Sarcoma 37                     | 1.0 | 7 | 23 | 6 | 0 |

Roridina A

|            |     |   |    |   |   |
|------------|-----|---|----|---|---|
| Sarcoma 37 | 0.5 | 8 | 18 | 6 | 0 |
|------------|-----|---|----|---|---|



- La Verrucarina A, Verrucarina B y Roridina A también tienen una acción pronunciada en el cultivo de células. La acción sobre cultivos de fibroplastos embrionarios del ave de corral da los siguientes resultados: Después de haber actuado la Verrucarina A durante 6 horas, la ED<sub>50</sub> (concentración que inhibe la mitad de la mitosis) es de 0,0025  $\mu$ /ml. A esta concentración y a una concentración mil veces mayor, las células sin dividir no son cambiadas morfológicamente. Por otra parte, las células que se dividen, se desintegran bajo la influencia de la Verrucarina A. Aunque la acción de la Verrucarina B es cualitativamente similar a la de la Verrucarina A, es sin embargo algo más débil; ED<sub>50</sub> = 0,01  $\mu$ /ml. La acción de la Roridina A es cualitativamente la misma que la de la Verrucarina A. ED<sub>50</sub> = 0,003  $\mu$ /ml.
5. los siguientes resultados: Después de haber actuado la Verrucarina A durante 6 horas, la ED<sub>50</sub> (concentración que inhibe la mitad de la mitosis) es de 0,0025  $\mu$ /ml. A esta concentración y a una concentración mil veces mayor, las células sin dividir no son cambiadas morfológicamente. Por otra parte, las células que se dividen, se desintegran bajo la influencia de la Verrucarina A. Aunque la acción de la Verrucarina B es cualitativamente similar a la de la Verrucarina A, es sin embargo algo más débil; ED<sub>50</sub> = 0,01  $\mu$ /ml. La acción de la Roridina A es cualitativamente la misma que la de la Verrucarina A. ED<sub>50</sub> = 0,003  $\mu$ /ml.
10. las células que se dividen, se desintegran bajo la influencia de la Verrucarina A. Aunque la acción de la Verrucarina B es cualitativamente similar a la de la Verrucarina A, es sin embargo algo más débil; ED<sub>50</sub> = 0,01  $\mu$ /ml. La acción de la Roridina A es cualitativamente la misma que la de la Verrucarina A. ED<sub>50</sub> = 0,003  $\mu$ /ml.
15. La acción de la Roridina A es cualitativamente la misma que la de la Verrucarina A. ED<sub>50</sub> = 0,003  $\mu$ /ml.

La inhibición de la multiplicación de las células in vitro (células del mastocitoma del ratón P-815) da los siguientes resultados:

20. La inhibición de la multiplicación de las células in vitro (células del mastocitoma del ratón P-815) da los siguientes resultados:

En una solución nutritiva adecuada estas células tumorales se multiplican hasta 4 a 5 veces su número original dentro de 40 horas. La ED<sub>50</sub> (la concentración que inhibe este aumento en un 50%) de la Verrucarina A para estas células es de 0,0006  $\mu$ /ml (= 1:1,600,000,000).

25. En una solución nutritiva adecuada estas células tumorales se multiplican hasta 4 a 5 veces su número original dentro de 40 horas. La ED<sub>50</sub> (la concentración que inhibe este aumento en un 50%) de la Verrucarina A para estas células es de 0,0006  $\mu$ /ml (= 1:1,600,000,000).

La ED<sub>50</sub> de la Verrucarina B para estas células es de 0,003  $\mu$ /ml y de la Roridina A 0,001  $\mu$ /ml.

Se examinó la toxicidad de la Verrucarina A,

11 ENE

284972



Verrucarina B y Roridina A, especialmente sobre los ratones. La toxicidad aguda DL<sub>50</sub> se determinó por administración intravenosa de los compuestos.

- 5. Verrucarina A DL 50 i.v. 1,5 mg/kg
- Verrucarina B DL 50 i.v. 7 mg/kg
- Roridina A DL 50 i.v. 1 mg/kg

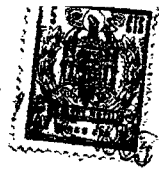
Además, la Verrucarina A es adecuada para el tratamiento de enfermedades de la sangre (por ejemplo leucemia mieloidea o linfática) y de enfermedades del sistema linfático (por ejemplo linfogranuloma de Hodgkin y linfosarcoma).

- 10. Cuando se tratan perros intravenosamente una vez al día con dosis de 0,1 mg/kg de Verrucarina A, puede establecerse una marcada reducción en el número de leucocitos en la sangre periférica después de una serie de inyecciones.

| Ejemplos:   | antes del tratamiento           | después del -<br>tratamiento    |
|-------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Perro A     | 8900 leucocitos/mm <sup>3</sup> | 2900 leucocitos/mm <sup>3</sup> |
| 20. Perro B | 1250 " "                        | 100 "                           |
| Perro C     | 9300 " "                        | 5000 "                          |

- 25. La Verrucarina A, Verrucarina B y Roridina A pueden usarse como medicamentos, por ejemplo en forma de composiciones farmacéuticas. Estas composiciones contienen una mezcla de los compuestos arriba indicados y un soporte orgánico o inorgánico adecuado para la administración entérica, parentérica o local. Son compuestos de soporte adecuados aquellos que no reaccionan con
- 30. las sustancias activas, por ejemplo gelatina, -

284072



- lactosa, almidón, estearato magnésico, talco, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, goma, glicoles polialquilénicos, vaselina, colestero -  
na y otros soportes farmacéuticos bien conoci -  
dos. Las composiciones farmacéuticas pueden pro -  
ducirse, por ejemplo, en forma de tabletas, gra -  
geas, polvo, cremas, supositorios o en forma lí -  
quida, por ejemplo soluciones, suspensiones o -  
emulsiones. Cuando es necesario son esteriliza -  
das y / o contienen compuestos auxiliares, por  
ejemplo agentes de conservación, estabilizadón,  
humectación o emulsificación. Además, pueden -  
contener otros compuestos de valor terapéutico.

- En los siguientes ejemplos no limitati -  
vos todas las temperaturas están indicadas con -  
letra en grados centígrados. Las proporciones -  
en el caso de los disolventes se refieren a pro -  
porciones por volumen.

EJEMPLO 1: Producción y aislamiento de Verruca -  
rina A, Verrucarina B y Verrucarina  
E en bruto.

- Se inoculan 100 cultivos agitados (ma -  
trices Erlenmayer de 500 ml, conteniendo cada -  
uno 100 ml de solución nutritiva) conteniendo -  
solución nutritiva de Richard, modificada de -  
acuerdo con G. Luz, 1934: Phytopathol, Z. 7, 589:  
[la solución nutritiva modificada consiste de -  
50,0 g de glucosa puriss., Pharmacoepia Helvéti -  
ca V, denominada de aquí en adelante Ph.H.V., -  
así como las siguientes sales analíticamente pu



- ras: 10,0 g de nitrato amónico, 5,0 g de fosfato potásico primario, 2,5 g de sulfato magnésico - (x 7 H<sub>2</sub>O), 0,02 g de cloruro férrico, y es completada hasta 1,0 litro con agua desmineralizada].
5. con una suspensión de conidios de la cepa S 833 *myrothecium verrucaria*. Después de incubar durante 9 días a 27°C sobre un artefacto agitador con movimiento amplitudal (frecuencia: 100 movimientos por minuto), se separa el micelio por filtración con succión y se sacude el filtrado de cultivo claro dos veces, cada vez con 1 litro de acetato etílico. Los extractos se lavan una vez con ácido clorhídrico 2N, una vez con una solución 2N de hidróxido sódico y por último con agua, y se evaporan en un vacío. Se obtienen 115 mg de un producto en bruto de color pardo que, en la cromatografía de capa delgada [ soporte: gel de sílice; agente de elución: cloroformo/metanol (97:3); coloración de las manchas en una atmósfera de iodo (amarillo-pardo) ] indica 2 manchas que corresponden a la Verrucarina A y B. Se cromatografía la mezcla sobre 6 g de gel de sílice con fines de mayor purificación. Se requieren 12 ml de disolvente por fracción para la elución.
  10. Las fracciones 1-5 [eluidas con benceno, cloroformo y cloroformo/metanol (99:1) ] rinden 3,6 mg de material amorfo (desechado). Las fracciones 6 y 7v [26 mg eluidos con cloroformo/metanol (99:1) ] rinden 8 mg de Verrucarina A cristalina en bruto (conteniendo aún Verrucarina B) a partir de éter.
  - 15.
  - 20.
  - 25.
  - 30.

284072



- Las fracciones 9 y 10 [eluidas con cloformo/metanol (99:1)] rinden 13 mg de Verrucarina E cristalina en bruto a partir de éter. En la cromatografía de capa delgada la Verrucarina E indica una mancha rojo-violeta en una atmósfera de iodo después de 10 minutos. Las fracciones 16-24 [eluidas con cloroformo/metanol (99:1) y (98:2)] rinden 15 mg de material amorfo desechado.
5. EJEMPLO 2: Producción y obtención de Verrucarina A y Verrucarina B en bruto.
10. La cepa S 833 se cultiva en 10 litros de la solución nutritiva descrita en el Ejemplo 1 en un fermentador de 14 litros (New Brunswick Co., New Brunswick EE.UU tipo FS 314) durante 6 días a 27°, efectuando el agitador 450 revoluciones por minuto y aerándose la mezcla a razón de 10 litros de aire por minuto. Se filtra 1 litro del líquido de cultivo a través de una capa de tierra de diatomeas (Celite) y se extracta en filtrado claro dos veces, cada vez con 1 litro de acetato etílico. Los extractos en acetato etílico se lavan una vez con 100 ml de ácido clorhídrico 2N dos veces con una solución 2N de hidróxido sódico, cada vez con 50 ml, y dos veces con agua, cada vez con 50 ml, y luego se evaporan en un vacío. Se obtienen 277 mg de un extracto en bruto de color pardo, el que indica 3 manchas en la cromatografía de capa delgada, las que corresponden a la Verrucarina A, B y E.
15. Se cromatografía el extracto en bruto sobre 14 g
- 20.
- 25.
- 30.



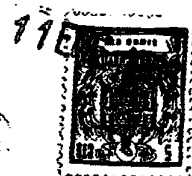
- de gel de sílice, requiriéndose 30 ml de disolvente por fracción para la elución. Las fracciones 1-11 [eluidas con benceno, cloruro metilénico y cloruro metilénico/metanol (99:1)] rinden 127 mg de material amorfo, el cual, de acuerdo con la cromatografía de capa delgada, contiene Verrucarina A y B. Las fracciones 12 y 13 [11 mg eluidos con cloruro metilénico/metanol (99:1)] rinden 3,5 mg de Verrucarina E cristalina a partir de éter. Las fracciones 14-22 [eluidas con cloruro metilénico/metanol (99:1)] rinden 30 mg de material amorfo. Se combina el material amorfo de las fracciones 6-11 y 14-17 con el líquido madre de las fracciones 12 y 13 (125 mg) y se cromatografía la mezcla sobre 13 g de gel de sílice. Las fracciones se eluyen con cloruro metilénico/metanol (99,5:0,5) y rinden un total de 3 mg de Verrucarina A cristalina en bruto, que contiene un poco de Verrucarina B después de recristalizar a partir de éter.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.

EJEMPLO 3: Producción y obtención de Verrucarina A y Verrucarina B en bruto.

- Se incuba la cepa S 833 bajo las condiciones indicadas en el ejemplo 1 en solución nutritiva de Weindling R. Weindling, Phytopathol. 24, 1155, R. Weindling y A. Emerson, *ibid.* 26, 1068 consistiendo de 25,0 g de glucosa puriss., Ph. H. V., las siguientes sustancias en estado analíticamente puro: 2,0 g de tartrato amónico, 2,0 g de fosfato potásico primario, 1,0 g de sul
- 25.
- 30.



- fato magnésico (x 7 H<sub>2</sub>O), 1,0 mg de sulfato de -  
hierro (x 7 H<sub>2</sub>O), 0,15 mg de sulfato de cobre -  
(x 5 H<sub>2</sub>O), 1,0 mg de sulfato de zinc (x 7 H<sub>2</sub>O),  
1,0 mg de sulfato de manganeso (x H<sub>2</sub>O) y 0,1 mg-  
5. de manganato sódico, completándose la mezcla has-  
ta 1.0 litro de agua desmineralizada. Se extrac-  
ta un litro de líquido de cultivo con acetato -  
etílico en forma análoga en la descrita en el -  
ejemplo 2. Se lavan los extractos dos veces, ca-  
10. da vez con 50 ml. de una solución 2N de hidróxido  
sódico y 2 veces cada vez con 50 ml de agua y -  
luego se evaporan en un vacío. Se obtienen 142 -  
mg de extracto en bruto que indica 3 manchas en  
la cromatografía de capa delgada, de las cuales  
15. 2 corresponden a la Verrucarina A y la Verrucari-  
na B. Se cromatografía el extracto sobre 7 g de  
gel de sílice con fines de mayor purificación, -  
utilizándose 15 ml de disolvente o fracción para  
la elución. Las fracciones 1-8 [eluidas con bence-  
20. no, cloruro metilénico y cloruro metilénico/meta-  
nol (99:1)] rinden 54 mg de material amorfo (de-  
sechado). La fracción 9 [6,5 mg eluidos con clo-  
ruro metilénico/metanol (99:1)] rinde 0,5 mg de  
Verrucarina A cristalina (que aún contiene Verru-  
25. carina B) a partir de éter. Las fracciones 10-14  
[eluidas con cloruro metilénico/metanol (99:1)]  
y 15-20 [eluidas con cloruro metilénico/metanol  
(98:2)] rinden 28 mg de material amorfo, en el -  
que se pueden comprobar cantidades adicionales -  
30. de Verrucarina A y B por medio de la cromatogra-



fía en capa delgada.

284072

EJEMPLO 4: Producción y aislamiento de Verrucarina A y Verrucarina B en bruto.

- Se incuba la cepa S 118 bajo las condiciones indicadas en el ejemplo 1 en la solución nutritiva de Weindling, descrita en el ejemplo 3. Con el fin de separar el micelio, se filtran 890 ml del líquido de cultivo, se sacude el filtrado claro dos veces, cada vez con 1 litro de acetato etílico, se lavan los extractos una vez con agua, dos veces con una solución 2N de hidróxido sódico y nuevamente dos veces con agua y se evaporan en un vacío. Se obtienen 428 mg de un producto en bruto de color amarillo, el que indica dos manchas en la cromatografía de capa delgada (procedimiento descrito en el ejemplo 1) las que corresponden a la Verrucarina A y Verrucarina B. Se cromatografía el producto en bruto sobre 25 g de gel de sílice con fines de mayor purificación. (Procedimiento análogo al descrito en el ejemplo 1). Se obtienen 3,5 mg de Verrucarina A cristalina en bruto (que aún contiene Verrucarina B).

EJEMPLO 5: Producción y comprobación de la Verrucarina A y Verrucarina B.

- Se incuba la cepa S 118 bajo las condiciones descritas en el ejemplo 1. La extracción y ulterior preparación de 780 ml de líquido de cultivo se lleva a cabo en forma análoga a la descrita en el ejemplo 1. Se obtienen 44 mg de extracto en acetato etílico en bruto (de color par



do) que indica dos manchas en la cromatografía de capa delgada (procedimiento descrito en el ejemplo 1), las que corresponden a la Verrucarina A y Verrucarina B.

5. EJEMPLO 6: Producción y aislamiento de la Verrucarina A, Verrucarina B y Roridina A en bruto.

- Se cultiva la cepa S 750 en un fermentador de 7 litros (New Brunswick Co., New Brunswick EE.UU., tipo FS 307) con 5 litros de solución nutritiva (solución nutritiva de Richard, descrita en el ejemplo 1), mientras se somete a aeración y se agita (300 r.p.m.) a 27°C. Después de separar el micelio por filtración, se extractan 4,1 litros de filtrado de cultivo de color amarillo claro tres veces, cada vez con 5 litros de acetato etílico, se lavan los extractos combinados una vez con 1 litro de agua y se concentran a 500 ml en un vacío. Luego se lava la solución concentrada tres veces, cada vez con 100 ml de una solución 2N de hidróxido sódico y tres veces, cada vez con 100 ml de agua a 0°C y se evapora en un vacío. Se obtienen 680 mg de un producto en bruto de color amarillo. Este se purifica por cromatografía sobre 30 g de gel de sílice. Se requieren 60 ml de disolvente por fracción para la elución. Las fracciones 1-10 (eluidas con benceno y cloroformo) rinden 318 mg de aceite (desechado). La fracción 11 [81 mg eluidos con cloroformo/metanol (99:1)] rinde 34 mg de Verrucarina A cristalina a partir de éter,



- la cual es homogénea de acuerdo con la cromatografía de capa delgada (descripción en el ejemplo 1). Se cristalizan 11 mg de una mezcla consistente de Verrucarina A y Roridina A a partir de éter del licor madre. Las fracciones 12-16 [152-mg eluidos con cloroformo/metanol (99:1)] rinden 61 mg de una mezcla cristalina a partir de éter, la cual de acuerdo con la cromatografía de capa delgada, consiste principalmente de Verrucarina A, pero aún contiene Verrucarina B y Roridina A. Los licores madres combinados de las fracciones 11-16 (125 mg) aún contienen aproximadamente 30 mg de Verrucarina A y 30 mg de Roridina A. Las fracciones 17-23 [eluidas con cloroformo/metanol (99:1) (98:2) y (1:1) rinden 79 mg de material amorfo. (Desechado).

EJEMPLO 7: Producción y aislamiento de Roridina A.

- Se cultiva la cepa S 973, *myrothecium roridum*, en un fermentador (New Brunswick Co., New Brunswick EE.UU. tipo FS 307), conteniendo 5 litros de solución nutritiva consistente de 20 g de glucosa puriss, Ph.H.V., 2,0 g de extracto de malta, Swiss Ferment Ltd., 2,0 g de extracto de levadura Difco, 2,0 g de peptona Gudahay, 2,0 g de fosfato potásico primario, 2,0 g de sulfato magnésico (x 7 H<sub>2</sub>O), 0,2 g de sulfato de hierro (x 7 H<sub>2</sub>O) mientras se somete a aeración (5 litros por minuto) y mientras se agita (300 r.p.m.). Después de separar el micelio por filtración, la solución clara de color amarillo que queda, la cual

284072



- tiene un valor pH de 6, se extracta tres veces, cada vez con 5 litros de acetato etílico. Se lavan los extractos combinados una vez con 1 litro de agua, se concentran a 700 ml en un vacío y se lavan tres veces, cada vez con 80 ml de una solución 2N de hidróxido sódico y dos veces cada vez con 80 ml de agua a 0° y luego se evapora. Los 5,7 g de producto amarillo en bruto que se obtiene, rinden 105 mg de Roridina A cristalina con un punto de fusión de 190-195° a partir de acetona/éter. (Homogénea de acuerdo con la cromatografía de capa delgada). Se cromatografían los licores madre (5,6 g) sobre 250 g de gel de sílice, requiriéndose 250 ml de disolvente por fracción para la elución. Las fracciones 1-10 [eluidas con benceno, cloroformo y cloroformo/metanol (99.5:0.5)] rinden 2,32 g de producto oleoso (desechado). Las fracciones 11-21 [2,45 g eluidos con cloroformo/metanol (99:1)] rinden 1,2 g de Roridina A cristalina en bruto a partir de cloroformo/metanol (97:3), la cual de acuerdo con la cromatografía de capa delgada, aún contiene algo de Verrucarina A y una sustancia A que no pudo ser identificada. Después de cristalizar a partir de acetona/éter/éter de petróleo, se obtienen 428 mg de Roridina A cristalina, de un punto de fusión de 191-196°, 166 mg de Roridina A cristalina que aún contiene trazas de sustancia A, así como 218 mg de una mezcla cristalina de Roridina A y sustancia A en -
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



la proporción de 1:1.

La Roridina A se obtiene en forma de prismas incoloros de un punto de fusión de 191-196° después de re cristalizar a partir de acetona/éter.

EJEMPLO 8: Producción y aislamiento de Verrucarina A, Verrucarina B y Roridina A en bruto.

10. Se cultiva la cepa S 1135 (saltante de la cepa S 973) en la solución nutritiva descrita en el ejemplo 7 en un fermentador de 50 litros (sistema Ultramix tipo FU 005, Hch. Bertrams Ltd., Basilea, Suiza) mientras se agita (1450 r.p.m.) y se somete a aeración (50 litros por minuto) a una presión de 1,4 atmósferas. Luego se filtra el líquido de cultivo (50 litros) después de la adición de tierra de diatomeas (Gelite) como auxiliar de filtración, se extracta el filtrado de cultivo claro de color amarillo seis veces, cada vez con 40 litros de acetato etílico y se lavan los extractos con agua. La mezcla de micelio/tierra de diatomeas se homogeniza después de la adición de agua y se agita tres veces, cada vez con 10 litros de acetato etílico. Los extractos que se obtienen después de filtrar y lavar con agua, se combinan con los extractos en acetato etílico del filtrato de cultivo y se concentran en un vacío hasta un volumen de aproximadamente 5 litros. Después de lavar una vez con 1 litro de una solución 2N de hidróxido sódico y dos veces, cada
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

284072

11 DE



- vez con 0,5 litros de agua, se evapora la mezcla hasta sequedad en un vacío. El residuo resultante (206 g) rinde 78 g de cristalizado en bruto después de la adición de éter, el cual, de acuerdo con la cromatografía de capa delgada (procedimiento descrito en el ejemplo 1), consiste esencialmente de Roridina A, aunque ésta aún contiene Roridina C, Verrucarina A y Verrucarina B. Quedan 128,5 g de residuo I del licor madre. Se recoge el cristalizado el bruto (78 g) en metanol y se filtra. Las porciones que son insolubles en metanol (2,5 g) representan un cristalizado que esencialmente consiste de Roridina C, aunque aún contiene Verrucarina A, como impureza. Las porciones que son solubles en metanol se evaporan y el residuo se recristaliza fraccionadamente a partir de metanol/éter, proporcionando los compuestos siguientes: 1) 33,9 g de Roridina A cristalina, pura, 2) 26,0 g de Roridina A cristalina que aún contiene algo de Roridina C, Verrucarina A y compuesto A, y 3) 15,6 g de residuo II de licor madre. Los compuestos 2 y 3 se combinan con el residuo I de licor madre (144 g) y se disuelven en 520 ml de una mezcla de cloroformo/benceno (3:1). Se cromatografían 260 ml de esta solución (correspondiendo a 72 g de residuo de licor madre) sobre 3,77 kg de gel de sílice en forma análoga a la descrita en el ejemplo 1. Se obtiene 1.2 g de Verrucarina A cristalina pura de las fracciones
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



eluidas con cloroformo/metanol (95:5) por cristalización a partir de éter.

EJEMPLO 9: Producción y aislamiento de Roridina

A. Roridina B. Roridina C. Verrucarina A y Verrucarina C.

5. Se incuba la cepa S 1135 myrothecium roridum en un fermentador de 10 litros (sistema Ultramix, tipo FU 001, Hch. Bertrams Ltd., Basilea, Suiza), sometida a aeración con 10 litros de aire por minuto a una presión de 1,4 atmósferas y a una temperatura de 27°C en la solución nutritiva siguiente: 30,0 g de glucosa puriss., Ph.H.V., 1,0 g de extracto de levadura Difco, 4,0 g de nitrato amónico, 2,72 g de fosfato potásico primario, 1,23 g de sulfato magnésico (x 7 H<sub>2</sub>O), 0,028 g de sulfato de hierro (II) (x 7 H<sub>2</sub>O), 0,003 g de sulfato de zinc (x 7 H<sub>2</sub>O). Se filtra el líquido de cultivo (10 litros) a través de una capa de tierra de diatomeas (Celite) y se extrae el filtrado de cultivo claro de color amarillo, tres veces, cada vez con 10 litros de acetato etílico. Se lavan los extractos con 1 litro de agua y se evaporan completamente en un vacío. Se disuelve el residuo en un litro de cloroformo y se lava la solución tres veces, cada vez con 100 ml de una solución 2N de hidróxido sódico y cuatro veces cada vez con 100 ml. de agua. Después de evaporar la solución clorofórmica lavada, se obtienen 12,0 g de producto en bruto de color amarillo, que se cromatogra-
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



fían sobre 250 g de gel de sílice con fines de mayor separación.

- Cromatografía I: Se requieren 500 ml de disolvente por fracción para la elución. Las fracciones 1 y 2 (eluidas con benceno) contienen 7,88 g de aceite (desechado). Las fracciones 3-6 (482 mg eluidos con cloroformo) rinden a partir de éter o éter de petróleo, 23, mg de Roridina B cristalina de un punto de fusión de 140-147°; la que de acuerdo con la cromatografía de capa delgada es homogénea. Las fracciones 7 y 8 [eluidas con cloroformo/metanol (99:1)] rinden 101 mg de material amorfo (desechado). Las fracciones 9 y 10 [1.48 g eluido con cloroformo/metanol (99:1)] rinden 646 mg de cristales de un punto de fusión de 122-143° a partir de éter. Después de recristalizar a partir de acetona/éter, se obtienen 400 mg de cristalizado consistente de Roridina A, conteniendo Verrucarina A y Roridina C y teniendo un punto de fusión de 130-138°. La ulterior separación del cristalizado se lleva a cabo por medio de la cromatografía II (ver abajo). La fracción 11 [305 mg eluidos con cloroformo/metanol (99:1)] rinde 106 mg de Roridina A cristalina a partir de éter, la que aún contiene trazas de impurezas. La ulterior purificación de la Roridina A se lleva a cabo por medio de la cromatografía III y la de los licores madre por medio de la cromatografía II. Las fracciones 12-20 [eluidas con cloroformo/metanol (99:1)(98:2) y (1:1)]
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



no rinden cristales. La ulterior purificación de las fracciones 12 y 13 (330 mg) se lleva a cabo por medio de la cromatografía II.

Cromatografía II: Los residuos de los li

5. cores madre de las fracciones 9, 10 y 11, y las fracciones 12 y 13 se combinan, dando un total de 1,39 g de compuesto, y se cromatografían con 700 g de tierra de diatomeas/agua (1:1) como la fase estacionaria y con los siguientes disolventes saturados con agua (200 ml por fracción) como la fase móvil. Las fracciones 1-19 [eluidas con benceno y benceno/cloroformo (95:5)] rinden 269 mg de material amorfo (desechado). Las fracciones 20-25 [91 mg eluidos con benceno/cloroformo (95:5)] rinden 13 mg de Verrucarina B pura y cristalina, a partir de éter. Las fracciones 26-30 [eluidas con benceno/cloroformo (95:5)] rinden 62 mg de material amorfo (desechado). Las fracciones 31-38 [130 mg eluidos con benceno/cloroformo (95:5)] rinden 12 mg de Verrucarina A cristalina y pura, a partir de éter. Se obtienen 20 mg de Roridina C cristalina y pura, de un punto de fusión de 117-121° de los licores madre por medio de la cristalización con éter. Las fracciones 39-43 [60 mg eluidos con benceno/cloroformo (95:5)] rinden 28 mg de Verrucarina A pura y cristalina y 17 mg de Roridina C pura y cristalina después de recrystalizar fraccionadamente a partir de éter. Los licores madre contienen Verrucarina B y Roridina C. Las fracciones 44-75

11E  
284072



- [269 mg eluidos con benceno/cloroformo (95:5) - (9:1) y (4:1)] rinden 48 mg de Verrucarina A y cristalina después de cristalizar fraccionada - mente. Los licores madre contienen Verrucarina B y Roridina C. Las fracciones 76-125 [eluidas con benceno/cloroformo (1:1) y cloroformo] rinden 526 mg de material amorfo (desechado). Las fracciones 126-133 [350 mg eluidos con cloroformo/acetato etílico (9:1)] rinden 305 mg de Roridina A pura y cristalina, de un punto de fusión de 194-202°, a partir de éter. Las fracciones 134-159 [eluidas con cloroformo/acetato etílico (9:1) (4:1) y acetato etílico] rinden 278 mg de material amorfo (desechado).
15. Cromatografía III: Se cromatografía 800 mg de la mezcla cristalina de las fracciones 9-11 de la cromatografía I, sobre 80 g de óxido aluminico. Se requieren 100 ml de disolvente por fracción para la elución. Las fracciones 1-11 (eluidas por cloroformo) rinden trazas de material amorfo (desechado). Las fracciones 12-21 [eluidas con cloroformo/metanol (99.5:0.5)] rinden 200 mg de una mezcla cristalina de Roridina A y Roridina C a partir de éter. Las fracciones 22-51 [eluidas con cloroformo/metanol (99:1)] rinden 432 mg de Roridina A cristalina y homogénea, a partir de éter. Las fracciones 52-67 [eluidas con cloroformo/metanol (95:5) (9:1) y (4:1)] rinden 46 mg de material amorfo (desechado).
- 30.

11 EN



EJEMPLO 10: Producción y aislamiento de Verrucarina A y Verrucarina B en bruto así como de Verrucarina C y Roridina B.

5. Se incuba la cepa S 118 como cultivo estático de superficie en matraces Erlenmeyer de 500 ml, conteniendo cada uno 100 ml de la solución nutritiva descrita en el ejemplo 7 y conteniendo además 3,0 g de cloruro amónico por litro, a 27°C. Se separa el micelio del licor de cultivo por filtración.
10. Extractando de 30 litros de licor de cultivo con acetato etílico, se obtienen 14 g de extracto en bruto. Se disuelven 12,7 g de este extracto en 1,5 litros de cloroformo y se lava la solución tres veces, cada vez con 150 ml de una solución de 2N de hidróxido sódico y 2 veces cada vez con 150 ml de agua a 0°C y se evapora. Se obtiene 9,5 g de producto en bruto, neutro, que se cromatografía sobre 250 g de gel de sílice, requiriéndose 400 ml de disolvente por fracción para la elución.
15. Las fracciones 1-10 [eluidas con cloroformo y cloroformo/metanol (99.5:0.5)] rinden 1,46 g de material amorfo (desechado). Las fracciones 11-20 [4,324 g eluidos con cloroformo/metanol (99:1)] rinden 200 mg de Verrucarina A cristalina, en bruto, la que aún contiene Verrucarina B. Las fracciones 21-30 [eluidas con cloroformo/metanol (98:2) (9:1)] rinden 4,21 g de material amorfo (desechado). Los residuos de los licores madre de las fracciones 11-20 (3,56 g) se cromatografían sobre óxido aluminico neutro de actividad II (descrito en Brockmann
- 20.
- 25.
- 30.



- Chemische Berichte Vol. 74 p. 73, 1941) con fines de mayor purificación. Se requieren 400 ml de disolvente por fracción para la elución. La fracción 1 [1,54 g eluido con cloroformo/benceno (4:1)] rinde 25 mg de Verrucarina A cristalina en bruto (conteniendo aún Verrucarina B) a partir de éter. Las fracciones 2-19 [eluidas con cloroformo/benceno (4:1), cloroformo, cloroformo/metanol (99:1)(98:2) y (95:5)] rinden 1,54 g de material amorfo (desechado). La fracción 20 [61 mg eluidos con cloroformo/metanol (3:1)] rinde 8 mg de cristales de un punto de fusión de 226-228° a partir de metanol/éter. Después de recristalizar a partir de acetona/éter, se obtiene Verrucarina C pura en forma de prismas de un punto de fusión de 223-224°.
- Extracción del micelio: Se extrae el micelio que ha sido secado, tres veces, cada vez con 2 litros de metanol y tres veces con 200 ml de agua durante el transcurso de 45 minutos a 40-50°, se filtra y se evapora. Luego se divide el residuo (12,8 g) entre 500 ml de agua y 1 litro de acetato etílico y se sacude la fase acuosa otras tres veces, cada vez con un litro de acetato etílico. Los extractos en acetato etílico evaporados rinden 5,20 g de aceite parto, el que se cromatografía luego sobre 120 g de gel de sílice en forma análoga a la descrita arriba. Por medio de la cristalización a partir de éter, se obtienen 41 mg de Roridina B pura y cristalina en forma de agujas de un punto de fusión de 147-152°, a partir de las fracciones
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



- (157 mg) eluidas con cloroformo/metanol (99.5:0.5). De las fracciones posteriores eluidas con cloroformo/metanol (99:1), cristalizan 16 mg de Verrucarina A en bruto (que aún contiene Verrucarina B), a partir de éter.
- 5.

EJEMPLO 11: Producción y aislamiento de Verrucarina A, Verrucarina B y Roridina B en bruto.

10. Se incuba la cepa S 118 en la solución nutritiva descrita en el ejemplo 10, en un fermentador de 50 litros (ejemplo 7) mientras se agita (1450 r.p.m.) y bajo constante aeración (0,8 litros por minuto por litro de solución nutritiva) durante 63 horas. Después de añadir tierra de diatomeas (Ce<sup>1</sup> ite) se extrae el licor de cultivo con un total de 22 litros de acetato etílico (separación de las fases en una centrífuga). Después de concentrar los extractos en un vacío hasta cuatro litros, se lava la mezcla 4 veces, cada vez con 400 ml de una solución 2N de hidróxido sódico y 3 veces, cada vez, con 300 ml de agua y luego se evapora. Se obtienen 19,5 g de extracto en acetato etílico, purificado. Por cristalización a partir de éter se obtienen 2,31 g de Verrucarina A cristalina en bruto (conteniendo aún Verrucarina B). Los licores madre (17,2 g) se cromatografían sobre 850 g de gel de sílice, requiriéndose 1,7 litros de disolvente por fracción para la elución. La fracción 1 (7,0 g eluidos con benceno) rinde 19 mg de cristales de un punto de fusión de 237-239° (no identi-
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



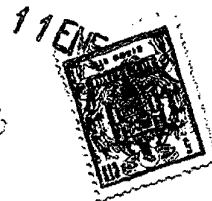
- ficados) a partir de éter/éter de petróleo. Las fracciones 2-6 (4,15 g eluidos con cloroformo)-rinden 60 mg de verrucarina B cristalina en forma de agujas de un punto de fusión de 139-143° a -
5. partir de éter/éter de petróleo. Las fracciones 7-10 [eluidas con cloroformo/metanol (99:1)] -rinden 1,09 g de material amorfo (desechado). -
- Las fracciones 11-18 [3,25 g eluidos con cloroformo/metanol (98:2)] rinden 2,18 g de Verrucarina A cristalina en bruto (conteniendo aún Verrucarina B) a partir de éter. Las fracciones--restantes se desechan.
- 10.

EJEMPLO 12. Producción y aislamiento de Verrucarina A, Verrucarina B y Verrucarina

15.

D.

- Se incuba la cepa S 833 en forma de cultivo agitado en un medio conteniendo por litro de mezcla 30 g de azúcar de caña, 2,5 g de cloruro amónico, 1,0 g de fosfato potásico primario, 0,5 g de sulfato magnésico ( $x 7 H_2O$ ), 0,5 g de cloruro potásico, 0,01 g de sulfato de hierro ( $x 7 H_2O$ ) y agua, en forma análoga a la descrita en el ejemplo 1..Se extractan 900 ml de licor de cultivo con 2 litros de acetato etílico.
20. El extracto rinde 243 mg de productos oleosos en bruto después de lavar con agua, una solución 2 N de hidróxido sódico y agua y después de evaporar en un vacío. Luego se cromatografía el producto en bruto sobre 12 g de gel de sílice.
25. Después de re cristalizar las fracciones, -
- 30.



- eluidas con cloroformo, se obtiene a partir de éter/éter de petróleo, 2 mg de Verrucarina D - pura en forma de agujas de un punto de fusión de 127-128°. En la cromatografía de capa delgada la Verrucarina D y la Verrucarina A fluyen a aproximadamente la misma velocidad. Se obtienen 38 mg de Verrucarina A cristalian en bruto, que aun contiene Verrucarina B, de las fracciones siguientes que se eluyen con cloroformo/metanol (99:1).
5. EJEMPLO 13: Separación de Verrucarina cristalina en bruto (conteniendo Verrucarina B) en Verrucarina A y Verrucarina B pura.
10. 9,55 g de Verrucarina cristalina en bruto (conteniendo Verrucarina B) se someten a cromatografía de partición sobre 5,4 kg de tierra de diatomeas/agua (1:1). Los disolventes requeridos para la elución se saturan con agua (1,2 litros por fracción). Las fracciones 1-20 [eluidas con benceno y benceno/cloroformo (95:5)] rinden 445 mg de material oleoso (desechado). Las fracciones 21-34 [1.20 g eluido con benceno/cloroformo (95:5)] rinden 747 mg de Verrucarina B cristalina y pura (homogénea de acuerdo con la cromatografía de capa delgada) a partir de acetona/éter. Las fracciones 35-37 [172 mg eluidos con benceno/cloroformo (95:5)] rinden 126 mg de mezcla cristalina conteniendo aproximadamente 50 % de Verrucarina A y aproximada -
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

284072



- mente 50 % de Verrucarina B, a partir de acetona/éter. Las fracciones 38-40 [eluidas de benceno/cloroformo (95:5)] rinden 406 mg de compuesto, consistente principalmente de Verrucarina A
5. (producto principal) y 3 a 4 sub-productos no identificables. Las fracciones 41-84 [8,6 g eluidos con benceno/cloroformo (9:1) (8:2) (3:2) - (7:3) y cloroformo] rinden 6,13 g de Verrucarina A cristalina y pura (homogénea de acuerdo con la cromatografía de capa delgada) a partir de acetona/éter..
- 10.

EJEMPLO 14: Cromatografía de capa delgada de las Verrucarinas y Roridinas.

- La cromatografía de capa delgada se lleva a cabo de acuerdo con métodos conocidos.
- 15.



284072

Valores Rf

| Compuesto     | Valores Rf |      |      | Reacción cromática con iodo | Color en luz ultravioleta. |
|---------------|------------|------|------|-----------------------------|----------------------------|
|               | 1)         | 2)   | 3)   |                             |                            |
| Verrucarina A | 0,70       | 0,28 | 0,59 | amarillo-pardo.             | claro                      |
| Verrucarina B | 0,83       | 0,47 | 0,69 | amarillo-pardo              | claro                      |
| Verrucarina C | 0,74       | 0,28 | 0,59 | amarillo-pardo              | claro-luminoso             |
| Verrucarina D | 0,70       | 0,28 | 0,59 | amarillo-pardo              | Oscuro                     |
| Verrucarina E | --         | --   | 0,91 | Violeta                     | Oscuro                     |
| Roridina A    | 0,70       | 0,18 | 0,55 | Amarillo-pardo              | Oscuro                     |
| Roridina B    | 0,55       | 0,36 | 0,41 | Verde-negro                 | Oscuro                     |
| Roridina C    | --         | --   | 0,42 | Amarillo-pardo              | Oscuro                     |

- 1) Soporte: óxido aluminico      Agente de elución: cloroformo/metanol (98:2)
- 2) Soporte: gel de sílice        Agente de elución: cloroformo/metanol (98:2)
- 3) Soporte: gel de sílice        Agente de elución: cloroformo/metanol (97:3)

284072



NOTAS

- Descrita suficientemente la naturaleza -  
del invento, así como la manera de realizarlo en  
la práctica, debe hacerse constar que las disposi -  
ciones anteriormente indicadas, son susceptibles  
de modificaciones de detalle, en cuanto no alte -  
ren su principio fundamental. También se hace -  
constar que el invento corresponde a una solici -  
tud de Patente presentada en Suiza con fecha 12 -  
de enero de 1962, bajo el nº 360/62, acogiéndose,  
por lo tanto, a los beneficios que conceden los -  
Convenios Internacionales en vigor y siendo lo -  
que constituye la esencia del referido invento y  
por lo que se solicita Patente de Invención por 20  
años, en España "Procedimiento para la producción  
de sustancias antibióticamente activas", caracte -  
rizándose por lo siguiente:
- 1ª. "Procedimiento para la producción de  
sustancias antibióticamente activas" a partir de  
líquidos de cultivo o micelios de cepas de la es -  
pecie de hongo myrothecium verrucaria (Albertini  
y Schweinitz) Ditmar ex Fries o myrothecium rori -  
dum Tode ex Fries, caracterizado porque se somete  
la mezcla a partición, adsorción cromatográfica -  
y cromatografía de partición.
  - 2ª. "Procedimiento para la producción de -  
sustancias antibióticamente activas," tal y como  
queda substancialmente descrita en la presenteMemo -  
ria.
- Esta Memoria consta de 43 hojas escritas



a máquina por una sola cara.

Madrid, 11 ENE 1963  
SANDOZ, A.G.

J. GOMEZ ALEBO Y MOSTR

A large, stylized handwritten signature or scribble, possibly reading 'J. Gomez Alebo y Mostre', written in dark ink over the typed name.

284072



IR SPECTRA

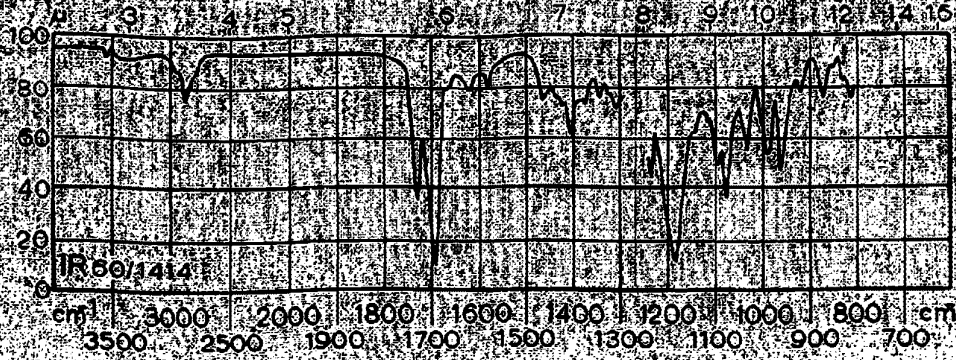


FIG. 1

284072

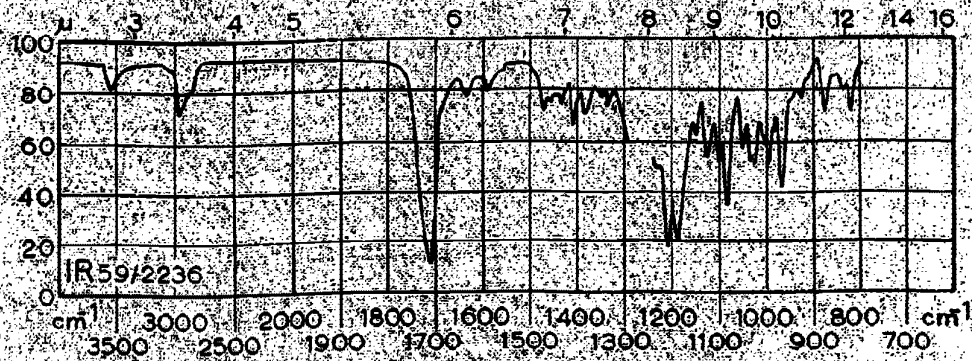


FIG. 2

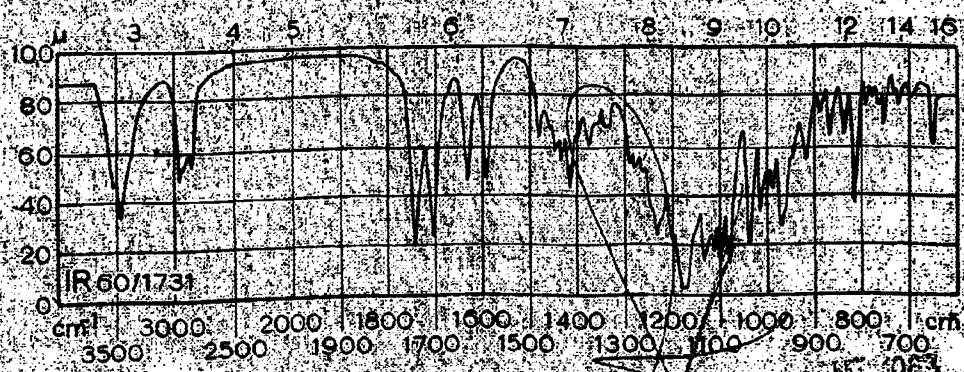


FIG. 3

MASSA  
 S. G. BENEDETTI  
 1963