

PATENTE DE INVENCION

27



Case 1818

37/BA/MK.

302284

Memoria Descriptiva

sobre

"Procedimiento para la producción de antibióticos a partir de hongos del género *Rhizoctonia*".

Solicitante: S A N D O Z, A.G., entidad suiza,
residente en Basilea, Suiza.

La presente invención se relaciona con un nuevo antibiótico, denominado en lo sucesivo Rhi 12-648, sus derivados di-O-acílicos y di-O-alquílicos, y con un procedimiento para su producción.

5.



La presente invención proporciona el antibiótico Rhi 12-648, descrito más adelante, y sus derivados di-O-acílicos y di-O-alquílicos.

- La presente invención proporciona además un procedimiento para la producción del antibiótico Rhi 12-648, descrito en la presente, caracterizado porque se cultiva en una solución nutritiva una de las tres cepas S 1440, S 1476 y S 1484 del género *Rhizoctonia* (Fungi imperfecti),
5. o una mutante de las mismas, y se aísla dicho antibiótico de dicha solución. Las tres cepas concuerdan morfológicamente entre sí y fueron aisladas de muestras de tierra de Cerdeña:
10. S 1440 Teulada : Rio Chia
15. S 1476 Baunei
- S 1484 Teulada - Giba
- Estas tres cepas se conservan en nuestros laboratorios. Sobre la mayoría de los medios nutritivos de agar (patata-dextrosa-agar, agar de malta
20. u otros medios nutritivos enriquecidos) estas cepas forman un micelio aéreo de color gris pálido a pardo grisáceo o gris oscuro y la parte inferior de los cultivos tiene una apariencia negra. Las hifas tienen un espesor de 1.5 a 3 μ , son hialinas y divididas en septos y a veces estos septos
25. de las hifas son ásperos. En la superficie del agar se forman clamidosporos de color pardo; generalmente éstos forman de 9 a 20 estructuras esclerosas (manojos de células). Las células individuales (clamidosporos) son de color pardo, irregu-
- 30.

302284



-3-

lares, redondas o redondeadas, poliédricas y cada una de ellas mide de 7.5 a 13 μ . Juzgando por su morfología, las cepas pertenecen al género *Rhizoctonia* (Fungi imperfecti).

5. El cultivo del antibiótico del presente invento puede efectuarse a una temperatura de aproximadamente 12° a aproximadamente 30°C, mediante la técnica del cultivo estático de superficie o la técnica del cultivo sumergido con agitación, o
10. en un fermentador con introducción de aire u oxígeno y agitación.

Para la producción del antibiótico del presente invento también es posible usar, en lugar de las cepas S 1440, S 1476 y S 1484 arriba indicadas, otras cepas que pueden ser obtenidas fácilmente de éstas, por ejemplo por selección o mutación mediante rayos ultravioleta o rayos X, u otros medios, por ejemplo por tratamiento de cultivos de laboratorio con productos químicos adecuados.
- 15.
20. El antibiótico del presente invento puede ser aislado de la solución nutritiva mediante los procedimientos técnicos más adelante descritos y, si se desea, puede ser convertido en un derivado etérico o acílico del mismo. Así, Rhi
25. 12-648 puede ser acilado para dar el correspondiente derivado acílico con un derivado reactivo de un ácido sulfónico o un ácido mono-carboxílico o dicarboxílico saturado o no saturado. Son ejemplos de tales derivados reactivos los anhídridos
30. de ácido, haluros de ácido o mezclas de los mismos.

302284



-4-

Rhi 12-648, por ejemplo, puede ser convertido con anhídrido acético en su diacetato o puede ser convertido con un haluro alquílico o sulfato dialquílico en un derivado etérico, por ejemplo con diazometano puede ser convertido en el éter dimetilico.

5.

Las cepas de hongo S 1440, S 1476 y S 1484 pueden ser cultivadas sobre diversos medios nutritivos que contienen las sustancias nutritivas usuales. Por ejemplo, son sustancias nutritivas

10.

adecuadas para estas cepas de hongo las sustancias nutritivas generalmente usadas para organismos carbono-heterotróficos; ejemplos específicos de la fuente de carbono son: glucosa, almidón, dextrina, lactosa y azúcar de caña; como fuente de

15.

nitrógeno pueden usarse compuestos orgánicos e inorgánicos conteniendo nitrógeno, siendo ejemplos específicos la peptona, extractos de levadura y carne, sulfato amónico, nitrato amónico y aminoácidos; las sales minerales usuales y oligoelementos también son adecuados para usarse en el medio nutritivo.

20.

El procedimiento del invento puede llevarse a cabo como sigue: Se inocula un medio nutritivo con un cultivo de una de las tres cepas de hongo S 1440, S 1476 o S 1484 y se incuba, por ejemplo a la temperatura ambiente durante 2 a 25 días. Tan pronto como se ha producido la cantidad máxima de antibiótico Rhi 12-648, se lleva a cabo la filtración y se separa el antibiótico del presente invento del medio de cultivo mediante métodos

25.

30.

302284



-5-

- de extracción o adsorción en forma de por sí conocida. Un método especialmente adecuado para aislar el antibiótico del presente invento es la extracción con acetato etílico, pero también pueden usarse otros disolventes orgánicos, por ejemplo bencina, benceno, acetato butílico, cloroformo o butanol; a continuación se separan los extractos del disolvente y se purifica el residuo cromatográficamente mediante agentes de adsorción, por ejemplo alúmina activada, gel de sílice o silicato magnésico, o mediante la distribución a contracorriente.
5. usarse otros disolventes orgánicos, por ejemplo bencina, benceno, acetato butílico, cloroformo o butanol; a continuación se separan los extractos del disolvente y se purifica el residuo cromatográficamente mediante agentes de adsorción, por ejemplo alúmina activada, gel de sílice o silicato magnésico, o mediante la distribución a contracorriente.
10. ejemplo alúmina activada, gel de sílice o silicato magnésico, o mediante la distribución a contracorriente.

El antibiótico Rhi 12-648 tiene las siguientes características:

15. Punto de fusión, determinado en un microscopio calefactor, 197-199°C (sin corregir). $[\alpha]_D^{22} = +207^{\circ}$ (c = 1.57 en CHCl₃).
Espectro ultravioleta: máximo a 265 mμ / log ε = 4.17 en metanol (véase la figura 1 de los dibujos diagramáticos que se acompañan).
20. Espectro infrarrojo: bandas a 3100, 2980, 1655, 1572, 1430, 1352, 1310, 1245, 1110, 1045, 983, 925, 845 cm⁻¹ (KBr) (véase la figura 2 de los dibujos).
Espectro de resonancia magnética nuclear: inter alia un dublet a δ = 1.52 ppm (3 protones) y un singlet a δ = 6.68 ppm (1 protón). (Me₄Si: δ = 0.00 ppm).
Con fines de análisis se efectuó el secado durante 12 horas a 25°C y 0.01 mm Hg.
25. C₁₈H₁₇O₆Cl calculado C 59.3 H 4.7 O 26.3 Cl 9.7%
(364.8) hallado C 59.1 H 4.6 O 25.1 Cl 10.0%
- 30.

302284



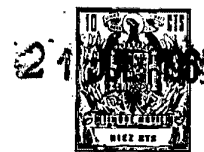
-6-

C 59.4 H 4.6 O 25.6 Cl 9.9%

La determinación termoeléctrica del peso molecular dió valores de 368 y 382 $\pm 2\%$ respectivamente.

- Reacciones cromáticas: una solución metanólica de Rhi 12-648 adquiere una coloración violeta fuerte después de la adición de solución acuosa de FeCl_3 . En NaOH 2N se obtiene una coloración rojo-amarillenta y con H_2SO_4 concentrado una coloración violeta-parduzco.
- 5.
10. El éter dimetílico del antibiótico Rhi 12-648 tiene las características siguientes: Punto de fusión $187-189^\circ\text{C}$. Espectro ultravioleta: máximo a $277 \text{ m}\mu$ ($\log \xi = 4.21$) en metanol (véase la figura 3 de los dibujos).
15. Espectro infrarrojo: bandas a 2950, 1720, 1650, 1595, 1470, 1340, 1270, 1215, 1085, 920, 870 cm^{-1} (KBr) (véase la figura 4 de los dibujos). Espectro de resonancia magnética nuclear: inter alia, dublet a $\delta = 1.53 \text{ ppm}$ (3 protones) singlet a $\delta = 3.85 \text{ ppm}$ (3 protones) singlet a $\delta = 3.92 \text{ ppm}$ (3 protones) singlet a $\delta = 6.52 \text{ ppm}$ (1 protón).
20. Con fines de análisis se efectuó el secado en un alto vacío a 25°C durante 12 horas.
25. $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{Cl}$ calculado C 61.2 H 5.3 O 24.4 Cl 9.1% (392.8) hallado C 59.8 H 5.2 O 24.2 Cl 9.4% El éter dimetílico del antibiótico Rhi 12-648 no da coloración alguna con FeCl_3 .
30. El diacetato del antibiótico Rhi 12-648 tiene las siguientes características:

302284



-7-

- Punto de fusión 190-192°C. Espectro ultravioleta: máximo a 277 m μ ($\log \epsilon = 4.15$) en metanol (ver la figura 5 de los dibujos).
- Espectro infrarrojo: bandas a 2950, 1775, 1735, 1667, 1600, 1370, 1265, 1155, 1108, 1052, 1002, 930, 897 y 860 cm^{-1} (KBr) (Véase la figura 6 de los dibujos).
5. Espectro de resonancia magnética nuclear:
- inter alia, dublet a $\delta = 1.55$ ppm (3 protones)
singlet a $\delta = 2.27$ ppm (3 protones)
10. singlet a $\delta = 2.33$ ppm (3 protones)
singlet a $\delta = 7.10$ ppm (1 protón)
- Con fines de análisis se efectuó el secado en un alto vacío a 25°C durante 12 horas.
- $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{O}_8\text{Cl}$ calculado C 58.8 H 4.7 O 28.5 Cl 8.0%
15. hallado C 58.5 H 4.6 O 28.2 Cl 8.1%
- La determinación termoeléctrica del peso molecular dió un valor de 440 $\pm 2\%$.
- El diacetato del antibiótico Rhi 12-648 no da coloración alguna con FeCl_3 .
20. El antibiótico Rhi 12-648 tiene in vitro una marcada acción inhibitoria hacia la levadura y los hongos como puede verse de la Tabla siguiente:

302284

21



-8-

Organismo de prueba	Prueba en placa			Prueba de dilución	
	Método	Conc. #	Inhibición	Método	inhibición #
Saccharomyces cerevisiae ETH M-108 (S 8)	A	2.0	20	M	(4.0)
		2.5	14		
	A	2.5	28	M	4.5
		3.0	25		
3.5		15			
4.0		traza			
Candida tropicalis (Thailandia) candida Wardana-butí-S 1063)	A	2.5	26	M	4.5 (5.0)
		3.0	20		
		3.5	13		
Cryptococcus neoformans Derm.Universitätsklinik Zürich (S 1257)	B	2.0	traza	O	(4.5)
Mucor pusillus (S 450)	A	2.5	25	M	(4.5)
		3.0	15		
		3.5	traza		
Rhizopus nigricans (S 1345)	B	2.0	30	-	-
		2.5	30		
		3.0	--		
Aspergillus fumigatus (S 130)	A	2.0	35	M	4.5
		2.5	30		
		3.0	23		
		3.5	15		
Endothia parasitica (S1248)	B	2.0	35	O	(5.0)
		2.5	28		
		3.0	24		
		3.5	20		
		4.0	9		

Phycomycetes

Phycomycetes

Ascomycetes

302284



1964

-9-

Organismo de prueba	Prueba en placa		Prueba de dilución	
	Método	Conc. * Inhibición	Método	Inhibición **
Fusarium anguioides (S 788)	B	2.0 aprox. 25	0	4.0
		2.5 aprox. 21		(5.0)
		3.0 traza		
Myrothecium verrucaria (S 833)	B	2.0 aprox. 20	0	4.0
		2.5 traza		(5.0)
Penicillium brefeldianum (S 464)	B	2.0 26	0	(4.0)
		2.5 23		
		3.0 15		
		3.5 traza		

F
u
n
g
i

i
m
p
e
r
p
e
c
t
i

Notas explicativas de la Tabla

- * = cifras de concentración como exponentes de los logaritmos decimales negativos, es decir $3.0 = 1:1000$
5. ** = concentración según indicada en *;
- los números sin paréntesis : la menor concentración que aún ejerce un efecto inhibitor total o muy fuerte;
- los números en paréntesis : inhibición más débil pero precisa hasta la concentración indicada.
10. A = lectura después de 16 a 20 horas de incubación a 37°C .
- B = lectura después de 24 a 48 horas de incubación a 27°C .
- 15.

302284



-10-

- M = prueba en caldo de malta al 2%, lectura después de 16 a 20 horas de incubación a 37°C.
5. O = prueba según se indica en M, lectura después de 24 a 48 horas de incubación a 27°C.

Prueba en placa

10. Se prepara una placa de prueba como sigue: Se distribuye parejamente sobre una capa básica de agar estéril de aproximadamente 3 mm de espesor en un platillo de Petri [agar de malta (extracto de malta al 2% obtenido de la Schweiz. Ferment A.G. de Basilea, Suiza)] , una capa germinadora de 1 mm de espesor (agar Difco-Bacto al 2% - organismos de prueba en forma de suspensiones de células o gérmenes) en una concentración adecuada.
- 15.

20. Se midió la acción inhibidora en términos del diámetro de las áreas de inhibición alrededor de discos de papel de filtro con un diámetro de 6 mm, los que fueron impregnados con soluciones del antibiótico Rhi 12-648 en acetona, después de la incubación apropiada de las placas de prueba. La "inhibición" arriba indicada es el promedio del diámetro en milímetros hallado después de haber efectuado varias pruebas a la misma concentración.
- 25.

Prueba de dilución

30. Se diluyó con agua desmineralizada una solución al 1% del antibiótico Rhi 12-648 en acetona. De este modo se produjeron soluciones con

302284



-11-

una concentración diez veces mayor que la concentración requerida, es decir los valores de la Tabla, y en cada tubo de ensayo se introdujo 1/10 del volúmen final (4 ml) en cada tubo de ensayo, es decir 0.4 ml de solución, de modo que la concentración en los tubos de ensayo fué la indicada en la Tabla. Se usaron como suspensiones de gérmenes de prueba cultivos de 2 días, diluidos, cultivados sobre una máquina agitadora a 27°C en el caso de la levadura, y suspensiones de conidios en agua estéril con 0.1% de lauril-sulfonato sódico en el caso de los hongos productores de micelios (y conidios).

El antibiótico Rhi 12-648 tiene además un fuerte efecto inhibitor sobre el aumento de las células tumorales y por lo tanto está indicado su uso como antimitótico. Este efecto se determinó por la inhibición del aumento de las células tumorales in vivo e in vitro (células del mastocitoma P 815 del ratón).

En una solución nutritiva adecuada estas células tumorales se multiplican hasta 4 a 5 veces su número original dentro de 40 horas. La DE-50 (concentración que inhibe este aumento en un 50%) de Rhi 12-648 hacia estas células es de $10^{-7.5}$ g/ml. La toxicidad aguda de Rhi 12-648 sobre el ratón blanco es de 175 mg/kg i.v.

Rhi 12-648 ejerce una acción sedativa e inhibitora de espasmos y por lo tanto está indicado su uso en el tratamiento de diversos desórde-

3.2284

21



-12-

nes psíquicos y neuróticos, por ejemplo perturbaciones del sueño.

- El antibiótico Rhi 12-648 y sus derivados antes indicados pueden ser usados, por ejemplo, en forma de preparaciones farmacéuticas. Estas contienen dichos compuestos en mezcla con un soporte orgánico o inorgánico adecuado para aplicarse en forma entérica, parentérica o local. Con este fin es posible usar materiales que no reaccionan con los compuestos nuevos y que son fisiológicamente aceptables, por ejemplo, gelatina, lactosa, almidón, estearato magnésico, talco, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, goma arábiga, glicoles polialquilénicos, jalea de petróleo, colestestina y otros soportes farmacéuticos conocidos. Las preparaciones farmacéuticas pueden, por ejemplo, tener la forma de tabletas, grageas, polvos, cremas, supositorios o emulsiones; pueden ser esterilizadas y/o pueden contener adyuvantes, por ejemplo agentes de conservación, estabilización, humectación o emulsificación. También pueden contener otras sustancias de valor terapéutico.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.

- Por lo tanto, la presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que contienen, además de un soporte fisiológicamente aceptable, el antibiótico Rhi 12-648 y/o un derivado del mismo tal como se indica en la presente.
- 25.

- En los siguientes Ejemplos no limitativos todas las temperaturas están indicadas en
- 30.

30228421



-13-

grados centígrado.

EJEMPLO 1 : Antibiótico Rhi 12-648

Se incubó una solución nutritiva teniendo un valor pH de aproximadamente 5.6 y conteniendo:

5. 2 g de KH_2PO_4
2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
2 g de extracto de malta, suministrado por la Schweiz. Ferment A.G.
10. 2 g de peptona Cudahy
20 g de Cerelose Sandoz y
agua desmineralizada hasta completar un litro, en un fermentador de 10 litros (New Brunswick Co., New Brunswick, EE.UU., tipo F 314) con un cultivo
15. de la cepa 1440 y se agitó (300 revoluciones por minuto) durante 120 horas a 27°C mientras se introdujo aire (10 litros de aire por minuto). Luego se filtró la solución sobre filtro de jarabe, se extrajo el filtrado claro dos veces, cada vez con 8 litros
20. de acetato etílico, a la temperatura ambiente, se lavaron las fases orgánicas combinadas con 5 litros de agua destilada y se secaron sobre sulfato sódico. El residuo amarillo que quedó después de la evaporación del disolvente en un evaporador rotatorio a 35° y en un vacío, fué cromatografiado sobre una cantidad 35 veces mayor de gel de sílice
25. (Merck 0.2-0.5 mm) mediante la cromatografía de elución. Se desecharon las fracciones eluidas con una mezcla de benceno/bencina (1:1) y luego con
30. cloroformo, se colectaron las fracciones eluidas

3 2284



5. con cloroformo/metanol (995:1), se evaporó el disolvente y se recristalizó el residuo dos veces de acetona/pentano: antibiótico Rhi 12-648 en forma de rosetas de cristal incoloras con un punto de fusión de 197-199° (sin corregir).

EJEMPLO 2: Eter di-O-metílico del antibiótico Rhi 12-648.

10. Se añadió un ligero exceso de solución etérea de diazometano a una solución de 100 mg de Rhi 12-648 en 30 ml de éter dietílico y 1 ml de metanol, a la temperatura ambiente. Después de 15 minutos, se evaporó la solución hasta sequedad en un vacío y se recristalizó el residuo de acetona/éter diisopropílico. Eter di-O-metílico del antibiótico Rhi 12-648: prismas incoloros con un punto de fusión de 187-189° (sin corregir),

EJEMPLO 3: D-O-acetato del antibiótico Rhi 12-648

20. Se calentaron 100 mg de Rhi 12-648 y 150 mg de acetato sódico anhidro en 1.0 ml de anhídrido acético hasta 100° durante una hora. Se virtió la mezcla de la reacción enfriada en 20 ml de agua, se acidificó con ácido acético glacial y se extrajo tres veces con el mismo volumen de acetato etílico. Se evaporaron los extractos combinados hasta sequedad en un vacío y se recristalizó el residuo de acetona/pentano: di-O-acetato del antibiótico Rhi 12-648: prismas incoloros con un punto de fusión de 190-192° (sin corregir).



- Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que este invento se refiere a una
5. Solicitud de Patente presentada en Suiza n.º. 9165/63 de fecha 23 de julio de 1963 acogiéndose, por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, 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 PRODUCCION DE ANTIBIOTICOS A PARTIR DE HONGOS DEL GENERO RHIZOCTONIA", caracterizándose por lo siguiente:
10. 1ª.- Procedimiento para la producción de antibióticos a partir de hongos del género Rhizoctonia, denominados Rhi 12-648, caracterizado porque se cultiva una de las tres cepas S 1440, S 1476 y S 1484 del género Rhizoctonia (Fungi imperfecti), o una mutante de las
15. mismas, en una solución nutritiva que contiene KH_2PO_4 y MgSO_4 como sales minerales, y porque se aísla dicho antibiótico de dicha solución.
20. 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque se lleva a cavo el cultivo en un fermentador mientras se introduce aire u oxígeno y se agita a una temperatura de aproximadamente 12ª a aproximadamente 30°C.
25. 3ª.- Procedimiento para la producción

302284



JUL.

de antibioticos a partir de hongos del género Rhi-
zoctonia, tal y como queda sustancialmente descrito
en la presente Memoria.

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

5.

Madrid,

S A N D O Z, A.G.

J. GOMEZ MERO Y MORA

21 JUL. 1964

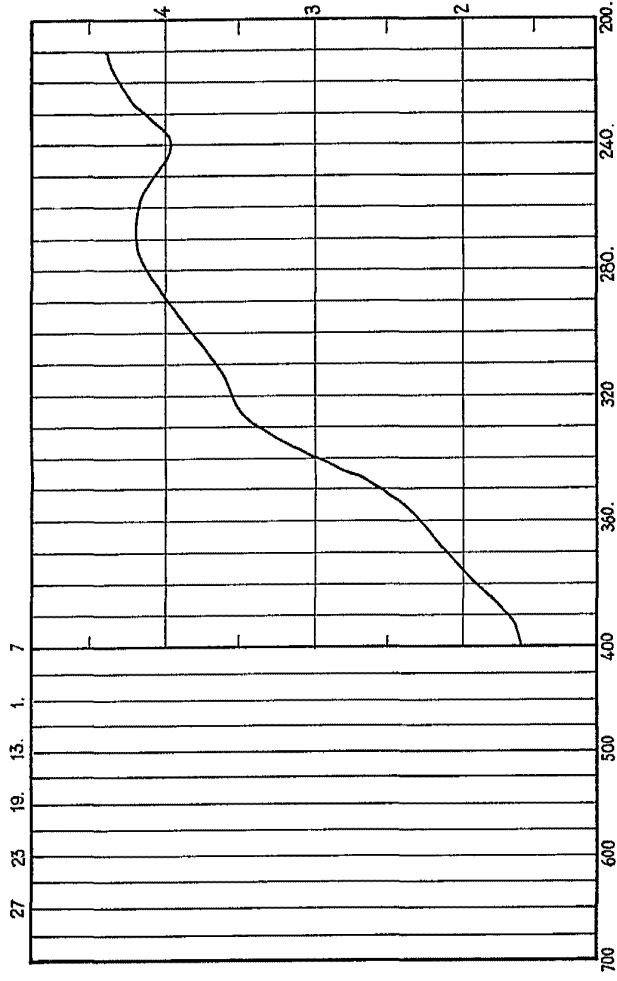


FIG.1

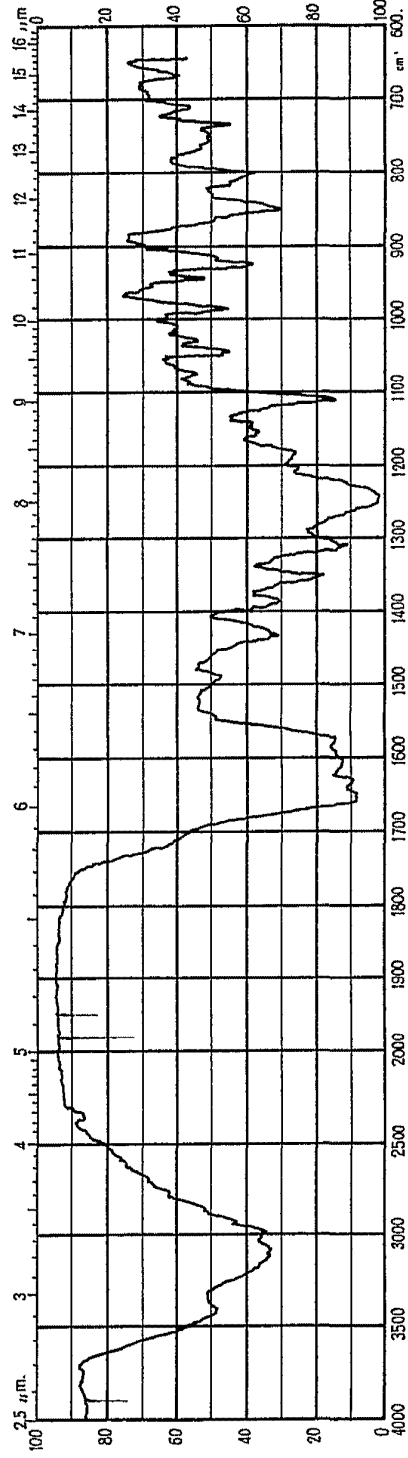


FIG.2

MADRID, SANDOZ S.A.

1 15/1/64



FIG. 1

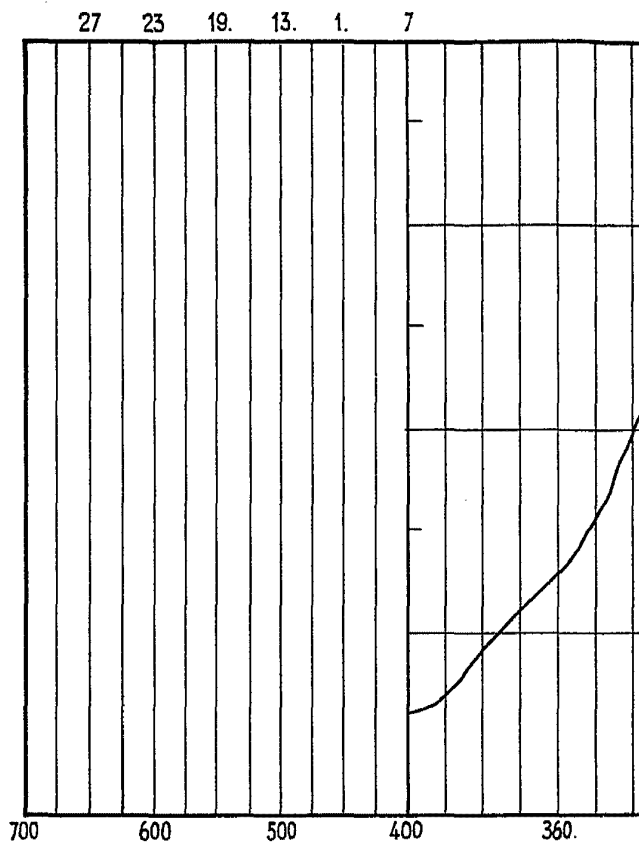
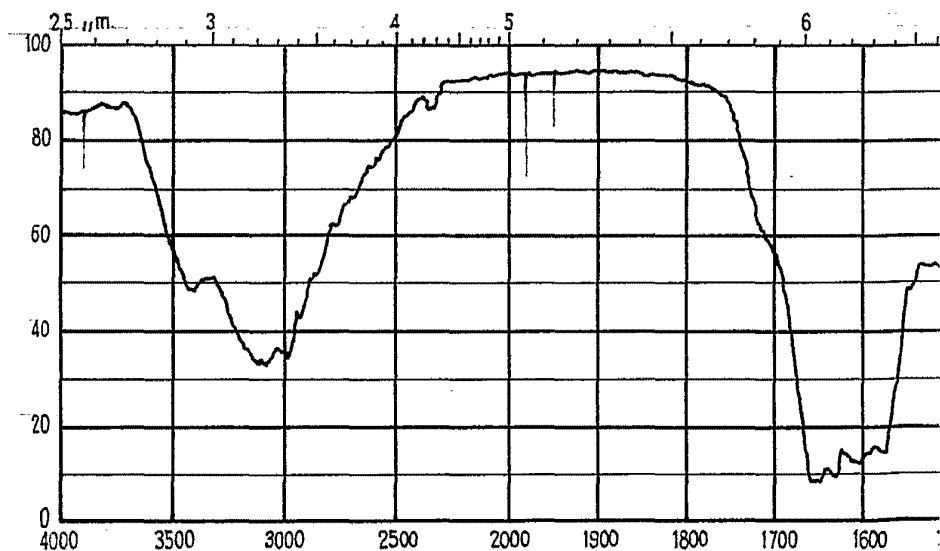
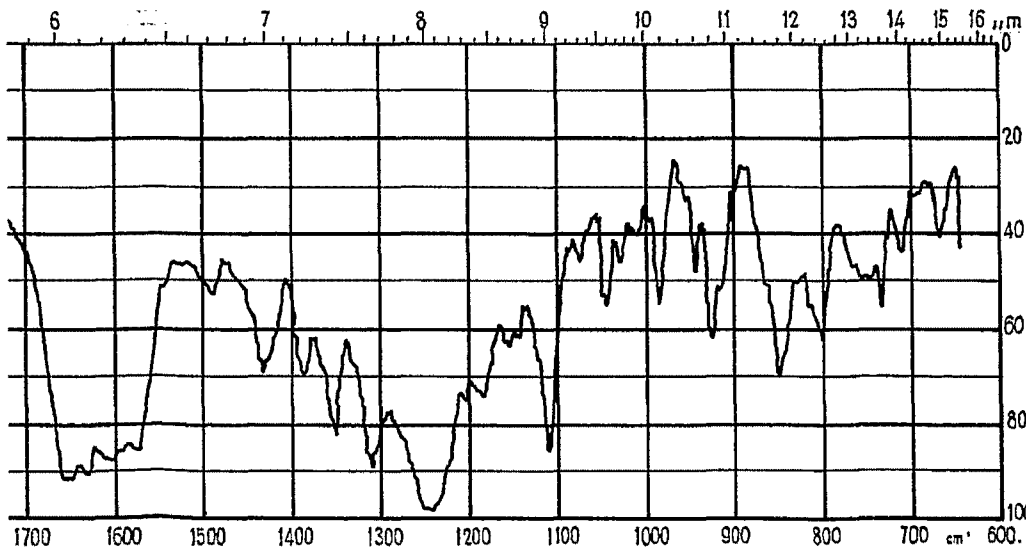
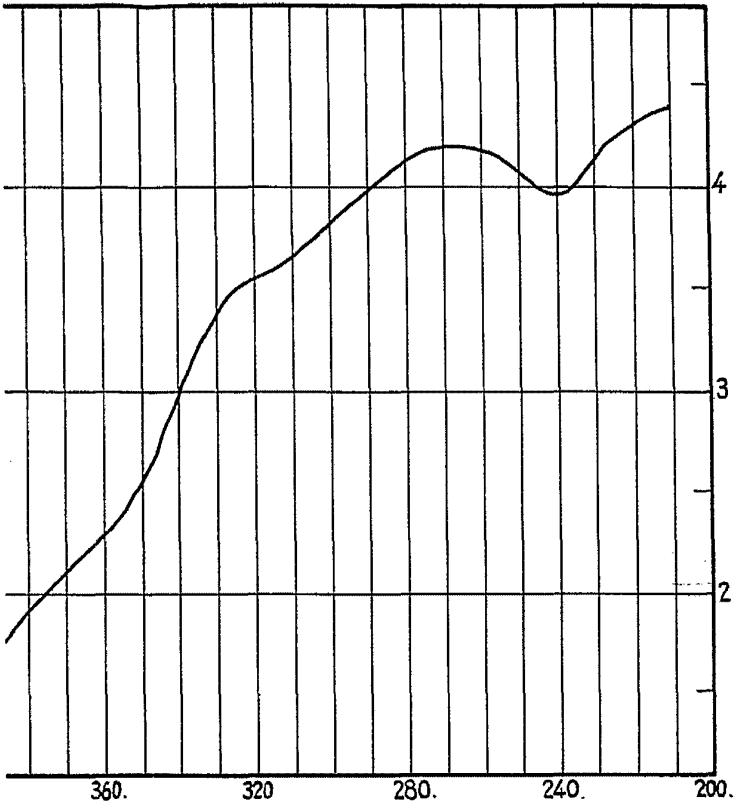


FIG. 2





MADRID.
SANDOZ. S.A.

[Handwritten signature and scribbles]

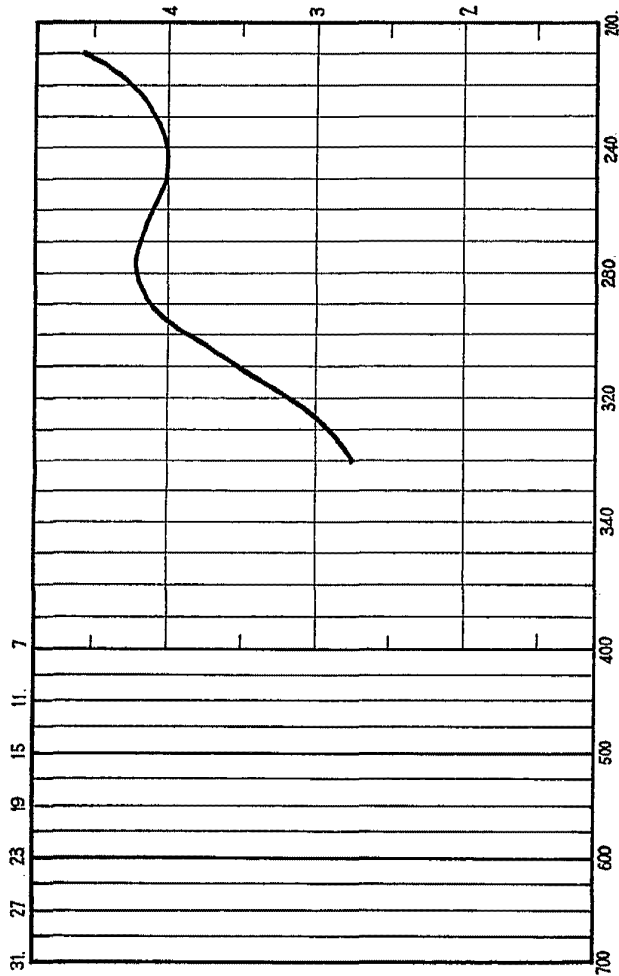


FIG. 3

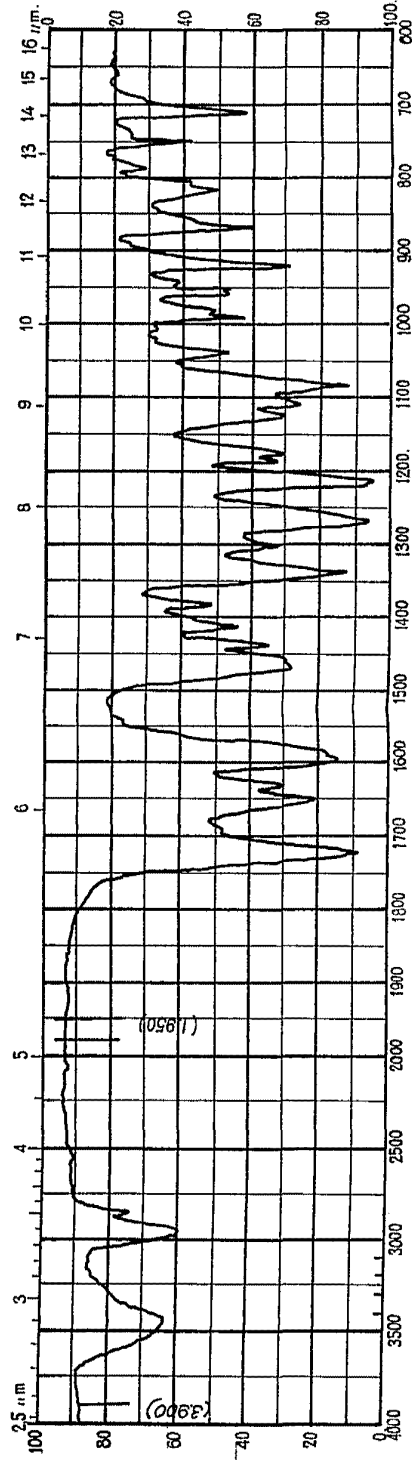


FIG. 4

MADRID,
SANDOZ, S.A.

21/11/57

1



FIG. 3

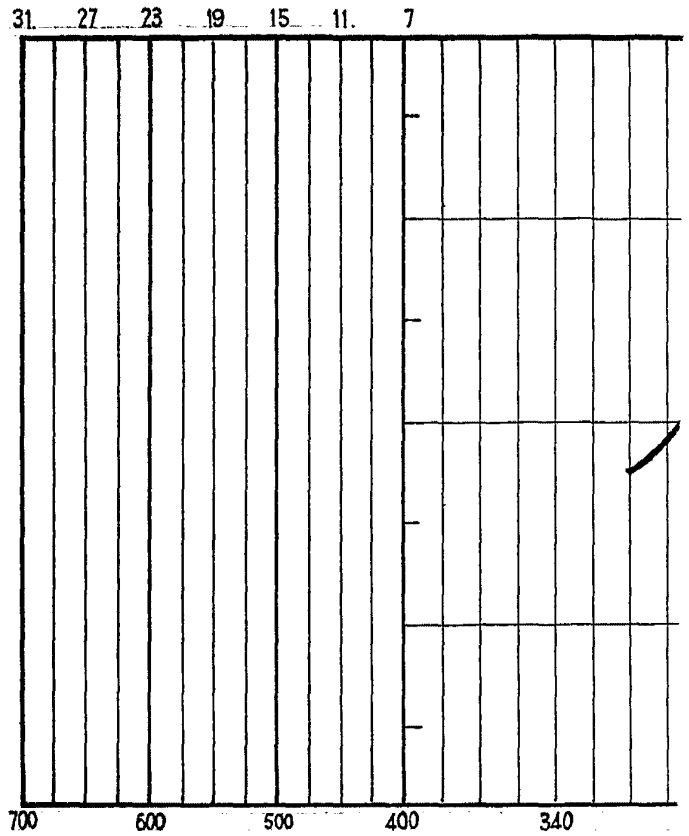
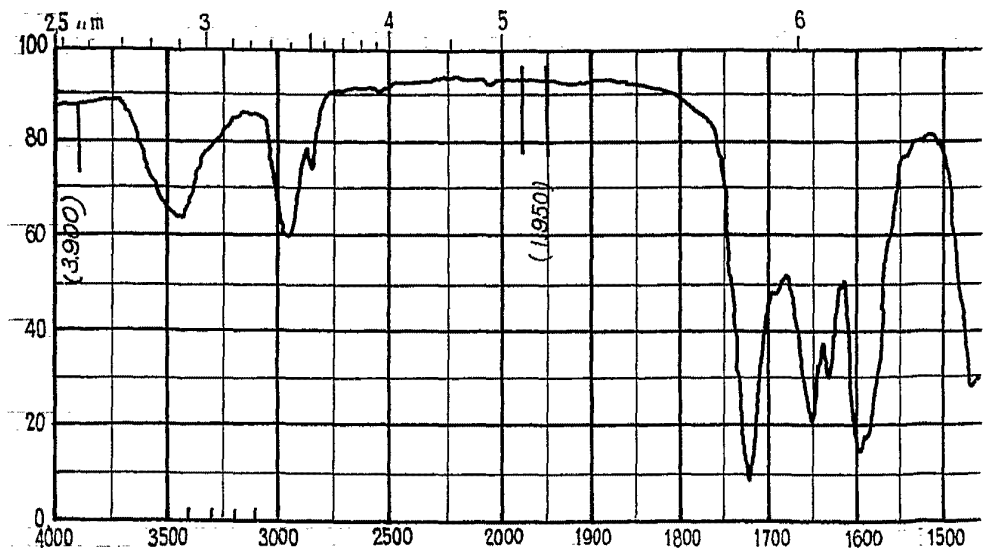
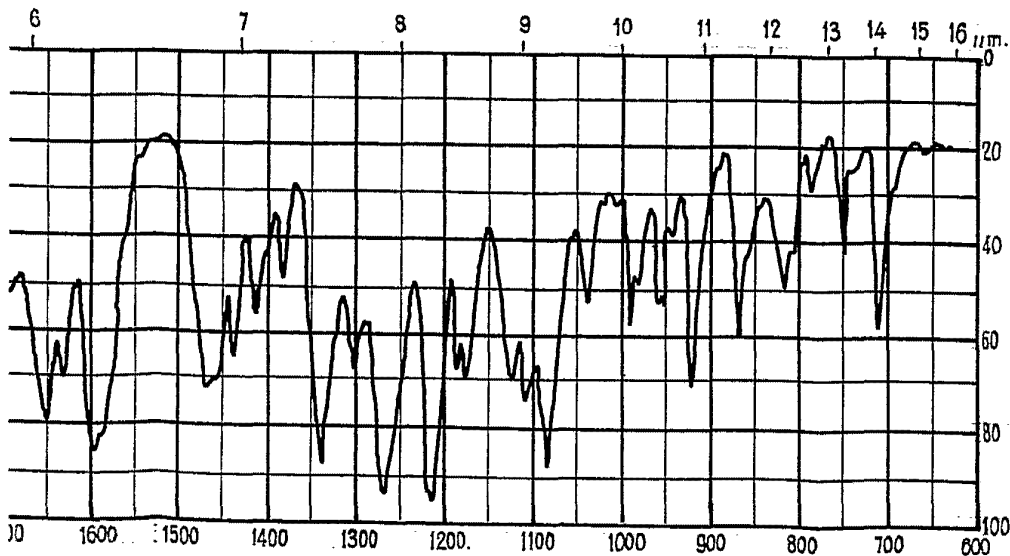
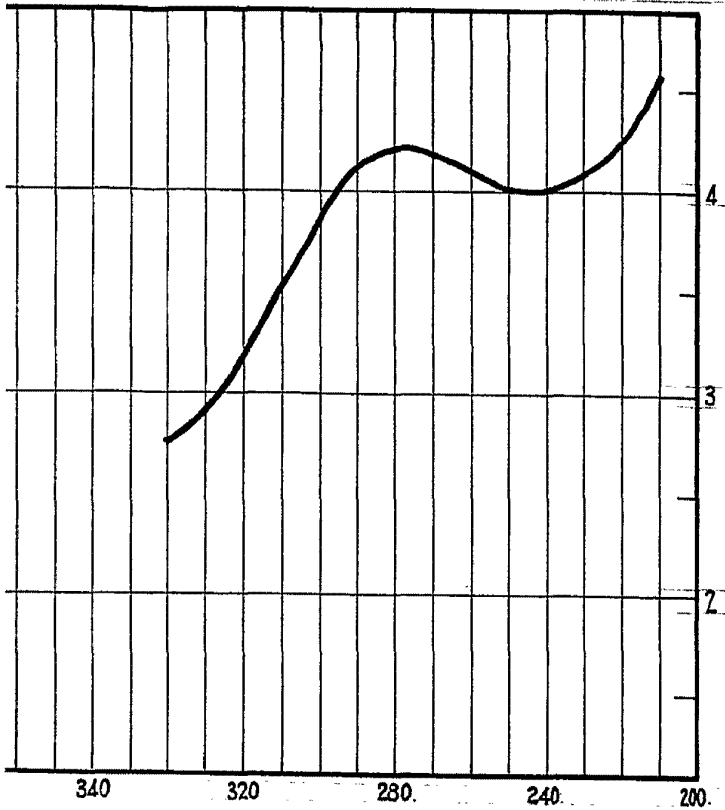
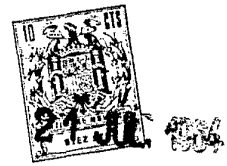


FIG. 4





MADRID. _____
SANDOZ, S.A.

21 JUL 1934

LABORATORIO DE FARMACIA Y MODELO

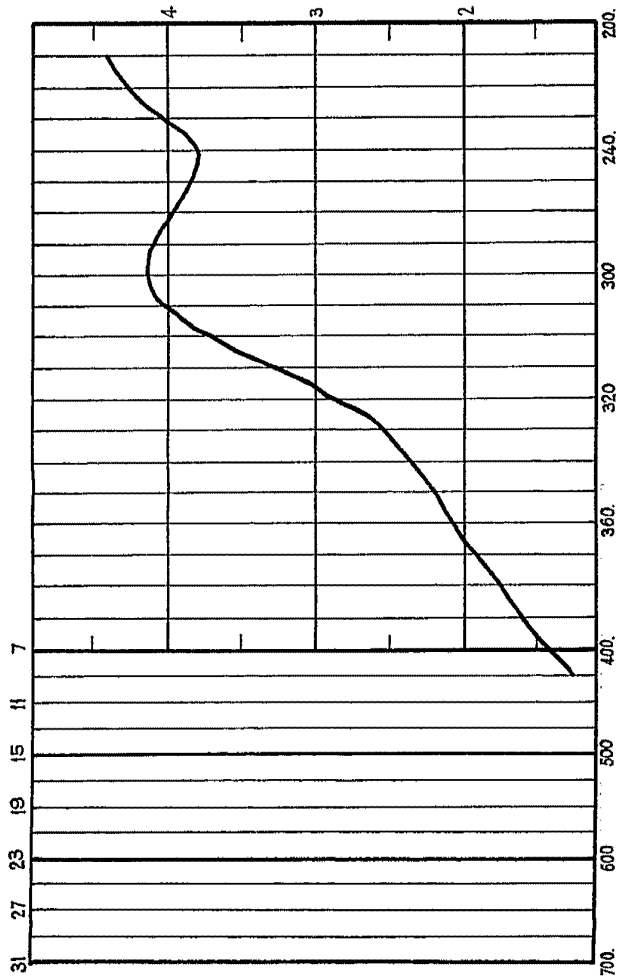


FIG. 5

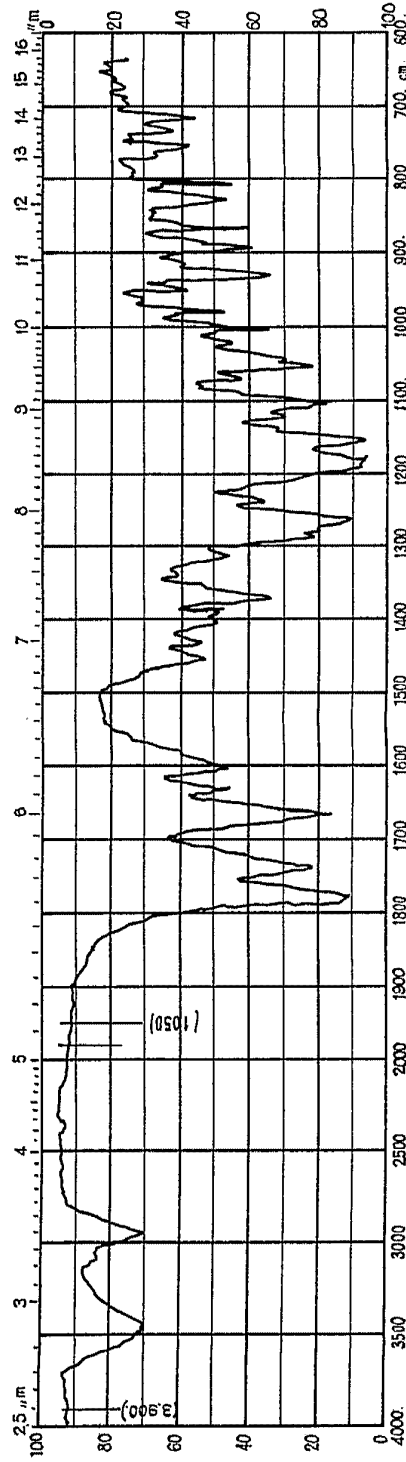


FIG. 6

MADRID. SANDOZ, S.A.

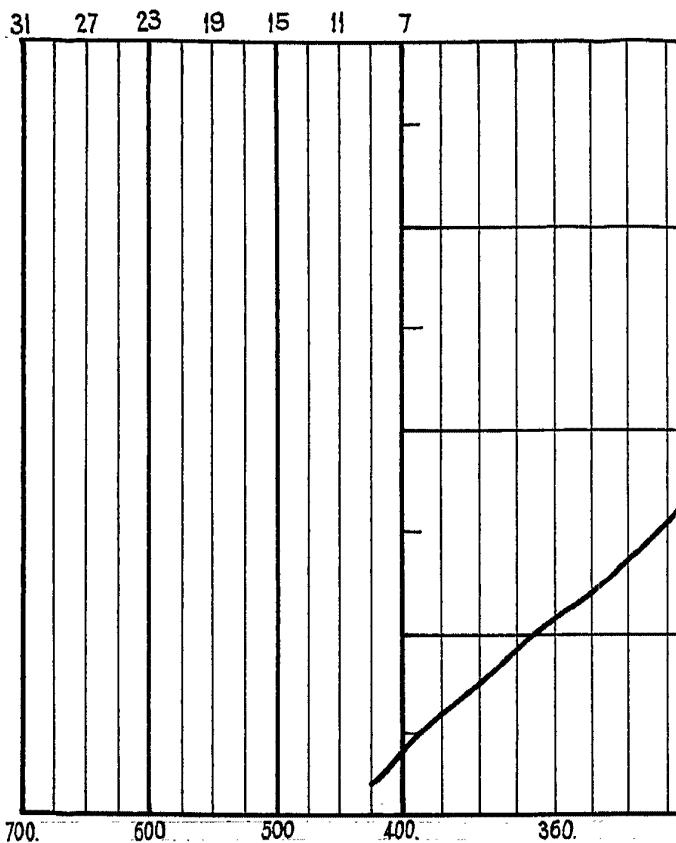


FIG. 5

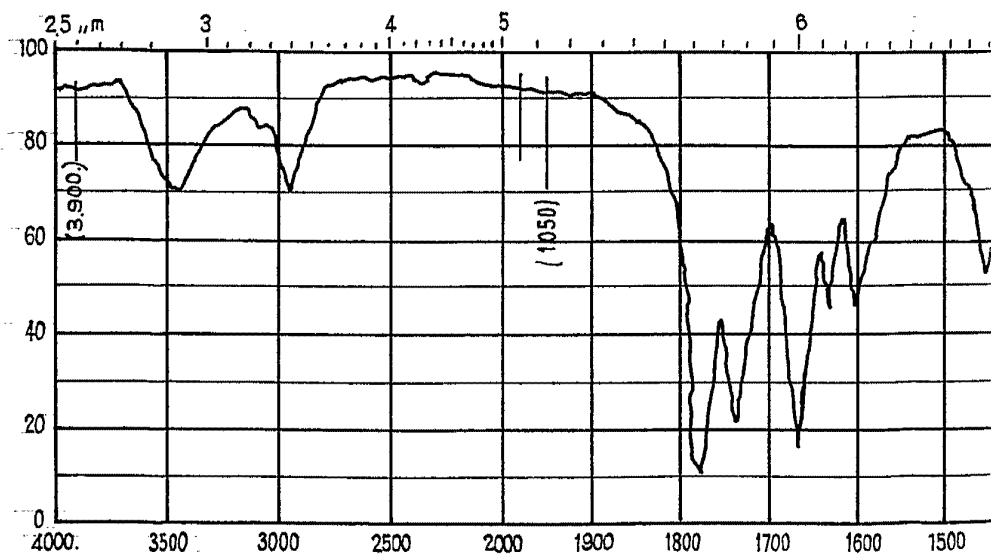
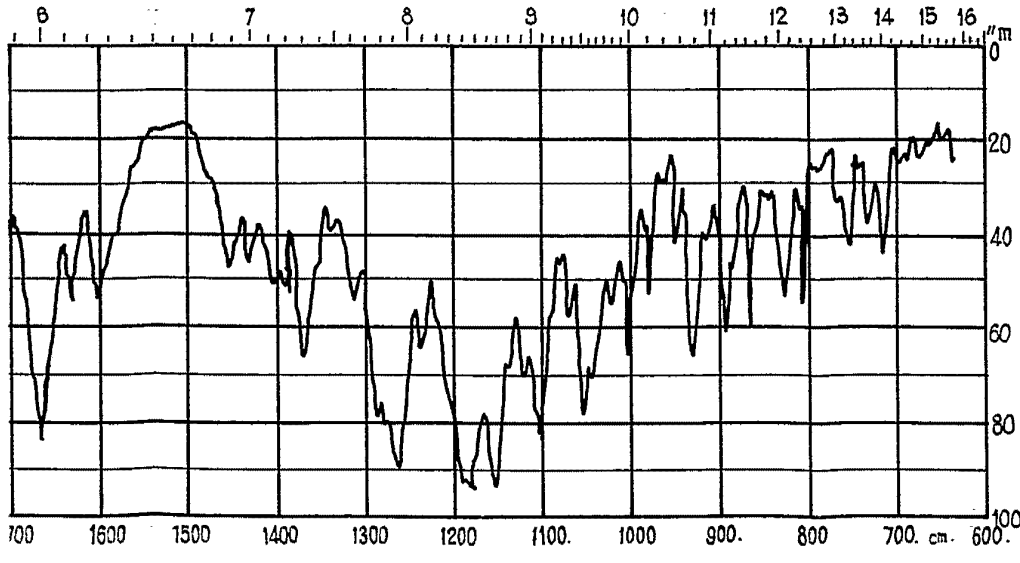
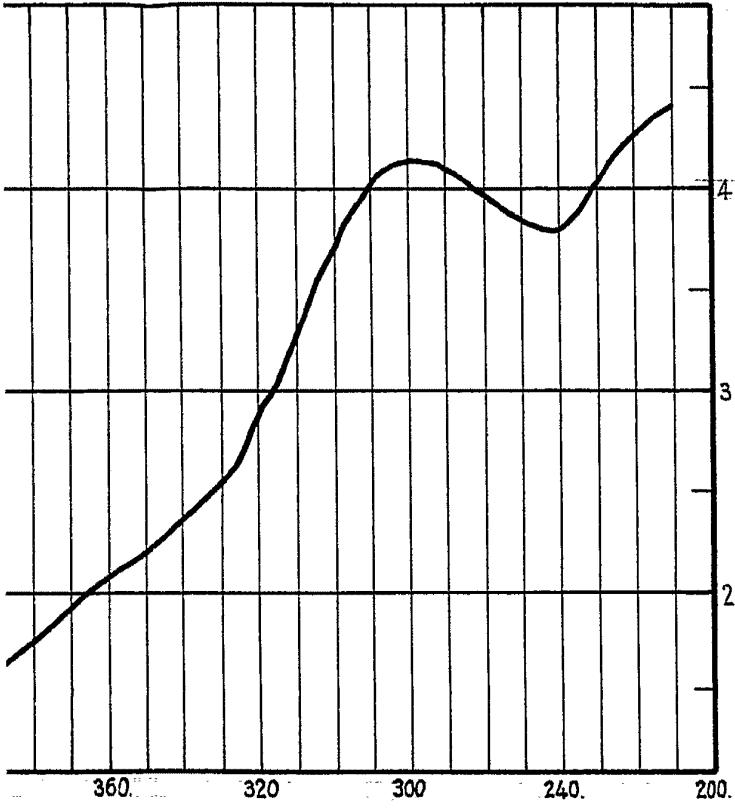


FIG. 6



MADRID.
SANDOZ. S.A.

