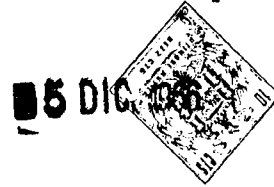


370103



PATENTE DE INVENCION

Case 2263.37/KU/MK.

## *Memoria Descriptiva*

*sobre:*

"PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DEL NUEVO ANTIBIOTICO  
SL 1846".

-----

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

La presente invención se relaciona con un nuevo  
antibiótico y con un procedimiento para su producción.

La presente invención proporciona un nuevo an-  
tibiótico en adelante denominado SL 1846.



La presente invención proporciona además un procedimiento para la producción de SL 1846, caracterizado porque se cultiva una cepa hasta ahora desconocida de la especie de hongo *Pseudeurotium ovalis* Stolk en una solución nutritiva y se aísla el antibiótico del filtrado de cultivo y se purifica en forma de por sí conocida, por ejemplo mediante extracción o adsorción.

La nueva cepa de *Pseudeurotium ovalis* Stolk usada de acuerdo con el invento fué aislada de una muestra de tierra (Rio de Janeiro) y se depositó una muestra de la misma con el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Northern Utilization Research and Development Division), Peoria, Illinois, bajo la referencia NRRL 3194.

La nueva cepa de la especie de hongo *Pseudeurotium ovalis* Stolk concuerda morfológicamente con la descripción dada por A.C.Stolk, *Antonie van Leeuwenhoek* 21 (1955) y C.Booth, *Mycological Papers* No. 83 (1961).

La cepa crece a 27°C sobre agar de extracto de malta/levadura con un micelio aéreo compacto, plano y de color gris-rosa. Los cleistotecios se desarrollan sobre el micelio substrato y están cubiertos por micelios aéreo. Son redondos, de color rojo-pardo y tienen un diámetro de 90-180  $\mu$ . Los asci transitorios miden 7.5-9 x 6.5-8  $\mu$ . Contienen ocho ascosporos elípticos, planos, de color pardo o aceituna, midiendo 5.5-6 x 3.5-4  $\mu$ . La forma de fruta secundaria, que se asemeja al esporotrico, se desarrolla simultáneamente con la forma de fruta principal.



También es posible producir el nuevo antibiótico SL 1846 usando cepas que pueden obtenerse de la cepa arriba indicada de *Pseudeurotium ovalis* Stolk, por ejemplo, por selección o mutación mediante rayos ultravioleta o rayos X, u otros medios, por ejemplo  
5 por tratamiento de cultivos de laboratorio con productos químicos adecuados.

La nueva cepa de *Pseudeurotium ovalis* Stolk puede ser cultivada sobre diversos medios nutritivos que contienen las substancias nutritivas usuales. Por ejemplo, son substancias nutritivas  
10 adecuadas para esta cepa de hongo las substancias 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 nitrógeno pueden usarse  
15 compuestos orgánicos o 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.

Un método para producir el antibiótico SL 1846 consiste en  
20 que se inocula un medio nutritivo líquido con conidios o micelios de la nueva cepa de *Pseudeurotium ovalis*. El cultivo se efectúa, por ejemplo, bajo condiciones aeróbicas, en cultivo estático de superficie o en cultivo sumergido mientras se sacude, o en fermentadores  
mientras se introduce aire u oxígeno con agitación. La temperatura de  
25 incubación es entre 20° y 35°C. Se prefiere usar una temperatura entre



25° y 30°C y un valor pH de 5-7, en cuyo caso el cultivo se incuba durante 4 a 10 días.

Un método especialmente adecuado para aislar el antibiótico del presente invento es la extracción del filtrado de cultivo con  
5 cloruro etilénico, aunque también pueden usarse otros disolventes orgánicos, por ejemplo benceno, acetato etílico, acetato butílico, cloroformo o butanol. A continuación se separan los extractos del disolvente, por ejemplo mediante destilación, y se purifica el residuo  
10 alúmina activada, gel de sílice o silicato de magnesio, o por medio de distribución a contracorriente, con el fin de aislar el antibiótico deseado.

El antibiótico SL 1846 tiene las características siguientes:  
SL 1846 es un compuesto neutro, cristalino e incoloro con la fórmula  
15  $C_{16}H_{24}O_5$ , un P.F. de 89-92°C y una rotación específica de  $[\alpha]_D^{20} = -117^\circ$  (c = 0.40 en cloroformo).

Espectro ultravioleta: máximo a 284.5 m $\mu$  (log  $\epsilon$  = 1.63) y una absorción final fuerte a 210 m $\mu$  (log  $\epsilon$  = 3.1) (en metanol)  
(Figura 1).

20 Espectro infrarojo: bandas a 3500, aproximadamente 3000, 1725, 1600, 1460, 1390, 1120, 1040, 1030, 1000, 970, 880, 840 cm<sup>-1</sup> (en cloruro metilénico) (Figura 2).

El antibiótico SL 1846 exhibe un alto efecto citostático y su uso está indicado en el tratamiento de enfermedades tumorales en  
25 animales y seres humanos. Este efecto se determina por la inhibición



del aumento de las células tumorales in vitro (células del mastocitoma del ratón P-815), las que en una solución nutritiva adecuada aumentan de 4 a 5 veces el número inicial dentro de 40 horas. La DE-50 (concentración que inhibe el aumento en un 50 %) de SL 1846 hacia esas

5 células es de  $10^{-9}$  g/ml.

El antibiótico SL 1846 también tiene un efecto amibostático específico, especialmente hacia la entameba histolítica. Con respecto a la toxicidad aguda de SL 1846 en ratones blancos, la DL-50 es

10 >160 mg/kg i.p. Además el nuevo antibiótico exhibe un marcado efecto antivirulento.

El antibiótico SL 1846 puede usarse por sí mismo como producto farmacéutico, ya sea en forma pura cristalina o amorfa o como concentrado bruto, o en la forma de preparaciones medicinales adecuadas para aplicarse, por ejemplo en forma oral, entérica o

15 parentérica. Una dosificación diaria adecuada del antibiótico del invento es de 30 a 1000 mg.

Con el fin de producir preparaciones medicinales adecuadas se trabaja el antibiótico con adyuvantes orgánicos o inorgánicos que sean inertes y fisiológicamente aceptables. Los siguientes son ejemplos de

20 tales adyuvantes:



- para tabletas y grageas : lactosa, almidón, talco y ácido esteárico;
- para jarabes : soluciones de azúcar de caña,  
azúcar invertido y glucosa;
- para soluciones inyectables: agua, alcoholes, glicerina y  
5 aceites vegetales;
- para supositorios : aceites naturales o endurecidos y ceras.

Las preparaciones pueden además contener adecuados agentes de conservación, estabilización y humectación, facilitadores de la solución, sustancias edulcorantes y colorantes y aromatizantes.

- 10 En el siguiente Ejemplo no limitativo todas las temperaturas están indicadas en grados Centígrado . Los puntos de fusión se determinaron sobre un bloque de Kofler.



EJEMPLO:

Se inoculan 100 litros de una solución nutritiva conteniendo

- glucosa . . . . . 20 g
- extracto de malta (Schweiz.Ferment AG) . . . . . 2 g
- 5 extracto de levadura Bacto . . . . . 2 g
- peptona . . . . . 2 g
- $KH_2PO_4$  . . . . . 2 g
- $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  . . . . . 2 g

y agua desmineralizada hasta completar 1 litro,

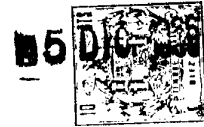
10 en un fermentador con 10 litros de un cultivo preliminar de  
*Pseudeurotium ovalis*, cepa NRRL 3194, y se incuba a 27° durante 111  
horas mientras se introduce aire (75 litros de aire por minuto) y se  
agita (150 revoluciones por minuto). Se filtra la solución de cultivo y  
se extrae el filtrado que tiene un pH de 5-6 tres veces, cada vez con  
15 50 litros de cloruro etilénico. Se lava el extracto de cloruro  
etilénico una vez con 5 litros de agua, se seca sobre sulfato  
magnésico y se evapora hasta sequedad en un vacío después de filtrar.  
Se cromatografía el residuo sobre 300 g de gel de sílice  
(Merck 0.2-0.5 mm). Se eluye con cloroformo/metanol (99.5:0.5)  
20 (volumen de la fracción 100 ml). Las fracciones 28-39 proporcionan  
SL 1846 cristalino e incoloro con un P.F. de 89-92°, de eter/pentano.

Los 10 litros de cultivo preliminar de *Pseudeurotium ovalis* se producen con la misma solución nutritiva y bajo las mismas condiciones de cultivo usadas en el Ejemplo arriba indicado.



N O T A

- Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente
5. indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una solicitud de Patente presentada en Suiza con fecha y número siguientes: 6 de diciembre de 1965, nº 16.789/65, acogiéndose por
10. 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 sobre: "Procedimiento para la producción del nuevo antibiótico SL 1846"; caracterizándose por lo siguiente:
15. 1.- Procedimiento para la producción del nuevo antibiótico SL 1846 que posee las características siguientes: un compuesto neutro incoloro y cristalino con la fórmula  $C_{16}H_{24}O_5$ , un P.F. de 89-92°C y una rotación
20. específica de  $[\alpha]_D^{20} = -117^\circ$  (c = 0.40 en cloroformo), y que indica las siguientes bandas en los espectros Ultravioleta e Infrarrojo: Espectro Ultravioleta: máximo a 284.5 m  $\mu$  (log  $\xi$  = 1.63) y una absorción final fuerte a 210 m  $\mu$  (log  $\xi$  = 3.1) (en metanol);
25. Espectro infrarrojo: bandas a 3500, aproximadamente 3000, 1725, 1600, 1460, 1390, 1120, 1040, 1030, 1000, 970, 880, 840  $cm^{-1}$  (en cloruro metilénico), caracterizado porque se cultiva la cepa NRRL 3194 de la especie de hongo Pseudoeurotium ovalis Stolk en una solución nutritiva, y se
30. aísla el antibiótico del filtrado de cultivo y se purifica.



2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se efectúa el cultivo bajo condiciones aeróbicas.

5. 3.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque se efectúa el cultivo a una temperatura entre 20° y 35°C y a un valor pH de 5 a 7.

10. 4.- Procedimiento para la producción del nuevo antibiótico SL 1846, tal y como queda substancialmente descrito en la presente Memoria, e ilustrado en los dibujos adjuntos.

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

Madrid,

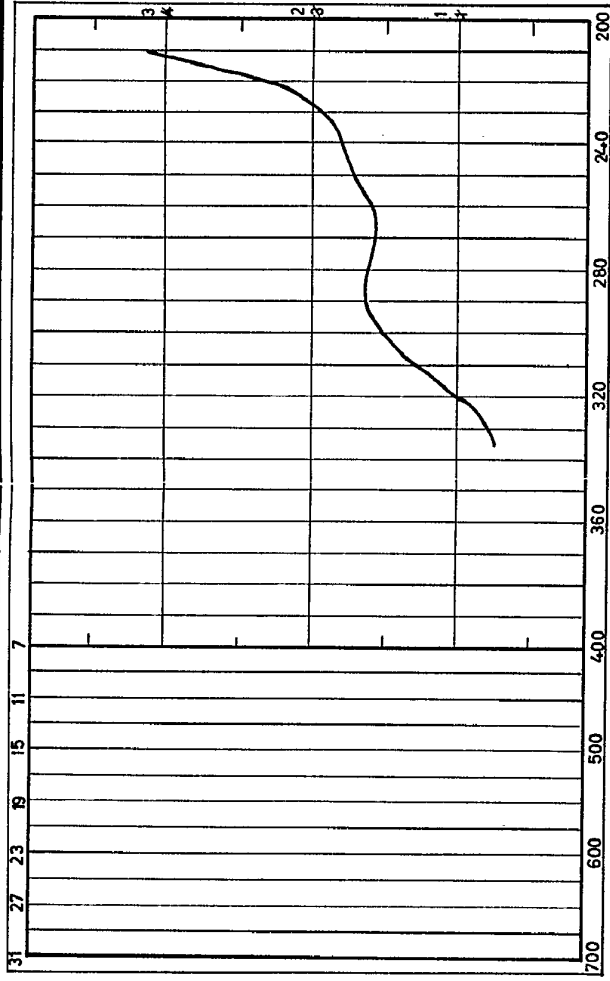
5 DIC 1968

SANDOZ, A.G.

L. GOMEZ ACEBO Y MODET

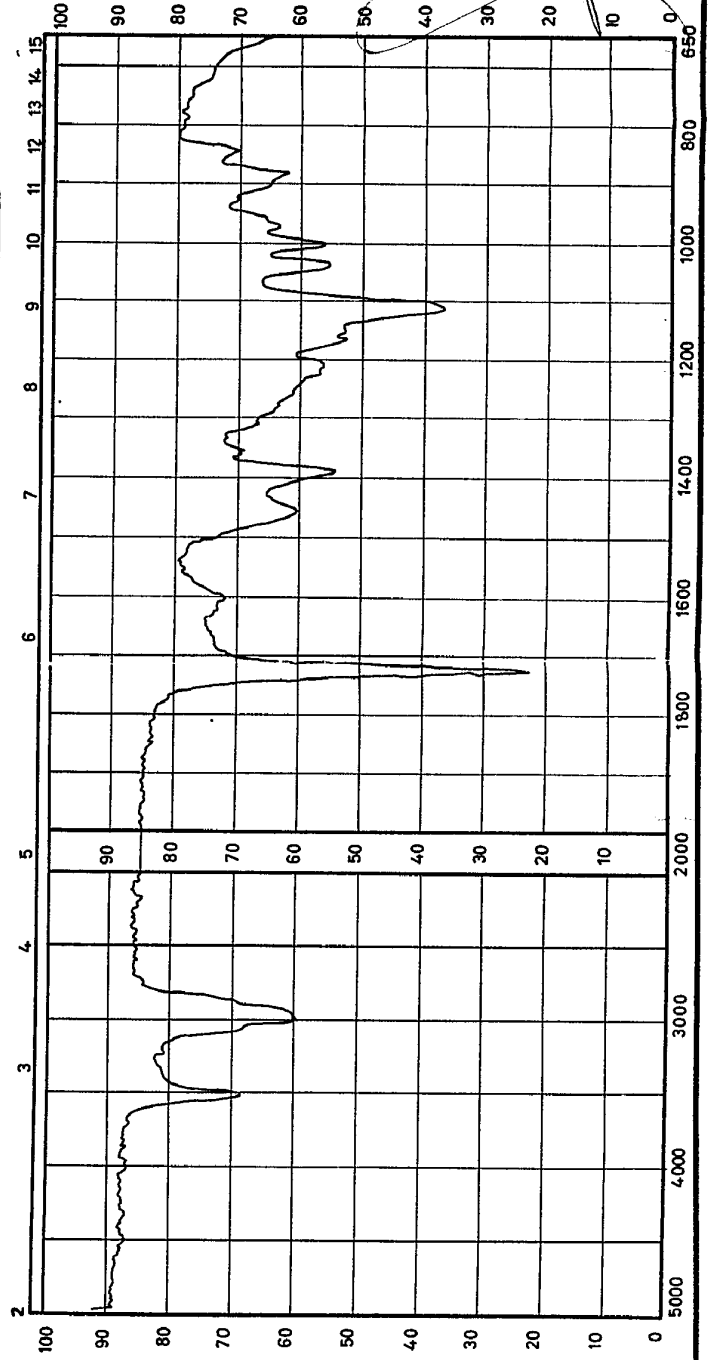
p. Firmado: F. Hernández Ruiz

FIG 1



ESCALA  
VARIACION

FIG 2



5 DIC. 1958  
 MADRID  
 SANJOZ. A. G.

FIG 1

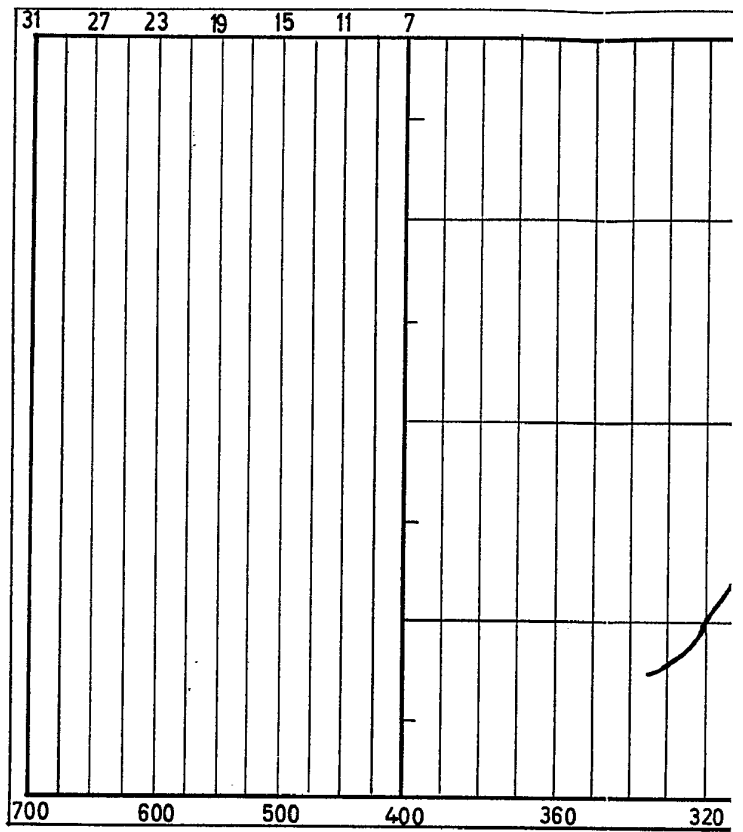
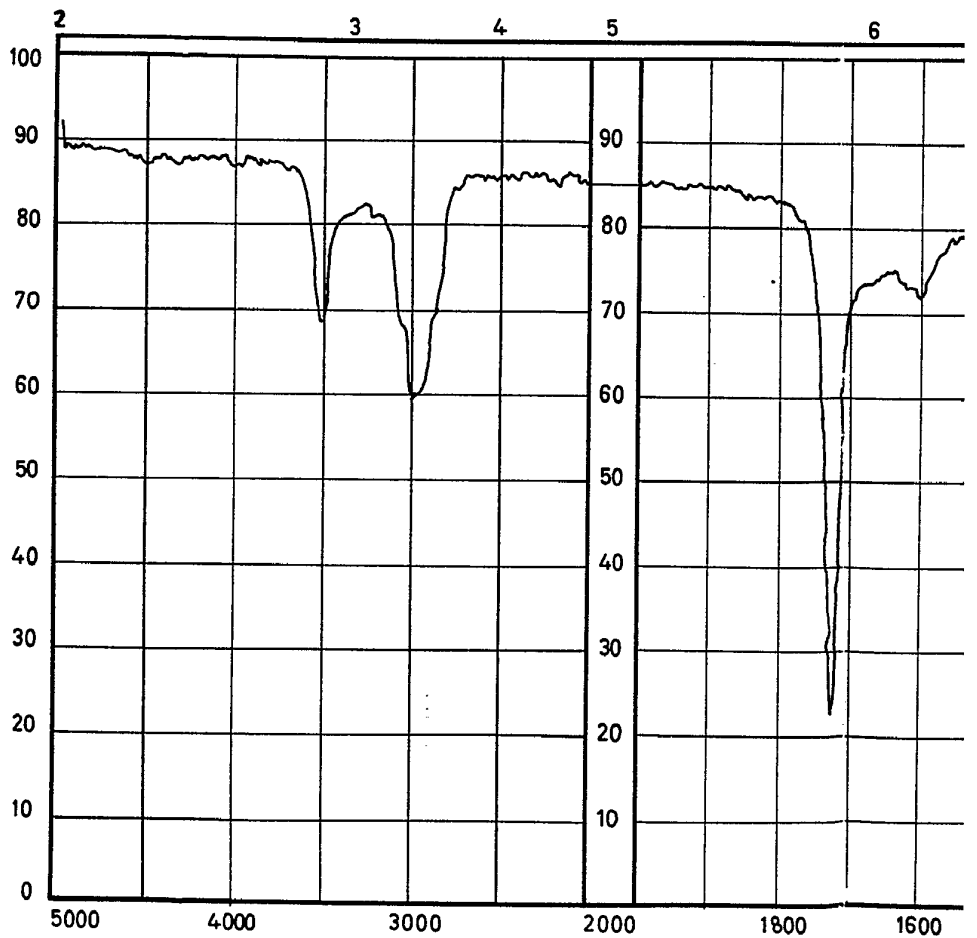
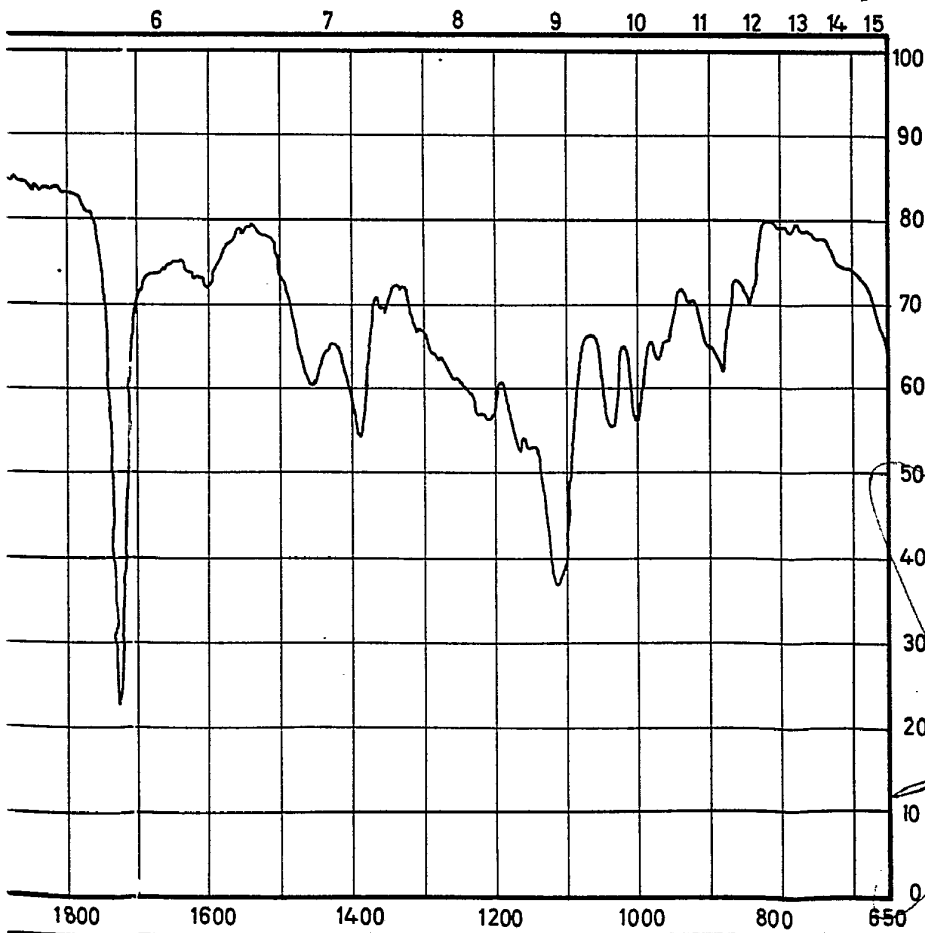
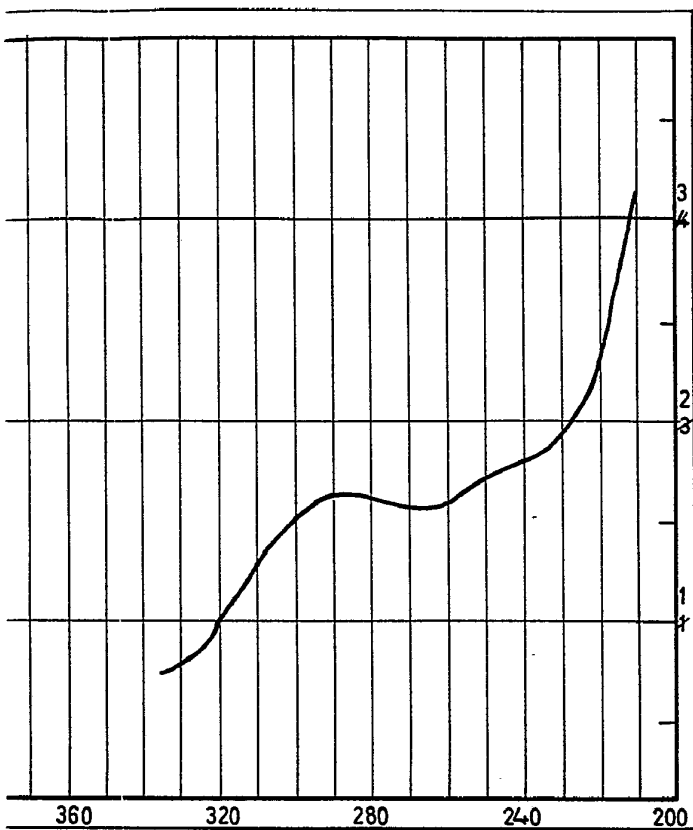


FIG 2



334163

HOJA UNICA



ESCALA  
VARIABLE

5 DIC. 1935  
MADRID.  
SANDOZ. A. G.

J. G. C.