

334164



PATENTE DE INVENCIÓN

Case 2264. 37/KU/MK.

Memoria Descriptiva

sobre:

"PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DEL NUEVO ANTIBIOTICO SL 2052".

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

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

La presente invención proporciona un nuevo antibiótico, denominado en lo sucesivo SL 2052.

5.



La presente invención proporciona además un procedimiento para la producción de SL 2052, caracterizado porque se cultiva una nueva cepa de la especie de hongo *Myrothecium roridum* Tode ex Fries en una solución nutritiva, y se aísla dicho antibiótico del medio de cultivo en forma de por sí conocida, por ejemplo mediante extracción o adsorción, y se purifica.

La nueva cepa de la especie de hongo *Myrothecium roridum* Tode ex Fries usada de acuerdo con el invento fué aislada de una muestra de tierra de un bosque de araucarias de Bulolo (Nueva Guinea) y se ha depositado una muestra de esta cepa con el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Northern Utilization Research and Development Division), Peoria, Ill., EUA, bajo la referencia NRRL 3195.

La nueva cepa concuerda morfológicamente con la descripción de la especie de hongo dada por N.C.Preston, *Trans.Brit.My.Soc.* 26, página 158 (1943) y J.C.Gilman, *A Manual of Soil Fungi*, The Iowa State University Press, página 397. El género *Myrothecium* Tode ex Fries pertenece a los Fungi imperfecti, orden de Moniliales y familia Tuberculariaceae.

La cepa de hongo NRRL 3195 de la especie de hongo *Myrothecium roridum* crece a 27°C sobre agar de extracto de malta-levadura con un micelio aéreo blanco, flojo. Los esporóforos abroquelados que inicialmente son de color verde, adquieren una coloración negra mientras avanza el proceso de maduración, y confluyen formando masas viscosas de esporos. El tallo del hongo muestra un lado posterior amarillento y desarrolla un pigmento soluble de color amarillo claro.

Los esporóforos se componen de soportes de conidios rectos, septalizados y ramificados, que llevan fialidas ligeramente claviformes,



las que forman una capa semejante al himenio. Los conidios cilíndricos, de color verde aceituna claro, redondeados a ambos extremos, se forman sobre estas fialidas. Generalmente contienen dos gotas de aceite y miden $6.5-9.5 \times 1.7-2.6 \mu$.

5 También es posible producir el antibiótico SL 2052 usando otras cepas que pueden obtenerse de la cepa arriba indicada de *Myrothecium roridum* Tode ex Fries, por ejemplo mediante selección o mutación mediante rayos Ultravioleta o rayos X u otros medios, por ejemplo por tratamiento de cultivos de laboratorio con productos
10 químicos adecuados.

La nueva cepa de *Myrothecium roridum* Tode ex Fries puede cultivarse sobre diversos medios de cultivo que contienen las sustancias nutritivas usuales. Por ejemplo, son sustancias nutritivas adecuadas para esta cepa de hongo las sustancias nutritivas
15 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 compuestos orgánicos e inorgánicos conteniendo nitrógeno, siendo ejemplos específicos la peptona, extractos de levadura y carne,
20 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 2052 consiste en que se inocula un medio nutritivo líquido con conidios o micelios
25 de la nueva cepa de *Myrothecium roridum*. El cultivo puede, por ejemplo, efectuarse 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 incubación puede ser de 20° a 35°C. Sin embargo, se prefiere usar una temperatura entre 25° y 30°C y un valor pH de 5-7, en cuyo caso se incuba el cultivo durante 4 a 10 días.

5 Se aísla el nuevo antibiótico, preferentemente extrayendo el filtrado de cultivo con acetato etílico, pero también pueden usarse otros disolventes, por ejemplo bencina, benceno, acetato butílico, cloroformo o butanol. Seguidamente se separa el disolvente de los extractos, por ejemplo mediante destilación, y se aísla el antibiótico deseado mediante purificación cromatográfica del residuo sobre
10 agentes de adsorción, por ejemplo alúmina activada, gel de sílice, silicato de magnesio, o mediante distribución a contracorriente.

El antibiótico SL 2052 tiene las características siguientes:
SL 2052 es un compuesto neutro, cristalino e incoloro con la fórmula $C_{23}H_{24}O_8$, un P.F. de 237-238°C y una rotación específica de $[\alpha]_D^{20} = +84^\circ$ (c = 0.54 en cloroformo).
15

Espectro Ultravioleta : máximos a 256 m μ (log ϵ = 4.01) y 291.5 m μ (log ϵ = 3.82), hombro a 360 m μ (log ϵ = 1.86) (en etanol) (Figura 1).

Espectro Infrarojo : inter alia bandas a 3150, 2955, 2950,
20 1755 hombro, 1745, 1680, 1545, 1470, 1380, 1230, 1210, 1145, 1105, 1030, 995, 970, 940, 905, 835, 795, 760, 725, 700 cm⁻¹ (1 mg/300 mg KBr) (Figura 2).

El antibiótico SL 2052 tiene un efecto fungistático muy alto
25 hacia diversos hongos productores de infecciones. El antibiótico ejerce una actividad especialmente pronunciada hacia diversas levaduras que producen Candidiasis en los seres humanos y en los animales. El antibiótico SL 2052 ejerce una acción especialmente fuerte hacia los hongos que producen dermatomicosis (dermatófitos) en los



seres humanos y en los animales. También indica una buena actividad hacia los hongos que producen endomicosis (blastomicosis, aspergilosis) en los seres humanos y en los animales.

En la prueba de la perforación de difusión de agar se
5 obtuvieron diámetros del area de inhibición de por lo menos 20 mm (diámetro de la perforación 7 mm) usando las cantidades siguientes de antibiótico:

Organismo:	Cepa No.	Cantidad necesaria de antibiótico disuelto en 0.1 ml de metanol al 5 %
10		
<i>Candida albicans</i>	S 1254	4 μ g
<i>Candida tropicalis</i>	S 1256	1 μ g
<i>Microsporum gypseum</i>	S 2418	50 μ g
15 <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	S 1284	20 μ g
<i>Trichophyton tonsurans</i>	S 3108	20 μ g
<i>Trichophyton yaoundei</i>	S 3110	30 μ g
<i>Cryptococcus neoformans</i>	S 1258	30 μ g
<i>Blastomyces dermatidis</i>	S 1252	30 μ g
20 <i>Blastomyces brasiliensis</i>	S 1251	30 μ g
<i>Aspergillus fumigatus</i>	S 133	30 μ g
<i>Paecilomyces varioti</i>	S 1996	10 μ g



Método de ensayo:

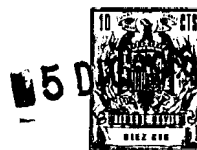
Se colocan en cápsulas de Petri estériles 20 ml de un medio nutritivo esterilizado que tiene una temperatura de 45°, conteniendo 2 % de extracto de malta (Schweiz.Ferment AG, Basilea), 0.75 % de Ionagar No. 2 (Oxoid Div. de Oxo Ltd., London SE 1) y agua desmineralizada. Después de haberse solidificado la capa básica, se colocan sobre esta capa básica 5 ml de una capa germinativa esterilizada que consiste del mismo medio como la capa básica, a la que se ha añadido una suspensión de 10^6 esporos del hongo de ensayo, después de haber enfriado a 40°C. Se punzan perforaciones con un diámetro de 7 mm en las placas de agar solidificadas bajo condiciones estériles, y después de separar el pedazo de agar punzado se trasladan las muestras de ensayo a probetas en porciones de 0.10 ml. Seguidamente se incuban las placas de ensayo a 27-37°C en una incubadora durante 1-4 días hasta que los hongos muestran un crecimiento abundante.

Se miden los diámetros de promedio de las áreas de inhibición (áreas sin crecimiento) de diversos ensayos paralelos.

El antibiótico SL 2052 no muestra un efecto perjudicial sobre el aumento de las bacterias o sobre el aumento de los cultivos de tejidos animales, de modo que su efecto específico hacia los hongos es más pronunciado.

La toxicidad aguda de SL 2052 en los ratones blancos asciende a una DL-50 de 18 mg/kg i.p. o una DL-50 de 5 mg/kg per os.

El antibiótico SL 2052 puede usarse por sí mismo como producto farmacéutico, ya sea en forma pura cristalina o amorfa o como concentrado bruto.



Con el fin de producir preparaciones medicinales adecuadas se trabaja el antibiótico SL 2052 con adyuvantes orgánicos o inorgánicos que sean inertes y fisiológicamente aceptables. Las preparaciones pueden además contener adecuados agentes de conservación, estabilización
5 y humectación y facilitadores de la solución.

La expresión "en forma de por sí conocida" tal como se usa aquí designa métodos en uso o descritos en la literatura sobre el asunto.

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



Ejemplo:

Se inoculan 10 litros de una solución nutritiva conteniendo:

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

y agua desmineralizada hasta completar un litro,

10 en un fermentador (New Brunswick Co., EUA, tipo FS 314) con una suspensión de esporos de *Myrothecium roridum*, cepa NRRL 3195, y se incuba a 27°C durante 96 horas mientras se agita (450 revoluciones por minuto). Se filtra la solución de cultivo y se extrae el filtrado que

15 tiene un pH de 4-5 tres veces, cada vez con 10 litros de acetato etílico. Se lava el extracto de acetato etílico una vez con tres litros de agua, se concentra hasta 1/10 de su volumen en un vacío, se seca sobre sulfato magnésico, se filtra y se separa el disolvente completamente en un vacío. Se cromatografía el residuo (1.5 g) sobre

20 60 g de gel de sílice (Merck 0.2-0.5 mm). Se eluye con cloroformo/metanol (99:1) (volumen de las fracciones 100 ml). Las fracciones 7-9 contienen SL 2052 puro. La cristalización de metanol/éter proporciona cristales incoloros con un P.F. de 237-238°.



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 16.790/65, acogiendo por lo tanto a los beneficios que concenden los
10. 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 PRODUCCION DEL NUEVO ANTIBIOTICO
15. SL 2052"; caracterizándose por lo siguiente:
- 1.- Procedimiento para la producción del nuevo antibiótico SL 2052 que tiene las características siguientes: un compuesto neutro incoloro y cristalino que tiene la fórmula $C_{23}H_{24}O_8$, un P.F. de 237-238° y una rotación específica de $[\alpha]_D^{20} = +84^\circ$ (c = 0.54 en cloroformo), y que indica las siguientes bandas en los espectros Ultravioleta e Infrarrojo.
20. Espectro Ultravioleta: máximos a 256 m μ ($\log \xi = 4.01$) y 291.5 m μ ($\log \xi = 3.82$), hombro a 360 m μ ($\log \xi = 1.86$) (en etanol);
25. Espectro infrarrojo: inter alia bandas a 3150, 2955, 2950, 1755 hombro, 1745, 1680, 1545, 1470, 1380, 1230, 1210, 1145, 1105, 1030, 995, 970, 940, 905, 835, 795, 760, 725, 700 cm^{-1}
30. (1 mg/300 mg KBr),



caracterizado porque se cultiva la cepa NRRL 3195 de la especie de hongo *Myrothecium roridum* Tode ex Fries en una solución nutritiva, y se aísla el antibiótico del filtrado de cultivo y se purifica.

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

10. 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 pH de 5 a 7.

4.- Procedimiento para la producción del nuevo antibiótico SL 2052, tal y como queda substancialmente descrito en la presente Memoria, e ilustrado en los dibujos adjuntos.

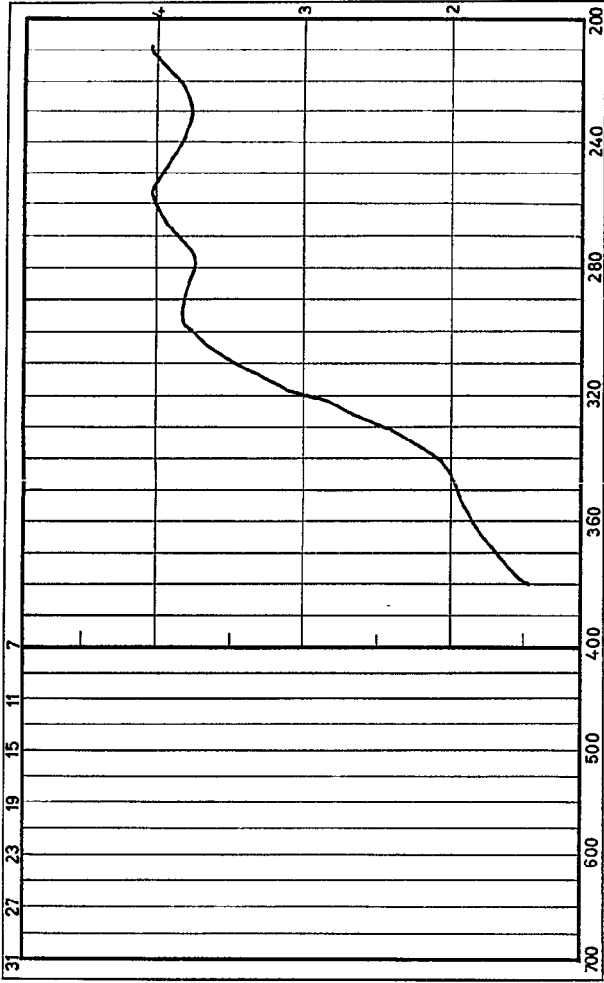
15. Esta Memoria consta de 10 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,
SANDOZ, A.G.

5 DIC. 1955

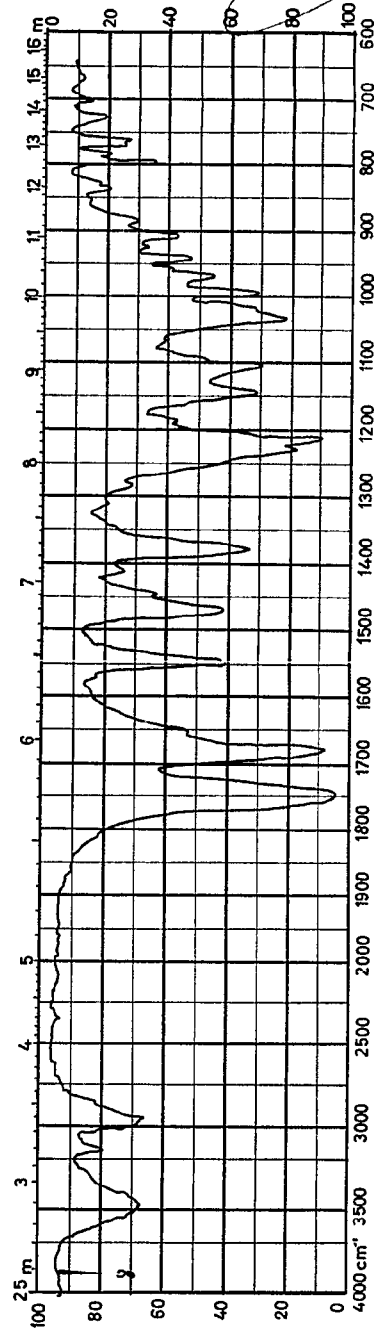
J. GOMEZ ACIÑO Y MODELL
Ingenieros de Fines Artísticos y Arquitectos R.U.

FIG 1



ESCALA
VARIABLE

FIG 2



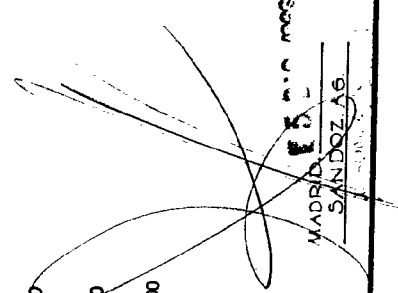

 MADRID 15 de mayo de 1964
 SANDOZ AG

FIG 1

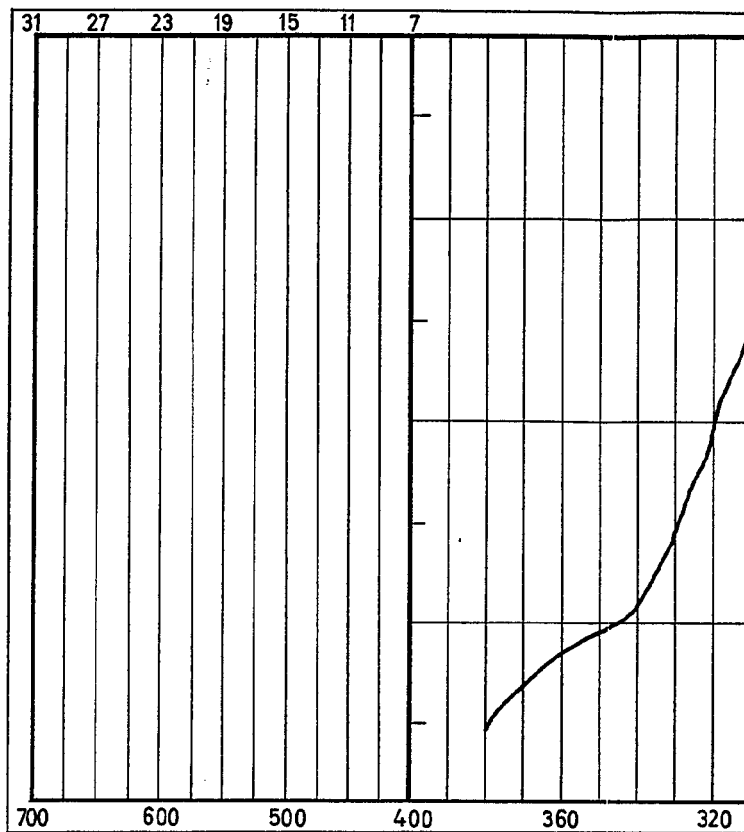
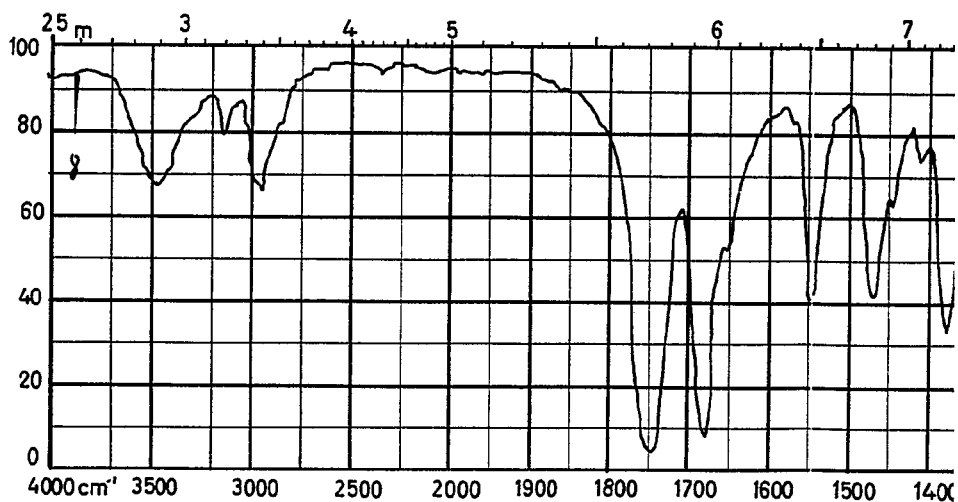
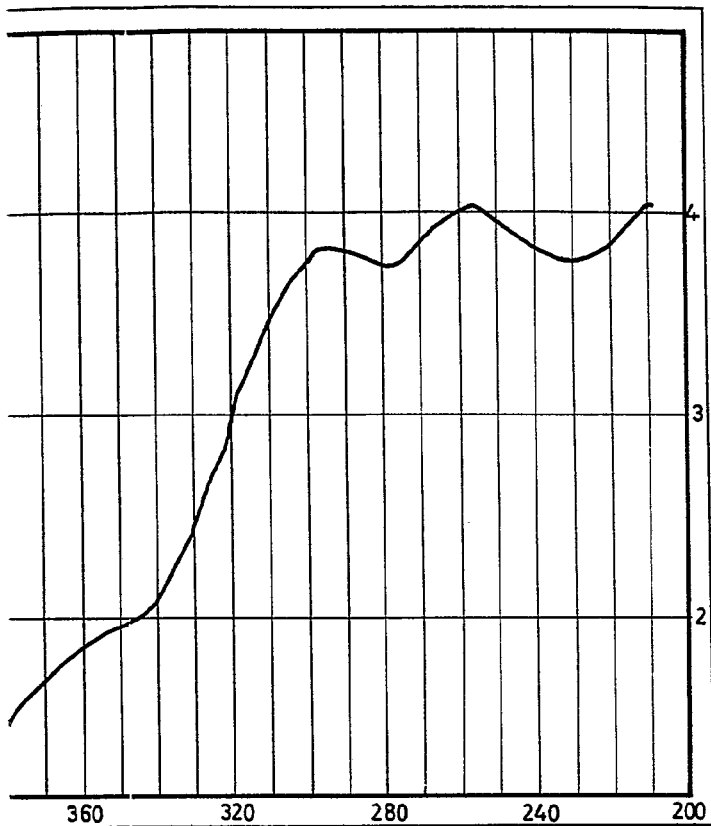


FIG 2



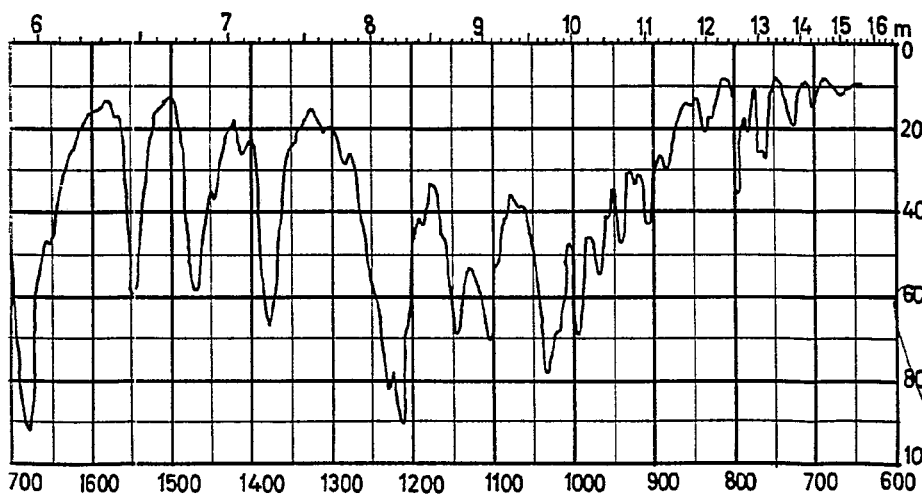
334164

FIG 1



ESCALA VARIABLE

FIG 2



MADRID
SANDOZ AG.
SONOZ AG.