

334165



PATENTE DE INVENCION

Case 2265. 37/KU/MK.

## *Memoria Descriptiva*

*sobre:*

"PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DEL NUEVO ANTIBIOTICO  
SL 2266."

-----

*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 antibiótico, en adelante denominado SL 2266, y sus sales son bases orgánicas e inorgánicas adecuadas.

5.



La presente invención proporciona además un procedimiento para la producción de SL 2266 y sus sales, caracterizado porque se cultiva una nueva cepa de la especie de hongo *Sordaria araneosa* en una solución nutritiva, y se aísla dicho antibiótico del medio de cultivo y se purifica en forma de por sí conocida, por ejemplo mediante extracción o adsorción, y se convierte opcionalmente en sus sales mediante reacción con bases orgánicas e inorgánicas adecuadas en forma de por sí conocida.

La nueva cepa de la especie de hongo *Sordaria araneosa* Cain fué aislada de una muestra de tierra de la selva de Dartonfield (Ceilán) 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 3196.

La nueva cepa concuerda morfológicamente con la descripción de la especie de hongo dada por Roy F. Cain, University of Toronto Studies, Biological Series, No. 38 (1934).

La cepa de hongo NRRL 3196 de la especie de hongo *Sordaria araneosa* forma un micelio substrato parduzco y un micelio aéreo delgado y ligero cuando se cultiva sobre un agar de extracto de malta/levadura. Sobre muestras esterilizadas de excrementos crece a 27°C con la formación de un micelio aéreo compacto de color gris-blanco y con aspecto de piel. Los peritecios sumergidos o parcialmente superficiales en forma de botella, miden 550 a 700  $\mu$ . Son de color pardo claro y están cubiertos de pelos septalizados largos y compactos.



Cada uno de los asci claviformes tiene aproximadamente 250 esporos y mide 300-350 x 52-63  $\mu$ . Los ascosporos se forman en muchas hileras y miden 11-14 x 6.5-8  $\mu$ . Al avanzar el proceso de maduración se vuelven de color pardo oscuro y son opacos. Son elipsoidales y tienen un apéndice hialino primario (9 x 3  $\mu$ ) y un apéndice secundario (6.5-8 x 2  $\mu$ ) en un extremo y solo un apéndice secundario en el otro extremo.

También es posible producir el antibiótico SL 2266 usando cepas que pueden obtenerse de la cepa arriba indicada de Sordaria araneosa Cain, por ejemplo mediante selección o mutación por medio de irradiación ultravioleta o rayos X u otros medios, por ejemplo por tratamiento de cultivos de laboratorio con productos químicos adecuados.

La nueva cepa de Sordaria araneosa Cain puede cultivarse sobre diversos medios nutritivos que contienen las sustancias nutritivas usuales. Por ejemplo son sustancias nutritivas adecuadas para esta cepa 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 nitrógeno pueden usarse compuestos orgánicos o inorgánicos conteniendo nitrógeno, siendo ejemplos específicos la peptona, extracto 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 2266 consiste en que se inocula un medio nutritivo líquido con conidios o micelios de la nueva cepa de *Sordaria araneosa* Cain. El cultivo puede efectuarse, 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 incubación puede ser de 20° a 35°C. Sin embargo, se prefiere usar una temperatura entre 20° y 30°C y un valor pH de 5 a 7, en cuyo caso el cultivo se incuba durante 4 a 10 días.

El nuevo antibiótico se aísla, preferentemente mediante extracción del filtrado de cultivo con cloruro etilénico y del micelio con metanol, pero también pueden usarse otros disolventes orgánicos, por ejemplo benceno, acetato etílico, acetato butílico, cloroformo o acetona. Seguidamente se concentran los extractos y se extrae el compuesto activo con agua que tiene un valor pH de 8 a 10. Se acidifican las fases alcalinas hasta un pH de 2 a 5, y se extraen con un disolvente orgánico, por ejemplo acetato etílico. Se separa el disolvente del extracto, después de lo cual se obtiene el antibiótico bruto; éste se sigue purificando por cromatografía sobre agentes de adsorción, por ejemplo alúmina activada, gel de sílice, resinas de intercambio de iones, distribución a contracorriente o mediante precipitación.

El antibiótico SL 2266 tiene las características siguientes:



SL 2266 es un ácido amorfo, incoloro con la fórmula  $C_{27}H_{40}O_8$  y una rotación específica de  $[\alpha]_D^{20} = -45^\circ$  ( $c = 0.57$  en etanol).

Espectro Ultravioleta : hombro a  $300 \text{ m}\mu$  ( $\log \epsilon = 1.84$ ) (en metanol) (Figura 1).

5 Espectro Infrarojo : inter alia bandas a 3550, 2950, 1710, 1460, 1390, 1310, 1170, 1090, 1060, 1030, 980,  $870 \text{ cm}^{-1}$  (en  $CH_2Cl_2$ ) (Figura 2).

La sal potásica de SL 2266 forma cristales incoloros con un P.F. de  $253-255^\circ$  y una rotación específica de  $[\alpha]_D^{20} = -50^\circ$  ( $c = 0.48$  en agua).

10 Espectro Ultravioleta : máximo a  $295 \text{ m}\mu$  ( $\log \epsilon = 1.78$ ) (en metanol) (Figura 3).

Espectro Infrarojo : inter alia bandas a 3450, 2950, 1705, 1580, 1470, 1450, 1400, 1180, 1090, 1060, 1025, 1010, 990,  $795 \text{ cm}^{-1}$  (1 mg/300 mg KBr) (Figura 4).

15

El antibiótico SL 2266 ejerce una actividad fungistática.

El antibiótico es especialmente efectivo contra los ficomicetos (Absidia y Rhizopus) de los que se sabe que producen la mucormicosis en los seres humanos y los animales. El SL 2266 es aún más efectivo  
20 contra diversas levaduras que producen Candidiasis en los seres humanos y los animales. El antibiótico además muestra una buena actividad contra los hongos que producen la histoplasmosis.

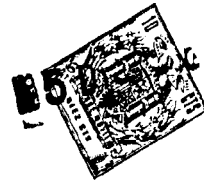
En la prueba de la perforación de difusión de agar se obtuvieron diámetros del área de inhibición de por lo menos 20 mm  
25 (diámetro de la perforación 7 mm) usando las cantidades siguientes de antibiótico:



	Organismo	Cepa No.	Cantidad necesaria de antibiótico disuelto en 0.1 ml de metanol al 5 %
5	Absidia cylindrospora	S 740	10 µg
	Absidia orchidis	S 2381	100 µg
	Rhizopus oryzae	S 2058	100 µg
	Candida albicans	S 1254	1 µg
	Candida tropicalis	S 1256	1 µg
10	Cryptococcus neoformans	S 1258	100 µg
	Saccharomyces cerevisiae	S 8	< 1 µg
	Histoplasma capsulatum	S 3095	30 µg

Método de ensayo:

Se vierten en cápsulas de Petri estériles 20 ml de un medio nutritivo esterilizado que tiene una temperatura de 45°C y que contiene 2 % de extracto de malta (Schweiz.Ferment AG, Basilea), 0.75 % de Ionagar No. 2 (Oxoid Div. of 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 esporos de 10<sup>6</sup> 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.

5 El antibiótico SL 2266 no muestra un efecto perjudicial sobre el aumento las bacterias, de modo que su efecto específico hacia los hongos es más pronunciado.

SL 2266 también tiene un fuerte efecto inhibitor sobre el aumento de las células tumorales. Este efecto se determina por la inhibición del aumento de las células tumorales (mastocitoma del ratón P 815) in vitro. La DE-50 de SL 2266 hacia estas células es 0.1 µg/ml. SL 2266 se caracteriza por una baja toxicidad. La toxicidad aguda de SL 2266 en los ratones blancos asciende a una DL-50 que sobrepasa los 250 mg/kg i.v. o per os.

15 El antibiótico SL 2266 y sus sales pueden usarse por sí mismos como productos farmacéuticos, 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 parentérica. Una dosificación diaria adecuada de SL 2266 es 50 a 1500 mg.

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



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

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

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.

15 En los siguientes Ejemplos no limitativos todas las temperaturas están indicadas en grados Centígrado. Los puntos de fusión se determinaron sobre un bloque de Kofler.



EJEMPLO 1:

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 Sordaria araneosa, cepa NRRL 3196, y se incuba  
a 27° durante 144 horas mientras se introduce aire (10 litros de aire  
por minuto) y se agita (300 revoluciones por minuto). Se filtra la  
solución de cultivo y se extrae el filtrado que tiene un pH de 4 a 6  
15 5 veces, cada vez con 6 litros de cloruro etilénico. Se extrae el  
micelio 4 veces, cada vez con 5 litros de metanol al 90 %, se separa el  
metanol del extracto y se extrae la fase acuosa 5 veces, cada vez con  
0.5 litros de cloruro etilénico. Se combinan todos los extractos de  
cloruro etilénico y se concentran en un vacío hasta 1/10 de su  
20 volumen. Se extrae el concentrado 3 veces, cada vez con 0.5 litros de  
hidróxido sódico 2 N frío, se ajusta el valor pH de los extractos  
básicos combinados a 2-3 mediante la adición de ácido clorhídrico (1:1)  
a 0° y se extrae 3 veces, cada vez con un litro de cloruro etilénico.



Se secan estos extractos sobre sulfato magnésico y se secan en un vacío, con lo cual se obtienen 1.5 g de SL 2266 bruto en forma de espuma ligeramente parduzca. Se cromatografían 1.5 g de SL 2266 bruto sobre 60 g de gel de sílice. La elución (volumen de la fracción 30 ml) con cloroformo/ácido acético glacial (98.5 : 1.5) proporciona 0.8 g de SL 2266 puro e incoloro de las fracciones 13 a 75.

EJEMPLO 2: Sal potásica de SL 2266.

Se disuelven 1.66 g de SL 2266 en 40 ml de metanol/agua (1:1) y se titula con hidróxido potásico 0.5 N hasta que se obtiene un pH de 7.0. Se filtra la solución sobre una capa delgada de carbón activo y se seca en un vacío. La cristalización del residuo de acetato etílico/metanol proporciona cristales incoloros de la sal potásica con un P.F. de 253-255°.

EJEMPLO 3: Sal sódica de SL 2266.

Se disuelven 0.50 g de SL 2266 en 50 ml de metanol/agua (1:1) y se titula con hidróxido sódico 0.1 N hasta que se obtiene un pH de 7.0. Se filtra la solución sobre una capa delgada de carbón activo y se seca en un vacío. Después de triturar con éter se obtiene la sal sódica en la forma de un polvo incoloro.



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 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 16.791/65, acogándose 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 Inven- ción por 20 años en España sobre: "PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DEL NUEVO ANTIBIOTICO SL 2266"; caracterizándose por lo siguiente.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.
- 1.-Procedimiento para la producción del nuevo antibiótico SL 2266 que tiene las características siguientes: un ácido amorfo, incoloro con la fórmula  $C_{27}H_{40}O_8$  y una rotación específica de  $[\alpha]_D^{20} = -45^\circ$  (c = 0.57 en etanol), y que indica las bandas siguientes en los Espectros Ultra- violeta e infrarrojo:
- Espectro Ultravioleta: hombro a 300 m  $\mu$  ( $\log \xi = 1.84$ ) (en metanol);
- Espectro Infrarrojo: inter alia bandas a 3550, 2950, 1710, 1460, 1390, 1310, 1170, 1090, 1060, 1030, 980, 870  $cm^{-1}$  (en  $CH_2Cl_2$ ), y sus sales con bases orgánicas o inorgánicas, caracteri- zado porque se cultiva la cepa NRRL 3196 de la especie de hongo Sordaria araneosa Cain en una solución nutritiva y se aísla el antibiótico del filtrado de cultivo y se



purifica, y cuando se requiere una sal, se efectúa la salificación.

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

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 un valor pH de 5 a 7.

10. 4.- Procedimiento para la producción del nuevo antibiótico SL 2266 y sus sales con bases orgánicas o inorgánicas, tal y como queda substancialmente descrito en la presente Memoria, e ilustrado en los dibujos adjuntos.

15. Esta Memoria consta de 12 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,  
SANDOZ, A.G.

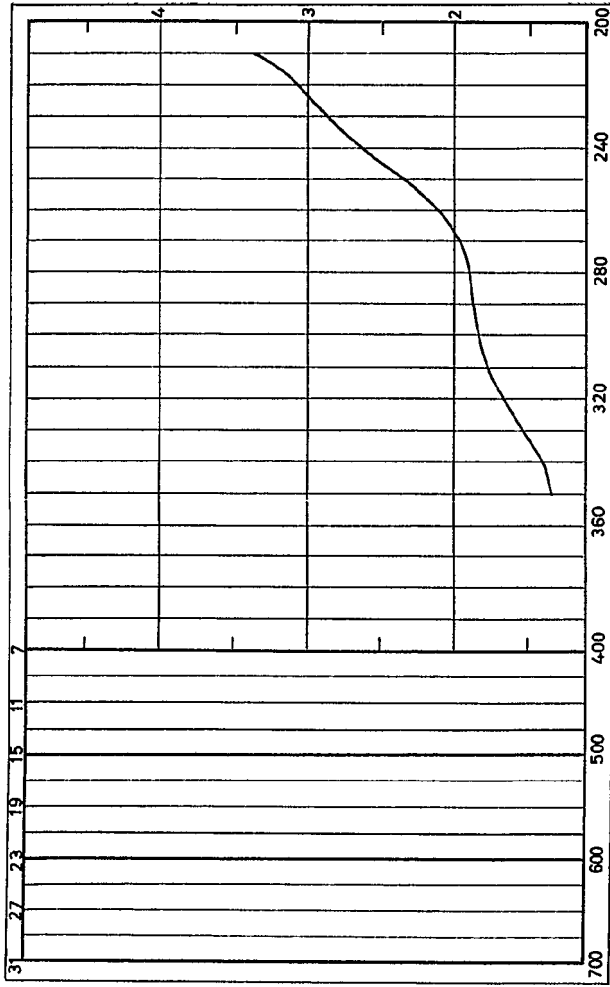
5 DIC. 1956

J. GÓMEZ DE LA FUENTE Y MODELA  
E. P. ETAMARCA E. F. GONZÁLEZ RUIZ

334195

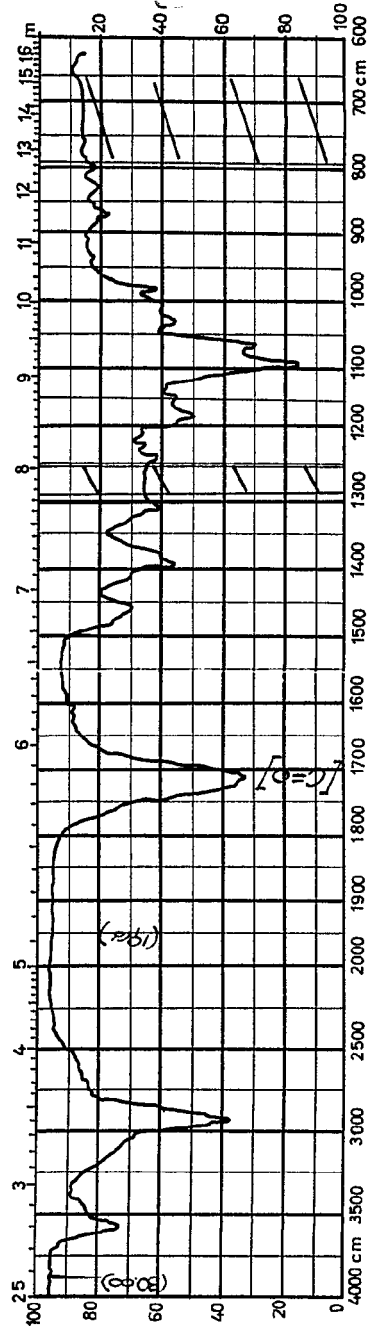
334195

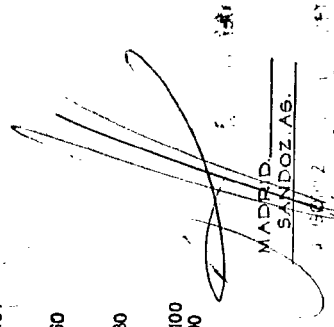
FIG 1



ESCALA VARIABLE

FIG 2



  
 MADRID  
 SANDOZ A.S.  
 1972

33-35

FIG 1

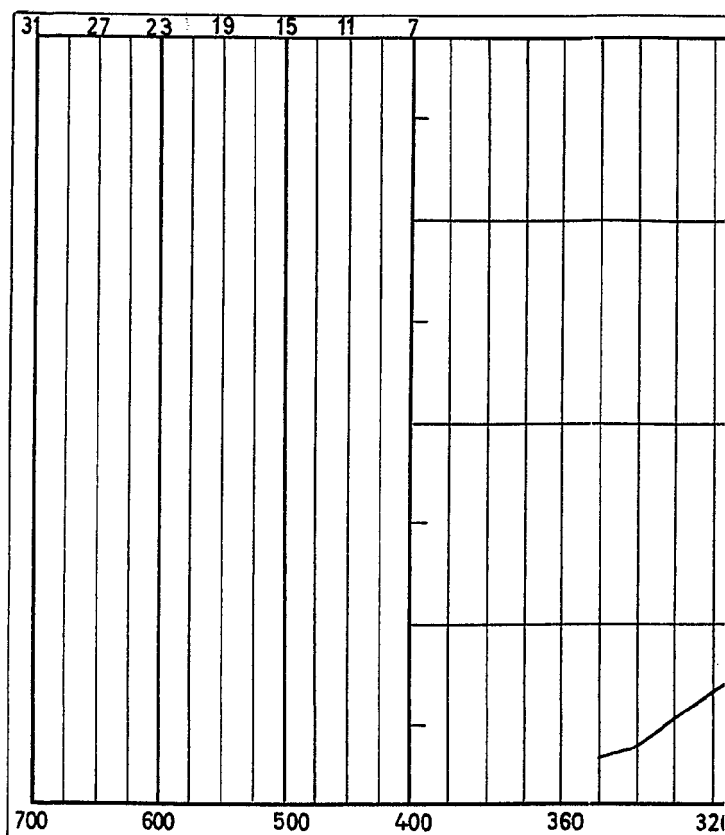
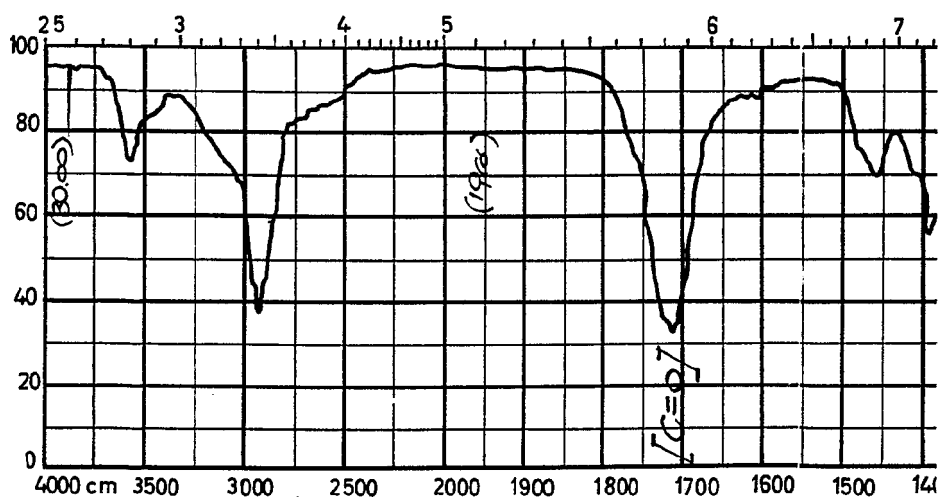
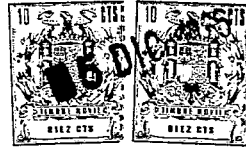
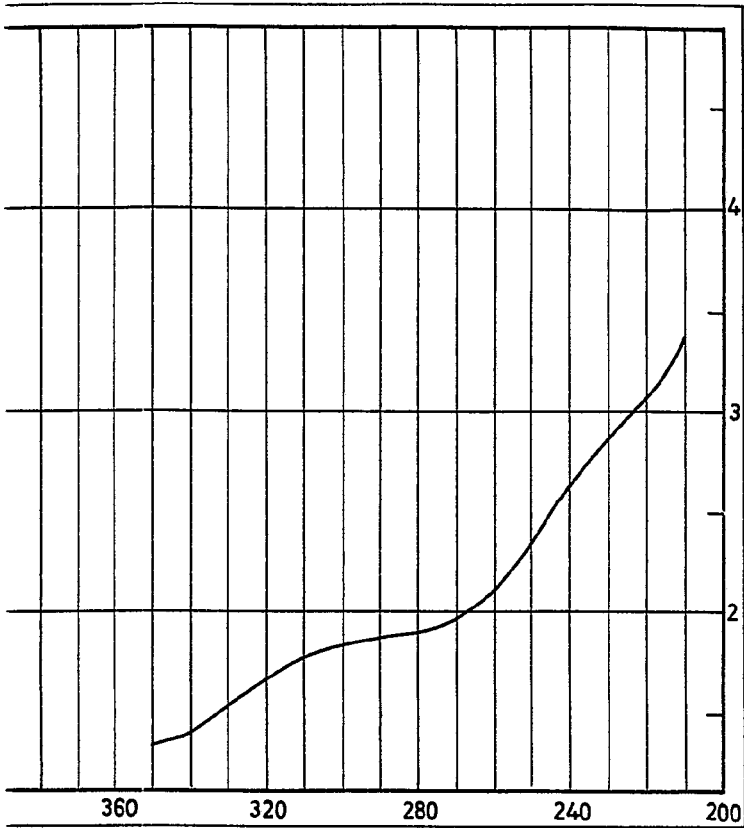


FIG 2



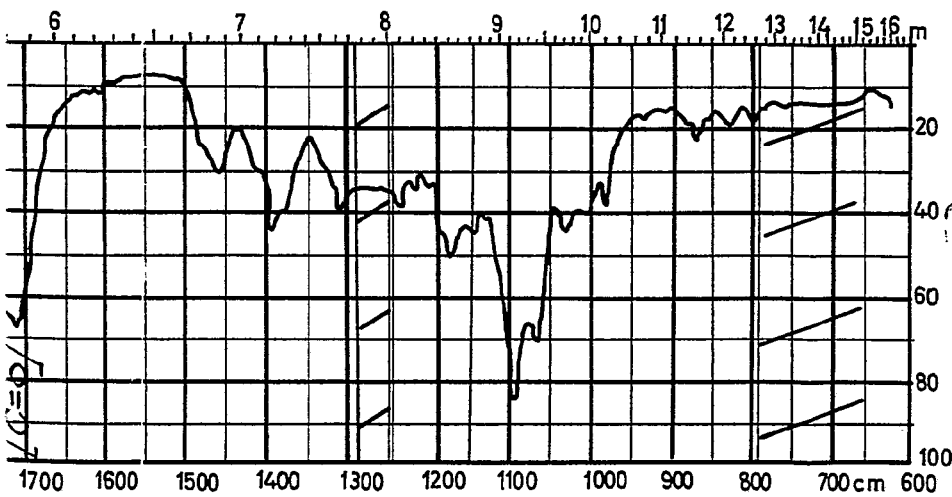
334165

FIG 1



ESCALA  
VARIABLE

FIG 2



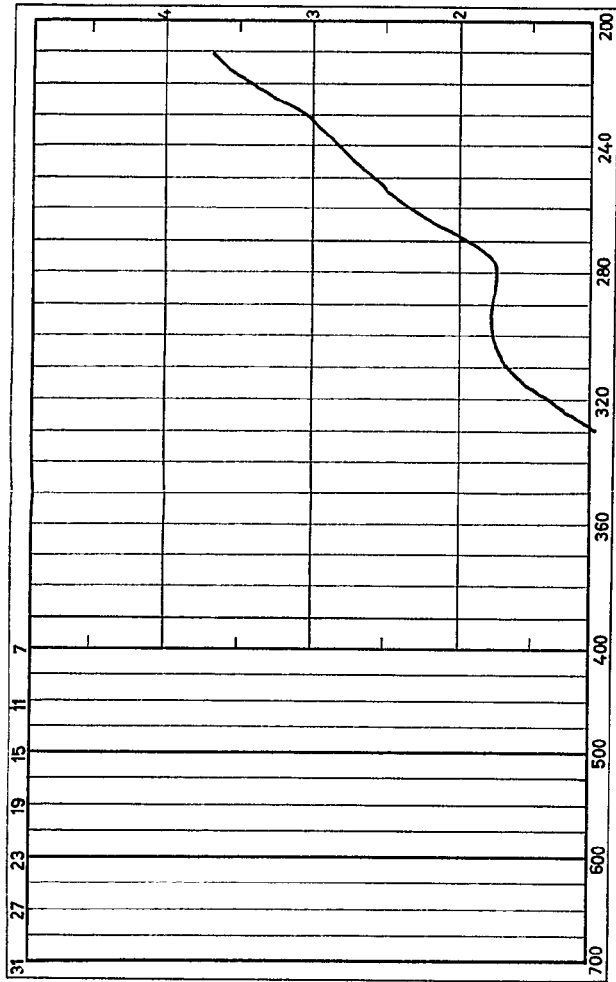
*[Handwritten signature]*

5 DIC 1967

MADRID  
SANDOZ A.G.

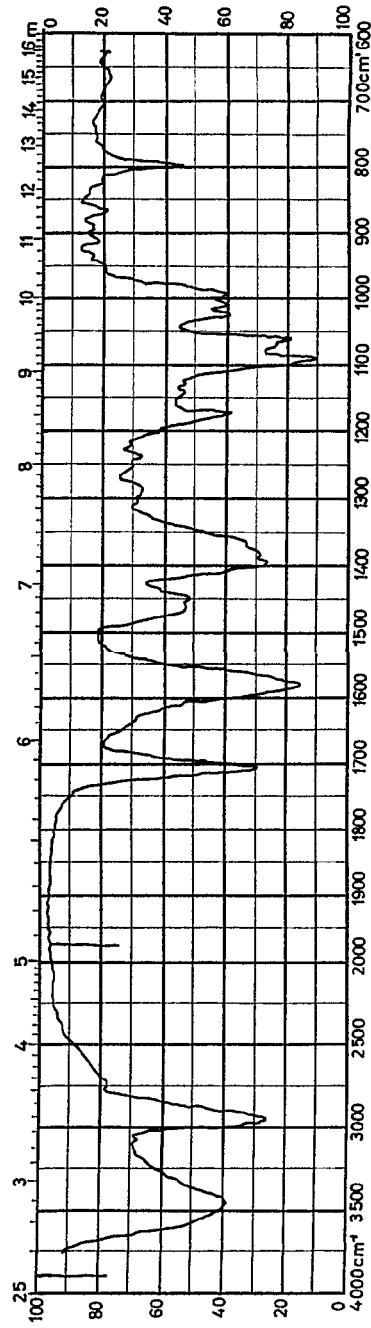
J 50-12 1. 1. 1967

FIG 3



ESCALA  
VARIABLE

FIG 4



51

MADRID.  
SANDOZ AG  
J. G. L.

FIG 3

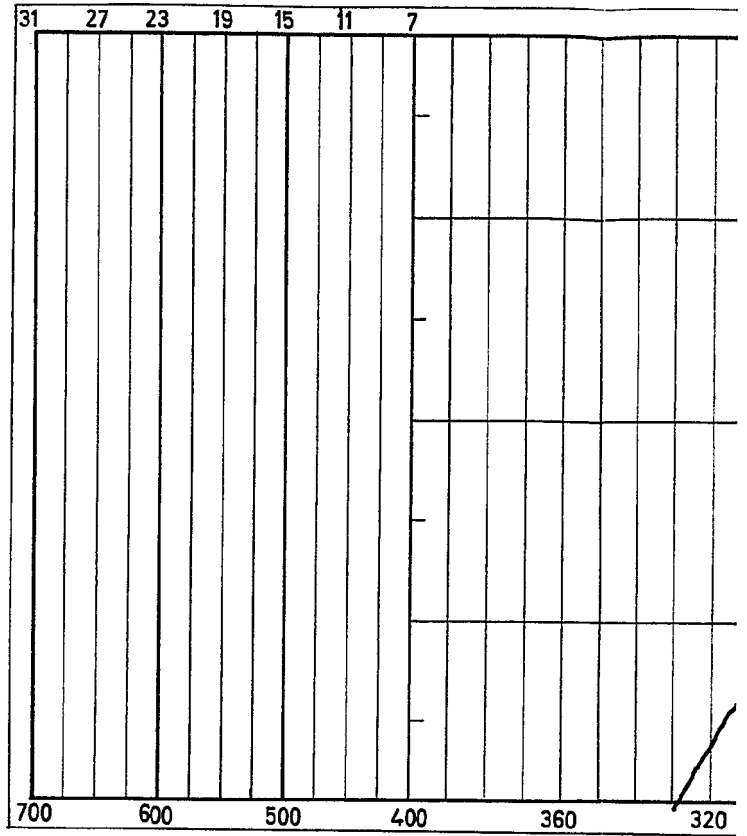
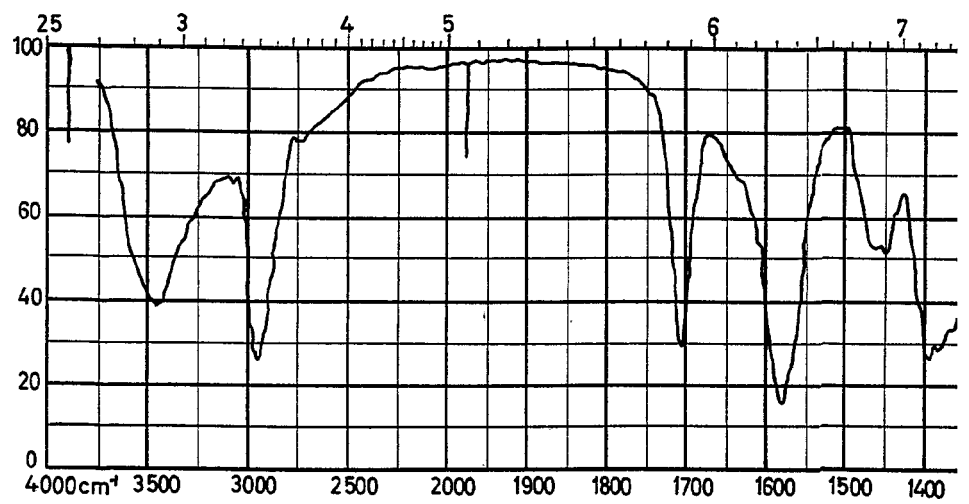
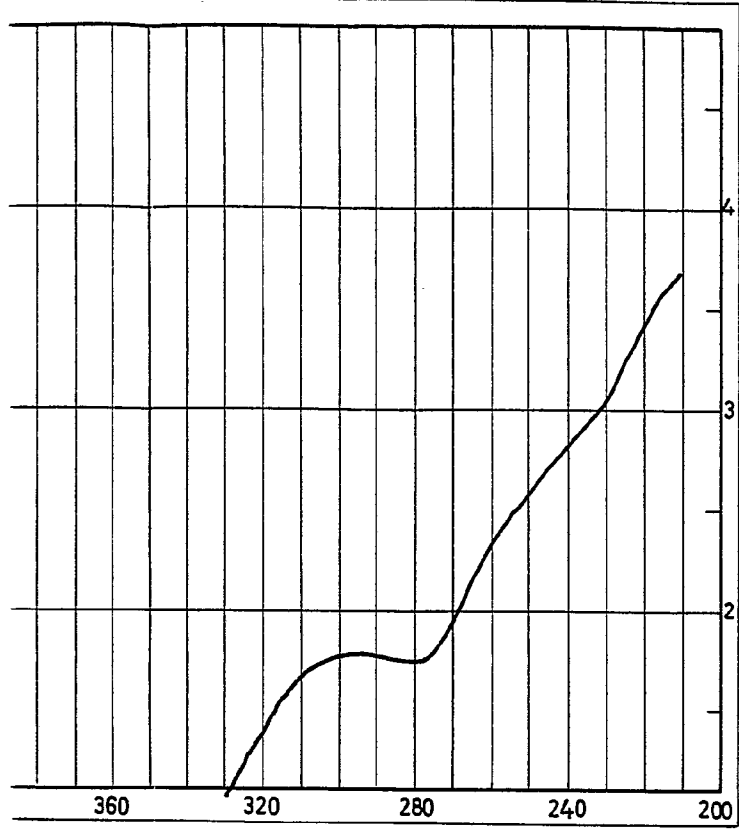


FIG 4



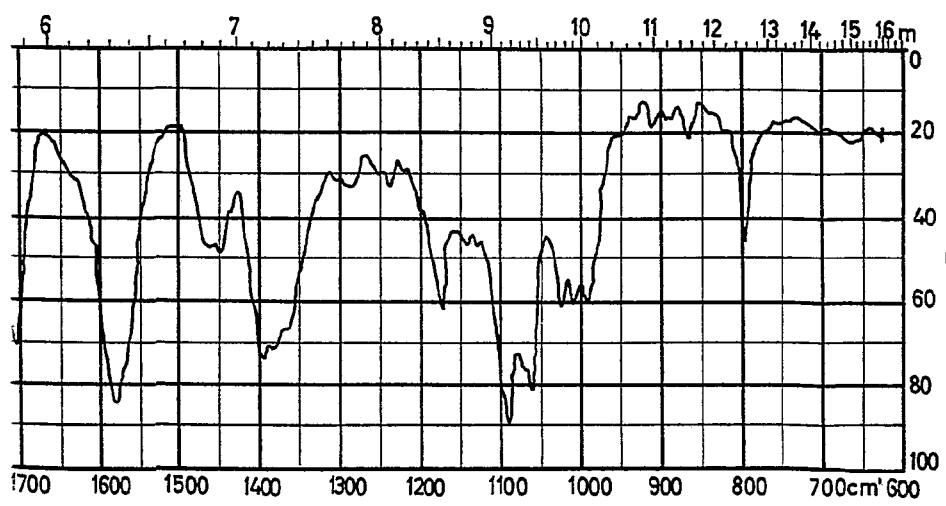
334115

FIG 3



ESCALA VARIABLE

FIG 4



5 D  
MADRID.  
SANDOZ, AG  
J. G. L.