

357

PAPEL DE INVENCIÓN

Caso 6341/6210/8.
=====



Memoria Descriptiva

sobre:

"Procedimiento para la obtención de antibióticos de venturicidina".

Solicitante: CIBA SOCIÉTÉ ANONYME, entidad suiza, residente en
Basilea, Suiza.

Este invento se relaciona con dos nuevos antibióticos, que en lo que sigue se designan como venturicidina K y venturicidina B, con sus derivados y con un procedimiento de preparación de los mismos.

Mod. 615

5.

**POOR
QUALITY**



Los nuevos antibióticos se forman en el cultivo de una nueva raza de Streptomycetos que se conserva bajo la denominación de Tü 342 en nuestros laboratorios y en el Instituto de Microbiología de la

5. Universidad de Tübingen. También fué depositada en el Department of Agriculture, Peoria, Illinois de Estados Unidos bajo la denominación NRRL 3399.

La raza Tü 342 fué aislada de una muestra de tierra que fué encontrada en los alrededores de Kocoussa, Guinea. Según las características que determinan la especie [véase Hütter et al., - Arch. f. Mikrobiol. 39, 173 (1961)], pertenece a la especie Streptomyces aureofaciens Duggar 1948, sus características son las siguientes:

10.

15. 1. Las esporas son alipsoideas, de tamaño 0,6 a 0,9 por 0,8 a 1,4 μ ; presentan una superficie lisa;

2. El micelio aéreo es al principio blanco, después pardo grisáceo a gris ceniza (cinereus);

20. 3. Las cadenas de esporas están ramificadas en forma monopodial, en espirales abiertas, sueltas e irregulares de 4 a 6 espiras;

4. En medios de cultivo conteniendo peptona no se forma ningún pigmento de tipo melamina.

25. La temperatura óptima de crecimiento de la raza Tü 342 se encuentra entre 33 y 37° C, siendo ésta 27-30°C en otras razas de la especie S. aureofaciens.

30. S. aureofaciens, además de los antibióticos Venturicinina K y B produce el conocido -

**POOR
QUALITY**



antibiótico "Venturiciidina" (= Antibiótico IA 358, véase DAs 1 104 450) que en lo que sigue se designa rá como "venturiciidina A". Los antibióticos pueden ser separados p. ej. por distribución de Craig y/o por cromatografía en gel de sílice. Como se indica después, también es posible transformar venturiciidina A en venturiciidina B.

10. El método de obtención de los antibióticos venturiciidina K y/o B se caracteriza por que la raza S. aureofaciens EÜ342 u otra raza que forme venturiciidina K y/o venturiciidina B se cultiva en un medio acuoso conteniendo una fuente de carbono y nitrógeno así como sales inorgánicas, bajo condiciones aerobias, hasta que la solución presente una acción esencialmente antibiótica; se aíslan después los antibióticos venturiciidina K y/o B y si se deseca se transforma la venturiciidina A formada en venturiciidina B, y si se deseca se transforman los antibióticos obtenidos en sus derivados.

20. En el cultivo, las fuentes de carbono y nitrógeno empleadas son por ejemplo, glucosa, sacarosa, fructosa, almidón, manita, aminoácidos por ejemplo glicina, péptidos, proteínas y sus productos de degradación, como peptona o tripton-extractos de carne, componentes solubles en agua de granos de cereales, como maíz o trigo, residuos de la destilación en la obtención del alcohol, licor - Cornsteeep, levadura, semillas, especialmente de colza, soja y algodón, sales de amonio y nitratos.

30. Las sales inorgánicas que contiene el medio de cul-



tivo son por ejemplo cloruros, carbonatos, sulfatos, nitratos, fosfatos de metales alcalinos, alcalino-térreos, magnesio, cinc, manganeso y hierro.

- El cultivo se realiza en condiciones aerobias, por ejemplo en una superficie en reposo o preferentemente sumergido, agitando o moviendo con aire u oxígeno en agitadores o en los conocidos fermentadores. La temperatura apropiada se encuentra entre 27 y 17°C. En general, el medio de cultivo muestra una acción esencialmente antibacteriana al cabo de 24 horas. Preferentemente, se realiza - el cultivo en varias etapas, es decir se obtiene primero un cultivo previo en un medio líquido, que se inoculará después en el medio de producción propiamente tal, por ejemplo, en relación 1:10. El precultivo puede obtenerse por ejemplo sembrando en un medio líquido un esporomicelio obtenido sobre un medio de cultivo sólido a los catorce días de crecimiento y dejándolo a su vez crecer durante 48 horas.
- Los antibióticos se aíslan del filtrado del cultivo según métodos conocidos teniendo en cuenta las propiedades químicas, físicas y biológicas de los antibióticos. El microorganismo *Botrytis cinerea* es especialmente bueno para comprobar la acción antibiótica en las diversas etapas de aislamiento - así como en el medio de cultivo. Las hifas de este microorganismo varían morfológicamente con los mencionados antibióticos (fuerte ramificación a partir de un determinado lugar formándose figuras de forma de escoba de bruja). El test se realiza -
- 5.
 - 10.
 - 15.
 - 20.
 - 25.
 - 30.



por ejemplo como sigue:

- En el centro de placas de agar-mal-
ta se inocular una superficie circular de 5 mm de -
diámetro con *Botrytis cinerea* y se incuban las pla-
cas de 2 a 3 días a 24°C. En este tiempo crece el
5. micelio hasta una magnitud de 20-30 mm de diámetro.
Una disolución de la sustancia a ensayar se coloca
a aproximadamente 5 mm de distancia del borde del -
micelio por medio de redondelitos de filtro de 6 mm
10. de diámetro. Las placas se incuban entonces a 24°C
durante 24-36 horas. En disoluciones activas, se -
comprueba una variación morfológica de las hifas -
hasta una distancia de 24 mm de los redondelos de -
filtro. Disoluciones con una concentración de anti-
15. bióticos de 10 /cc dan hifas que presentan todavía
un cambio más claro.

- Contrariamente a las venturicidi-
nas A y B, que son glicósidos de la 2-desoxi-D-ram-
nosa (venturicidina B) o 3-O-carbamimidil-2-desoxi-D-ram-
20. nosa (venturicidina A), el antibiótico venturicidina
X no es un glicósido. No contiene ningún azúcar.
Tampoco es idéntico con la aglicona de venturicidi-
na A y B ($C_{36}H_{60}O_8$). Hasta ahora, la venturicidina
X no ha sido obtenida como sustancia cristalina sino
25. como un polvo amorfo, uniforme en cromatografía en
capa fina. Es una sustancia lipófila, neutra e in-
colora, soluble, entre otros, en metanol, etanol, -
acetona, acetato de etilo, cloroformo y cloruro de
metileno.

30. El análisis elemental dá: C = 66,35%;

22 JUL



H = 9,18%; O = 24,90%.

El peso molecular (método osmométrico en cloruro de metileno) dió 701. Estos datos están de acuerdo con la fórmula empírica $C_{39}H_{64}O_{11}$

5. (peso molecular 709, C = 66,07; H = 9,10; O = 24,83) y $C_{39}H_{64}O_{10}$ (p.s. 692; C = 67,60; H = 9,31; O = 23,09). El poder rotatorio específico $[\alpha]_D^{23}$ es $-61,5^\circ$ (c = 1, en cloroformo).

10. El espectro infrarrojo en compresiones de bromuro potásico muestra, entre otras, bandas a 3480, 2965, 2942, 2875, 1702, 1643, 1452, 1382, 1300 (hombro), 1279, 1232, 1222, 1184, 1169 (hombro), 1129, 1095, 1052, 984, 910, 880, 870, 850, 780, 752 y 710 cm^{-1} (véase figura 1).

15. El espectro IR en cloroformo deuterado, 60 μ , está representado en la figura 2.

20. El espectro U.V. en alcohol rectificado muestra los siguientes máximos: $\lambda = 220\text{ nm}$ (log $\xi = 4,47$; hombro); $\lambda = 226\text{ nm}$ (log $\xi = 4,50$); $\lambda = 232,5\text{ nm}$ (log $\xi = 4,47$); $\lambda = 241\text{ nm}$ (log $\xi = 4,25$); $\lambda = \text{aprox. } 295\text{ nm}$ (log $\xi = 2,93$, hombro).

25. En cromatografía en capa delgada en gel de sílice, empleando como eluyente acetato de etilo, el valor R_f es 0,30, por lo tanto es bastante más elevado que los valores para la venturiciidina A y B (venturiciidina A: 0,49; venturiciidina B: 0,41).

30. En la hidratación de venturiciidina I con carbon-paladio en metanol, son aceptados - aproximadamente 2 moles de hidrógeno. La tetrahidroventuriciidina I forma cristales incoloros de punto



28 JUN 1954

de fusión 156-157°C. El análisis elemental da:
C = 57,39; 57,11; H = 9,91; 9,66; La determina-
ción del peso molecular por el método de la presión
osmótica, en acetato de etilo, dió 735. Estos da-

- 5. Los datos concuerdan con la fórmula empírica $C_{39}H_{58}O_{10}$ -
(calculado: C = 57,21; H = 9,64; mn = 697). Pro-
bablemente, la fórmula empírica de la venturici-
dina K es $C_{39}H_{54}O_{10}$.

- 10. El poder rotatorio específico del
tetrahidroderivado es $[\alpha]_D^{23} = -48,5^{\circ}$ (c = 0,968 ;
en cloroformo).

El espectro U.V. en alcohol recti-
ficado muestra máximos a $\lambda = 212 \text{ m}\mu$ ($\log \xi = 2,63$)
y $\lambda = 275 \text{ m}\mu$ ($\log \xi = 2,30$).

- 15. El espectro I.R. en bromuro potá-
sico muestra, entre otros, bandas en: 2310, 2455, 3400
(hombro), 2960, 2940, 2875, 1732, 1703, 1697, 1625,
1457, 1411, 1395, 1361, 1370, 1331, 1270, 1242, 1225,
1215, 1190, 1170 (hombro), 1133, 1089, 1052 (hombro),
20. 1029, 1011, 989, 935, 908, 882, 849, 839, 803, 796,
773, 746, 729, 695, 593 cm^{-1} (véase figura 3).

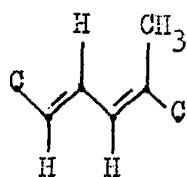
En la figura 4 se da el espectro
IR en CCl_4 de tetrahidro-venturici-
dina K.

- 25. La venturici-
dina K y su tetrahidro-
derivado pueden aislarse según el procedimiento usual,
por ejemplo con halogenuros de ácidos o especialmente
anhidridos de ácido, por ejemplo ácidos carboxílicos
alifáticos, aromáticos, aromáticos o heterocíclici-
cos, sobre todo ácidos grasos de cadena corta, por
ejemplo ácido acético.
- 30.

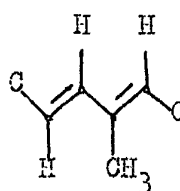
POOR
QUALITY



- En la acetilación **28** la tetrani-
droventuricidina K se obtiene el acetilderivado en
forma de aceite incoloro. En la figura 5, se dá el
espectro NMR de esta combinación en cloroformo deu-
terado. El espectro IR. en cloroformo muestra, en-
tre otras, las bandas a 3460, 1733, 1705 (hombro),
1457 y 1370 cm^{-1} . El espectro NMR es CDCl_3 muestra
señales en $\delta = 2,02 \text{ ppm}$ (s, 3H); 2,08 ppm (s, aprox.
9H).
10. En la metanolisis ácida se obtie-
nen aproximadamente 5 productos de reacción; de ellos
tres son obtenidos cromatográficamente en forma pu-
ra como aceites incoloros. No se forman metilglicó-
sicos. Los espectros NMR de los productos muestran
señales OCH_3 que pueden originarse por metanolisis
de un anillo lactona. La señal $\int 5,0 \text{ ppm}$ que apa-
rece en la venturicidina K no hidratada e hidratada,
correspondiente a un grupo $-\text{COO}-\text{CH}-$ indica también
la presencia de un anillo lactona (macrocíclico). -
15. Las otras 3 señales en esta zona, que solo muestra
el producto no hidratado, pertenecen a átomos de hi-
drógeno en dobles enlaces. El singlete en $\int 2,05 -$
ppm (figura 2) es ascrito a un grupo C-metilo en un
doble enlace pues esta señal falta asimismo en el
20. espectro del producto hidratado. En combinación con
el espectro UV, que corresponde a un dieno conjuga-
do, se puede aceptar una de las dos fórmulas parcia-
les Ia y Ib como componente de la estructura
- 25.



Ia



Ib

Además de este sistema dieno, existe un grupo cetona no conjugado (hombro a 295 nm en el espectro U.V. de la venturiciidina A y a 275 nm en el producto de hidratación). De los espectros IR se demuestra ade-

5. más la presencia de unos 16 grupos metilos, que denotan la existencia de una cadena carbonada semejante a la del macrolido clásico del tipo eritromicina.

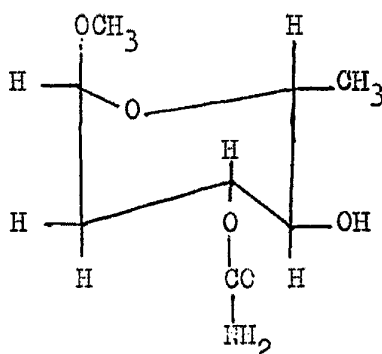
10. Para la venturiciidina A se indicó la fórmula $C_{43}H_{71}NO_{12}$ en la patente mencionada antes. No se aclaró la estructura de la combinación. En relación con la investigación del nuevo antibiótico venturiciidina B se esclarecieron también estructuralmente fragmentos parciales de la venturiciidina A.
15. De los análisis se deduce la fórmula $C_{42}H_{70}O_{11}$ para la venturiciidina B que tienen por consiguiente un COH menos que la venturiciidina A. A partir de los espectros infrarrojos (figuras 5 y 6) se puede suponer que la venturiciidina A es un éster carbámico de la venturiciidina B pues el máximo de absorción en 1605 cm^{-1} no lo presenta la venturiciidina B. En consonancia con esto, la venturiciidina B da un tri-O-acetilderivado mientras que la venturiciidina A proporciona solo un di-O-acetilderivado. Se obtuvo
- 20.



una comprobación de esta suposición al lograr un pro ducto de degradación tipo azúcar de la venturici-
na A y B y aclarar la relación entre ellos y sus cons tituciones. La venturicidina A en la metanolisis -

5. catálizada por ácido en condiciones suaves dió un -
metilglicósido cristalino, $C_8H_{15}NO_5$ (I). Por hidró-
lisis con hidróxido bórico se separó el grupo carba-
milo y se obtuvo el metilglicósido $C_7H_{14}O_4$ (II) de
una diésoxihexosa.

10. Del espectro KMR se obtiene la si guiente constitución y configuración para el metil-
glicósido $C_8H_{15}NO_5$:

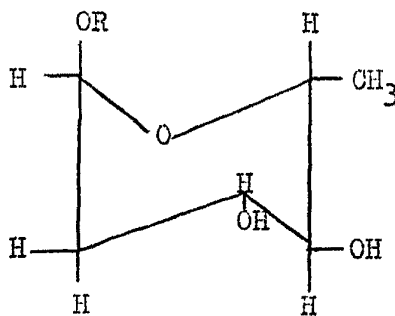


I

- Además la asignación de las seña les individuales fué confirmada por desacoplamiento de epin (véase ejemplo 1). La señal \int 4,86 ppm co rresponde claramente al proton en posición 3. Su -
desplazamiento químico corresponde al de un hidróge-
no junto a un grupo aciloxi. La señal en \int 3,21 -
corresponde al átomo de hidrógeno H-4. Por lo tan-
20. to, el grupo hidroxilo libre tiene que estar en C-4,



- mientras que C-3 lleva el resto carbamilo, la señal de H-1 (δ 4,73 ppm) es un doble doblete con las pequeñas constantes de acoplamiento $J_{1e,2a} = 3,8$ cps y $J_{1e,2e} = 1,5$ cps. De ello se deduce, por una parte, la posición ecuatorial de H-1 y por otra la posición 2 del grupo CH_2 , que se obtiene del desacoplamiento de spin. Las constantes de acoplamiento $J_{2a,3} = 11,5$ cps. $J_{3,4} = 9$ cps y $J_{4,5} = 9$ cps demuestran la posición axial de los átomos de hidrógeno en C-3, C-4 y C-5. El doblete en δ 1,33 muestra un grupo CH_3-CH- , en un 6-desoxiazúcar. El producto de degradación de la venturicidina A es por tanto una 3-O-carbamil-2-desoxi-ramnosa. Por hidrólisis con hidróxido bórico se obtiene el metilglicósido α -metil-2-desoxi-D-ramnosido $C_7H_{14}O_4$ de constitución y configuración II



II : R = CH_3

III : R = H

El mismo compuesto se forma también en la metanolisis de la venturicidina B.

Por hidrólisis de II se obtiene el azúcar libre III, que en agua muestra una rota-



ción óptica $[\alpha]_D^{23} = + 19,9^{\circ}$ (valor final después de 90 minutos).

5. La aglicona de venturicidina A y B no ha sido obtenida hasta ahora en forma pura. Basándose en el comportamiento en cromatografía en capa fina y en los espectros RMR, se puede admitir que ambos antibióticos contienen la misma aglicona.

10. Los antibióticos venturicidina B y venturicidina X muestran una buena actividad antimicrobiana, especialmente antifúngica, que es superior a la de la venturicidina A. La tabla 1 da un espectro de actividad de las venturicidinas A, B y X frente a determinados hongos. Se representa los diámetros del halo de inhibición en mm, de diferentes concentraciones de antibiótico frente a estos microorganismos en el test de difusión en placas (diámetro de los redondeles de filtro impregnados con la disolución de antibióticos, 6 mm). Los números entre paréntesis indican una inhibición incompleta y las rayas que no se lleve a cabo el correspondiente experimento.

25. La tabla muestra también que, en las máximas concentraciones ensayadas (10 mg/cc), los antibióticos son inactivos frente a la levadura fermentativa. Esto tiene importancia para la utilización de venturicidina X y/o B como fungicida en viticultura. Los residuos de los fungicidas orgánicos conocidos hoy en viticultura se encuentran en un orden de magnitud de 10 ppm. Sin embargo, cantidades de 3-5 ppm ocasionan ya retrasos en

30.



la fermentación (Vogeler y Goeldener, Zeitschr. für Obst- und Weinbau 103, 494-504, 1957), puesto que el umbral de actividad de venturicidina A y B frente a la levadura de fermentación es un cuarto más elevada, es ventajoso utilizar estos antibióticos como fungicidas en viticultura.

T A B L A I.

23



Espectro de actividad de venturicidina A, B y X

Hongo ensayado		Diámetros del halo de inhibición en las concentraciones en mg/cc.			
		10	1	0,1	0,01
Mucor Tü 285	A	(8)	(8)	(8)	-
parvisporus	B	11,5	(10)	(8)	-
	X	16	16	(12)	-
Mucor Tü 181	A	10,5	9,5	8	-
mucedo	B	14	10	7	-
	X	25	23	14,5	-
Mucor Tü 284	A	(7,5)	(7)	-	-
miehei	B	8	8	-	-
	X	18	17	12	-
Zygorhynchus Tü	A	-	-	-	-
Moelleri 190	B	(9)	(8)	-	-
	X	15	14	(8)	-
Trichophyton Tü					
297	A	-	-	-	-
mentagrophytina	B	-	-	-	-
	X	20	15	-	-
Trichophyton Tü					
298	A	12	12	12	-
rubrum	B	(10)	(11)	(7)	-
	X	25	20	-	-
Paecilomyces Tü	A	(11)	(10)	(7)	-
varioti 137	B	15	12	(10)	-
	X	27	26	14	-
Dyssochlamys Tü	A	(17)	(16)	(14)	-
nivea 271	B	22	16	15	-
	X	33	24	15	-
Aspergillus Tü					
155	A	-	-	-	-
terrena	B	(11)	(11)	(11)	-
	X	17	16	10	-



Endothia Tü 163	A	(15)	(12)	(10)	-
parasitica	B	(19)	(15)	(12)	-
	X	26	21	12	-
Cordyceps Tü 255	A	(14)	(10)	(8)	-
militarys	B	19	14	8	-
	X	31	28	17	-
Verticillium Tü	A	(9)	(11)	(11)	-
coccorum 264	B	(14)	(12)	(12)	-
	X	21	19	9	-
Leptosphaerulina	A	-	-	-	-
oryzae Tü 281	B	-	-	-	-
	X	16	14	-	-
Botrytis Tü 157 ^{***}	A	31	24	24	22
cinerca	B	39	32	32	29
	X	40	40	31	26
Beauveria Tü 253	A	11	(11)	(11)	(9)
bassiana	B	22	15	(11)	(8)
	X	35	-	25	14
Penicillium Tü 287	A	9	8	8	-
avellaneum	B	14	10	(9)	-
	X	22	20	12	-
Keratinomyces Tü	A	(10)	(10)	(8)	-
534	B	(14)	(12)	(10)	-
	X	21	19	16	-
Pseudogymnoascus	A, B	-	-	-	-
vinaceus Tü 293	X	22	20	-	-
Saccharomyces					
cerevisiac	A, B, X	0	-	-	-

*** ensayada en la disposición ucl test según Nütter et al., Arch. Mikrobiol. 51, 1 (1965)

28 J



Los nuevos antibióticos pueden ser utilizados para combatir las infecciones producidas por hongos y también como aditivo del forraje animal, para la conservación de artículos alimenticios, como desinfectante y además para combatir las enfermedades criptogámicas en plantas vivas.

Así, los antibióticos venturicidina B y/o K pueden usarse como medicamentos, por ejemplo en forma de preparados farmacéuticos. Estos contienen los antibióticos mezclados con un excipiente farmacéutico, orgánico o inorgánico, apropiado para aplicación enteral o parenteral, especialmente topi-
10. cal. Como excipientes hay que considerar aquellas sustancias que no reaccionan con las nuevas combina-
15. ciones, como por ejemplo gelatina, lactosa, almidón, estearato de magnesio, aceites vegetales, alcoholes bencílicos u otros excipientes de medicamentos conocidos. Los preparados farmacéuticos pueden presentarse en forma de tabletas, grageas, polvo, supositorios, o en forma líquida como disoluciones, sus-
20. pensiones o emulsiones. En ciertos casos se esterilizan y/o contienen productos auxiliares, como agentes de conservación, estabilizadores, humectantes o emulgentes. También pueden contener otros materia-
25. les con valor terapéutico.

Para combatir hongos del tipo -
Aspergillus niger, Alternaria tennis, Botrytis cine-
rea, Cercospora melonis, Didymella Lycopersici, Fusarium nivale, Glomerella cingulata, Helminthosporium
30. avenae etc., los antibióticos pueden ser utilizados

**POOR
QUALITY**

28 JAN



- en forma de preparados líquidos, por ejemplo disolución, suspensión o emulsión, o en forma sólida como granulados, o polvos. Para la obtención de disoluciones de los antibióticos directamente pulverizables
5. pueden considerarse por ejemplo fracciones de aceite mineral de elevado a medio punto de ebullición, como aceite Diesel o queroseno, aceite de alquitrán y aceites de origen vegetal o animal, así como hidrocarburos, como naftalina alquilada, tetrahidronaftalina;
10. en casos dados bajo aplicación de mezclas de xileno, ciclohexanoles, cetonas, además hidrocarburos clorados, como tricloroetano y tetracloroetano, tricloroetileno o tri- y tetraclorobencenos. Es ventajoso el uso de disolventes orgánicos cuyo punto de ebullición se encuentre por encima de 100°C.
- 15.

- Resulta especialmente práctica - la preparación de formas de aplicación acuosas a partir de concentrados de emulsiones, pastas o polvos para pulverizar, por adición de agua. Como sustancias emulsionantes o dispersantes entran en consideración productos que no se ionizan por ejemplo productos de condensación de alcoholes alifáticos, aminas o ácidos carboxílicos con un resto de hidrocarburo de larga cadena de aproximadamente 10 a 20 átomos de carbono, con óxido de etileno -como el -
20. producto de condensación de octadecilalcohol y 25 - a 30 Mol de óxido de etileno o el de la oleilamina técnica y 15 Mol de óxido de etileno o el producto de condensación de dodecilmercaptan y 12 Mol de óxi
25. do de etileno. Bajo los emulsionantes activos anio
- 30.

**POOR
QUALITY**



- nicamente que pueden emplearse, mencionaremos: la sal sódica del ester sulfúrico del alcohol dodecílico, la sal sódica del ácido odecilbencenosulfónico, la sal potásica o trietanolamina del ácido oleico, la sal potásica o trietanolamina del ácido oleico o del ácido abiético o de mezclas de estos ácidos, o la sal sódica de un ácido sulfónico de petróleo. Como dispersantes activos por formación de cationes están las combinaciones de amonio cuaternario, como el bromuro de cetilpiridinio, o el cloruro de dioxietilbencildodecilamonio.
- 5.
- 10.

- Para la obtención de polvos para esparcir pueden elegirse como excipientes sólidos talco, caolín, bentonita, carbonato cálcico, fosfato cálcico, pero también carbón, serrín de corcho, harina de madera y otros materiales de origen vegetal. También es muy conveniente la obtención de preparados en forma granulenta. Las diferentes formas de aplicación pueden ser desempeñadas en la forma usual por adición de sustancias que mejoren la distribución, la adherencia, la resistencia a la lluvia o el poder de penetración; mencionaremos las siguientes sustancias: ácidos grasos, resina, cola, caseína o alginatos.
- 15.
- 20.

- El invento será descrito en los siguientes ejemplos. Las temperaturas se indican en grados Celsius.
- 25.

Ejemplo 1

- a) Se siembra, con un cultivo en agar de *Streptomyces aureofaciens* Tü 342,300 cc de un medio de cultivo líquido que se encuentra en un
- 30.



28

- matraz Erlenmeyer de 2 litros y contiene por litro 20 g de harina de soja con mucha gusa) y 20 g de manita y cuyo pH antes de la esterilización fué - ajustado a 7,5 con potasa cáustica; se incuba la -
5. suspensión a 27° con agitación. Después de unas - 48 horas se lleva el cultivo, en la relación 1:10, a un medio de igual composición que se encuentra en un fermentador. Se incuba de nuevo a 27° con buena aircación durante 24 horas. El ensayo descrito antes
10. con *Botrytis cinerea* se utiliza para el control de la actividad en los cultivos y en todos los estadios de la elaboración.

- b) La raza *Streptomyces aureofaciens* Tü 342 se cultiva en un medio líquido, según el pro
15. cedimiento descrito, conteniendo por litro 20 g de extracto de malta (aproximadamente 50% de contenido sólido), 20 g de solubles de destileria residuos de maiz seco), 5 g de cloruro sódico y 1 g de nitrato-sódico.

- c) La raza *Streptomyces aureofa-*
20. *ciens* Tü 342, según el procedimiento descrito, se - cultiva en un medio líquido que contiene por litro 20 g de solubles de destileria 20 g de lactosa, 5 g de cloruro sódico y 1 g de nitrato sódico.

- d) La raza *Streptomyces aureofaciens*
25. Tü 342, de acuerdo al procedimiento descrito, se cul
- tiva en un medio líquido que contiene por litro 10 g de glucosa, 5 g de peptona, 3 g de extracto de -
- carne, 5 g de cloruro sódico y 10 g de carbonato -
30. cálcico. El pH se ajusta antes de la esterilización



a 7,2 con potasa caústica.

- Si el cultivo muestra una actividad esencialmente antimicrobiana, se enfría y se filtra bajo presión con adición de un material auxiliar para la filtración, por ejemplo Hyflo-Supercel^R. Sin variar el pH (7,5-7,8 aprox.) el filtrado se extrae dos veces con la mitad de su cantidad de acetato de etilo; con ello, las sustancias activas antibioticamente pasan al acetato de etilo. Cantidades notables del antibiótico se encuentran también en el residuo del filtrado y se recuperan por varias extracciones con metanol. Los extractos en metanol se reducen mucho al vacío, se diluyen en agua y se extraen varias veces con acetato de etilo. Después de la concentración de los extractos en acetato de etilo obtenidos del filtrado del cultivo y de los residuos, se obtiene un residuo oleoso de 80-100 g a partir de 100 litros de líquido de cultivo.
- 40 g de este residuo se purifican previamente por una distribución de braig con 190 "platos". El sistema de disolventes utilizado contiene 4,25 litros de tetracloruro de carbono 0,75 litros de cloroformo, 4 litros de metanol y 1 litro de agua. Las venturicidinas A, B y X se enriquecen en los platos 75-130 (máximo en el 100). Estas fracciones se purifican y se secan al vacío. Se obtiene 25 g de un polvo amarillo pálido. 21 g de esta sustancia se reparten con el mismo sistema de disolventes en 600 platos. Las venturicidinas se en-
- 5.
 - 10.
 - 15.
 - 20.
 - 25.
 - 30.



- cuentran en los platos 265-396. Por evaporación al vacío se obtiene 5,1 g de venturicidina B y venturicidina K de los platos 265-308; 5,4 g de venturicidina B y K y venturicidina A de los 309-328 y 10,1 g de venturicidina A y venturicidina K de los 329-396. Por cromatografía en capa fina en gel de sílice F 254 (placas Merck), con acetato de etilo como eluyente, las sustancias muestran los siguientes valores R_f (la mancha se revela con ácido sulfúrico - concentrado y calentamiento a 140°C): venturicidina A: 0,49; venturicidina B: 0,41; venturicidina K: 0,30. Las tres mezclas de sustancias se cromatografían en columnas de gel de sílice Merck. Del residuo de evaporación de las fracciones 329-396 se obtiene por cromatografía en 250 g de gel de sílice (Merck) y elución con 1,5 litros de cloroformo-acetato de etilo (1:1), 135 g de venturicidina K en forma de polvo amorfo amarillo. Tiene las propiedades descritas en la parte general.
20. A continuación se eluye el residuo de las fracciones 329-396 con 1 litro de acetato de etilo. Se obtiene así 5,27 g de venturicidina A que por cristalización de cloroformo-éter forma cristales incoloros. Punto de fusión: 140-142°. -
25. $[\alpha]_D^{23} = +119$ (c = 0,5 en cloroformo). El espectro infrarrojo en KBr se da en la figura 6 y el de RMN (60 MHz) en $CDCl_3$ en la figura 7.
- Para dilucidar la estructura de venturicidina A se realizaron los siguientes experimentos:
- 30.

28 JUN



1. Di-O-acetil-venturicidina A

200 mg de venturicidina A se acetilaron con 2 cc de anhídrido acético y 0,6 cc de piridina durante 15 horas a la temperatura ambiente y se evaporaron al vacío. Se cromatografió el residuo sobre 20 g de gel de sílice. Empleando acetato de etilo como eluyente se obtuvieron 205 mg del producto uniforme cromatográficamente, que después de una triple recristalización, a partir de acetona-éter de petróleo, dió cristales incoloros de punto de fusión 169-171°. $[\alpha]_D^{23} = + 95^\circ$ (c = 0,97 en cloroformo). Espectro de absorción infrarroja en IR: máximos a 1748, 1715 (hombro), 1608 cm^{-1} ; el espectro NMR en CDCl_3 : 2,00 ppm (s, 3 H), 2.06 ppm (s, 3H). Por lo demás, el espectro no se diferencia esencialmente del de la venturicidina A

$\text{C}_{47}\text{H}_{75}\text{NO}_{14}$ Calculado: C 64,29 H 8,61 N 1,60 %
 Encontrado : C 64,30 H 8,80 N 1,70 %

20. 2. α -metil-3-O-carbamoil-2-desoxi-D-ramosido (I)

A una disolución de 3,30 g de venturicidina A en 200 cc de metanol absoluto se añadieron 20 cc de ácido clorhídrico 1,3 N en metanol absoluto. Después de 6 horas a 20°, el análisis cromatográfico en capa fina muestra la desaparición completa del material de partida. La disolución se evaporó a sequedad en el vacío a 25°. El cromatograma en capa fina (acetato de etilo) mostró una mancha parda alargada con Rf 0,6 y una mancha aguda gris azulada con Rf 0,28. La separación se realizó



- en 200 g de gel de sílice. Con acetato de etilo se obtuvieron en total 1,892 g de fracciones uniformes amorfas que se componen principalmente de dos combinaciones (Rf 0,52 y 0,53). Acetato de etilo-metanol (8:2) dió 641 mg de la sustancia con Rf 0,28 que después de recristalizar dos veces de éter-éter de petróleo y sublimación (100-110°, alto vacío) - formó cristales incoloros con punto de fusión 146-149°. $[\alpha]_D^{23} = +137^\circ$ (c = 1,47 en acetona); espectro de absorción infrarroja en najol[®]: ν (OH) y ν (NH) 3400, 3350, 3290 y 3190, ν (CO) 1715, 1620 cm^{-1} . El espectro de RMN en CDCl_3 después de tratar con D_2O (100 MHz) dió:
- 5.
- 10.



Desacoplamiento de spines:

	Asignación	Señal desacoplada ∫ Multiplicidad.	Asignación
1,33 ppm	3 H-6	3,66 ppm d, J=9 Hz	H-5a
3,66 ppm	H-5a	1,33 ppm s, 3H	3 H-6
		3,21 ppm d, J=9 Hz	H-4a
3,21 ppm	H-4a	3,66 ppm	H-5a
		4,86 ppm dd, J _{3,2a} =11,5Hz	H-3a
		J _{3,2e} =5,5 Hz	
4,73 ppm	H-1e	1,75 ppm dd, J _{2a,2e} =13 Hz	H-2a
		J _{2a,3a} = 9 Hz	
		2,18 ppm dd, J _{2e,2a} =13 Hz	H-2e
		J _{2e,3a} =5,5Hz	

Espectro de masas:

m/e 205 (M), 174 (M - OCH₃), 161 (M - CONH₂), 131 (M - OCH₃ - CONH₂ + H), 113 (131 - H₂O), 104, 100 (pico-base).

C₈H₁₅NO₅ Calculado: C 46,82 H 7,37 N 6,83 % p.m. 205
 Hallado : C 46,80 H 7,22 N 6,88 % p.m. 205 (espectro de masas)

3. Metil-O-acetil-O-carbamil-2-desoxi-D-ramnosido

250 mg del carbamato I se acetilaron según método usual con 4 cc de anhídrido acético y 1 cc de piridina y el producto bruto se cromatografió en 30 g de gel de sílice con acetato de etilo. El eluido (235 mg) se destiló en alto vacío y se enfrió después lentamente hasta formar cristales incoloros de punto de fusión 100-110°. El espectro NMR muestra que se trata de una mezcla de al menos



tres isómeros: 3 dobles (J 6,5 Hz aprox.) en δ - 1,17, 1,23 y 1,35 ppm; todos de aproximadamente igual intensidad; señales de acotilo en δ 2,00 y 2,07 ppm; singletes OCH₃ en δ 3,33, 3,38 y 3,49 ppm.

C₁₀H₁₇NO₅ Calculado: C 48,58 H 6,93 N 5,66 %

Encontrado: C 48,53 H 6,92 N 5,61 %

5. 4. α -Metil-2-desoxi-D-ramosido (II), a) a partir de carbamato I

- 220 mg del carbamato I en 9 cc de agua fueron hidrolizados con 6,1 cc de disolución saturada de hidróxido bórico, durante 48 horas a la temperatura ambiente. El carbonato de bario formado se separó por filtración y el exceso de hidróxido bórico se precipitó haciendo pasar CO₂. El filtrado se evaporó al vacío y se cromatografió el residuo en 20 g de gel de sílice. Con acetato de etilo se obtuvo, primero, 50 mg del material de partida y, después, 130 mg del producto de hidrólisis en forma de un aceite espeso con un Rf uniforme (0,25 con acetato de etilo como eluyente). Después de varios días cristalizó en cristales incoloros $[\alpha]_D^{23} = +133^{\circ}$ (c = 1,05 en acetona); El espectro de absorción infrarroja del líquido: ν (OH) 3400 cm⁻¹ (banda ancha) y ninguna banda en la región de 6 μ . El espectro de absorción infrarroja y el valor Rf concuerdan con los del metilglicósido de la venturicidina B (véase después). El espectro NMR en CDCl₃ (60 MHz); δ 1,29 ppm (d, J = 6,5 Hz, 3 H); 1.4 - 2.4



ppm (m, 2H); 3,32 ppm (s, 3 H); 4.75 ppm (dd, $J_{1e,2a} = 4,5$ Hz, $J_{1e,2e} 1,5$ Hz aprox. 1 H). Señales de otros 5 H en un montón mal resuelto entre $\int 2,8$ y 4,0 ppm.

5. b) Por metanolisis de venturicidina B

A 850 mg de venturicidina B en 50 cc de alcohol absoluto se añadieron 5,5 cc de ácido clorhídrico 1,3 N en metanol absoluto. Al cabo de cinco horas a la temperatura ambiente, no se comprobó ninguna cantidad del material de partida. La disolución se evaporó al vacío, a 25° y se cromatografió el residuo en 80 g de gel de sílice. Acetato de etilo eluyó 625 mg de producto homogéneo con un Rf de 0,6 (cromatografía en capa fina con acetato de etilo), que no se distinguía de las correspondientes fracciones de la metanolisis de venturicidina A. Con acetato de etilo-metanol 8 : 2 se obtuvieron 180 mg de aceite incoloro, Rf 0,25, uniforme. $[\alpha]_D^{23} = + 158^\circ$ (c = 1,11 en acetona). El espectro de MLR era idéntico con el del producto obtenido por hidrólisis alcalina del carbamato (véase arriba).

5. 2-desoxi-D-ramnosa

Se calentó a 80-85° durante hora y media 85 mg de α -metil-2-desoxi-D-ramnosido (a partir de venturicidina A, véase 4., método a) con 10 cc de ácido sulfúrico 0,5 N. Después se neutralizó el ácido sulfúrico con carbonato de bario, se filtró y se evaporó la disolución al vacío. Se disolvió el residuo en 5 cc de acetona, se filtró nuevamente y se evaporó. Se obtuvieron 30 mg de un -

28 JUN 1964

- jarabe claro amarillo pálido. La siguiente purificación se realizó por cromatografía en gel de sílice con acetato de etilo-metanol 8:2. El eluato, viscoso se cromatografió en capa fina (acetato de etilo-metanol 8 : 2, Rf 0,30) Espectro de absorción infrarroja del líquido: ninguna banda en la región de 6 u. $\frac{[\alpha]_D^{23}}{c} = + 60,8^{\circ}$ (c = 0,977 en acetona); + 19,9^o (c = 0,993 en agua, valor final a los 90 minutos). Por hidrólisis del glicósido de venturicidina B se
10. obtuvo el mismo azúcar (idénticos espectro de absorción infrarroja y valor Rf).

Ejemplo 2

- Se hidratan en una atmósfera de hidrógeno 3 g de venturicidina X en 150 cc de metanol con 750 mg de carbón-paladio al 10%. Después de 2 horas la hidratación llega a un punto de reposo: se han utilizado 237 cc de hidrógeno (20^o, 725 mm) lo que corresponde a aproximadamente 2 Mol. Se separa el catalizador por filtración, se evaporará la disolución y se cromatografía el residuo en 30 g de gel de sílice. Con acetato de etilo se eluyen 2,56 g del tetrahidroacrilato de venturicidina X en forma de sustancia incolora que cristaliza en contacto con éter. Las propiedades del compuesto se han indicado en la parte general de la descripción.
- 15.
- 20.
- 25.

Ejemplo 3

- Se dejan reaccionar a la temperatura ambiente durante 6 horas 100 mg de tetrahydroventuricidina X con 2 cc de anhídrido acético y 2 cc de piridina. Se evapora la disolución a sequedad.
- 30.

POOR
QUALITY



5. Por cromatografía en gel de sílice (10 g) con cloroformo-acetato de etilo (4:1) como eluyente, se obtienen 84 mg de un aceite incoloro. Las propiedades de este producto de acetilación de la tetrahidro-venturicidina K se han indicado en la parte general de la descripción.

Ejemplo 4

10. 4,31 g del residuo de evaporación de las fracciones 285-308 del ejemplo 1 se cromatografía en 350 g de gel de sílice. Con cloroformo-acetato de etilo (1:1) se eluyen 1,75 g de venturicidina K. En la elución con acetato de etilo se obtienen 1,23 g de venturicidina B uniforme cromatográficamente. Se obtiene en forma de polvo incoloro por precipitación de acetato de etilo-éter de petróleo.

15. Punto de fusión 145-149°. $\sqrt{\frac{M}{D}}^{23} = + 100^\circ$ (c = 0,347 en cloroformo). Espectro infrarrojo en comprimidos de KBr, véase fig. 8. Espectro de RMN en CDCl₃, véase figura 9.

$C_{42}H_{70}O_{11}$ Calculado: C 67,16%; H 9,40%; Em 751
Hallado : C 66,86%; H 9,29%; Em 733

20. El peso molecular fué determinado por medidas de presión osmótica.

Ejemplo 5

25. 200 mg de venturicidina K se acetilan con anhídrido acético de igual manera que se describe para venturicidina A en el ejemplo 1 bajo 1). La tri-O-acetil-venturicidina B obtenida en bruto se purifica por cromatografía en gel de sílice y elución con -



acetato de etilo. Se obtiene un polvo incoloro amorfo, de punto de fusión 150 - 152°. El espectro NMR en CCl₃ muestra señales en δ = 1,59 ppm (s, 3 H); 2,01 ppm (s, 3 H) y 2,02 ppm (s, 3H).

C₄₆H₇₆O₁₄ Calculado : C 65,73 %, H 8,73 %
Hallado : C 65,92 %, H 8,54 %

5.

Ejemplo 6

3 mg de venturicidina A en 2 cc de etanol agua (1:1) se dejan estar a la temperatura ambiente con unas gotas de disolución de hidróxido de bario saturada. Lentamente, se forma un precipitado de carbonato bórico. Al cabo de 24 horas no se puede comprobar la existencia de material de partida por cromatografía en capa fina; por el contrario aparece una nueva mancha con las propiedades de la venturicidina B, junto a pequeñas cantidades de productos secundarios con menor Rf.

10.

15.

Ejemplo 7

Se disuelven 100 mg de venturicidina K en 1cc de etilcelosolve, conteniendo 10% de triton^R K-100 y se lleva a un litro con agua destilada. La disolución sirve como pulverizante, por ejemplo para combatir, en samientos, infecciones con Botrytis cinerea.

20.

25.

Se rocian cuatro veces, en intervalos de 14 días, con la disolución para pulverizar, mencionada antes, parcelas infectadas en la segunda generación de un vinedo experimental. En comparación con las parcelas de control sin tratamiento se obtiene una actividad contra Botrytis cinerea.

28

Ejemplo 8

La disolución testigo de la sustancia activa se obtiene por disolución de 10% de venturicidina B en etilcelosolve, conteniendo 10% de Triton X-100 y se lleva a la concentración deseada con agua destilada.

- Por una parte, se pulverizaron con la disolución testigo y se dejaron secar hojas jóvenes de aproximadamente igual tamaño de plántones de vid de la clase "Riesling Sylvaner"; por otra parte, se pusieron en la disolución de la sustancia activa durante 48 horas. A continuación, las hojas así tratadas se infectaron con una suspensión acuosa de conidias de Botrytis cinerea Pers. y se incubaron a la temperatura ambiente en una cámara húmeda. Después de 4 días, se valoró el porcentaje de superficie de hojas coloreada por el excitante como consecuencia de la infección. Los resultados se dan en la siguiente tabla en la que sirve de patrón un preparado de oxiclóruo de cobre al 50%.



23 JUN 1966

Tabla: Actividad de la venturicidina B frente a Botrytis cinerea

Substancia ensayada	Concentra- ción emplea da.	% de actividad	
		Tratamiento de superficie	Absorción del tallo
Venturicidina B	0,01	82	41
	0,001	41	13
	0,0001	13	0
Oxicloruro de cobre	0,3	67,4	0
Control		0	

Ejemplo 9

Se obtuvo un caldo acuoso al 0,1% de venturicidina K. Este caldo fué pulverizado una vez profílecticamente sobre plantas de arroz colocadas en un invernadero.

5. Dos días después del tratamiento se infectaron las plantas con una suspensión de conidias de *Piricularia oryzae* Bri et Cav. que causa la enfermedad tizón del arroz y después de 7 días se determinó el ataque del hongo.

10. En comparación con los controles no tratados, se comprobó solo un ataque del 15% en las plantas rociadas con venturicidina K.

N O T A

28 JUN



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 patentes presentadas en Suiza con fechas 30 de junio de 1.967, número 9324/67, 20 de diciembre de 1.967, número 17886/67 y 11 de junio de 1.968 sin número, acogiéndose por 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 OBTENCIÓN DE ANTIBIÓTICOS DE VENTURICIDINA"; caracterizándose por lo siguiente:

1ª.- Procedimiento para la obtención de antibióticos de venturicidadina más especialmente de antibióticos venturicidadina X y/o B, caracterizado porque se cultiva en un medio nutritivo acuoso, conteniendo una fuente de carbono y de nitrógeno y sales inorgánicas, la raza *Streptomyces aureofaciens* Tü 342 u otra raza que forme venturicidadina B y/o venturicidadina X, hasta que el medio muestre una actividad esencialmente antibacteriana, se aíslan los antibióticos venturicidadina X y/o B del filtrado del cultivo y, si se desea, se transforma la venturicidadina A formada en venturicidadina B y, si se

28 JUN



desea, se obtienen derivados de los antibióticos.

5. 2ª.- Procedimiento, según la rei vindicación 1, caracterizado porque el cultivo se realiza en condiciones aerobias, preferentemente su mergido.
10. 3ª.- Procedimiento, según la rei vindicación 1 ó 2, caracterizado porque los antibióticos se extraen con un disolvente orgánico o mezcla de disolventes.
15. 4ª.- Procedimiento, según las rei vindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque los antibióticos se extraen con acetato de etilo y/o metanol.
20. 5ª.- Procedimiento, según una de las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque los antibióticos se purifican y/o se les separa por dis tribución en contracorriente.
25. 6ª.- Procedimiento, según una de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque los antibióticos se purifican y/o separan por distribu- ción de Craig en un sistema de disolventes contenien do tetracloruro de carbono-cloroformo-metanol-agua.
30. 7ª.- Procedimiento, según una de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque la - separación de los antibióticos se efectua por croma tografía.
30. 8ª.- Procedimiento, según una de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque los antibióticos se separan por cromatografía en gel de sílice.
30. 9ª.- Procedimiento, según una -

28 JUN



de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque -
la venturicidina B se obtiene en forma pura.

10ª.- Procedimiento, según una -
de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque la
5. venturicidina X se obtiene en forma pura.

11ª.- Procedimiento, según una de
las reivindicaciones 1-9, caracterizado porque la -
venturicidina B se transforma en venturicidina X me-
diante de hidróxido bórico.

10. 12ª.- Procedimiento, según una de
las reivindicaciones 1-11, caracterizado porque los
antibióticos se someten a hidratación.

13ª.- Procedimiento, según una -
de las reivindicaciones 1-12, caracterizado porque
15. los antibióticos o sus productos de hidratación, se
acilan.

14ª.- Procedimiento, según la rei-
vindicación 10, caracterizado porque la venturicidina
X se transforma en su tetrahidroderivado.

20. 15ª.- Procedimiento, según una de
las reivindicaciones 10 ó 14, caracterizado porque -
la venturicidina X o su producto de hidratación, se
acetila.

16ª.- Procedimiento, según una de
25. las reivindicaciones 1-11, caracterizado porque los
antibióticos se degradan por metanolisis ácida.

17ª.- Procedimiento para la ob-
tención de antibióticos de venturicidina; tal y co-
mo queda sustancialmente descrito en la presente Me-
30. moria, y planos.



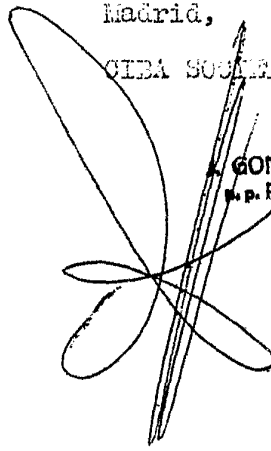
28 JUN 1968

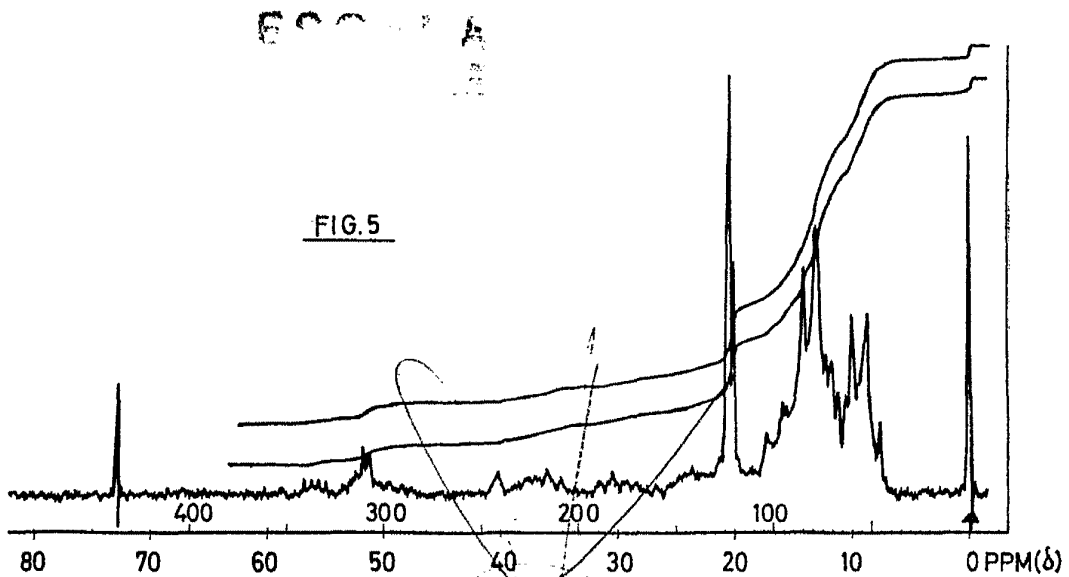
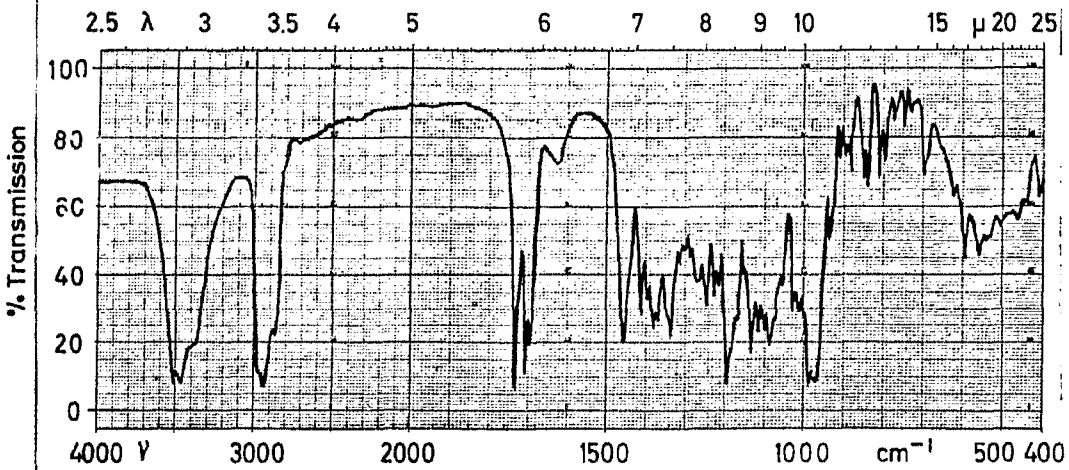
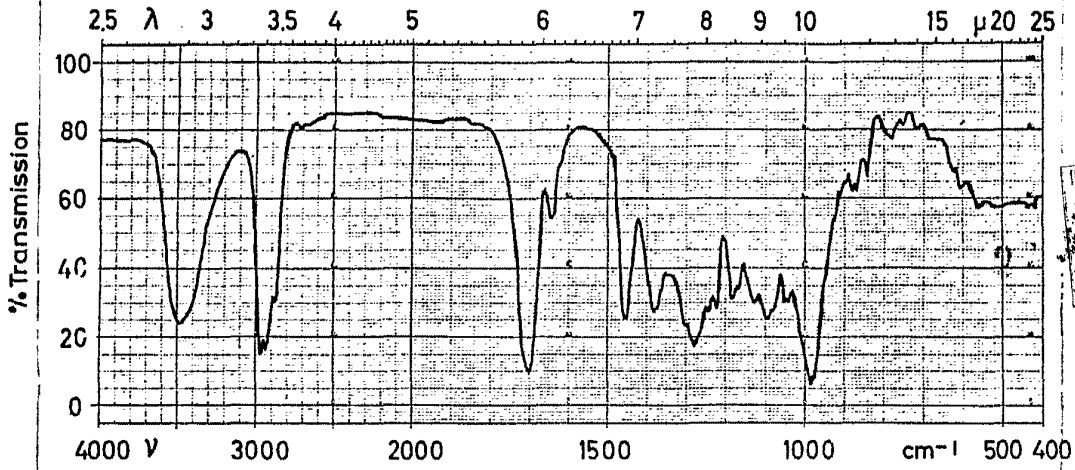
Esta Memoria consta de treinta y cinco hojas, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 28 JUN 1968

GIBB SOCIÉTÉ ANONYME,

GOMEZ ACEBO Y MODEY
p. p. Filiales de E. Hernández Ruiz





Handwritten scribbles and illegible text at the bottom of the page, possibly including a signature or date.

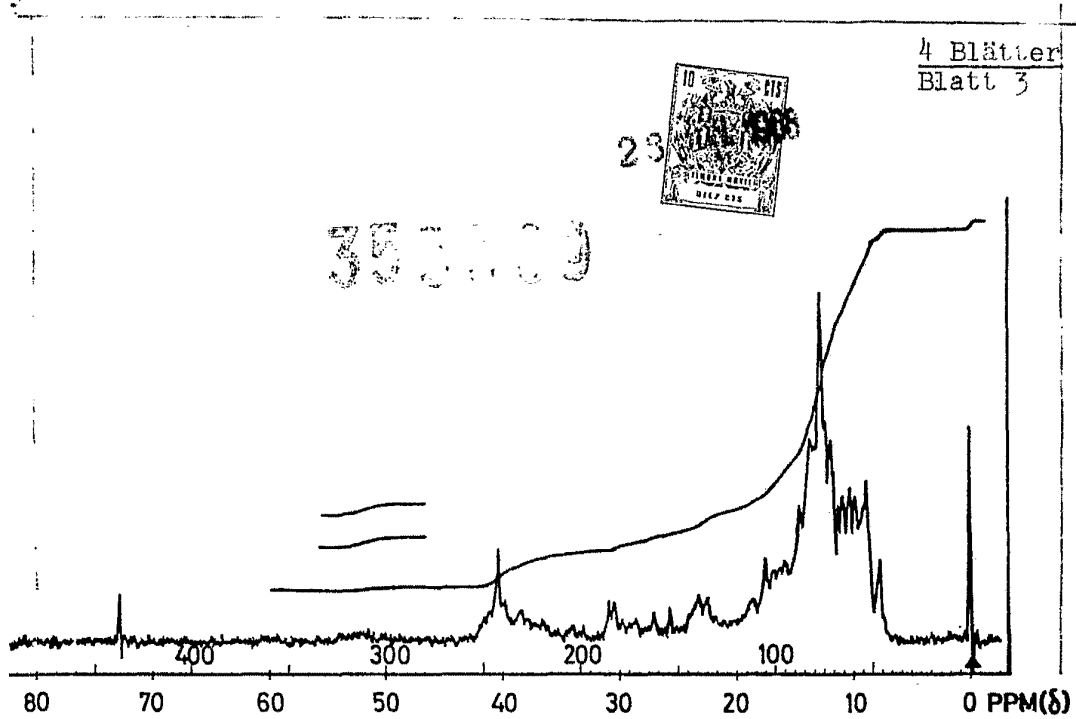


FIG. 4

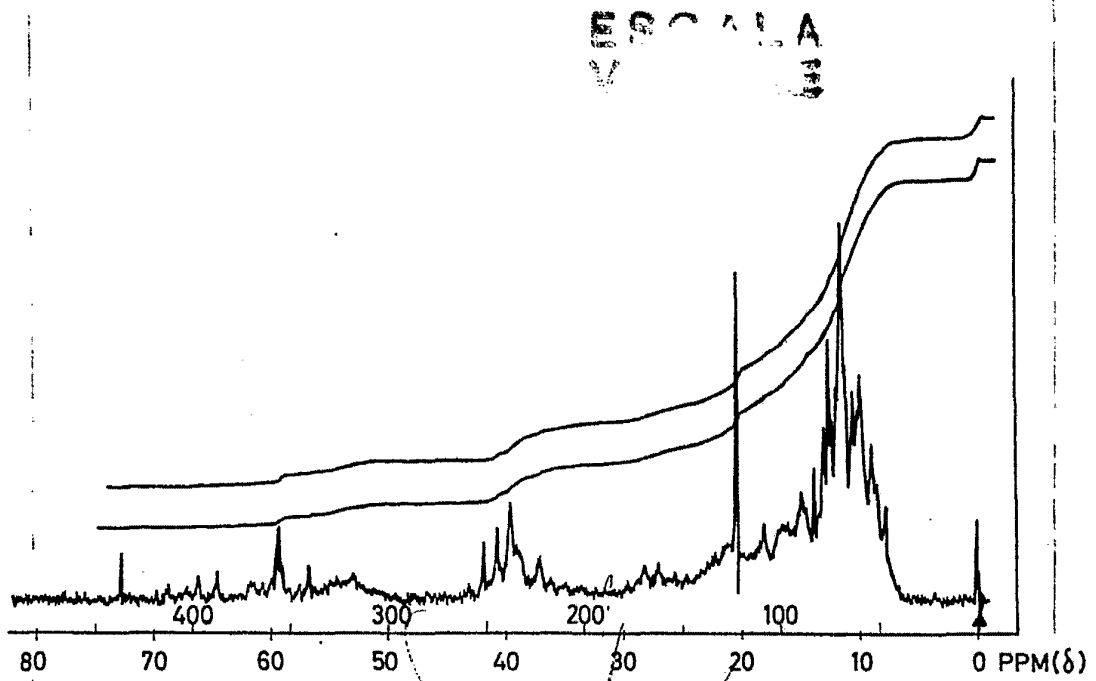


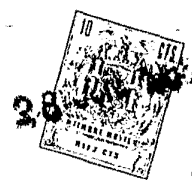
FIG. 2

2

1 (SOMER) 111

1 (SOMER) 111

1 (SOMER) 111



4 Blätter
Blatt 2

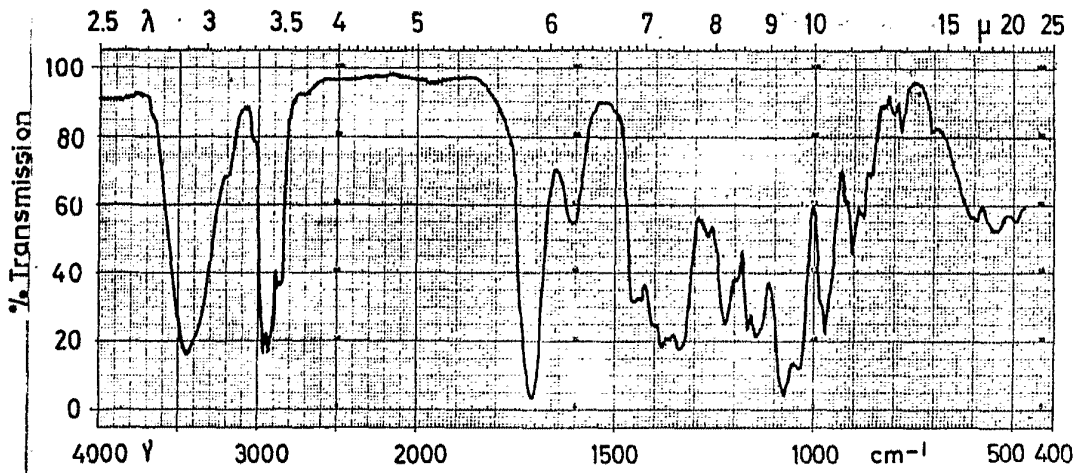


FIG. 6

3000 A
1000 A

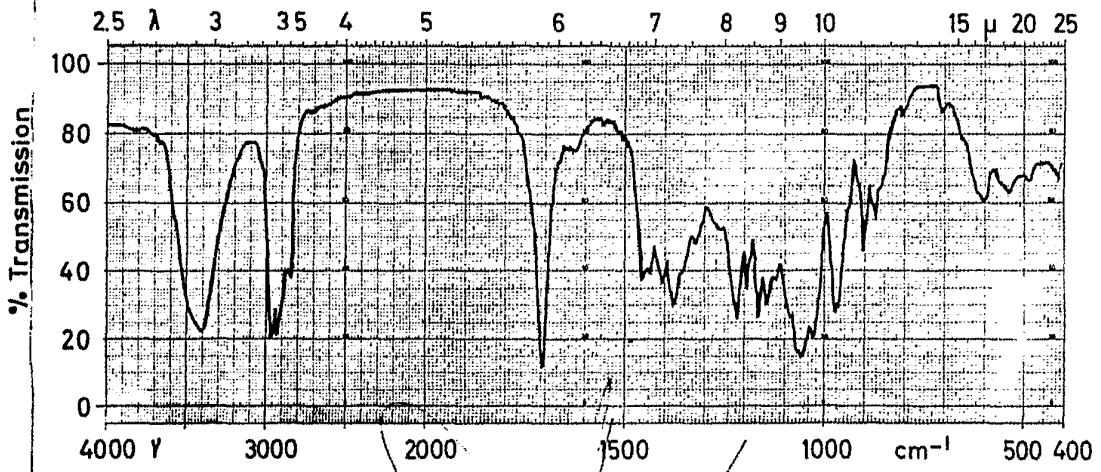
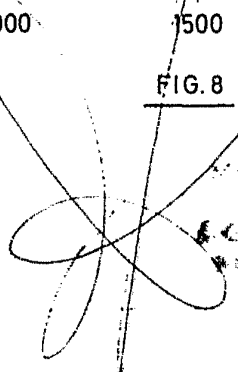


FIG. 8



2
1000 A
1000 A

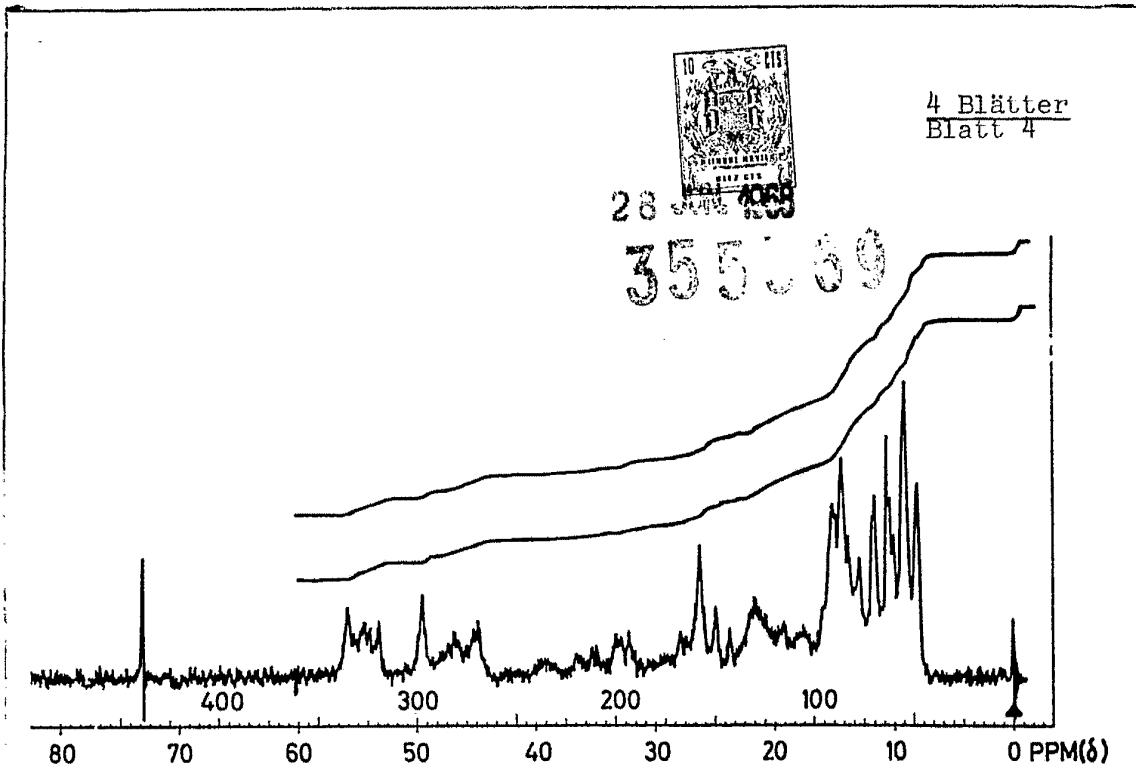


FIG. 7

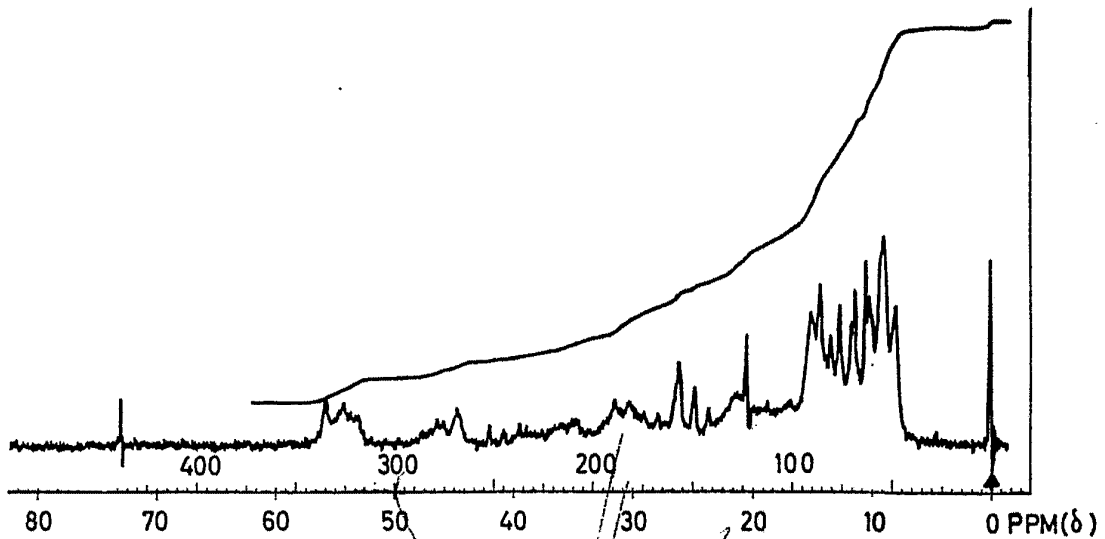


FIG. 9

28 JUL 1968

Madrid

CONF

n. s. Eto

MODEL

...