

30



C12 AGI
D K

PATENTE DE INVENCION

379788

Boletín Case No. 22.734.

CL
WIB

Memoria Descriptiva 379788

sobre:

Procedimiento para la producción de antihongos.

=====

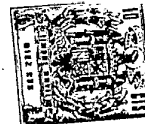
Solicitante

AMERICAN CYANAMID COMPANY, entidad norteamericana, residente en Berdan Avenue, Township of Wayne, Estado de New Jersey, EE.UU. de A.

=====

La presente invención se relaciona con un nuevo antihongo, con su producción por fermentación, con métodos para su recuperación y concentración a partir de soluciones crudas, y con procedimientos para su purificación. Los nuevos productos

5.



son activos contra una variedad de hongos, y los efectos del nuevo antihongo sobre microorganismos específicos, junto con sus propiedades químicas y físicas, lo diferencian de antihongos anteriormente descritos.

5. El nuevo antihongo, que ha sido designado BH890, se forma durante el cultivo bajo condiciones controladas de un streptomiceto aislado a partir de una muestra de tierra forestal recogida en Pennsylvania. Un cultivo viable de este nuevo microorganismo ha sido depositado en el Laboratorio de Colección de Cultivo, División de Desarrollo e Investigación de Utilización de Norte, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Peoria, Illinois, y ácido agregado a su colección permanente. Es libremente obtenible en este depósito bajo su número de advenimiento NRRL 3609.
- 10.
15. La descripción e identificación de este nuevo microorganismo, mantenido en la colección de cultivo de los laboratorios Lederle, Pearl River, New York, fueron suministrados por el doctor H. D. Tresner de estos laboratorios.
20. Se hicieron observaciones de las particularidades culturales, fisiológicas y morfológicas del cultivo de acuerdo con los métodos detallados por Shirling y otros, ["Methods for Characterization of Streptomyces Species". Internat. Journ. of Syst. Bacterior. 16:313-340, (1966)]. Los medios empleados en el estudio fueron seleccionados de aquellos recomendados por Pridham y otros, ["A Selection of Media for Maintenance and Taxonomic Study of Streptomyces", Antibiotics Annual (1956-1957), pp. 947-953], para el cultivo de streptomycetos. Los detalles se registran en las tablas I-IV, y la descripción general del cultivo se da más abajo. Los colores
- 25.
30. descriptivos subrayados fueron tomados de Jacobson y otros,

379788

- 3 -



["Color Harmony Manula". 3^{ra} edit. Container Corp. of America, Chicago (1948)]

Cantidad de desarrollo

5. Buena en la mayoría de los medios; leve en agar de solución Czapek's.

Micelio aéreo y/o color de esporo en masa

10. Micelio aéreo blansuzco a grisáceo o canela; masas de esporo en matices grisáceos, que varían de Covert Tan (2 ge) a Natural (2 dc) a Slate Tan (2 ig) a Covert Gray (2 fe) a Beige Brown (3 ig). Esporulación leve a fuerte dependiendo del medio.

Pigmentos Solubles

15. No se formaron pigmentos solubles en los medios empleados.

Color reverse

15. En tamices de amarillentos a grisáceos a verdoso oscuro.

Reacciones Fisiológicas Misceláneas

20. Nitratos reducidos a nitritos en caldo de nitrato orgánico; licuefacción completa de gelatina en 14 días; no se produjeron pigmentos melanoideos en agar de peptona-hierro; tolera hasta 7 % de NaCl en medio de desarrollo. Utilización de fuente de carbón de acuerdo con el método de Pridham y otros,
25. ["The Utilization of Carbon Compounds by Some Actinomycetales as an Aid for Species Determination". J. Bacteriol. 56:107-114 (1948)] como sigue: regular a buena utilización de 1-arabino-sa, d-fructuosa, i-inositol, lactosa, d-manitol, d-melibiosa, d-rafinosa, i-ramnosa, salicina, d-trehalosa, d-xilosa, y glucosa; ninguna utilización de adonitol, d-melizitosa y sucrosa.

30. Micromorfología



Micelio aéreo fuerte, dando lugar a cadena en espiral compactas cortas a esporos globosos a cilíndricos cortos de $0,5-0,6 \mu \times 0,9-1,1 \mu$; superficies de esporo lisas, como se determina por microscopía electrónica a 8000X.

5. En base a las características generales observadas, el cultivo es un miembro del género Streptomyces. La esporulación grisacea, cadenas en espiral de esporos lisos y falta de pigmento de melanoide une el cultivo con un grupo relativamente grande de especies de Streptomyces. Sin embargo, ciertas características tal como sus espirales compactos de esporos globosos a ocasionalmente cilíndricos cortos sugieren una estrecha relación con especies del complejo de Streptomyces semejante al higroscópico. Cuando se hicieron comparaciones con miembros de este grupo, fué evidente que el nuevo cultivo difiere en el sentido de que le falta la naturaleza higroscópica conspicua de masas de esporos normalmente asociada con S-higroscopicus. Adicionalmente, esporos de este último son típicamente de apariencia falangiforme y cilíndrica corta, Tresner y otros, ["Morphological Spore Types in the Streptomyces hygroscopicus-likes Complex". Appl. Microbiol. 15:637-639, (1967)], mientras que los de NRRL 3609 son en general globosos. Una semejanza muy sorprendente se comprobó, sin embargo, con las especies de Streptomyces misionensis, Cercos y otros, ["Misionina: antibiótico poliénico producido por Streptomyces misionensis n. sp. Revista de Investigaciones Agrícolas 16:5-28 (1962)]. Se observó una concordancia buena en el color de esporos, morfología de esporoforo, forma de esporo, configuración superficial de esporos, producción de pigmento de melanoide y esquema de utilización de fuente de carbón, tal particularidades culturales como el hábito de des
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



arrollo, color de micelio vegetativo y la apariencia moteada de los reversos de cultivo sobre ciertos medios, fueron marcadamente similares. Cuando se hicieron comparaciones con descripciones publicadas y/o cultivos de referencia de otras especies, no se encontró ninguna que se asemejara tan estrechamente a este cultivo que S-misionensis. Por lo tanto, NRRL 3609 será de aquí en adelante considerado como una raza de esa especie.

TABLA I

Características de cultivo de Streptomyces misionensis NRRL 3609

Incubación 14 días
Temperatura: 28°C

Medio	Cantidad de desarrollo	Micelio aéreo y/o Esporos	Pigmento soluble	Color Reverso	Observaciones
Agar de solución Czapek	Leve	Micelio aéreo blancuzco. Es porulación leve.	Ninguno	Incoloro	
Agar de dextrosa de asparagina	Bueno	Micelio aéreo blancuzco que se vuelve <u>Cobert Tan</u> (2 ge) en zonas de es porulación. Es porulación moderada.	Ninguno	<u>Slate Tan</u> (2 ig) a sin denominación (18 pn) <u>Verde oscuro</u>	Moteado reverso
Agar de Hickey y Friesner	Bueno	Micelio aéreo blancuzco a gris, que se vuelve <u>Natural</u> (2 do) en zonas de esporulación. Leve esporulación.	Ninguno	<u>Bamboo</u> (2 gc) a sin denominación (18 pn)	Moteado reverso; sectorio moderado
Agar de extracto de levadura	Bueno	Micelio aéreo gris a canela, se vuelve <u>Slate Tan</u> (2 ig) en zonas de esporulación. Esporulación fuerte.	Ninguno	<u>Adobe Brown</u> (3 ig) a sin denominación (18 pn)	Moteado reverso; sectorio moderado



TABLA I (Continuación)

Medio	Cantidad de desarrollo	Micelio aéreo y/o Esporos	Pigmento soluble	Color reverso	Observaciones
Copos de arena Kuster	Buena	Micelio aéreo gris a canela, que se vuelve <u>Slate Tan</u> (2 lg) en zonas de esporulación. Esporulación moderada.	Ninguno	<u>Lt. Mustard Tan</u> (2 ie) a sin denominación (18 pn)	Moteado reverso; sectorio moderado
Pasta de tomate Agar de harina de arena	Buena	Micelio aéreo gris a canela, que se vuelve <u>Slate Tan</u> (2 lg) en zonas de esporulación. Leve esporulación.	Ninguno	<u>Yellow Maple</u> (3 ng) a sin denominación (18 pn)	Moteado reverso
Agar de dextrosa de patata	Buena	Micelio aéreo blanco a grisáceo, que se vuelve <u>Covert Gray</u> (2 fe) en zonas de esporulación. Esporulación moderada.	Ninguno	<u>Camel</u> (3 ie) a sin denominación (18 pn)	Moteado reverso; leve hidrólisis de almidón
Agar de Bennett	Buena	Micelio aéreo gris a canela, que se vuelve <u>Slate Tan</u> (2 lg) en zonas de esporulación. Esporulación moderada.	Ninguno	<u>Covert Brown</u> (2 li) a sin denominación (18 pn)	Moteado reverso; sectorio moderado
Agar de almidón Sales inorgánicas	Buena	Micelio aéreo blancuzco, que se vuelve <u>Beige Brown</u> (3 ig) en zonas de esporulación. Esporulación fuerte.	Ninguno	<u>Biscuit</u> (2 ec) a <u>Slate Tan</u> (2 ig) a sin denominación (18 pn)	Moteado reverso; sectorio moderado

379788

- 7 -



T A B L A II

Micromorfología de *Streptomyces misionensi* NRRL 3609

Medio	Micelio aéreo y/o es- tructuras esporíferas	Forma de es- poro	Tamaño de es- poro	Superfi- cie de es- poro
Agar de extrac- to de le- vadura	Fuerte micelio aéreo, que da lugar a cade- nas cortas compactas en espiral de esporos	Globo- sas; ocu- sional- mente cilín- drica corta	0,5-0,6 μ X 0,9-1,1 μ	Smith co- mo se de- termina por mi- croscopía por elec- trón a 8000X

T A B L A III

Reacción fisiológica miscelánea de *Streptomyces misionensis*
NRRL 3609

Temperatura: 28°C

Medio	Periodo de incubación	Cantidad de desarrollo	Reacción fisiológica
Caldo de nitrato or- gánico	7 días	Buena	Leve reducción de ni- trato a nitrito
Caldo de nitrato or- gánico	14 días	Buena	Nitrato reducido a ni- trito
Gelatina	7 días	Buena	Leve licuación
Gelatina	14 días	Buena	Completa licuación
Peptona- Agar de hierro	24 horas	Buena	Pigmentos melancoides no formados
4-13% NaCl en Agar de extracto de levadu- ra	10 días		Tolera hasta 7 % NaCl en medio de desarrollo



T A B L A IV

Diagrama de utilización de fuente de carbón de Streptomyces misionensis NRRL 3609

Fuente de carbón	Utilización *
Adonital	0
1-Arabinosa	3
d-Fructosa	3
i-Inositol	2
Lactosa	3
d-Mannitol	3
d-Melezitosa	0
d-Melibiosa	3
d-Raffinosa	3
1-Rhamnosa	3
Salicina	3
Sucrosa	0
d-Trehalosa	3
d-Xilosa	2
Dextrosa	3
Control negativo	0

- * 3-Utilización buena
 2-Utilización regular
 1-Utilización pobre
 0-Ninguna utilización

5.

Se comprenderá que para la producción del nuevo anti-hongo, la presente invención no está limitada a este organismo en particular u organismos que responden totalmente a las

379788



- 9 -

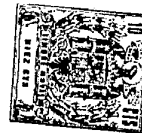
5. características precedentes de desarrollo y microscópicas que se dan con propósitos ilustrativos. En realidad, se desea y se quiere incluir el uso de mutantes producidos a partir de los organismos descritos mediante varios métodos, tales como radiación X, radiación ultravioleta, mostaza de nitrógeno, exposición de fagositos y similares.

EL PROCEDIMIENTO DE FERMENTACION

10. El cultivo del organismo S-misionensis puede llevarse a cabo en una amplia variedad de medios de cultivo líquidos. Medios que son útiles para la producción del nuevo antibiótico incluyen una fuente asimilable de carbón tales como almidón, azúcar, melasa, glicerol, etc; una fuente asimilable de nitrógeno tales como proteína, hidrolisato de proteína, péptidos, amino ácidos, licor fuerte de maíz, etc; y aniones y cationes inorgánicos, tales como potasio, sodio, calcio, sulfato, fosfato, cloruro, etc. Elementos de vestigio tales como boro, molibdeno, cobre, etc; se suministran como impurezas de otros constituyentes de los medios. Aereación en tanques y botellas se proveen forzando aire estéril a través o
15. sobre la superficie del medio de fermentación. Se provee agitación adicional en tanques mediante un impulsor mecánico. Un agente antiespumante tal como octadecanol al 1 % en aceites de
20. lardo puede agregarse según sea necesario.

PREPARACION DE INOCULACION

25. Se prepara una inoculación en frasco con agitador de S.misionensis inoculando 100 mililitros entre medio de líquido estéril en frascos de 500 mililitros con raeduras o lavados de esporos de un sesgado de agar del cultivo. El siguiente medio se emplea comúnmente:



5.	Cereposa	20 gramos
	Harina de soya	10 gramos
	Licor fuerte de maíz	5 gramos
	Carbonato de calcio	3 gramos
	Agua hasta	1.000 mililitros

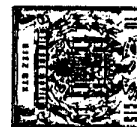
Los frascos se incuban a una temperatura de 25 a 29°C, preferiblemente 28°C y se agitan vigorosamente en un agitador rotativo durante 30 a 48 hr. Estas inoculaciones de 100 mililitros se usan para inocular tandas de 1 lt. y 12 lt. del mismo medio en fermentadores de vidrio de dos litros y 20 litros. La masa de inoculación se airea con aire estéril mientras se continúa el desarrollo durante 30 a 48 hr. Estas tandas de inoculación se usan para inocular tanques fermentadores.

FERMENTACION EN TANQUES

15. Para la producción de BH890 en tanques fermentadores se usa regularmente el siguiente medio de fermentación:

20.	Almidón	52,5 gramos
	Harina de maíz	14,5 gramos
	Licor fuerte de maíz	15,0 gramos
	Carbonato de calcio	9,5 gramos
	Sulfato de amonio	6,75 gramos
	Caseina	3,0 gramos
	Harina de semilla de algodón	2,5 gramos
	Cloruro de amonio	2,0 gramos
25.	Sulfato de manganeso	0,10 gramos
	Agua hasta	1000 mililitros

30. Se agrega aceite de lardo al medio en la cantidad de 0,8 % v/v. Cada tanque se inocula con aproximadamente 3 % de inoculación preparada como se describe precedentemente. Se suministra aireación al régimen de 0,5 a 1,0 litro de aire es



5. térril por litro de caldo por minuto y la mezcla de fermentación se agita con un impulsor accionado a 300 a 800 r.p.m. La temperatura se mantiene a 25-29°C, generalmente a 28°C. La fermentación se continúa generalmente durante aproximadamente 60 a 90 hr al término de lo cual se cosecha la masa.

PROCEDIMIENTO DE AISLACION

10. Luego de completarse la fermentación, la masa fermentada que contiene el antihongo de la presente invención se filtra, preferiblemente con la adición de tierra de diatomeas o cualquier otro auxiliar filtrador convencional. Normalmente la almohadilla de masa de filtro de micelio se lava con una pequeña porción de agua. Se descartan tanto el filtrado como el lavado. El antihongo se extrae a partir de la masa de micelio con metanol utilizando aproximadamente 1 litro de metanol por cada 2,5 a 3,0 litros de masa líquida. Generalmente, una segunda extracción de la masa con una porción más pequeña de metanol asegura una extracción completa. Los extractos se combinan y se concentran hasta una fase acuosa bajo presión reducida. La fase acuosa se deja reposar durante la noche a 4°C. Al reposar se forma un producto sólido crudo que contiene componentes a los cuales se les refiere como BH890 α y BH890 β . El sólido se recoge y se lava con acetona. El sólido lavado primero se seca con aire y luego se seca sobre pentóxido fosforoso u otro agente secador bajo presión reducida.
- 25.

30. El componente α se prepara a partir de una porción del material crudo así preparado por recristalizaciones repetidas. Esencialmente, el componente β se separa como una impureza dejando el componente α purificado en forma aislada. Las recristalizaciones se lleva a cabo disolviendo una por-



- ción de BH890 crudo en dimetilformamida y filtrando la solución. También pueden usarse otros solventes, tales como por ejemplo, dimetilacetamida y dimetilsulfóxido. Para precipitar el antihongo se usa etil acetato o etil acetato en agua.
5. Generalmente, colocando la mezcla en un ambiente frío (temperatura alrededor de 0-5°C), tiende a asegurar una precipitación completa. El sólido cristalino se recoge por filtración y se lava con agua y con acetona y se seca en aire. El procedimiento de recristalización generalmente se repite dos veces
10. para resultar en un BH890 α purificado libre del componente β .
- El componente β se prepara a partir de una porción de BH890 crudo separando el material en los componentes α y β por distribución a contracorriente de solvente. Un sistema de solvente útil comprende etil acetato, butanol secundario, metanol y regulador en la relación de 900 a 303 a 160 a 600 en volumen respectivamente. El regulador se prepara combinando
15. 6,3 ml de trietilamina con 2 litros de agua, regulando a un pH de 7,5 con ácido acético glacial y diluyendo hasta 2400 ml con agua. Con un aparato de distribución a contracorriente
20. de tubo 200 aproximadamente 300 transferencias son suficientes para una buena separación de los componentes. El progreso de la separación puede medirse por determinaciones de densidad óptica a 303 m μ y diagramando las determinaciones contra el número de tubos. Se combinan las fracciones apropiadas, el líquido se concentra y se liofiliza para recuperar tanto los componentes α como β .
- 25.

CARACTERISTICAS FISICAS

- Los dos componentes BH890 α y BH890 β pueden distinguirse mediante características físicas seleccionadas. Las
30. muestras analíticas de ámbos componentes están esencialmente

379788



libres de cenizas. BH890 α se secó bajo presión reducida en un aparato secador Abderhalden sobre acetona en ebullición durante 16 hr y BH890 β se secó bajo presión reducida sobre P₂O₅ sobre acetona en ebullición durante la noche.

5. Los componentes BH890 α y BH890 β contienen los elementos carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno en sustancialmente los siguientes porcentajes en peso:

	BH890 α	BH890 β
10. Carbón	58,52	57,78
Hidrógeno	8,73	7,74
Nitrógeno	1,78	1,59
Oxígeno (dif)	30,97	32,89

15. El componente α no tiene un punto de fusión definitivo. Un espectro de absorción de infrarrojo de BH890 α en un gránulo de KBr se prepara de la manera convencional. Exhibe absorción característica en la región del infrarrojo del espectro en las siguientes longitudes de ondas expresadas en micrones: 3,00; 3,42; 5,85; 6,13; 6,40; 6,48; 6,68; 6,87; 7,17; 7,57; 8,45; 8,87; 9,35; 9,65; 9,95; 10,02; 11,10; 11,35; 20. 11,82; 13,35 y 14,37. La curva de infrarrojo se muestra en la figura 1 de los dibujos que se acompañan.

Componente α en metanol demuestra máxima absorción ultravioleta a:

$$230 \text{ m}/\mu \quad (E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 315)$$

$$279 \text{ m}/\mu \quad (E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 298)$$

$$290 \text{ m}/\mu \quad (E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 588)$$

$$302 \text{ m}/\mu \quad (E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 905)$$

$$318 \text{ m}/\mu \quad (E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 815)$$



BH890 α da un equivalente de neutralización de 936 cuando se titula en ácido acético glacial con ácido perclórico y un equivalente de neutralización de 962 cuando se titula en piridina usando hidróxido de tetrabutil amonio.

5. La rotación específica de BH890 α se determina en una variedad de solventes y los valores obtenidos se dan en la Tabla V que sigue inmediatamente.

T A B L A V

Rotación específica de BH890 α en varios solventes

Solvente	Concentración	$[\alpha]_{25}^D$
Dimetilformamida	0,988 %	+ 19,2°
Dimetilsulfóxido	1,031 %	+ 5,8°
Acido acético glacial	0,863 %	+ 10,4°
Piridina	0,930 %	+ 18,2°

10. El componente β no tiene un punto de fusión definitivo. Un espectro de absorción de infrarrojo de BH890 β en un gránulo de KBr se prepara de la manera convencional. Exhibe absorción característica en la región de infrarrojo del espectro a las siguientes longitudes de ondas expresadas en micrones: 3,00; 3,45; 5,85; 6,36; 6,70; 6,90; 7,25; 8,50; 9,40; 10,00; 11,85; 13,33 y 14,40. La curva de infrarrojo se muestra en la figura 2 de los dibujos que se acompañan.
- 15.

El componente β en metanol demuestra máxima absorción ultravioleta a:

$$230 \text{ m}/\mu \quad (E_{1 \text{ cm}}^{1\%} = 370)$$

$$278 \text{ m}/\mu \quad (E_{1 \text{ cm}}^{1\%} = 320)$$

$$289 \text{ m}/\mu \quad (E_{1 \text{ cm}}^{1\%} = 616)$$

379788

- 15 -



302 m/μ (E $\frac{1\%}{1 \text{ cm}}$ = 934)

318 m/μ (E $\frac{1\%}{1 \text{ cm}}$ = 840)

La rotación específica de BH890 β se determina en una variedad de solventes y los valores obtenidos se dan en la Tabla VI que sigue.

T A B L A VI

Rotación específica de BH890 β en varios solventes

<u>Solvente</u>	<u>Concentración</u>	<u>$[\alpha]_{25}^D$</u>
Dimetilformamida	0,747 %	- 4,03°
Dimetilsulfóxido	0,951 %	- 18,7 °
Acido acético glacial	0,993 %	- 8,07°
Piridina	1,038 %	- 9,7 °

5. BH890 antifungoso se distingue claramente de otros antihongos por los datos de caracterización que se dan precedentemente y por su actividad antifungosa. La actividad in vitro de este nuevo antihongo se presenta en la Tabla que sigue a continuación que demuestra la concentración inhibitoria mínima requerida para inhibir el desarrollo de microorganismos representativos en un medio nutritivo.
- 10.

T A B L A VII

Actividad antifungosa in vitro de BH890 β

<u>Organismo</u>	<u>Concentración mínima inhibitoria meg./ml.</u>
<u>Candida albicans</u> 300 (E83)	2
<u>Cryptococcus neoformans</u> SP (E138)	2
<u>Epidermophyton floccosum</u> ATCC 10227 (E139)	1
<u>Microsporium audouini</u> ATCC 14057 (E140)	2
<u>Microsporium canis</u> ATCC 10214 (E55)	5



TABLA VII (Continuación)

Organismo	Concentración mínima inhibitoria mcg/ml.
<u>Microsporium gypseum</u> ATCC 14683 (E130)	2,5
<u>Phialophthora jeanselmei</u> NIH 8724 (E16)	5
<u>Trichophyton rubrum</u> (E97)	2,5
<u>Trichophyton tonsurans</u> NIH 662 (E10)	2
<u>Trichophyton mentagrophytes</u> (E11)	2,5

* Procedimiento de dilución de agar común.

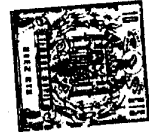
Además, BH890 es elevadamente activo in vitro contra organismos patógenos, incluyendo razas de Blastomyces dermatitidis y Coccidioides immitis que causan micosis profundamente localizada.

5. Actividad contra hongos productores de micosis profundamente localizada

Organismo y Raza	Conc. mcg/ml	
	Inhibitoria mínima*	Fungicida**
<u>Coccidioides immitis</u>		
658	0,78	1,56
10. 660	0,78	1,56
691	0,20	0,20
<u>Blastomyces dermatitidis</u>		
5,10	0,39	0,39
5,17	0,39	1,56
15. 5,27	0,20	0,20

El control amfotericina B, fué inhibitorio para las tres razas Coccidioides immitis de 0,2 a 0,39 mcg/ml y fungicida de 0,39 a 0,78 mcg/ml.

20. El control amfotericina B, fué inhibitorio para las tres razas Blastomyces dermatitidis de 0,1 a 0,2 mcg/ml y fungicida de 0,39 a 1,56 mcg/ml.



* Concentración requerida para inhibir desarrollo de organismo.

** Concentración requerida para destruir organismo.

5. BH890 antifungoso es activo in vivo contra Candida albicans y Cryptococcus neoformans. El nuevo antihongo es por lo tanto potencialmente útil como agente terapéutico para tratar infecciones fungosas en mamíferos provocadas por dichos microorganismos. Puede esperarse que dicho antihongo sea empleado utilmente para tratar o combatir tales infecciones por aplicación tópica o administración parenteral o cuando se toma oralmente.

10. La utilidad del nuevo antihongo se demuestra por su habilidad para controlar infecciones letales sistemáticas por y con estos organismos en ratones.

15. El ensayo con C. albicans se llevó a cabo con ratones hembras de Carworth Farms CF 1, de peso de aproximadamente 20 gramos, infectados intravenosamente con una dosis letal de una dilución 1:20 de un cultivo de caldo de soya de triptica-so de 24 hr del organismo. Los ratones infectados se trataron con BH890 en dosis diferentes por inyecciones subcutáneas dentro de 1 hr luego de infección o inyecciones subcutáneas dentro de 1 hr luego de infección seguido por una segunda dosis 4 hr después. Se hizo un registro del tamaño de cada grupo y el número de ratones que permanecen vivos 6 días después de infección.

20. La Tabla VIII siguiente ilustra actividad antifungosa de BH890 contra C. albicans.

25.



T A B L A VIII

Actividad de BH890, Anfotericina y Nistatina en
Ratones infectados con Candida albicans

Dosis subcutánea mg/kg	Vivos/total de ratones (por ciento) 14 días después de iniciación de infección		
	BH890	Anfotericina	Nistatina
800	22/30 (73)	-	-
400	15/20 (75)	10/10 (100)	-
200	10/30 (33)	6/20 (30)	27/30 (90)
100	8/20 (40)	3/10 (30)	15/20 (75)
50	12/30 (40)	5/20 (25)	15/30 (50)
25	0/10 (0)	-	2/20 (10)
12	0/20 (0)	0/10 (0)	3/30 (10)

Dosis efectiva media mg/kg (a) 200 (140-290) 200 (estimado) 60 (40-70). Controles no tratados infectados: 58/60 (97 %) de ratones murieron en 3 días después de iniciación de infección (tiempo de supervivencia promedio, 1,3 días).

5. (a) 95 % límites de confianza en paréntesis. Las curvas de efecto de dosis no eran paralelas.

El ensayo con C. neoformans se llevó a cabo con ratones hembras de Carworth Farmas CF 1, de peso de aproximadamente 20 gramos, infectados intravenosamente con una dosis letal de un cultivo de caldo de soya de tripticaso de 24 hr del organismo. Los ratones infectados se trataron con BH890 en dosis diferentes por inyecciones subcutáneas dentro de un periodo de 1 hr después de infección o inyecciones subcutáneas dentro de un periodo de 1 hr después de infección seguido por una segunda dosis 24 hr después. Se observaron y se anotaron ratones vivos a totales 7 días después de infección.

La Tabla IX siguiente ilustra actividad antifungosa de

379788



BH890 contra C. neoformans.

T A B L A IX

Actividad de BH890, Anfotericina y Nistatina en Ratones infectados con Cryptococcus Neoformans

Dosis subcutáneas mg/kg Vivos/total de ratones (por ciento) 7 días después de iniciación de infección

	BH890	Amfotericina	Nistatina
800	41/50 (82)	48/50 (96)	Toxic
400	29/30 (97)	17/20 (85)	10/10 (100)
200	47/60 (78)	39/50 (78)	55/60 (92)
100	23/30 (77)	12/20 (60)	26/30 (87)
50	37/60 (62)	35/50 (70)	40/60 (67)
25	1/10 (10)	-	13/30 (43)
12	-	13/30 (43)	17/50 (34)

Dosis efectiva media mg/kg (a) 77 (24-250) 20 (12-32) 24 (18-32). Controles no tratados infectados: 104/120 (87 %) de ratones murieron entre el 2do. y 7to. día después de iniciación de infectación.

5.

(a) 95 % límites de confianza en paréntesis. Las curvas de efecto de dosis no eran paralelos.

La invención se describirá con mayor detalle en combinación con los siguientes ejemplos específicos.

10.

Ejemplo 1

Preparación de inoculación

Un medio típico empleado para desarrollar la inoculación primaria se preparó de acuerdo con la siguiente fórmula:

15.

Cereales	20 gramos
Harina de soya	10 gramos
Licor impregnado de maíz	5 gramos



Carbonato de calcio 3 gramos
 Agua hasta 1.000 mililitros

5. Esporos lavados y raspados del sesgado de agar de S. misionensis se emplean para inocular dos frascos de 500 ml que contienen 100 ml cada uno del medio estéril precedente. Los frascos luego se colocan en un agitador rotativo y se agitan vigorosamente durante 48 hr a 28°C. La inoculación de frasco resultante se transfiere a un fermentador de vidrio de 5 galones y contiene 12 lt. del medio estéril. El fermentador de vidrio se airea con aire estéril mientras se lleva a cabo el desarrollo durante aproximadamente 48 hr, luego de cuyo tiempo los contenidos se usan para sembrar un tanque fermentador de 300 litros.

Ejemplo 2

Fermentación

15. Se prepara un medio de fermentación de acuerdo con la siguiente fórmula:

	Almidón	52,5	gramos
	Harina de maíz	14,5	gramos
20.	Licor fuerte de maíz	15,0	gramos
	Carbonato de calcio	9,5	gramos
	Sulfato de amonio	6,75	gramos
	Caseína	3,0	gramos
	Harina de semilla de algodón	2,5	gramos
25.	Cloruro de amonio	2,0	gramos
	Sulfato de manganeso	0,10	gramos
	Agua hasta	1.000	mililitros

30. Se emplea aceite de lardo en el medio en una cantidad de 0,8 % v/v. El medio de fermentación se esteriliza a 120°C con un baño de vapor a una presión de 20 libras durante 45-60



minutos. El pH del medio luego de esterilización es aproximadamente 6,6. Se inoculan 300 litros de medio estéril en un tanque fermentador de 400 litros con 12 litros de inoculación, preparada como se describe en el ejemplo 1. La fermentación se lleva a cabo a 28°C empleando aceite Hodag LG-8 como agente antiespumante. Se suministra aireación a un régimen de 0,5 litros de aire estéril por litro de masa por minuto. La masa se agita con un impulsor accionado a aproximadamente 300 r.p.m. Al término de aproximadamente 66 horas de tiempo de fermentación se cosecha la masa.

Ejemplo 3

Aislación

Se filtran 300 litros de masa fermentada con aproximadamente 2 % (p/v) de auxiliar filtrador de tierra de diatomeas y la almohadilla de filtro se lava con aproximadamente 30 litros de agua. El filtrado y lavado recogidos se descartan. La masa lavada se agita en aproximadamente 100 litros de metanol durante aproximadamente 1/2 hora. La suspensión se filtra y la masa se lava con 20 litros adicionales de metanol. El lavado y filtrado de metanol combinados se concentran hasta una fase acuosa (aproximadamente 6 litros en volumen) y este concentrado se deja reposar durante la noche a 4°C. Un sólido birrefringente que se forma al reposar se recoge por centrifugación y se lava con acetona. La acetona restante se separa por evaporación al aire y el sólido se seca sobre P₂O₅ bajo presión reducida. El sólido cristalino secado de BH890 crudo pesa 118 gramos.

Ejemplo 4

Preparación de BH890d

Se disuelve una porción (40 gramos) del BH890 crudo,



- como se obtiene del ejemplo precedente, en 150 ml de dimetilformamida y la mezcla se filtra. Se agrega etil acetato al filtrado hasta alcanzar el punto de turbidez. Se agregan 150 ml de agua luego de lo cual se agregan 150 ml adicionales de etil acetato con agitación. La mezcla resultante se deja reposar durante la noche a 4°C. El sólido de color amarillo pálido que se forma se suspende y el sistema de dos fases se recoge por filtración y se lava primeramente con agua y luego con acetona. El sólido secado en aire pesa 29 gr. El material crudo se recristaliza dos veces disolviendo primeramente en dimetilformamida y repitiendo el procedimiento anterior a partir de ese punto. Se obtienen luego de tres recristalizaciones aproximadamente 4,4 gramos de BH890 α purificados que tiene las características físicas y químicas descritas anteriormente aquí.

Ejemplo 5

Preparación de BH890 β

- Se emplea como el material de partida BH890 crudo como se obtiene en el ejemplo 3 y se separa en componentes α y β por distribución a contracorriente de solvente. El sistema solvente está compuesto de etil acetato, butanol secundario, metanol y regulador (900:303:160:600 en volúmen) en donde el regulador se prepara agitando juntamente trietilamina (6,3 ml) y agua (2 litros) y regulando el pH de la solución a 7,5 con ácido acético glacial y diluyendo a 2400 ml con agua. La distribución a contracorriente se lleva a cabo en un aparato de tubo 200 empleando 10 ml de fase inferior y 10 ml de fase superior por tubo y 310 transferencias. La carga de muestra se coloca en los primeros 15 tubos preparando una solución saturada de BH890 en 150 ml de fase inferior y 150 ml de fase supe



- rior, dando una carga neta de 350 mg. Al completarse las 310 transferencias una porción de medio ml. de fase inferior se separa de los tubos seleccionados. Cada muestra se diluye con 10 ml. de metanol y se determina su densidad óptica a 303 m/μ. Se obtiene una curva que tiene primero un máximo menor y luego una mayor diagramando densidad óptica contra número de tubo. Los números de tubo 85 a 120 comprenden BH890β y los números de tubo 113 a 150 comprenden BH890α. Se combinan tubos apropiados y los líquidos se concentran se paradamente a una fase acuosa, se filtran y se liofilizan. Cada uno de los sólidos obtenidos con liofilización se trituran con acetona, se filtran, se lavan con acetona nuevamente y luego se secan en aire. Se obtienen la muestra analíticamente pura, BH890β que pesa 38 mg y 140 mg de BH890α.

15.

Ejemplo 6

Preparación de tabletas que contienen BH890

El compuesto antiandrógeno, BH890 se incorpora en una tableta farmacéutica común de acuerdo con la siguiente formulación.

20.

<u>Ingrediente</u>	<u>Por Tableta</u>	
	<u>mg.</u>	<u>Para 10.000 tabletas, g.</u>
BH890	50	500
Lactosa	225	2250
Almidón de maíz (para mezcla)	50	500
Almidón de maíz (para pasta)	25	250
Estearato de magnesio	5	50
	<hr/>	<hr/>
	355	3350

25.

El ingrediente activo, BH890, lactosa y almidón de maíz para mezola se combinan juntamente. El almidón de maíz para pasta

30.



- se suspende en agua a una relación de 100 g de almidón de maíz por 800 ml de agua y se calienta con agitación para formar una pasta. La pasta resultante luego se usa para granular el polvo mezclado. Se usa agua adicional si es necesario. Los gránulos mojados se hacen pasar a través de una malla N° 8 y se secan a 49°C. Los gránulos secos se hacen pasar a través de una malla N° 16 y se lubrican con estearato de magnesio. La granulación luego se comprime en tabletas (tabletas de peso 355 mg) en una máquina formadora de tabletas apropiada. Cada tableta contiene 50 mg de ingrediente activo.

Ejemplo 7

Preparación de Cápsulas de capa dura que contienen BH890

- El ingrediente activo, BH890 puede suministrarse en cápsulas de capa dura. Una formulación útil para preparar las cápsulas es la siguiente:

Ingrediente	<u>Por Cápsula</u>	
	<u>mg.</u>	<u>Para 1.000 Cápsulas, g.</u>
BH890	50	50
Lactosa	90	90
Estearato de magnesio	1	1
	<hr/>	<hr/>
	141	141

- El ingrediente activo, lactosa y estearato de magnesio se combinan juntamente. La mezcla se usa para llenar cápsulas de capa dura de un tamaño adecuado con un peso de relleno de 141 mg por cápsula.

Ejemplo 8

Preparación de Suspensión oral que contiene BH890

<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad % p/v</u>
BH890	1,00
Gel de silicato de aluminio y magnesio	0,50

379788



	<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad % p/v</u>
	Sucrosa	60,00
	Metilparabeno	0,08
	Propilparabeno	0,02
5.	Agente de sabor	cs
	Agua destilada cs ag	100,00

Los parabenos y sucrosa se disuelven en aproximadamente dos tercios del volumen final de agua destilada a 80°C y el Vee-gum se agrega con agitación. La suspensión se enfría a 40°C.

10. El ingrediente activo y agente aromatizante se agregan con agitación. La suspensión enfriada se regula hasta un volumen final con agua destilada.

La suspensión provee 50 mg de ingrediente activo por dosis de 5 ml de suspensión.

15. Ejemplo 9

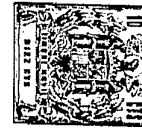
Preparación de una suspensión inyectable que contiene BH890

El componente activo, BH890 puede incorporarse en una suspensión inyectable de acuerdo con la siguiente formulación:

	<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad % p/v</u>
20.	BH890	5,0
	Cloruro de sodio F.E.U.	4,0
	Alcohol bencílico, Calidad de reactivo	0,90
	Agua para inyección cs ag	100,0

25. El vehículo se prepara mezclando juntamente todos los ingredientes precedentes con excepción de BH890. El vehículo e ingrediente activo micronizado se vuelven estériles por medios apropiados. Se prepara una dispersión del ingrediente activo en el vehículo diluyendo el ingrediente activo primero con una porción del vehículo y luego agregando la porción restante del vehículo con agitación.

30.



Una dosis de 1 ml de esta suspensión provee 50 mg de ingrediente activo.

T A B L A X

Actividad de alfa BH890 y Nistatina en ratones con una infección intestinal C. albicans.

5.

Dosis oral, mg/kg	Número de ratones con BH890α		90% de reducción (2) en <u>C. albicans</u>	
	Ensayo 1	Ensayo 2	Nistatina	
			Ensayo 1	Ensayo 2
25	7/10	9/10	10/10	9/10
12	-	-	7/10	7/10
6		6/10	6/10	6/10
3	-	-	7/10	6/10
1,5	-	2/5	6/10	4/10
0,8	-	-	4/10	4/10

10.

15.

Dosis efectiva media mg/kg (95 % límites de confianza) 3,0 (1-9) 1,9 (0,5-8)

(1) Dos dosis en 0,5 ml de 0,85 % NaCl, 3 horas aparte. La primer dosis fué dada 1 hora después de completarse el periodo infectante.

20.

(2) Reducción de por lo menos 90 % en flora fecal de C. albicans en comparación con el promedio de aquella de los ratones de control tratados con 0,85 % NaCl como se determina por recuento de colonia en placas inoculadas con una alícuota de un homogenato de un gránulo fecal de cada ratón. El número promedio de colonias de C. albicans en la muestra fecal de los ratones de control fué el siguiente:

25.

Ensayo I - 300 (desviación normal - 180)
Ensayo II- 60 (desviación normal - 45)

379788

- 27 -



- 27 - Bui



379788

T A B L A X I

Toxicidad aguda de alfa BH890, Anfotericina y Nistatina en ratones

Dosis única, mg/kg	Muerres/total de ratones, 14 días después de dosificación							
	Subcutánea		Intraperitoneal		Oral			
	BH890	Amfotericina Nistatina	BH890	Anfotericina Nistatina	BH890	Amfotericina Nistatina		
1600	0/20	0/10	-	0/10	-	0/20	0/10	0/20
800	0/20	0/10	12/20	0/10	-	-	-	-
400	-	-	5/20	9/10	-	10/10	-	-
200	-	-	3/20*	5/10	-	9/10	-	-
100	-	-	-	1/10	-	10/10	-	-
50	-	-	-	0/10	-	4/10	-	-
25	-	-	-	-	-	0/10	-	-

* Una dosis de 200 mg/kg no fué letal en ensayos subsecuentes con ratones infectados.

379788

- 27 -

T A B L A X I

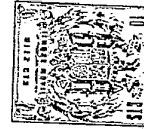
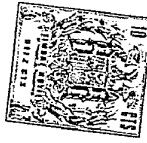
Toxicidad aguda de alfa BH890, Anfoter

Muertes/total de ratones, 14 días después

Dosis única, mg/kg	Subcutánea			Intraperitoneal	
	BH890	Amfotericina	Nistatina	BH890	Anfotericoina
1600	0/20	0/10	-	-	0/10
800	0/20	0/10	12/20	-	0/10
400	-	-	5/20	9/10	-
200	-	-	3/20*	5/10	-
100	-	-	-	1/10	-
50	-	-	-	0/10	-
25	-	-	-	-	-

* Una dosis de 200 mg/kg no fué letal en ensayos subsiguientes o

- 27 - Bis



379788

BH890. Amfotericina y Nistatina en ratones

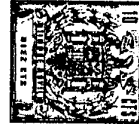
4 días después de dosificación

<u>Peritoneal</u>		<u>Oral</u>		
<u>Amfotericina</u>	<u>Nistatina</u>	<u>BH890</u>	<u>Amfotericina</u>	<u>Nistatina</u>
0/10	-	0/20	0/10	0/20
0/10	-	-	-	-
-	10/10	-	-	-
-	9/10	-	-	-
-	10/10	-	-	-
-	4/10	-	-	-
-	0/10	-	-	-

subsiguientes con ratones infectados.

379788

- 28 -



- N O T A -

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental, 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 DE ANTIHONGOS; caracterizándose por lo siguiente:

5.

10.

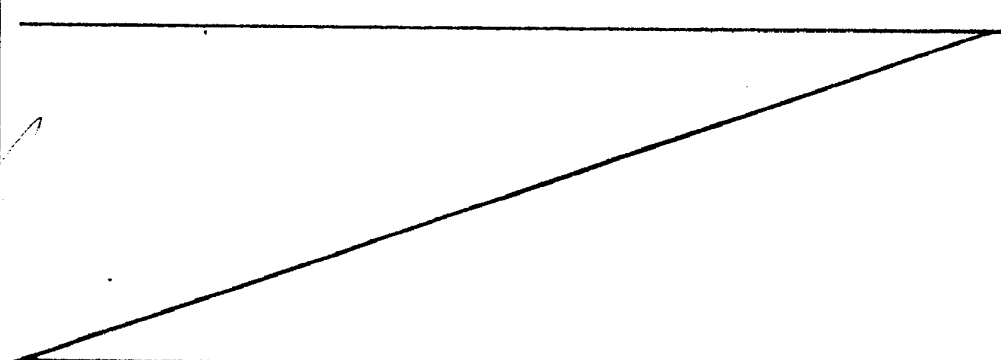
15.

20.

1ª.- Procedimiento para la producción de antihongos, caracterizado porque comprende cultivar una raza de Streptomyces misionensis productora de BH890 antifungoso en un medio nutritivo acuoso bajo condiciones aeróbicas hasta impartir a dicho medio una actividad antibacteriana sustancial por la producción de BH890 antifungoso.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende cultivar una raza de Streptomyces misionensis productora de BH890 antifungoso en un medio nutritivo acuoso bajo condiciones aeróbicas hasta impartir a dicho medio una actividad antibacteriana sustancial por la producción de BH890 antifungoso, y aislar el BH890 antifungoso así producido.

3ª.- Procedimiento para la producción de antihongos,



379788-29-



tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria, e ilustrado en los adjuntos dibujos.

Esta Memoria consta de 29 hojas, escritas a máquina por una sola cara.

5.

Madrid 30 OCT. 1972

AMERICAN CYANAMID COMPANY

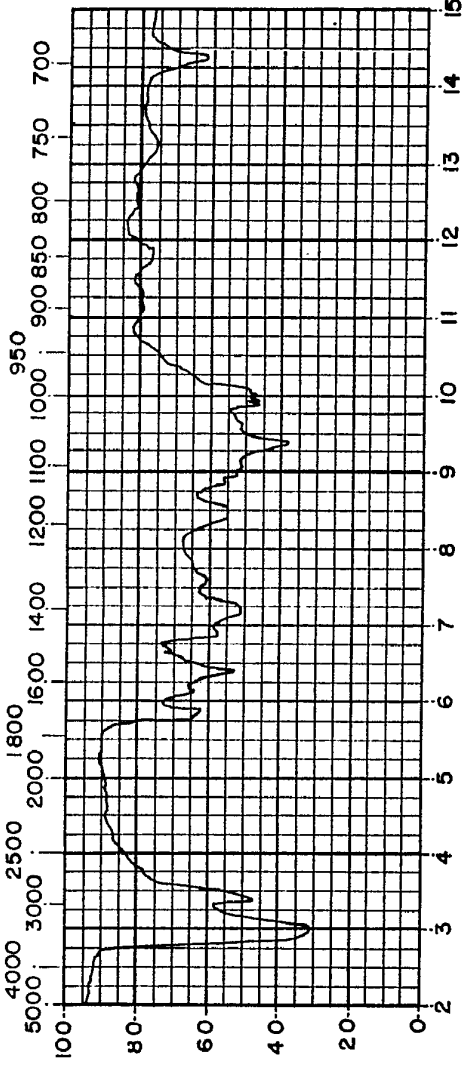
J. GOMEZ ACEBO Y MODER
p. p. Firmados L. Gaeta Fernández

A large, stylized handwritten signature in dark ink, appearing to read "Gomez Acebo y Moder".

A large, light-colored handwritten scribble or signature in the bottom left corner of the page.

379788

Fig.-1



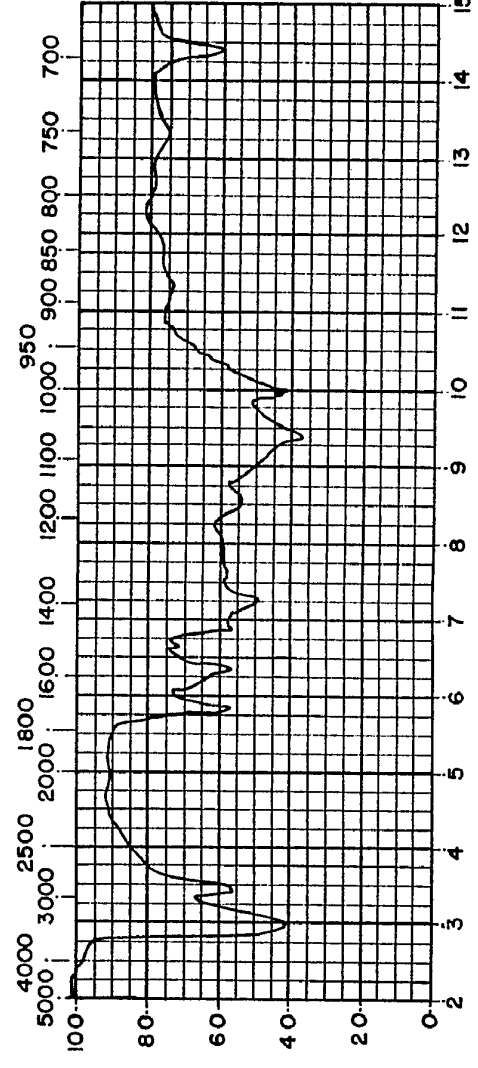
379788

ESCALA
VARIABLE

30 OCT. 1972

Madrid
J. GOMEZ ACEBO Y MOJER
 P. P. Filiales L. Casas Fariñas

Fig.-2



379788

FIG.-1

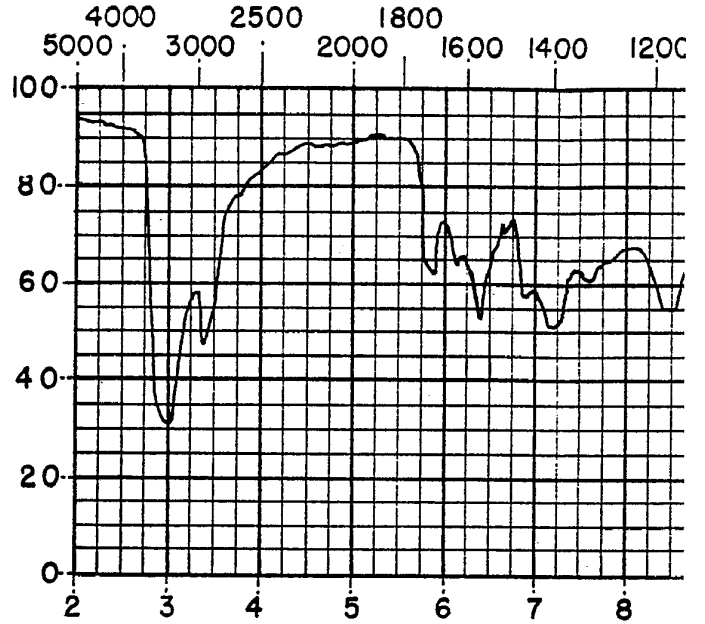
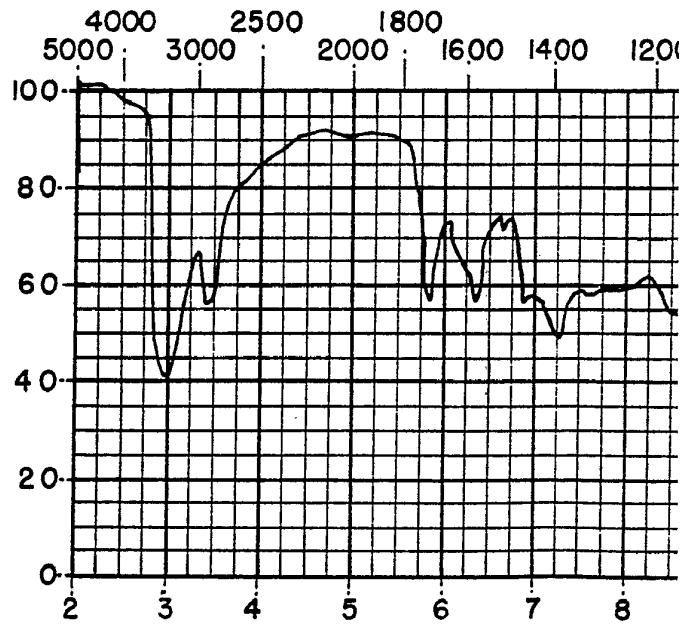
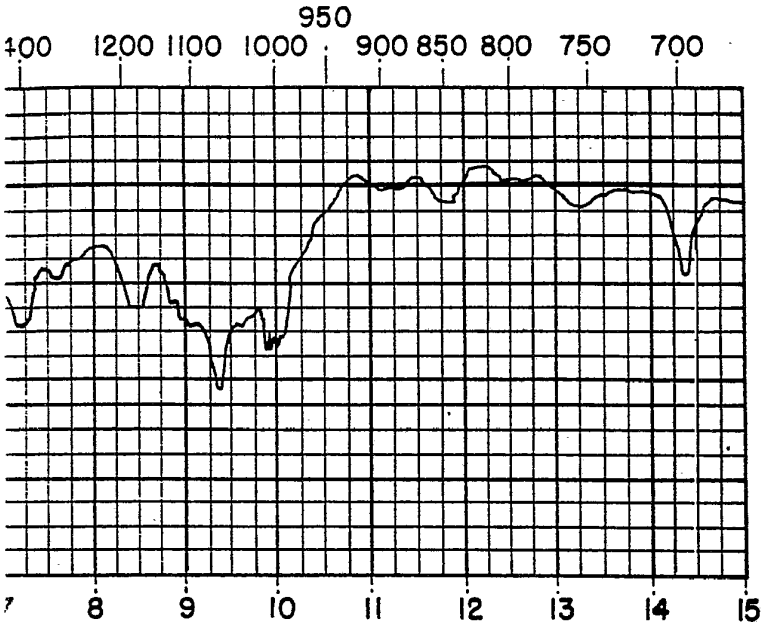


FIG.-2

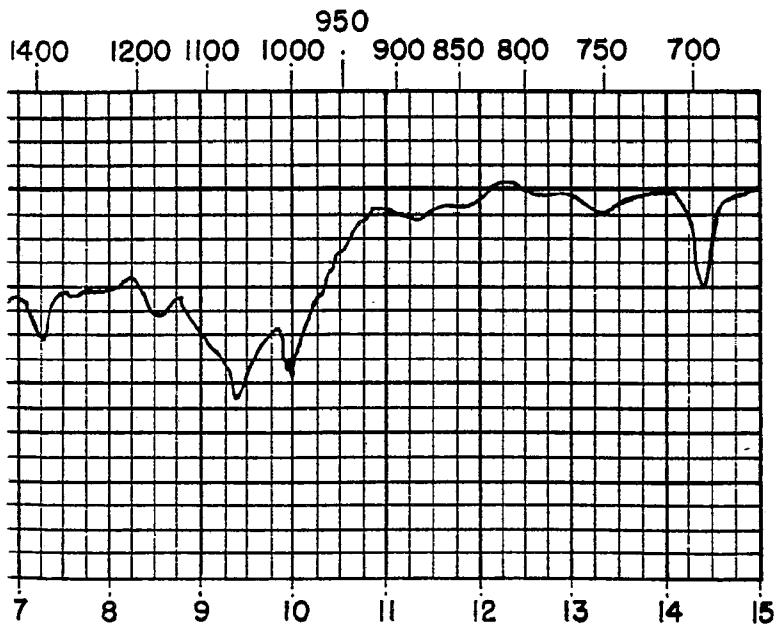


noja unica



379788

ESCALA
VARIABLE



30 OCT. 1972

Madrid

J. GOMEZ ACEBO Y MODEY

p. p. Firmado: L. Gaeta Fernández