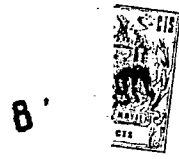


33278+A

EX-I-IV



387672

Nº 387.672

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

por VEINTE años

cuyo privilegio se solicita para España,
sus territorios y plazas de soberanía, a
favor de:

Nera BELLAVITA née CAGNOLI

de nacionalidad italiana, domiciliada en
Via XX Settembre 2, Perugia, Italia, rela
tiva a:

"METODO PARA PRODUCIR SUBSTANCIAS CON AC-
TIVIDAD ANTIMICOTICA Y/O ANTIBIOTICA"

=====

Prioridad: Solicitud de patente en Italia
nº 9314/70 de fecha 10 Enero
1970.

387672

8



SECCION TECNICA	
CLASIFICACION I. P. C.	
CLASE <u>CO7</u>	<u>CO7</u>
SUBCLASE <u>B</u>	<u>G</u>

MEMORIA DESCRIPTIVA

FUNDAMENTO DE LA INVENCION

5. Un objeto principal de la invención es un método para la preparación del extracto etanólico total y para la preparación de varios compuestos presentes en dicho extracto. - - - - -

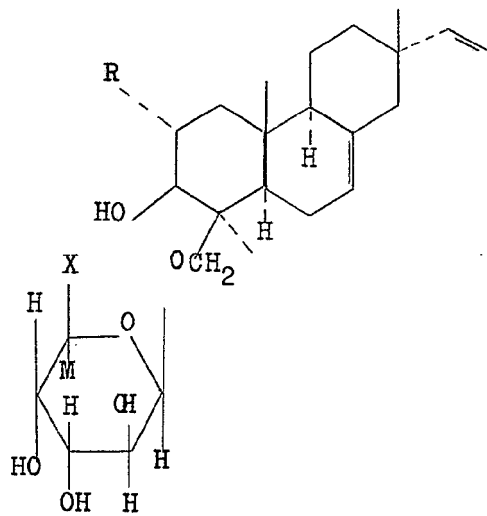
10. Otros objetos de la invención son métodos para la transformación de por lo menos uno de los compuestos que son parte del extracto total, en un compuesto distinto, aún incluido en dicho extracto total. - - - - -

Un objetivo de la invención es la obtención de nuevos antibióticos con una elevada acción antibacterica y/o antimicótica, por procesos industriales que sean económicamente convenientes. - - - - -

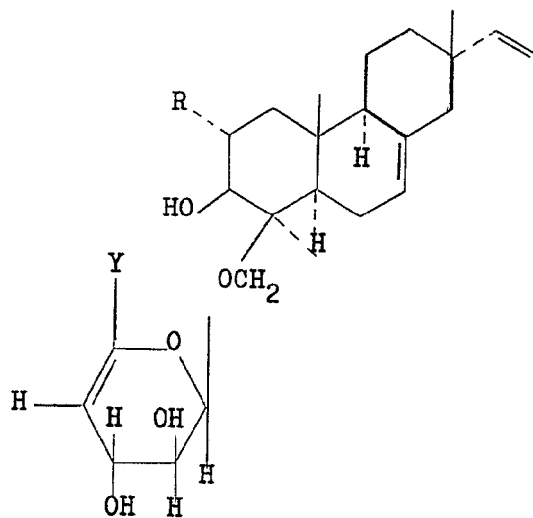


Estos y otros objetivos resultarán aparentes a quienes estén versados en la materia, a partir de la siguiente descripción de la invención. - - - - -

La invención se refiere a uno o más glucósidos (denominados a partir de ahora glucósidos A, B, C, D, E, F, G, H) que tienen la fórmula a)



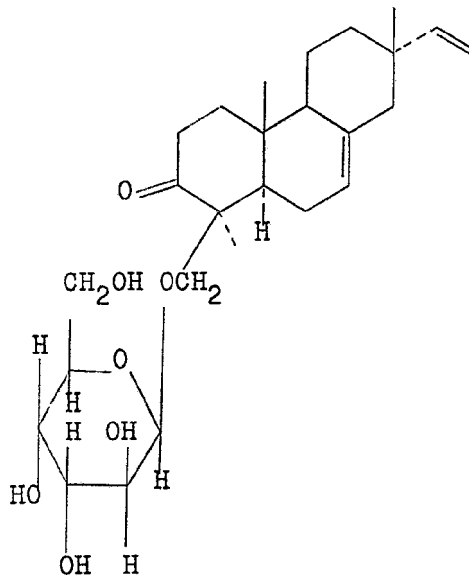
donde R puede ser hidrógeno o hidroxilo y X puede ser un grupo carboxilo (COOH) o un grupo $-CH_2OH$, b)



387672



donde R tiene el significado dado anteriormente e Y es -CHO o CH₂OH con la condición que cuando Y es -CH₂OH, R es hidrógeno, y c)



En particular esta invención se refiere a: - - - -

5. a) el extracto etanólico total del cultivo del hongo *Oospora Virescens* (Link) Wallr; a su método de preparación y a su actividad antibiótica; - - - - -

10. b) a nuevos glucósidos aislables del extracto etanólico total del cultivo del hongo; a métodos para la separación de los mismos y a su actividad antibiótica; - - - - -

c) particularmente a dos de estos glucósidos (D y E) con una actividad antimicótica pronunciada y a su preparación semisintética utilizando los glucósidos A, B, F y G. - -

BREVE DESCRIPCION DE LOS PLANOS

15. En los planos las Figs. 1 a 8 muestran los espectros

387672



de IR de los glucósidos denominados A a H en la memoria; - -

La Fig. 9 muestra una cromatografía en capa fina de los ocho glucósidos separados. - - - - -

Además, se ha descubierto que puede obtenerse de los cultivos del hongo *Oospora Virescens* (Link) Wallr, un extracto etanólico total con una actividad antibiótica pronunciada del que se han aislado ocho metabolitos de naturaleza glucosídica, designados a partir de ahora por las letras A a H: - - - - -

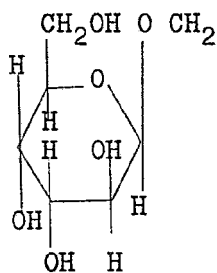
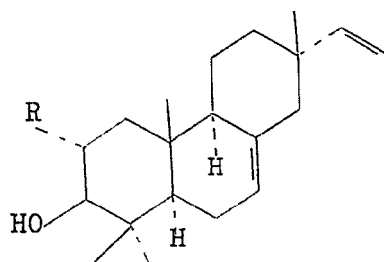
10.

PROPIEDADES QUÍMICAS Y FÍSICAS DE LOS GLUCOSIDOS A a H

FORMULAS MOLECULARES	p.f.	$[\alpha]_D^{20}$	M ⁺ (iones moleculares)	I.R.
A C ₂₆ H ₄₂ O ₈	130 ^o	-42,7 ^o	---	Fig. 1
B C ₂₆ H ₄₂ O ₇	110 ^o	-32,3 ^o	---	Fig. 2
C C ₂₆ H ₄₀ O ₇	160-2 ^o	-71,4 ^o	---	Fig. 3
D C ₂₆ H ₃₈ O ₆	---	-123 ^o	446	Fig. 4
E C ₂₆ H ₃₈ O ₇	---	-113 ^o	462	Fig. 5
F C ₂₆ H ₄₀ O ₉	188-190 ^o	-82,3 ^o	---	Fig. 6
G C ₂₆ H ₄₀ O ₈	192-194 ^o	-85,2 ^o	---	Fig. 7
H C ₂₆ H ₄₀ O ₆	170-2 ^o	-149 ^o	448	Fig. 8

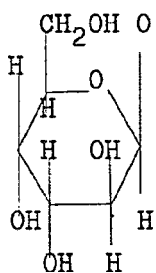
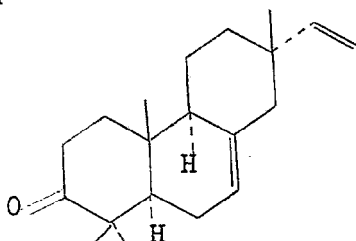
Dichos metabolitos tienen las fórmulas estructurales siguientes: - - - - -

387672

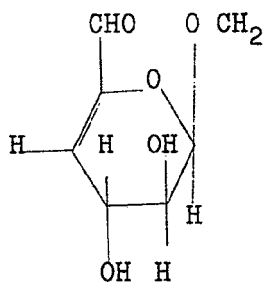
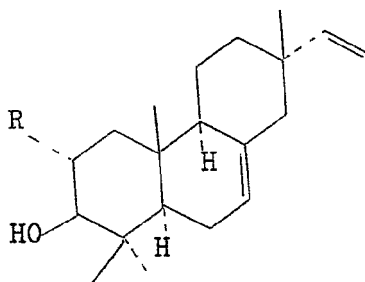


glucósido A R = OH

glucósido B R = H



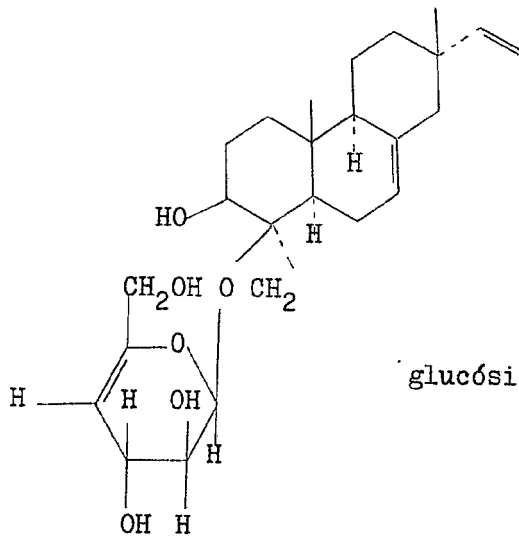
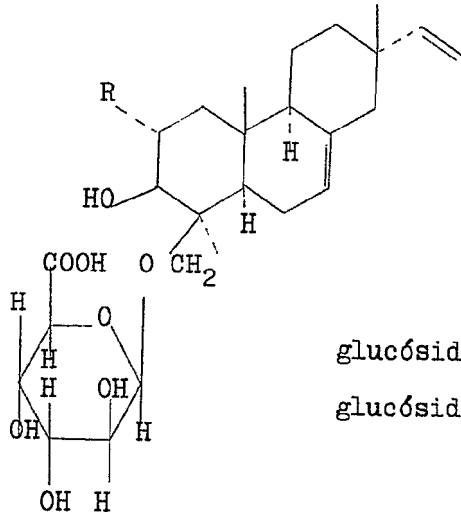
glucósido C



glucósido E R = OH

glucósido D R = H

387672



387672



5. Según un primer aspecto básico de la invención, ésta se refiere, por lo tanto, a un extracto total etanólico que es una mezcla de los ocho glucósidos A a H, obtenido por la extracción etanólica en caliente del cultivo liofilizado del *Oospora Virescens* (Link) Wallr. - - - - -

10. Según otro aspecto de la invención, ésta se refiere a algunos de los glucósidos (D y E), con una acción antibiótica (es decir acciones antibactericas y antimicóticas asociadas), y obtenidos directamente por medio de la purificación por cromatografía del extracto total. - - - - -

15. Según otro aspecto de la invención, ésta se refiere a dos de los glucósidos (F y G) con acción antimicótica, en particular frente al *Cryptococcus Neoformans*, que se obtienen por medio de la cristalización como sales sódicas a partir del extracto etanólico del cultivo liofilizado de *Oospora Virescens*, acidificación subsiguiente de su disolución acuosa, y purificación por cromatografía; además pueden utilizarse como sustancias intermedias para la obtención de otros glucósidos antibióticos (D y E). - - - - -

20. Según otro aspecto de la invención, ésta se refiere a dos glucósidos (A y B) con acción antimicótica, que se obtienen por extracción etanólica del cultivo liofilizado de *Oospora Virescens* (Link) Wallr, y por subsiguiente purificación por cromatografía; además pueden usarse como sustancias intermedias para la obtención de otros glucósidos antibióticos (D y E). - - - - -

25.

387672



5. Según otro aspecto, la invención se refiere a un método para la preparación de dichas ocho sustancias glucosídicas que consiste en la preparación y crecimiento de un cultivo de *Oospora Virescens* (Link) Wallr; la liofilización del cultivo; la extracción y el secado de los glucósidos solubles en alcohol etílico. - - - - -

Para la separación de los glucósidos A a H se emplea cromatografía en columna con gel de sílice. - - - - -

10. Según otro aspecto, la invención se refiere a un método para la preparación de dichas sustancias glucosídicas, que consiste en la preparación y crecimiento de un cultivo de *Oospora Virescens* (Link) Wallr; la liofilización del cultivo, la extracción de los glucósidos solubles en alcohol etílico; la precipitación por medio del enfriamiento de las sales sódicas (de F y G); su acidificación para la eliminación del sodio; y la purificación por cromatografía. - - - - -

15.

20. Según otro aspecto, la invención provee que los glucósidos (A y B) presentes en el extracto etanólico a concentraciones elevadas, pueden someterse a una oxieliminación para ser transformados en glucósidos activos (D y E). - - - - -

25. Según otro aspecto, la invención se refiere a un método para la preparación de glucósidos, según el cual los glucósidos (F y G) se cristalizan del extracto etanólico en forma de sales sódicas, se acidifican y se separan por cromatografía, se someten entonces a reducción para obtener glucósidos (A y B) solubles en etanol; estos últimos se aíslan por

387672



cromatografía y se someten a una oxieliminación para obtener los glucósidos D y E. - - - - -

La actividad antimicótica de los glucósidos mencionados anteriormente se muestra en la tabla siguiente: - - - -

TABLA I

Organismos de prueba	Concentración inhibitoria mínima en µg/ml							
	A	B	C	D	E	F	G	H
<i>Aspergillus fumigatus</i>	50	50	50	12,5	25	50	50	100
<i>Aspergillus flavus</i>	—	100	100	12,5	—	100	50	100
<i>Mucor corymbifer</i>	50	50	50	12,5	—	100	100	50
<i>Penicillium marneffeii</i>	12,5	25	50	12,5	25	100	50	50
<i>Epidermophyton floccosum</i>	50	3,12	25	25	50	100	50	100
<i>Microsporum canis</i>	12,5	3,12	25	25	50	50	50	50
<i>Trichophyton rubrum</i>	25	12,5	25	12,5	25	100	25	50
<i>Candida albicans</i>	100	100	100	50	6,25	100	50	100
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,18	0,78	0,09	6,25	0,04	1,56	0,18	50
<i>Histoplasma capsulatum</i>	—	—	—	12,5	50	—	—	—

387672



5. Todos los compuestos A a H tienen un espectro antimicótico amplio inhibiendo el crecimiento de fermentos patógenos (C. albicans, Crypt. neoformans, etc.), de dermatofitos (M. canis, E. floccosum, T. rubrum, etc.) y de saprofitos potencialmente patógenos como A. fumigatus y A. flavus. - - - -

De manera general, los productos A, B, C, F, G y H son particularmente efectivos contra el Cryptococcus neoformans. - - - - -

10. Sin embargo, los productos D y E tienen la actividad antifúngica más fuerte. - - - - -

En general, el producto D es más efectivo que el producto E frente a los hongos filamentosos por el hecho de que su actividad se produce a menores concentraciones que con el último. - - - - -

15. El producto E es particularmente más activo frente a algunas levaduras patógenas (sobre todo el Cryptococcus neoformans) actuando incluso a concentraciones sumamente bajas. - - - - -

20. La actividad antifúngica ha sido medida in vitro, sobre un líquido de Sabouraud con glucosa más cloranfenicol (0,5%) a distintas concentraciones. - - - - -

Dos de los ocho glucósidos (D y E) muestran un amplio espectro de actividad tanto in vitro como in vivo inhibiendo el crecimiento de hongos parásitos del hombre y de los

387672



animales; por lo tanto estos productos son biológicamente más interesantes. - - - - -

Es de particular interés la muy baja toxicidad de los glucósidos D y E. - - - - -

5. La DL₅₀ subcutánea de D en ratones fue 250 mg/Kg. --

La DL₅₀ subcutánea de E en ratones fue de 250 mg/Kg.

Los productos D y E se administran mejor al hombre y animales en terapia externa en forma de polvo, tintura o pomada que contenga 500 mg de sustancia activa. - - - - -

10. La pomada contiene como excipiente lanolina o ácidos grasos (por ejemplo ácido undecílico y caprílico). - - -

Además D y E pueden administrarse al hombre y a los animales en dosis orales diarias de varios gramos sin ningún efecto desfavorable. - - - - -

15. Las tabletas y las cápsulas, preparadas según procedimientos bien conocidos, contienen 70 mg de sustancias activas y 25 mg de ácido ascórbico y 3 mg de metabisulfito K. - -

20. El nuevo glucósido D puede utilizarse contra varias micosis cutáneas de dermatofitos (alopecia, eczema, herpes, empeine y favo) e histoplasmosis. - - - - -

El nuevo glucósido E puede usarse en la terapia de infecciones particulares, que actualmente se denominan gene-

387672



ralmente candidiasis o moniliasis y criptococcosis. - - - - -

Además los glucósidos D y E son particularmente interesantes puesto que reaccionan con un amplio número de levaduras dermatofitas y patógenas incluyendo la *Candida albicans*, conocida formalmente como *Monilia albicans*, que ha resistido toda la terapia antifúngica conocida hasta ahora. - - - - -

Los metabolitos D y E tienen también la propiedad de inhibir el crecimiento in vitro de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas tales como *Staphilococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*. - - - - -

TABLA II

ESPECTRO ANTIBACTERICO DE D y E

ORGANISMO	CIM ^{xx} glucósido D	mcg/ml glucósido D
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	5
<i>Bacillus subtilis</i>	3	5
<i>Escherichia coli</i>	10	15

xx CIM = concentración inhibitoria mínima. - - - - -

El extracto alcohólico total, que tiene una
DL₁₀₀ = 500 mg/kg (subcutáneo)
DL₁₀₀ = 500 mg/KG (intraperitoneal)
muestra una pronunciada actividad antimicótica y antibacteri-

387672



ca in vitro frente a los agentes antes enumerados. - - - - -

Para la investigación que ha sido el objeto de este trabajo se ha utilizado una cepa de deuteromicetos de Oospora Virescens (Link) Wallr de la familia de las Moniliáceas, que es naturalmente rara, aislada de las ramas muertas de mora -seleccionada en malta de agar de una colonia diferenciada de las demás por una esporulación más rápida e intensa. - - - - -

5.

Características de cultivo, morfológicas y fisiológicas del hongo

10.

Sobre medios orgánicos sólidos o líquidos basados en malta y extractos vegetales con o sin glucosa (granos de trigo, granos de maíz, granos de avena, zanahorias o semillas de alubia, etc.) las colonias del hongo son redondas, con un perfil ligeramente ondulado primeramente plano y blanco, después subido; cambian con el grado de desarrollo hasta volverse verdes con el tiempo, con un tono verde oliva oscuro y aspecto aterciopelado. - - - - -

15.

El color verde resulta del color de la capa que lleva las esporas y es más intenso cuando la esporulación es abundante. - - - - -

20.

El micelio vegetativo consiste en comillas divididas, ramificadas hialinas, de alrededor de 2,5µ de ancho, que soportan numerosas conidioforas que llevan abundantes esporas encadenadas, producidas en una sucesión basipetal en cadenas muy largas flexuosas. - - - - -

25.

387672



Las conidioforas son sencillas, hialinas, erectas o dobladas de 30-40µ de longitud, ligeramente hinchadas en la base y estrechadas hacia la punta. - - - - -

5. Las esporas son fusiformes, lisas, de unas 7-8µ de longitud y 2,5-3µ de anchura de color verde o verde oliva en la masa. - - - - -

En los medios antes mencionados, el hongo a menudo produce un pigmento marrón difusible. - - - - -

10. En medios sintéticos (Czapek, Veindeling) el hongo crece poco sin fructificación. - - - - -

El crecimiento de Oospora Virescens es lento a una temperatura de 10°C, óptimo a 23-25°C, mientras que no se observa ningún crecimiento a 30°C. - - - - -

15. En cultivos sumergidos (medios líquidos agitados magnéticamente) el hongo crece muy lentamente sin esporulación: los ocho glucósidos A a H no se producen. - - - - -

Por lo tanto, el método superficial sobre cultivos estacionarios (es decir no agitados) se utiliza como en los ejemplos siguientes: - - - - -

20. Ejemplo A (Cultivos estacionarios sobre medios líquidos sintéticos) - - - - -

1) Líquido de Czapek modificado (pH 6-6,5 después de la esterilización) - - - - -

387672



- 5. K_2HPO_4 1 g
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 "
- KCl 0,5 "
- $FeSO_4$ 0,01"
- $NaNO_3$ 2 "
- Glucosa 20 "
- agua desionizada hasta completar 1 litro

2) Líquido de Veindeling (pH 4,5-5 después de la esterilización) - - - - -

- 10. $NH_4OCO(CH_2CH_2)_2COONH_4$ 2 g
- KH_2PO_4 1 "
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 "
- Glucosa 25 "
- Microelem. sol 1 ml
- 15. agua desionizada hasta completar 1 litro

Los medios de crecimiento, repartidos (150 ml/botella) en botellas Roux de 1000 ml y esterilizadas a una presión de 24 p.s.i. (aprox. 1,7 kg/cm²) durante 3-4 minutos, se inoculan con 2 ml de una suspensión acuosa estéril de abundantes esporas, preparada a partir de cultivos de O. Virescens, de 20 a 40 días, bien esporulados sobre planos inclinados de agar de avena. - - - - -

- 20. Después de la inoculación, el hongo se hace crecer en un cultivo estacionario a temperatura ambiente de 23-25°C
- 25. a la luz del día. - - - - -

387672



En los medios antes mencionados (1 y 2) el hongo crece mal y no esporula; los metabolitos A a H no se producen.

Ejemplo B (Cultivos estacionarios sobre medios líquidos orgánicos sin glucosa) - - - - -

- 5. Extractos líquidos (en agua desionizada) de - - - - -
 - 1) Zanahorias (250 g/l pH alrededor de 6 después de la esterilización)- - - - -
 - 2) Granos de trigo (150 g/l pH alrededor de 6 después de la esterilización) - - - - -
- 10. 3) Granos de maíz (200 g/l pH alrededor de 6,4 después de la esterilización) - - - - -
 - 4) Semillas de alubias (100 g/l alrededor de 6,2 después de la esterilización) - - - - -
- 15. 5) Semillas de guisantes (100 g/l alrededor de 6 después de la esterilización) - - - - -
 - 6) Semillas de lenteja (100 g/l alrededor de 6 después de la esterilización) - - - - -
 - 7) Patata (200 g/l alrededor de 5,5 después de la esterilización) - - - - -

20. Los medios son repartidos, dispuestos en autoclave, inoculados y cultivados como en el Ejemplo A. - - - - -

El crecimiento vegetativo es más o menos abundante y la esporulación es buena o moderada; los metabolitos A a H no se producen. - - - - -



387672

Ejemplo C (Cultivos estacionarios sobre medios líquidos orgánicos con azúcares). - - - - -

Caldos (en agua corriente) de: - - - - -

- 5. 1) Extracto de malta (polvo) (15 g/l; Bé 1,6; pH alrededor de 6 después de la esterilización) - - - - -
- 2) Extracto de levadura con glucosa (2%) (3 g/l; pH alrededor de 7,8 después de la esterilización) - - - - -

Extractos con glucosa (2%), preparados como en el Ejemplo B (1-7), de: - - - - -

- 10. 3) Zanahorias (pH alrededor de 5,5 después de la esterilización); - - - - -
- 4) Granos de trigo (pH alrededor de 5,8 después de la esterilización); - - - - -
- 15. 5) Granos de maíz (pH alrededor de 5,5 después de la esterilización); - - - - -
- 6) Semillas de alubias (pH alrededor de 6 después de la esterilización); - - - - -
- 7) Semillas de guisantes (pH alrededor de 5,8 después de la esterilización); - - - - -
- 20. 8) Semillas de lentejas (pH alrededor de 6 después de la esterilización); - - - - -
- 9) Patata (pH alrededor de 5,5 después de la esterilización).

Los medios son repartidos, dispuestos en autoclave, inoculados y cultivados como en el Ejemplo A. - - - - -

387672



El crecimiento vegetativo y la esporulación son vigorosos y abundantes sobre los medios de malta (1), zanahoria con glucosa (3), trigo con glucosa (4) y maíz con glucosa (5).

5. El crecimiento es bueno pero con escasa esporulación en los medios de levadura con glucosa (2), alubia con glucosa (6), guisantes con glucosa (7), lentejas con glucosa (8) y patata con glucosa (9). - - - - -

10. En los medios antes mencionados, pero en particular en malta, zanahoria, maíz y trigo, con la excepción de patata, el hongo produce los metabolitos A, B, C, F y G en el transcurso de 10 a 30 días de crecimiento. - - - - -

Ejemplo D (Cultivos estacionarios sobre medios líquidos orgánicos con glucosa a distintos niveles de pH). - -

15. Los medios de zanahoria con glucosa y maíz con glucosa (como en el Ejemplo C, 3) y 5)), que mostraron ser los mejores para el desarrollo del hongo y la producción de algunos metabolitos, se ajustan a los siguientes valores de pH, después de la esterilización: - - - - -

- 20. 1) a- Extracto de zanahoria con glucosa, pH alrededor de 5
- b- Extracto de zanahoria con glucosa, pH alrededor de 7
- c- Extracto de zanahoria con glucosa, pH alrededor de 8,6-8,8
- 25. 2) a- Extractos de granos de maíz con glucosa, pH alrededor de 5
- b- Extractos de granos de maíz con glucosa, pH alrededor de 7

387672



c- Extractos de granos de maíz con glucosa, pH alrededor de 8,6-8,8

Los medios se preparan, inoculan y cultivan como en el Ejemplo A. - - - - -

5. Generalmente, en 1)a,1)b y 2)a,2)b, el valor del pH inicial del medio ajustado, independientemente de la presencia del hongo, se mantiene constante mientras que en 1)c y 2)c cambia lentamente, en el transcurso de 50 horas, hacia valores neutros.- - - - -

10. Después de una incubación de 20 - 30 días, la asimilación de glucosa en los medios 1)a y 2)a es lenta y el pH inicial aumenta hacia valores neutros. - - - - -

15. En los medios 1)b, 1)c y 2)b, 2)c, la asimilación de la glucosa es más rápida y la reacción del medio tiende a un pH de 9. - - - - -

En los medios 1)b, 1)c y 2)b, 2)c, el crecimiento y la esporulación son más rápidos y abundantes. - - - - -

20. En 1)c y 2)c, después de una incubación de 15 días, se producen los metabolitos A, B, C, F y G; después de 30 días también se producen D, E y H. - - - - -

Sólo 1)c es el mejor medio para la producción de D y E. - - - - -

387672



Extracción, separación y purificación de los metabolitos

Extracción y separación por cromatografía: - - - -

5. 3 litros de cultivos de hongo *Oospora Virescens* (Link) Wallr se liofilizan y extraen en Soxhlet con etanol. Del extracto etanólico, por enfriamiento lento precipitan F y G bajo la forma de sales sódicas; el extracto etanólico, filtrado y secado al vacío se añade a una columna de gel de sílice (KIESEL GEL 0,05 -0,2 mm Merck) y el cromatograma se revela con una mezcla de cloroformo-metanol. - - - - -

10. Las fracciones que contienen 250 mg de glucósido D se eluyen primeramente y después en el orden siguiente: - - - 50 mg de C, 300 mg de H, 300 mg de E, 2000 mg de B, 4000 mg de A. - - - - -

15. La disolución acuosa de 5000 mg de sales sódicas de F y G se acidifican con ácido clorhídrico N dando F y G que se purifican por cromatografía en columna siendo el eluyente cloroformo-metanol. - - - - -

Bajo condiciones ideales para el crecimiento del hongo la producción de metabolitos D y E es siempre limitada.

20. Un ulterior desarrollo de la invención consiste en la producción semisintética de los metabolitos D y E partiendo respectivamente de los productos más abundantes B, G y A, F. - - - - -



Producción semisintética de D

5. 1) El metabolito B, por tritilación, acetilación, destritilación, oxieliminación con el reactivo de Doering, y subsiguiente desacetilación con metóxido sódico en metanol da un 50% de D. - - - - -

2) El metabolito G por reducción con $LiAlH_4$ y tratamiento subsiguiente como en (1) da D. - - - - -

Producción semisintética de E

10. 1) El metabolito A por tritilación, acetilación, destritilación, oxieliminación con el reactivo de Doering y subsiguiente desacetilación con metóxido sódico en metanol da E con un 40% de rendimiento. - - - - -

2) El metabolito F por reducción con $LiAlH_4$ y tratamiento subsiguiente como en (1) da E. - - - - -

15. PARTE EXPERIMENTAL

Preparación del medio de cultivo para el crecimiento y esporulación del hongo Oospora Virescens (Link) Wallr.

(Ejemplo D, 1c).

20. El medio se prepara con un extracto de zanahoria en agua desionizada (250 g/l) obtenido en autoclave a una temperatura de unos 120°C durante 2-3 minutos. El extracto se filtra utilizando algodón en rama, se enriquece con glucosa (2%) y se reparte (300 ml/botella) en botellas Lepin de 3000 ml

387672



(con una sección rectangular) y se pone en autoclave a una temperatura de 120° durante unos 3-4 minutos. - - - - -

5. Después de enfriar, el medio se ajusta a un pH de 8,6-8,8 con una disolución estéril de hidróxido sódico normal y se inocula con 5 ml de una suspensión acuosa estéril de abundantes esporas; las condiciones de inoculación y de cultivo son las del Ejemplo A. - - - - -

10. El crecimiento y la esporulación son vigorosos y abundantes. Después de 15 días de incubación se producen los metabolitos antibióticos A, B, C, F y G; después de 30 días los metabolitos D, E y H. - - - - -

Los glucósidos A a H están contenidos tanto en el micelio como en el licor de fermentación. - - - - -

Purificación del extracto total etanólico.

15. Se extraen exhaustivamente con etanol 3 litros de un cultivo liofilizado (D, 1c) (10 botellas Lepin) en Soxhlet y se concentran a 2/3; después de enfriamiento lento cristalizan 5 g de sales sódicas de F y G; la mezcla se filtra y evapora al vacío hasta sequedad (12 g). El extracto crudo (12 g),
20. que contiene los metabolitos A, B, C, D, E y H, se cromatografía en una columna de 250 g de gel de sílice (KIESELGEL G 0,05-0,2 mm Merck). La columna se eluye con una mezcla de cloroformo-metanol (93:7). Se eluyen progresivamente: - - - - -

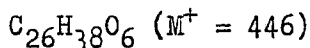
D - 250 mg : soluble en etanol, metanol, cloroformo, acetato

387672



de etilo; precipita amorfo de disoluciones de acetato de etilo. - - - - -

$$[\alpha]_D^{20} = 123^\circ (c = 0,96; \text{metanol});$$



5. El espectro de ultravioletas a 258 mμ (λ = 6000; etanol) El espectro de infrarrojos muestra picos a las siguientes longitudes de onda expresadas en inversa de centímetros cuando se determinó en un disco de KBr: 3401, 3077, 2959, 2924, 2899, 2874, 2833, 2817, 1681, 1639, 1471, 1460, 1439, 1429, 1383, 1370, 1344, 1325, 1292, 1274, 1221, 1178, 1138, 1091, 1047, 1015, 1000, 961, 952, 930, 909, 893, 885, 868, 856, 826, 813. - - - - -
- 10.

*C.c.f. R_f = 0,65 mancha púrpura - - - - -

15. C - 50 mg : soluble en etanol, metanol, cloroformo, cristalizabile de acetato de etilo, p.f. 160-162°. - - - - -

$$[\alpha]_D^{20} = -71,4^\circ (c = 0,98; \text{metanol}); C_{26}H_{40}O_7$$

El espectro de ultravioletas no muestra ningún máximo de absorción entre 220-400 mμ. - - - - -

20. El espectro de infrarrojos muestra picos a las siguientes longitudes de onda expresadas en inversa de centímetros cuando se determinó en un disco de KBr: 3584, 3401, 3086, 3058, 2976, 2950, 2907, 2865, 2825, 2801, 1709, 1681, 1667, 1639, 1490,



1471, 1460, 1449, 1439, 1425, 1412, 1387, 1364,
 1342, 1330, 1311, 1290, 1266, 1250, 1230, 1214,
 1176, 1156, 1143, 1138, 1114, 1105, 1095, 1072,
 1026, 1008, 980, 963, 951, 945, 909, 886, 873,
 869, 853, 839, 806, 749, 741. - - - - -

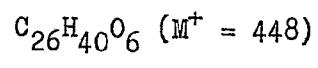
5.

*C.c.f. $R_f = 0,52$ mancha roja. - - - - -

H - 300 mg : soluble en etanol, metanol, cloroformo, cristali-
 zable de etanol p.f. 170° - 172° . - - - - -

$$[\alpha]_D^{20} = -149^{\circ} (c = 0,72; \text{metanol});$$

10.



El espectro de ultravioletas no muestra ningún
 máximo de absorción entre 220-400 mp. - - - - -

15.

El espectro de infrarrojos muestra picos a las
 siguientes longitudes de onda expresadas en in-
 versa de centímetros cuando se determinó en un
 disco de KBr: 3534, 3448, 3086, 3040, 2959, 2950,
 2924, 2899, 2865, 2817, 1689, 1681, 1639, 1471,
 1447, 1429, 1412, 1381, 1337, 1206, 1186, 1124,
 1084, 1058, 1047, 1026, 1000, 921, 811, 790. - -

20.

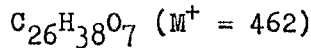
*C.c.f. $R_f = 0,42$ mancha púrpura. - - - - -

E - 300 mg : soluble en etanol, metanol, cloroformo, acetato
 de etilo; precipita amorfo de una disolución de
 acetato de etilo/éter de petróleo. - - - - -

387672



$$[\alpha]_D^{20} = -113^\circ \text{ (c = 0,97; metanol);}$$



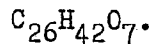
El espectro de ultravioletas tiene un máximo de absorción a 258 mμ (ξ = 6000, etanol). - - - - -

- 5. El espectro de infrarrojos muestra picos a las siguientes longitudes de onda expresadas en inversa de centímetros cuando se determinó en un disco de KBr: 3401, 3077, 2959, 2915, 2874, 2841, 2817, 1695, 1639, 1449, 1431, 1414, 1387, 1372,
- 10. 1342, 1179, 1149, 1089, 1058, 1000, 926, 910, 885, 862, 826. - - - - -

*C.c.f. R_F = 0,36 mancha parda. - - - - -

- 15. B - 2000 mg: soluble en etanol, metanol, cloroformo, precipita amorfo de una disolución de acetato de etilo, p.f. alrededor de 110°. - - - - -

$$[\alpha]_D^{20} = -32,3^\circ \text{ (c = 1,05; metanol)}$$



El espectro de ultravioletas no muestra ningún máximo de absorción entre 220-400 mμ. - - - - -

- 20. El espectro de infrarrojos muestra picos a las siguientes longitudes de onda expresadas en inversa de centímetros cuando se determinó en un disco de KBr: 3401, 3086, 2924, 2874, 2817, 1639, 1447, 1425, 1412, 1383, 1372, 1330, 1294, 1285, 1267,

387672



1215, 1143, 1138, 1086, 1015, 1000, 966, 952,
909, 879, 856, 833, 830, - - - - -

*C.c.f. R_f = 0,34 mancha parda. - - - - -

5. A - 4000 mg: soluble en metanol, etanol, cloroformo, precipi-
ta amorfo de acetona, acetato de etilo, p.f. al-
rededor de 130°. - - - - -

$$\left[\alpha \right]_D^{20} = -42,7^\circ \text{ (c = 1,03; metanol)}$$
$$C_{26}H_{42}O_8$$

10. El espectro de ultravioletas no muestra ningún
máximo de absorción entre 220-400 mμ. - - - - -

15. El espectro de infrarrojos muestra picos a las si-
guientes longitudes de onda expresadas en inver-
sa de centímetros cuando se determinó en un dis-
co de KBr: 3401, 3086, 2959, 2907, 2825, 1637,
1451, 1443, 1425, 1414, 1383, 1372, 1156, 1138,
1070, 1010, 966, 941, 934, 909, 883, 832, 829,
782. - - - - -

*C.c.f. R_f = 0,16 mancha verde. - - - - -

20. * La cromatografía en capa fina se hizo sobre placas de gel
de sílice (KIESELGEL H Fluka) activadas durante 60 minutos a
110° y eluidas con una mezcla de cloroformo-metanol (85:15);
detección : ácido sulfúrico al 50% a 110° durante 5 minutos.

387672



8 ENF

Separación de los productos F y G

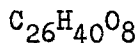
Se disolvieron 5 g de sales sódicas de F y G en 200 ml de H₂O, y se les añadió con agitación ácido clorhídrico N, dando F y G. El precipitado se recogió por centrifugación, se secó al vacío resultando unos 4 g, que se purificaron por cromatografía en columna con 100 g de adsorbente (ácido silícico/celita 3:1), eluyendo con una mezcla de cloroformo-metanol (90:10); G y F se eluyeron progresivamente. - - - - -

5.

G - 1400 mg: soluble en metanol, etanol, cloroformo, precipita amorfo del etanol p.f. = 192°-194°. - - - - -

10.

$$[\alpha]_D^{20} = -85,2^\circ \text{ (c = 1,1; metanol);}$$



El espectro de ultravioletas no muestra ningún máximo de absorción entre 220 - 400 mμ. - - - - -

15.

El espectro de infrarrojos del éster carboximético de G muestra picos a las siguientes longitudes de onda expresadas en inversa de centímetros cuando se determinó en un disco de KBr: 3425,

20.

3086, 3003, 2959, 2950, 2933, 2924, 2865, 2849, 2833, 1745, 1639, 1468, 1449, 1437, 1412, 1383, 1350, 1299, 1290, 1220, 1142, 1095, 1086, 1078, 1056, 1046, 1011, 1010, 992, 943, 900, 881, 858, 847, 840, 806, 781. - - - - -

*C.c.f. R_f = 0,32, mancha parda. - - - - -

387672



F - 2000 mg : soluble en metanol, etanol, cloroformo; precipi-
ta amorfo de etanol, p.f. = 188-190° . - - - - -

$$[\alpha]_D^{20} = -82,3^\circ \text{ (c = 1,13; metanol); } C_{26}H_{40}O_9$$

5. El espectro de ultravioletas no muestra ningún
máximo de absorción entre 220-400 mμ . - - - - -

10. El espectro de infrarrojos muestra picos a las
siguientes longitudes de onda expresadas en in-
versa de centímetros cuando se determinó en un
disco de KBr: 3546, 3401, 3086, 2967, 2950,
2899, 2865, 2833, 2817, 1730, 1667, 1639, 1471,
1451, 1414, 1389, 1372, 1319, 1282, 1227, 1152,
1136, 1081, 1000, 961, 951, 934, 917, 893, 855,
826, 813. - - - - -

*C.c.f. $R_f = 0,18$ mancha verde. - - - - -

15. * La cromatografía en capa fina se hizo sobre placas de gel
de sílice (KIESELGEL H Fluka) activadas durante 60 minutos a
110° y eluidas con una mezcla de cloroformo-metanol -ácido acé-
tico (80:15:5); detección: ácido sulfúrico al 50% a 110° duran-
te 5 minutos. - - - - -

20. Producción semisintética de D y E

Producción de D

1 D) Se agita 1 g de B con 1 g de trifenilclorometano y 4 ml
de piridina durante 72 horas a temperatura ambiente; cuando la

387672



mezcla se enfría a 0°C, se añaden 6 ml de piridina y 6 ml de anhídrido acético. Después de 24 h a temperatura ambiente la mezcla se vierte sobre agua helada y se recoge el precipitado. El producto crudo se cromatografía sobre gel de sílice (KIESELGEL G 0,05-0,2 mm Merck), se eluye con bencenoacetato de etilo (90:10); después de la evaporación del disolvente se obtiene un rendimiento de 2,2 g de producto monotritilado y acetilado. - -

5. La destritilación del producto se logra con ácido acético (80%) a 110°; después de la separación por cromatografía el derivado tetraacetilo obtenido (1,2 g) se somete a oxielimnación con el reactivo de Doering (SO₃-piridina-DMSO y trietilamina) para dar el derivado triacetilo de D (0,9 g). Este último, por desacetilación con metóxido sódico en 2 ml de metanol (1 g de sodio disuelto en 100 ml de metanol) durante 15 minutos a 60° seguida durante 45 minutos durante los cuales la disolución alcanza la temperatura ambiente, da 500 mg de D.
10. 2 D) Se disuelve 1 g de G en THF, se le añade 1 g de LiAlH₄ durante 60 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se trata de manera convencional y después de la purificación por cromatografía se obtiene 1 g de B. Este producto tratado por el procedimiento descrito anteriormente (1), da 500 mg de D. - - - -
- 15.
- 20.

Producción de E

- 1 E) 1 g de A tratado como se describe anteriormente en (1D) da E (400 mg). - - - - -
25. 2 E) 1 g de F tratado como se describe anteriormente en (2D) da E (400 mg). - - - - -
- Referirse a la descripción de D reemplazando B por A, G por F y D por E. - - - - -

IV

387672

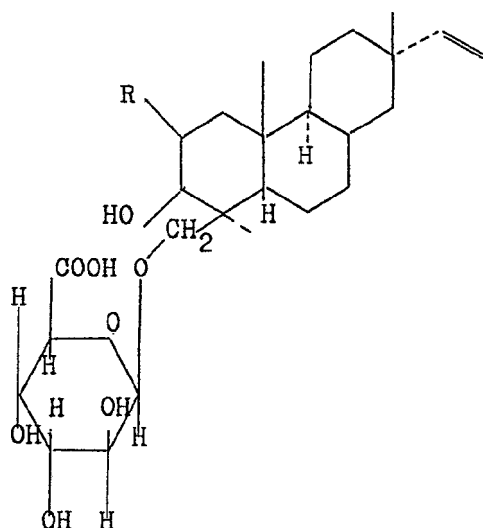


N O T A

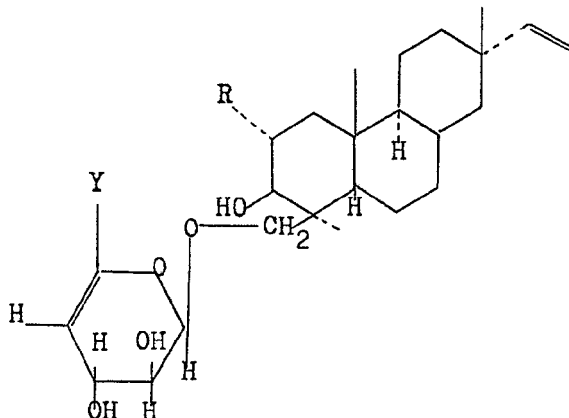
Se declaran de novedad y propiedad para España, sus territorios y plazas de soberanía, las siguientes: - - - - -

R E I V I N D I C A C I O N E S

5. 1.- Método para producir sustancias con actividad antimicótica y/o antibiótica, caracterizado porque se produce una mezcla en etanol que contiene compuestos de la fórmula



en donde R puede ser hidrógeno o hidroxilo (compuestos A, B, F y G); de la fórmula

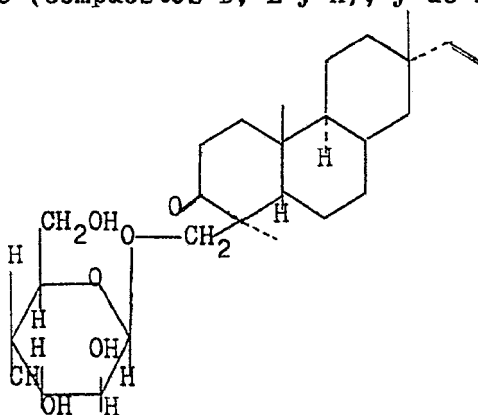


IV

387672



en donde R tiene el significado dado anteriormente y Y es -CHO ó -CH₂OH con la condición de que cuando Y es -CH₂OH, R es hidrógeno (compuestos D, E y H); y de la fórmula



5. por medio del cultivo de una cepa productora de glucósidos de *Oospora virescens* (Link) Wallr en un medio de decocción orgánico con glucosa a una temperatura de 10 a 25°C, durante un período de por lo menos 10 días en cultivo estacionario, siendo elegido dicho medio de decocción orgánico del grupo compuesto por malta, glucosa-levadura, glucosa-zanahoria, glucosa-trigo, glucosa-maíz, glucosa-alubias, glucosa-guisantes y glucosa-lentejas y teniendo un pH básico, liofilizar y extraer con etanol. - - - - -
- 10.

2.- Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la temperatura es de 23-25°C. - - - - -

15. 3.- Método según la reivindicación 2, caracterizado porque el medio es de decocción de glucosa-zanahoria. - - -

4.- Método según la reivindicación 1 ó 3, caracterizado porque el pH es de 8,6-8,8. - - - - -

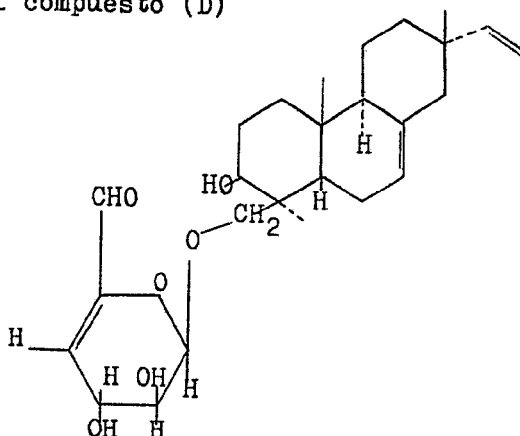
IV

387672

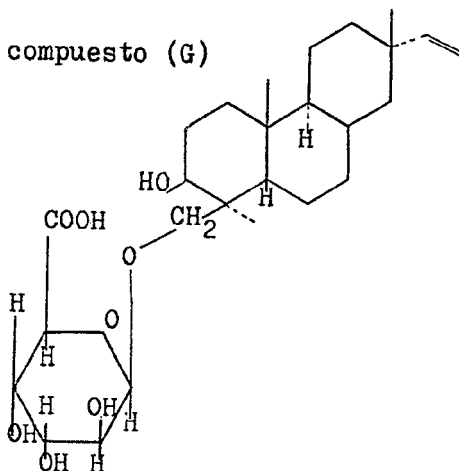


5.- Método según la reivindicación 1, caracterizado porque los compuestos se separan por medio del enfriamiento de la disolución en etanol, del filtrado de la disolución, de la separación mutua de los compuestos en el filtrado, en una columna de cromatografía, en la acidulación del precipitado que queda de la etapa de filtración y en la separación de los compuestos restantes en una columna de cromatografía. - - - - -

10. 6.- Método para producir sustancias con actividad antimicótica y/o antibiótica, para la producción semisintética del compuesto (D)



partiendo del compuesto (G)



caracterizado porque comprende las etapas de: reducción de



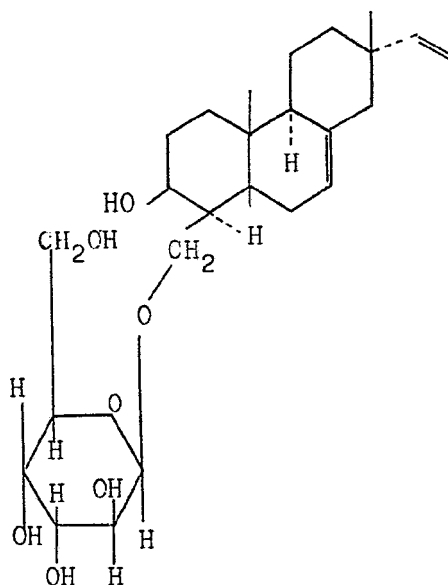
IV

387672



dicho compuesto por medio de LiAlH_4 ; tritilación, acetilación; destritilación; oxieliminación con reactivo Doering y desacetilación. - - - - -

5. 7.- Método para producir sustancias con actividad antimicótica y/o antibiótica, para la producción semisintética del compuesto D, definido anteriormente, partiendo del compuesto - - - - -



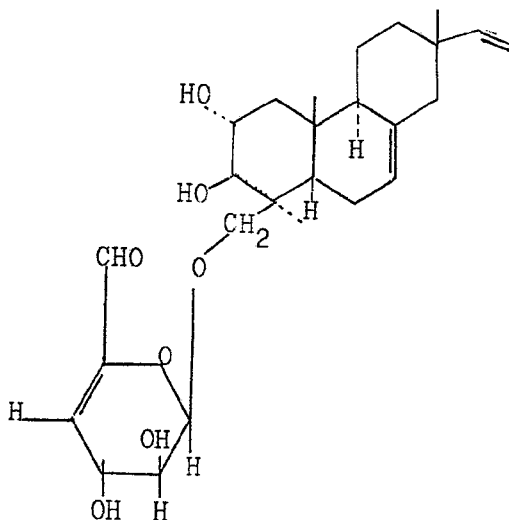
10. caracterizado porque comprende las etapas de: tritilación; acetilación; destritilación; oxieliminación con reactivo Doering y desacetilación. - - - - -

8.- Método para producir sustancias con actividad antimicótica y/o antibiótica, para la producción semisintética del compuesto (E) - - - - -

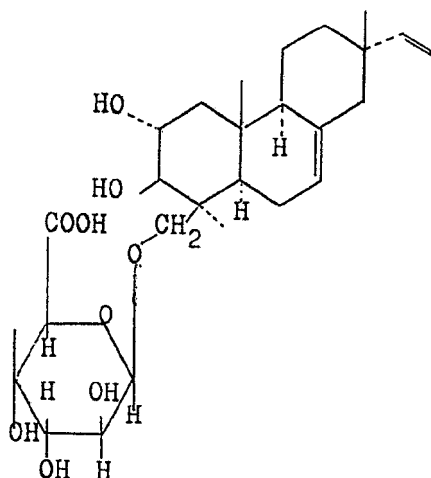


IV

387672



partiendo del compuesto (F) -----



5. caracterizado porque comprende las etapas de: reducción de dicho compuesto por medio de LiAlH_4 ; tritilación; acetilación; destritilación; oxieliminación con reactivo Doering y desacetilación. -----

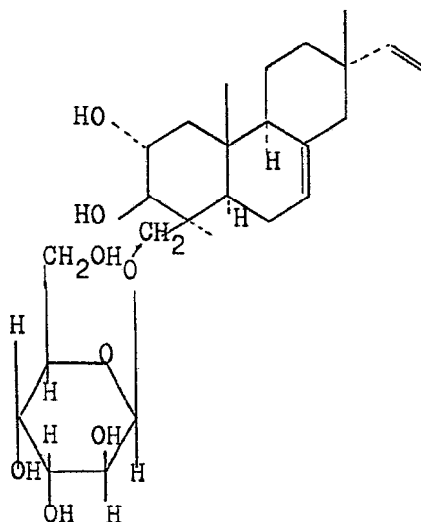
9.- Método para producir sustancias con actividad antimicótica y/o antibiótica, para la producción semisinté-

IV

387672



tica del compuesto E, definido anteriormente, partiendo del
compuesto - - - - -



5. caracterizado porque comprende las etapas de tritilación;
acetilación; destritilación; oxieliminación con reactivo
Doering y desacetilación. - - - - -

10.- "METODO PARA PRODUCIR SUBSTANCIAS CON ACTIVI
DAD ANTIMICOTICA Y/O ANTIBIOTICA". - - - - -

Todo ello conforme se describe y reivindica en la
presente memoria que consta de treinta y seis hojas folia-
das y mecanografiadas por una sola de sus caras, y de cin-
co láminas de dibujos que la ilustran.

BARCELONA, - 8 ENE. 1971

P. A. M. CURELL SUÑOL

Maria Luce

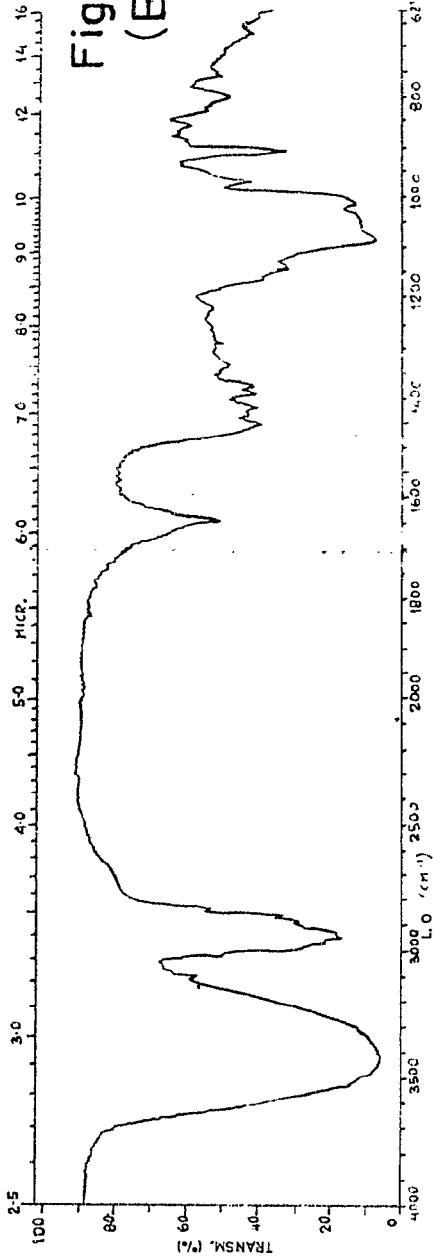
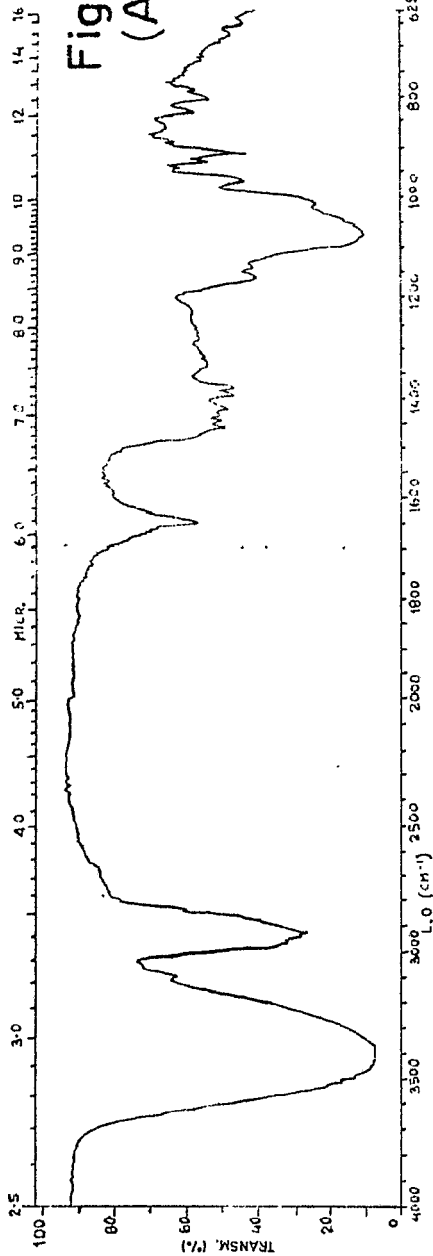


587672

587672



8 ENE

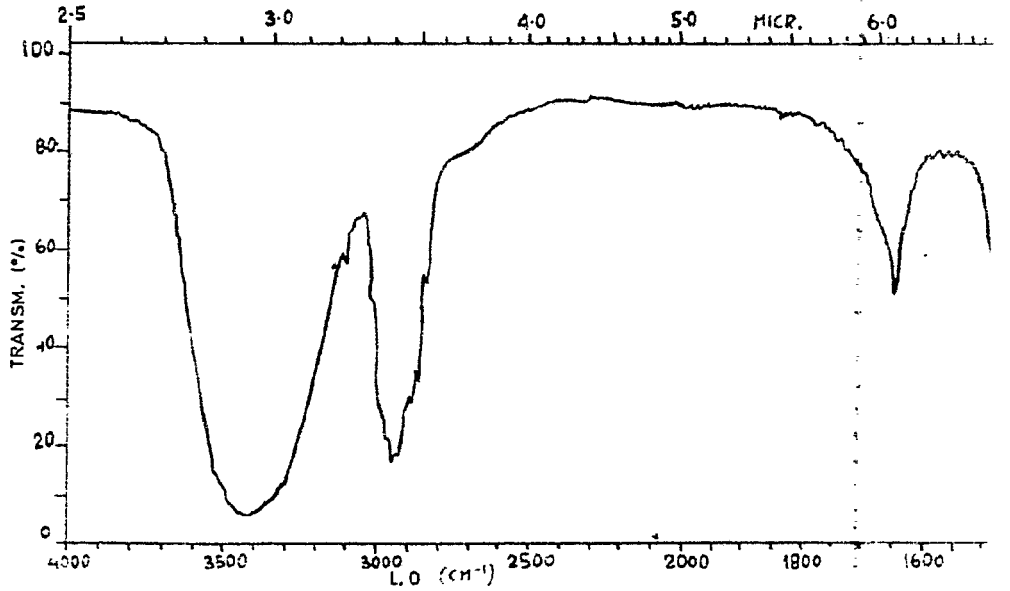
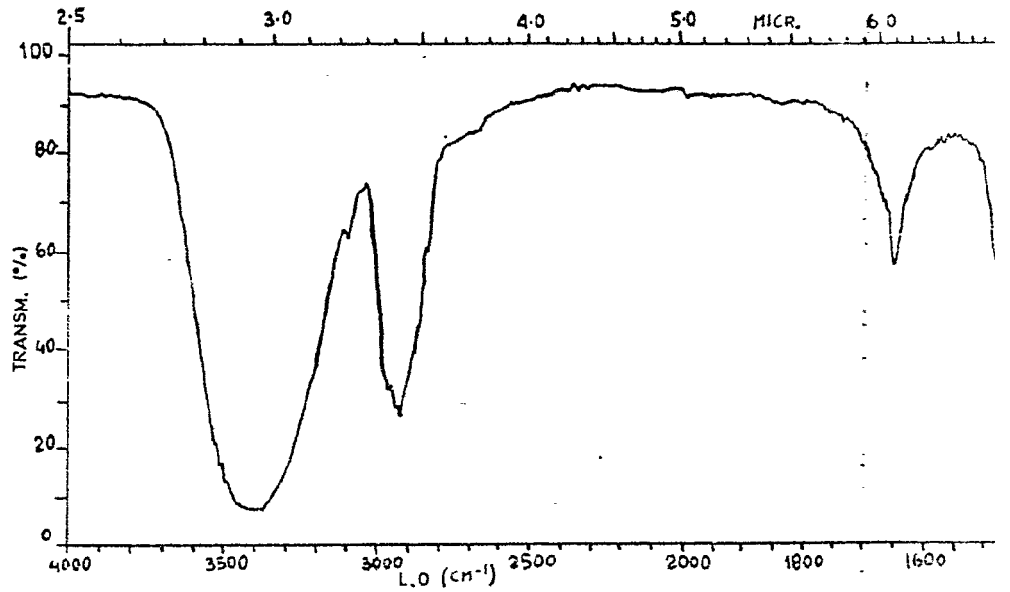


BARCELONA, - 8 ENE. 1971
P. A. M. CURELL SURRO.

Maria. Bellavita

NERA BELLAVITA née CAGNOLI

387672



POOR QUALITY

387672

- 8 ENE

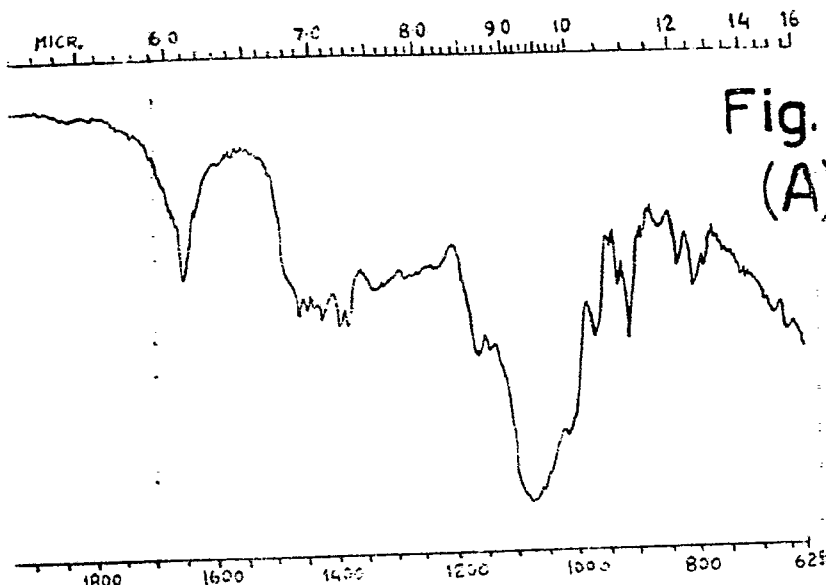


Fig. 1
(A)

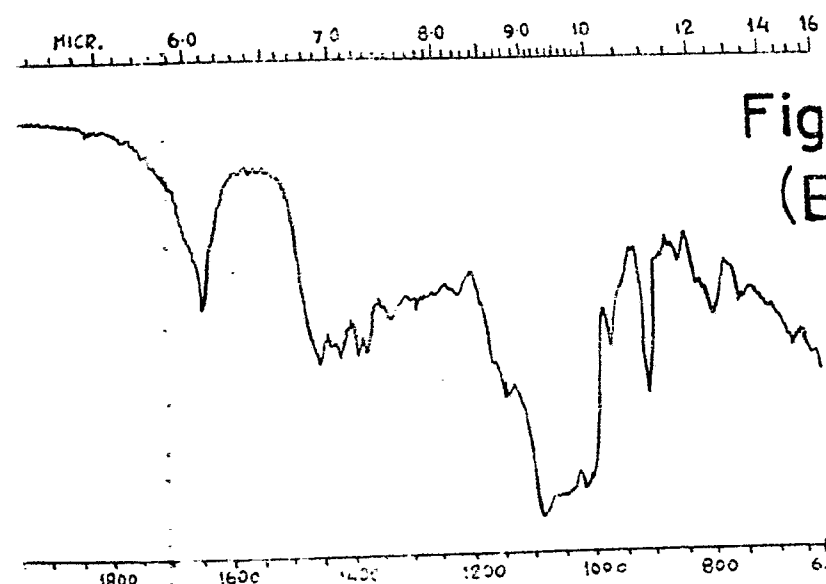


Fig. 2
(B)

BARCELONA, - 8 ENE. 1971

P. A. M. CURELL SUÑOL

M. Curell Suñol

POOR
QUALITY

387672

537672



=8

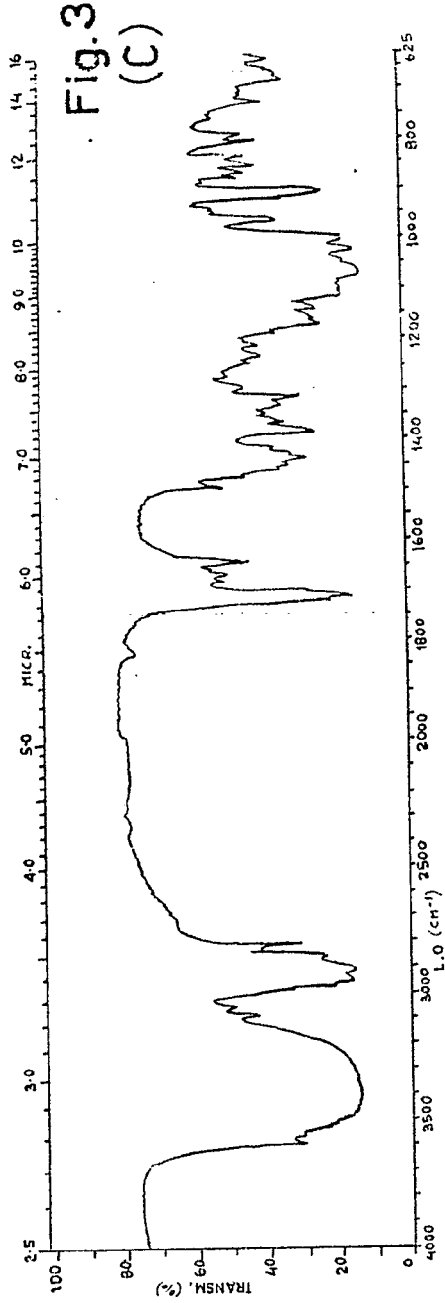


Fig.3 (C)

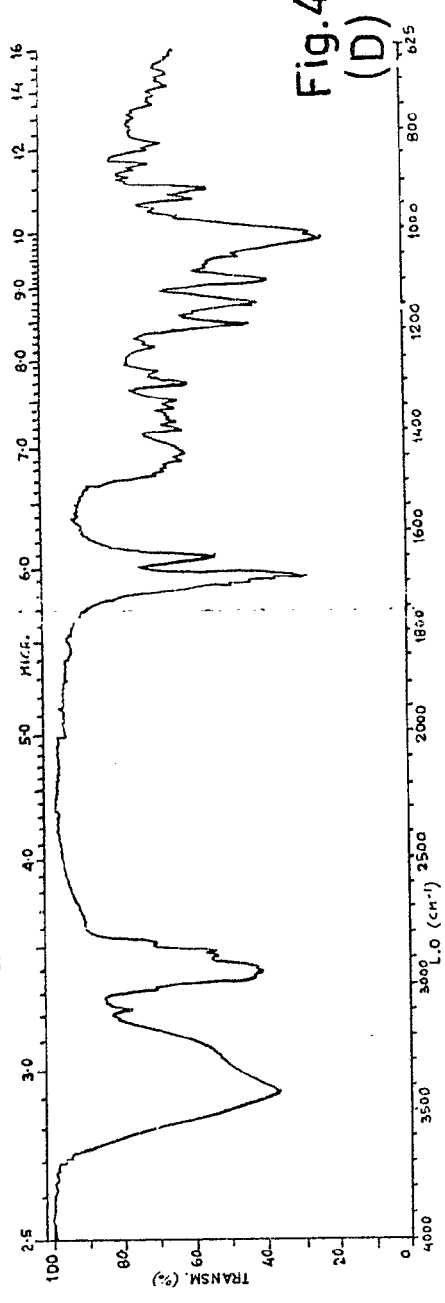


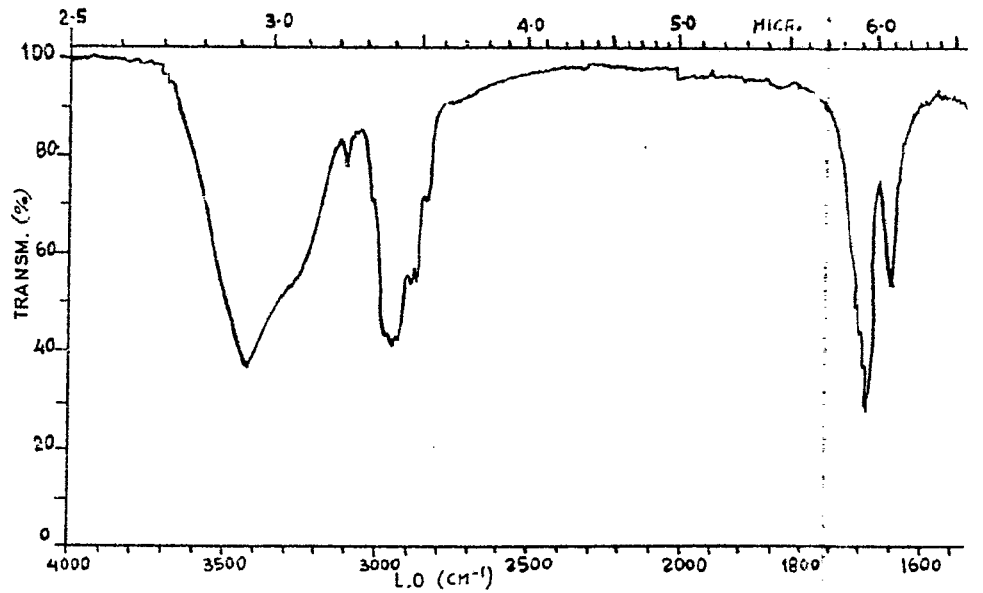
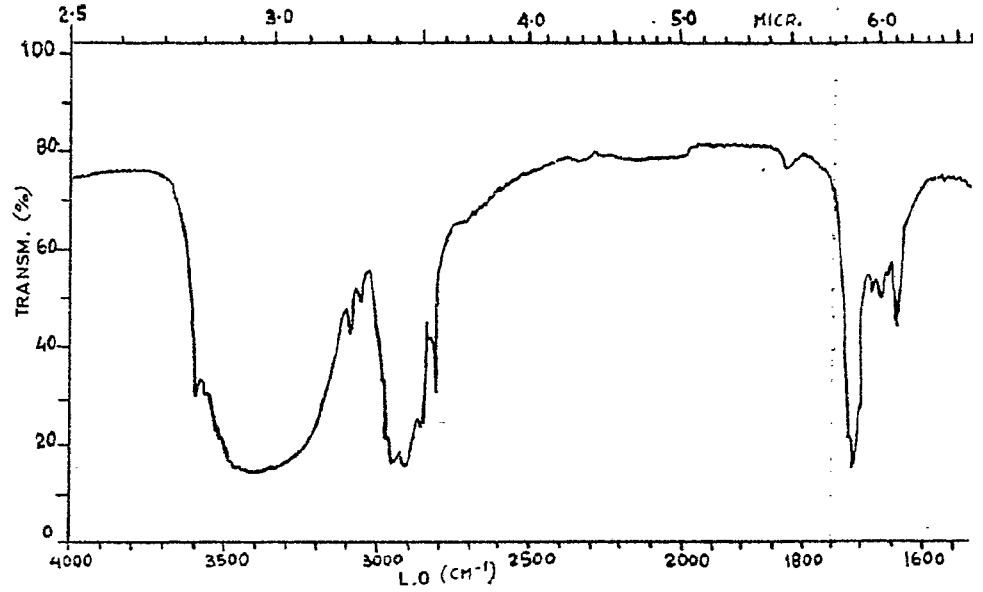
Fig.4 (D)

BARCELONA, - 8 ENE. 1971.
F. A. M. CURELL SUÑOL

M. m. h. m.

NERA BELLAVITA née CAGNOLI

387672



POOR
QUALITY

587672

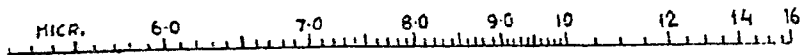


Fig. 3
(C)

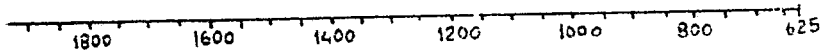
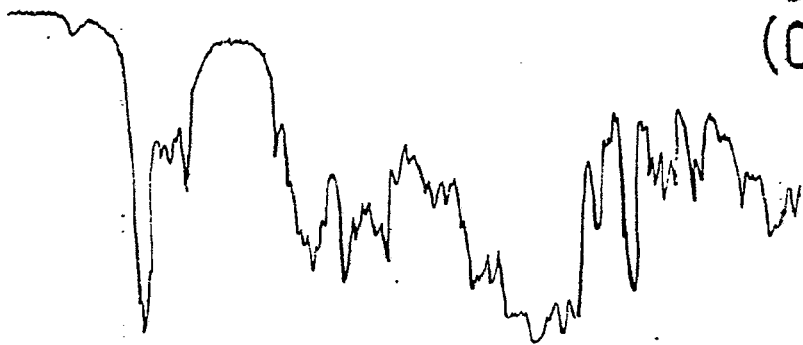
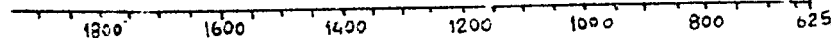
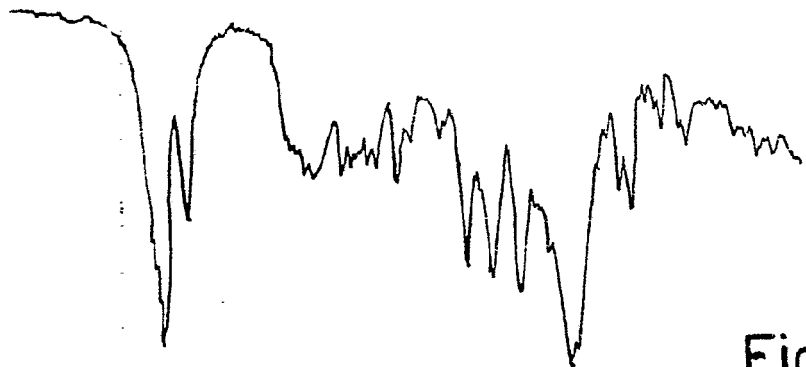
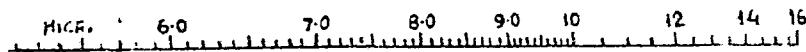


Fig. 4
(D)



BARCELONA, - 8 ENE. 1971.

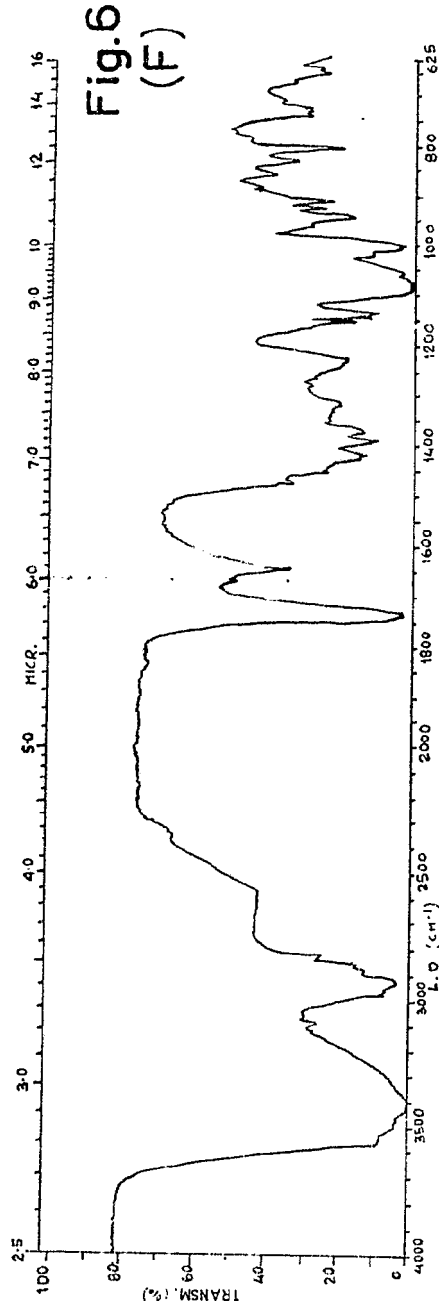
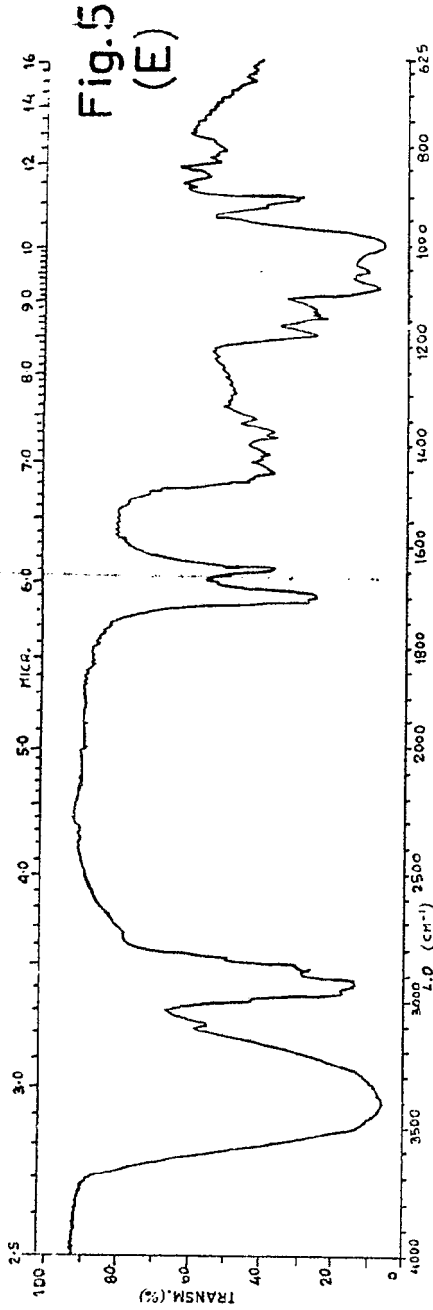
F. A. M. CURELL SUÑOL

Monsieur

POOR
QUALITY

387672

387672

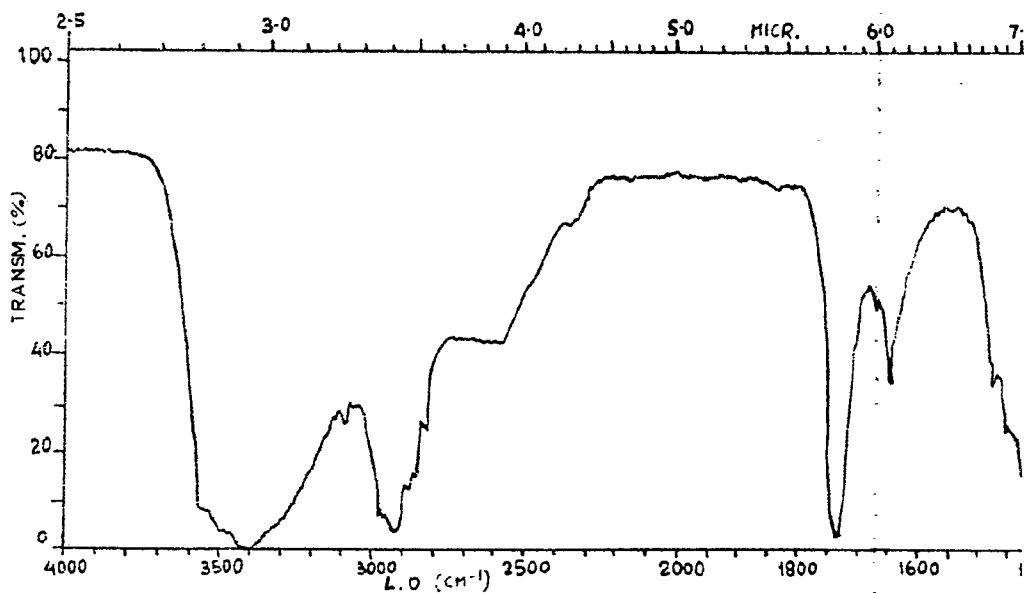
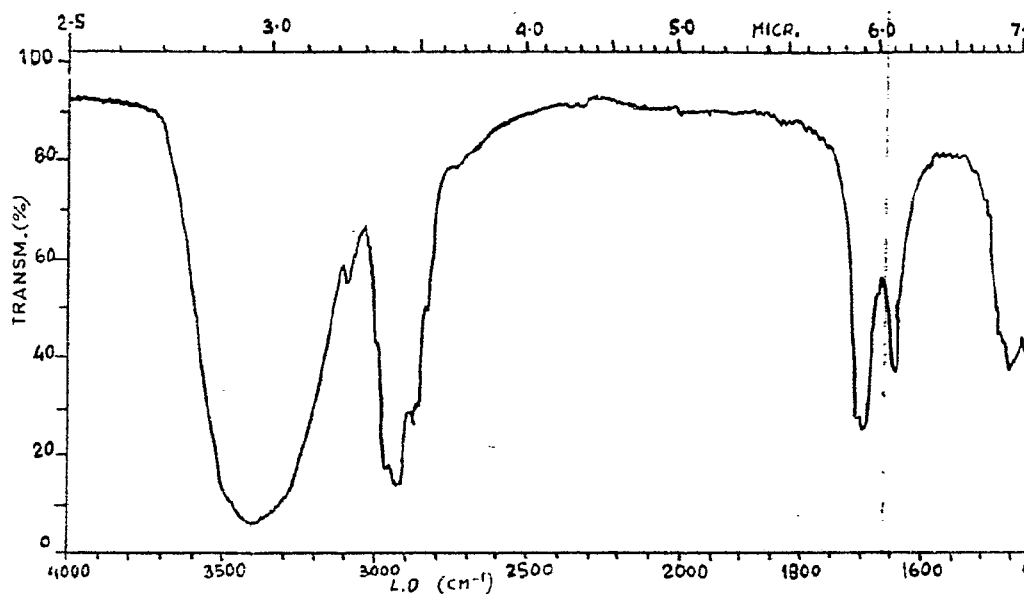


BARCELONA, - 8 ENE. 1971
F. A. M. CURELL SUÑOL

M. M. ...

NERA BELLAVITA née CAGNOLI

387672



POOR
QUALITY

387672

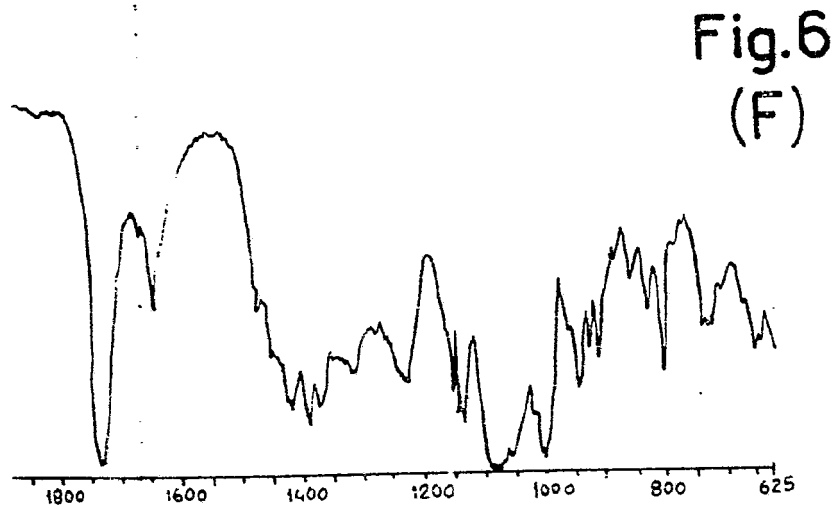


100% 6.0 7.0 8.0 9.0 10 12 14 16



1800 1600 1400 1200 1000 800 625

100% 6.0 7.0 8.0 9.0 10 12 14 16



BARCELONA, - 8 ENE. 1971

P. A. M. CURELL SUÑOL

Mm. lada

387672

387672

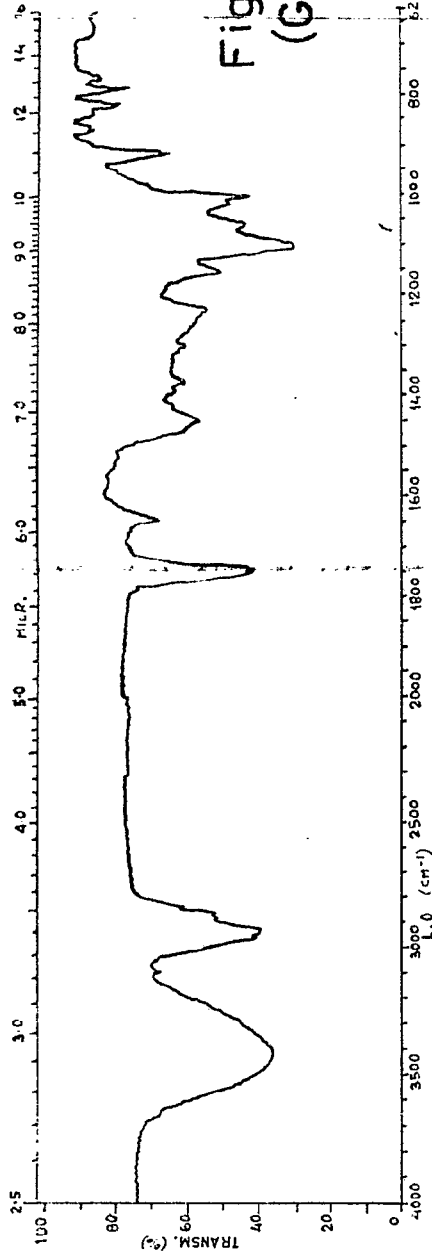


Fig. 7 (G)

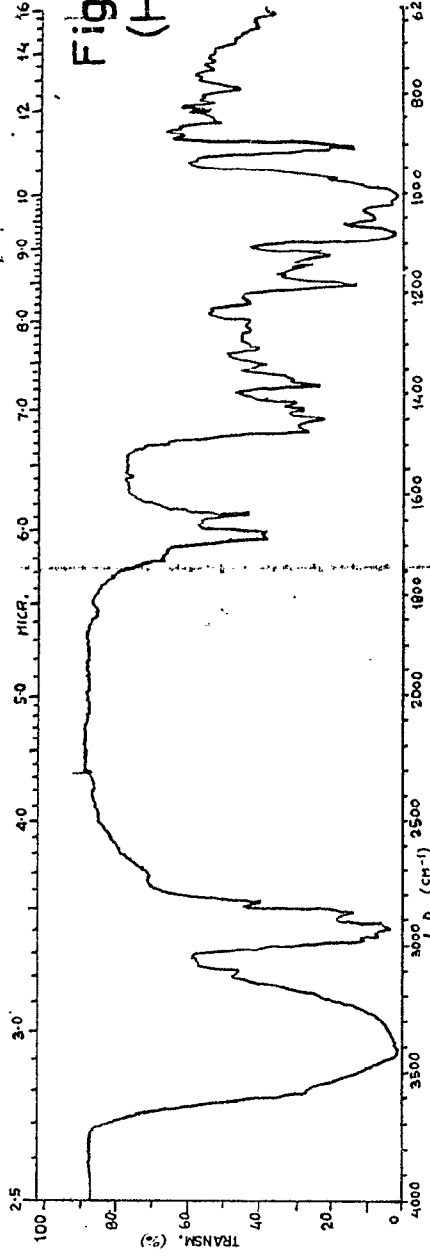


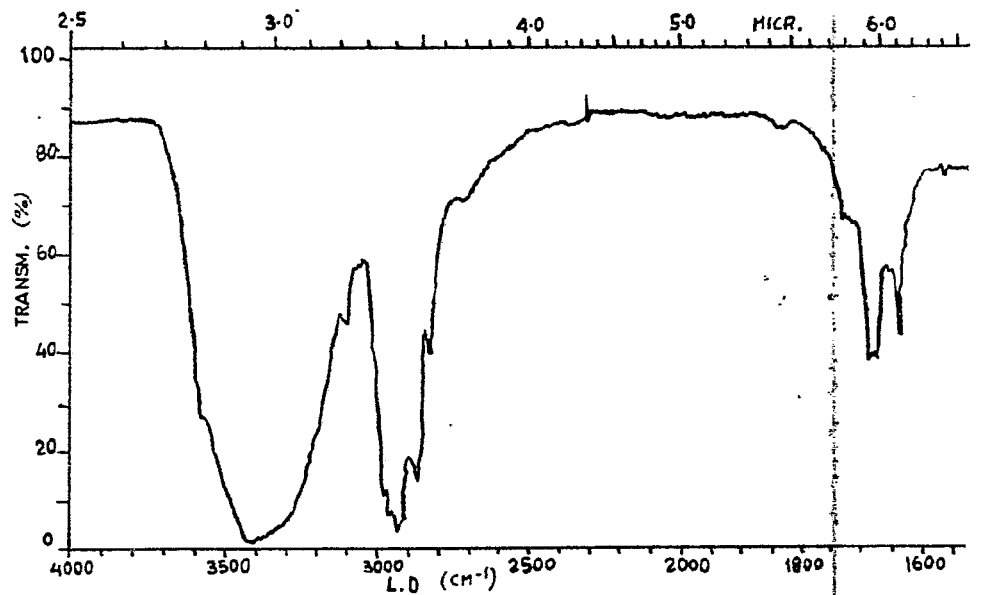
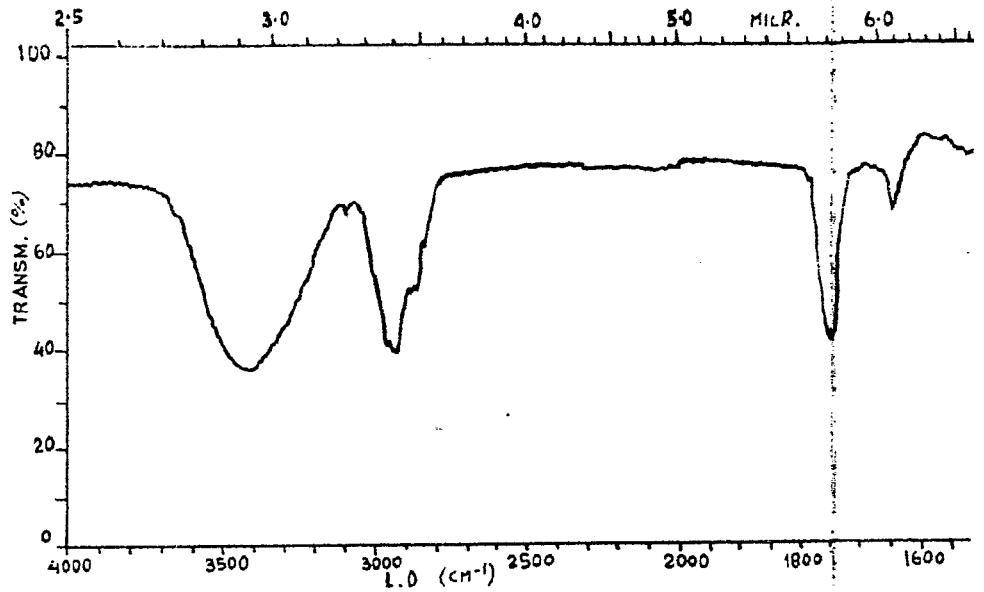
Fig. 8 (H)

BARCELONA, - 8 ENE. 1971
P. A. M. CURELL SUÑOL

Maria José

NERA BELLAVITA née CAGNOLI

387672



POOR
QUALITY

387672

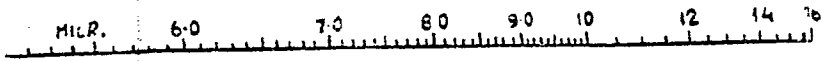


Fig. 7
(G)

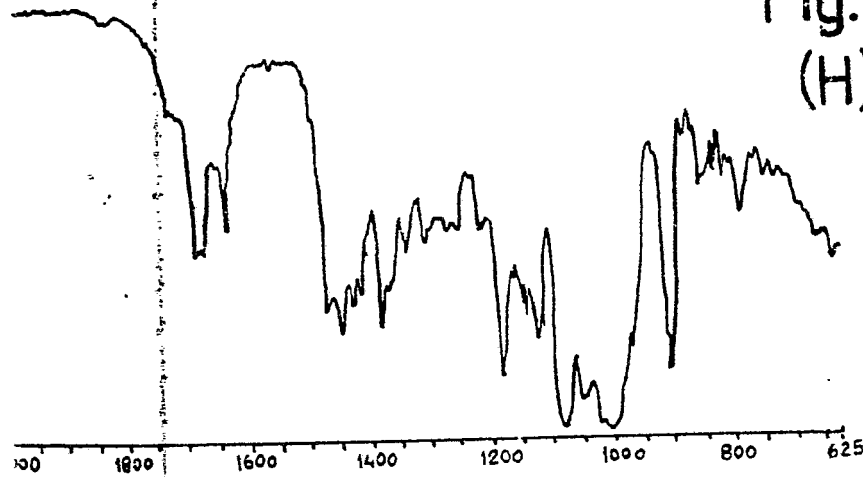
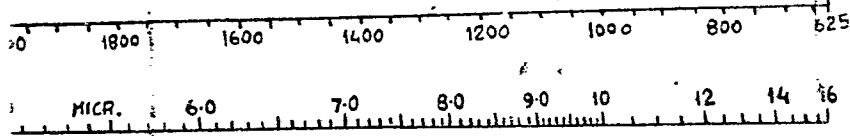


Fig. 8
(H)

BARCELONA, - 8 ENE. 1971

P. A. M. CURELL SUÑOL

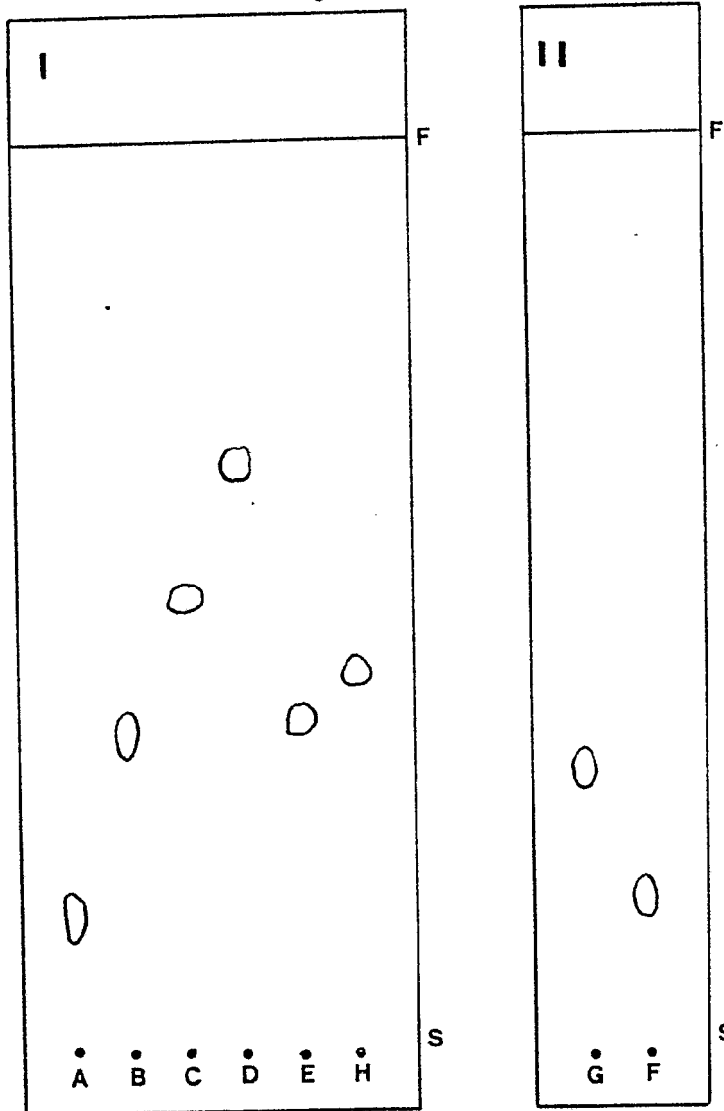
POOR
QUALITY

387672



- 8 ENE 1971

Fig. 9



BARCELONA, - 8 ENE. 1971

P. A. M. CURELL SUÑOL

Maria Lina