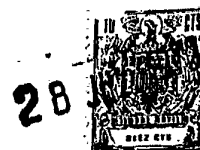


Y/Ref: 64533

O/Ref: OG. 23.358.-MI



PATENTE DE INVENCION

405289

405289

Int. Cl.: C12K, A01N

MEMORIA DESCRIPTIVA

Sobre:

PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE UNA SUSTANCIA INHIBIDORA DEL
DESARROLLO DE HONGOS "

Solicitante: La Sociedad japonesa: MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.,
domiciliada en N° 8, 2-chome, Kyobashi, Chuo-ku,
TOKYO, Japon.

Inventores: Don Taro NIIDA; Don Shigeharu INOUE; Don Takashi
TSURUOKA; Don Takashi SHOMURA; Don Yasumitsu KONDO;
Don Yasuaki OGAWA; Don Hiroshi WATANABE; Don Yasu-
haru SEKIZAWA; Don Tetsuro WATANABE e Hiroshi IGA-
RASHI.



405 289

28

Esta invención se relaciona con un nuevo y útil procedimiento de producción de sustancia antibiótica designada sustancia SF-1293, y con la producción fermentativa de esta sustancia antibiótica SF-1293, así como con sus usos

5. como pesticida y fungicida.

La mayor parte de los pesticidas que se han utilizado en agricultura son compuestos sintéticos que han sido sintetizados por procedimientos químicos y se han aplicado grandes cantidades de compuestos que contienen cloro, compuestos sintéticos que contienen mercurio y compuestos sintéticos que contienen arsénico, etc., como pesticidas a varias plantas y terrenos. Sin embargo, por regla general, estos pesticidas sintéticos son enteramente y relativamente difíciles de degradar o descomponer después de su aplicación a las plantas o terreno y por consiguiente continúan existiendo en el cuerpo de las plantas y también en el terreno. La continuada existencia de estos pesticidas aplicados puede conducir al problema de la contaminación del ambiente natural y a su destrucción. En consecuencia en los años recientes existe una creciente demanda de explotación de pesticidas capaces de ser degradados y disipados pronto, una vez que han ejercido sus acciones pesticidas deseadas tras su aplicación. Como los pesticidas de tipo antibiótico son generalmente más degradables que los pesticidas sintéticos, es más razonable y deseable usar sustancias antibióticas como pesticida a fin de evitar el problema de la contaminación del ambiente natural.

10.

15.

20.

25.

Un objeto de la presente invención es la provisión de una nueva sustancia antibiótica que sea útil como pesticida para controlar varias clases de microorganismos fitopatóge-

30.

405 289

2a



nos y particularmente hongos fitopatógenos.

Otro objeto de la invención es la provisión de un procedimiento para la producción de tal nueva sustancia antibiótica.

5. Otros objetos de la presente invención se verán claramente en la siguiente descripción:

Hemos realizado muestras extensas investigaciones para examinar productos metabólicos de muchas razas del género *Streptomyces*, al objeto de buscar una nueva sustancia antibiótica que sea activa como inhibidora del desarrollo de microorganismos patógenos en varias enfermedades de plantas. Hemos descubierto que una sustancia antibiótica que es desconocida, pero que muestra una elevada actividad inhibidora del desarrollo de varios hongos patógenos, incluyendo los hongos patógenos del tizon de la vaina del arroz y del añublo de éste último, es producida y acumulada en el cultivo de una raza del género *Streptomyces*, y que esta sustancia activa puede aislarse del cultivo. Hemos conseguido aislar esta sustancia activa en forma pura y la hemos designado sustancia SF-1293.

20. De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, por consiguiente, se proporciona una nueva sustancia antibiótica SF-1293 eficaz en la inhibición del desarrollo de hongos, que forma un polvo amorfo y blanco que funde a 159-161°C, es soluble en agua y metanol pero escasamente soluble en etanol, butanol, acetona, acetato etílico, cloroforma, benceno, hexano y éter etílico, que es anfotérico y positivo en las reacciones con reactivo ninhidrico, reactivo de biuret y reactivo de Lemieux, pero es negativo en las reacciones con cloruro férrico, reactivo de Fehling, reactivo de Molisch y reactivo de Folin, que muestra una rotación óptica de $(\alpha)_D^{25} = \text{menos } 34^\circ$ en su solu-

405289 28 JUN

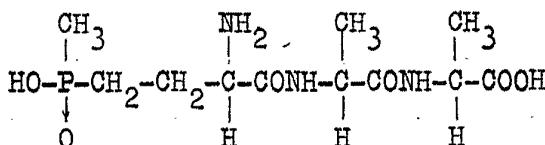


ción acuosa al 1%, que da un análisis elemental de C = 40,28%, H = 6,82%, N = 11,89%; P = 8,90% y O = 32,11% (el resto), que muestra un peso molecular de 355, determinado a partir de la curva de titulación, y por consiguiente tiene una fórmula

- 5. empírica $C_{11}H_{22}O_6N_3P$, y que exhibe bandas de absorción características en la zona infrarroja del espectro cuando se peletiza o granula en bromuro potásico a los siguientes números de onda en cm^{-1} ; 1650 y 1540, atribuible a los enlaces amidos.

Esta sustancia SF-1293 se identifica ahora como un

- 10. compuesto representado por la siguiente fórmula:



Seguidamente se describen otras propiedades de la

- 15. sustancia SF-1293.

En electroforesis con papel filtrante, la sustancia SF-1293 migra en una distancia de 4 cm hacia el cátodo en 20 minutos a un pH de 1,9 y a un voltaje de 3.500 voltios, mientras que migra en una distancia de 5,5 cm. hacia el ánodo en 2 horas a un pH de 9,5 y a un voltaje de 250 voltios. Este hecho indica que la sustancia SF-1293 es anfotérica.

- 20.

En cromatografía en papel, la sustancia SF-1293 muestra los siguientes valores Rf para distintos sistemas disolventes: 0,02 para n-butanol saturado de agua; 0,98 para cloruro amónico acuoso al 3% ; 0,50 para fenol acuoso al 75% 0,92 para acetona acuosa al 50%; 0,11 para n-butanol-metanol-agua (4:1:2); 0,01 para benceno-metanol (3:1) y 0,93 para agua destilada.

- 25.

En cromatografía en capa delgada de celulosa y gel

- 30. de sílice, la sustancia SF-1293 muestra diferentes valores Rf

405289

20 JUN 1972



para diferentes sistemas disolventes, como se muestra en la siguiente tabla. Con distintos sistemas disolventes, la sustancia SF-1293 da una sola mancha que tiene diferentes valores Rf y por consiguiente se confirma que dicha sustancia es pura y homogénea.

TABLA 1

<u>Sistemas disolventes revelados</u>	<u>Valores Rf</u>	
	<u>Cromatografía en capa delgada de gel de sílice</u>	<u>Cromatografía en capa delgada de celulosa</u>
n-Butanol-ácido acético-agua (2:1:1)	0,42	0,65
10. n-Butanol-metanol-agua (4+1:2)	0,21	0,41
Etanol-amoniaco-agua (8:1:1)	0,65	0,43
Etanol-agua (4:1)	0,25	0,66
n-Propanol-piridina-ácido acético-agua (15:10:3:10)	0,45	0,40

15. La sustancia SF-1293 fue hidrolizada mediante tratamiento con ácido clorhídrico 6N a 110°C durante 20 horas. Al examinarse mediante cromatografía en papel la mezcla de reacción de esta reacción de hidrolisis, se observó que se habían producido dos manchas que eran positivas en la reacción con reactivo ninhidrico y que una de estas dos manchas mostraba un valor Rf correspondiente al de la alanina.

20. La sustancia SF-1293 muestra sólo la absorción terminal en la zona ultravioleta del espectro.

Con referencia a los adjuntos dibujos:

25. La figura 1 muestra una curva del espectro de absorción infrarrojo de la sustancia SF-1293 granulada en bromuro

405289

28



potásico.

La figura 2 muestra una curva del espectro de resonancia magnética nuclear de la sustancia SF-1293 disuelta en deuterio-agua.

5. Con referencia a la curva del espectro de absorción infrarrojo de la sustancia SF-1293, se ve que la banda de absorción de la amida I existe a 1650 cm^{-1} y que la banda de absorción de la amida II existe a 1540 cm^{-1} . Por esto es evidente que la sustancia SF-1293 es uno de los antibióticos de tipo péptido.

10. La sustancia SF-1293 exhibe principalmente una actividad inhibidora del desarrollo de microorganismos fúngidos. Las concentraciones inhibidoras mínimas de la sustancia SF-1293 contra varios hongos fueron determinadas usando el conocido método de dilución de caldos y se muestran en la siguiente Ta-
15. bla 2.

TABLA 2

<u>Microorganismos de ensayo</u>	<u>Concentraciones inhibidoras mínimas (mcg/ml)</u>
Alternaria kikuchiana	3,1
20. Alternaria mali	3,1
Botrytis cinerae	3,1
Glomerella cingulata	6,2
Pellicularia sasakii	0,09
Muccor angulisporus	100
25. Leptosphaeria salvinii	0,75
Sclerotinia scrolotiorum	0,37
Trichophyton asteroides	0,18
Piricularia oryzae	25

405289

28



El medio de cultivo usado para la determinación de las concentraciones inhibitoras mínimas fue el agar de Czapek.

Como se verá por los resultados de la Tabla 2, la sustancia SF-1293 exhibe una elevada actividad antimicrobiana de inhibición del desarrollo de una amplia gama de microorganismos patógenos. Además, dicha sustancia fue confirmada como altamente efectiva en el control del tizón de la vaina de arroz (pellicularia sasakii), al efectuarse una serie de ensayos en un invernadero y en un arrozal.

5. Las polioxinas (véase "Agricultural Biological Chemistry". Vol. 29, páginas 848-854 (1965), y Vol. 31, páginas 190-199 (1967)) y las validamicinas A y B (véase "Journal of Antibiotics", vol. 24, páginas 119-123 (1971)) son conocidas como antibióticos eficaces en la inhibición del desarrollo de
10. varios microorganismos fitopatógenos y particularmente de la *Pellicularia sasakii*. La sustancia SF-1293 puede ser diferenciada de las polioxinas que muestran una clara banda de absorción en la zona ultravioleta del espectro, y también de las validamicinas, que son antibióticos de tipo glicósido.
15. Como se indica anteriormente, la sustancia SF-1293 de la presente invención posee actividad antimicrobiana y particularmente fungicida contra los hongos fitopatógenos. La sustancia SF-1293 es útil para la protección de plantas contra el ataque de hongos fitopatógenos, así como para el tratamiento terapéutico de infecciones de plantas, que han sido
20. causadas por hongos fitopatógenos.
- 25.

- De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, por consiguiente, se proporciona un método de control de infecciones de plantas por hongos, que comprende la
30. aplicación de una cantidad efectiva de la sustancia SF-1293



405289

28

a las plantas. En particular, de acuerdo con una versión del segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método de control de las enfermedades producidas por el tizón y añublo en las plantas de arroz, que comprende la aplicación

5. de una cantidad efectiva de la sustancia SF-1293 a dichas plantas.

Para su empleo en el control de infecciones de plantas producidas por hongos, la sustancia SF-1293 de la presente invención puede aplicarse a plantas, directamente o en mezcla con un vehículo o diluyente inertes, que pueden ser sólidos o líquidos. La sustancia SF-1293 de la presente invención puede formularse en forma de polvo fino, polvo basto humectable, gránulos, solución, suspensión o emulsión, según se desee.

10. Para la preparación del polvo fino, polvo basto humectable y

15. gránulos, puede emplearse un vehículo sólido tal como tierra de diatomeas, talco, caolín, arcilla, sílice, carbonato cálcico y similares. Para la preparación de una solución, suspensión o emulsión, puede emplearse un vehículo líquido tal como agua y disolventes orgánicos, por ejemplo xileno, tolueno,

20. benceno, metanol, etanol, acetona, ciclohexanona, dimetilformamida y similares. En estas formulaciones preparadas, puede incorporarse una variedad de agentes de acción superficial, como agente esparcidor, agente dispersante, agente humectante y/o agente emulsionador.

25. La sustancia SF-1293 de la presente invención muestra también una elevada actividad inhibidora contra el Trichophyton asteroides, que causa la tricofitosis. Por consiguiente, la sustancia SF-1293 de la presente invención es útil para el tratamiento terapéutico de la tricofitosis. Para su empleo en

30. el tratamiento terapéutico de la tricofitosis, la sustancia

405289 28



SF-1293 puede formularse en solución en un adecuado disolvente orgánico, tal como cetanol, o en un unguento, cuyas formulaciones pueden aplicarse exteriormente en el lugar del tegumento donde se ha presentado la tricofitosis. La sustancia

5. SF-1293 es de baja toxicidad. Se ensayó la toxicidad aguda de esta sustancia mediante inyección intravenosa de una solución acuosa de la misma en grupos de ratones, cada uno de cuyos grupos constaba de 5 animales. No murió ninguno de ellos en cada grupo tratado con dosis de 25 mg/kg y 50 mg/kg de la sustancia SF-1293, pero murieron todos los ratones de un grupo tratado con una dosis de 100 mg/kg de dicha sustancia.

- La sustancia SF-1293 de la presente invención puede producirse mediante cultivo de una raza de Streptomyces hygroscopicus bajo condiciones aeróbicas. Por consiguiente, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de producción de la sustancia SF-1293, que comprende el cultivo de una raza de Streptomyces hygroscopicus productora de dicha sustancia bajo condiciones aeróbicas en un medio de cultivo que contenga fuentes asimilables de nitrógeno y carbono, para producir y acumular la referida sustancia en el cultivo, y la ulterior recuperación de esta sustancia antibiótica del cultivo.
- 15.
 - 20.

- Como ejemplo de la raza de Streptomyces hygroscopicus productora de la sustancia SF-1293, figura una que aislamos primeramente de una muestra de tierra y que hemos designado Streptomyces hygroscopicus SF-1293. Esta raza de SF-1293 ha sido depositada en la American Type Culture Collection, Washington D. C., con el núm. ATCC 21705 (el 16 de Julio de 1971 se recibió de la ATCC un cultivo de esta raza), así como en una depositaria pública japonesa, el "Fermentation Research
- 25.
 - 30.

405289

28 JUN



Institute", de Chiba (Japón), bajo el número de depósito FERM-P nº 996.

El Streptomyces hygrosopicus SF-1293 presenta las siguientes características microbiológicas:

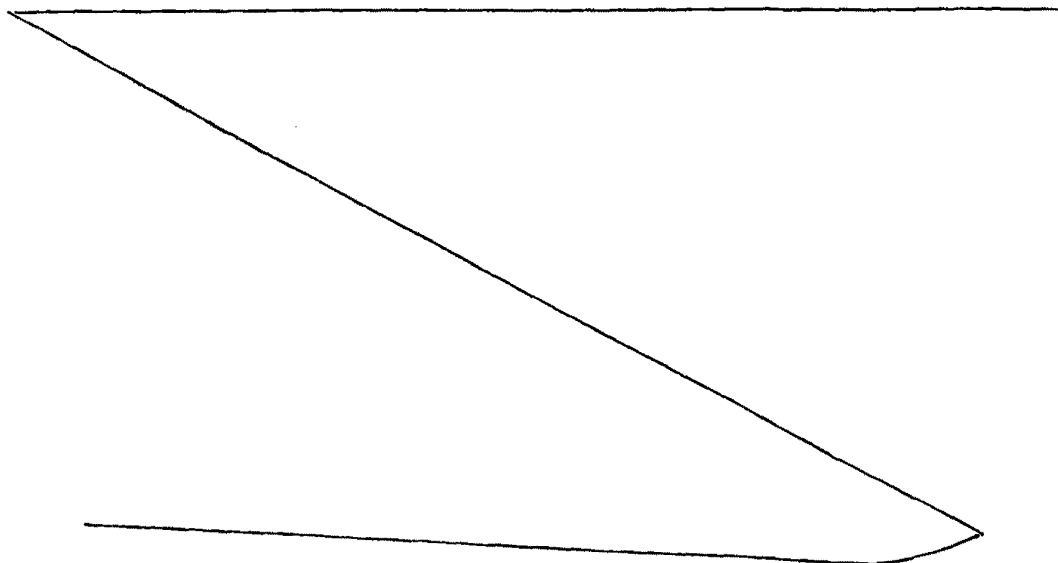
5. (I) Observación morfológica.

Se producen bien los micelios aéreos y se forman abundantemente esporas en medios de almidón-agar, harina de avena-agar, levadura-malta-agar y tirosina-agar. El micelio aéreo se ramifica simplemente, pero no en forma de verticilo.

10. En la punta del micelio aéreo se forman espirales cerradas y compactas o espirales abiertas y cortas. No se observa ninguna formación de esclerocio. La observación por microscopia electrónico muestra que la estructura superficial de la espora es lisa. Las esporas son de forma elíptica a ovalada y se encadenan normalmente entre sí diez o más. El tamaño de la espora es de 0,6 a 0,8 por 0,8 a 1,1 micras.
- 15.

(II) Las características de diferentes medios de cultivo se indican en la siguiente Tabla 3.

Sigue Tabla 3 en página 11.....



40528928 JU



TABLA 3

<u>Medio de cultivo</u>	<u>Desarrollo</u>	<u>Micelio aéreo</u>	<u>Pigmento soluble</u>
Agar de nitrato de sacarosa	Incoloro a pardo claro, con ligero tinte verdoso	Escaso, de color blanco a gris blanquecino	Ninguno
Agar de asparraguina de glucosa	Crema a verde tenue	Blanco cambiando luego a pardo verdoso claro	Ninguno
Agar de asparraguina de glicerina	Crema a amarillo claro	Escaso, de color blanco	Ninguno
Agar de almidón	Buen desarrollo, crema con ligero tinte verdoso, cambiando gradualmente a pardo claro	Abundante, pardo grisáceo, tornándose gradualmente higroscópico	Ninguno
Agar de tirosina	Buen desarrollo, crema amarillento a pardo amarillento claro	Abundante, pardo grisáceo, tornándose gradualmente higroscópico	Ninguno
Agar nutriente	Desarrollo delgado, amarillo claro	Escaso, color blanco	Ninguno
Agar de levadura y malta	Buen desarrollo pardo amarillento	Abundante, gris pardusco, tornándose gradualmente higroscópico	Ninguno
Agar de harina de avena	Buen desarrollo, verde grisáceo, claro	Abundante, pardo grisáceo, tornándose gradualmente higroscópico	Ninguno
Agar de levadura y almidón	Buen desarrollo, pardo amarillento	Abundante, gris pardusco, tornándose gradualmente higroscópico	Ninguno
Trozo de patata	Desarrollo elevado, muy rugoso, pardo claro	No observado	Ninguno



NOTA: La temperatura de incubación fue de 28°C en todos los medios de cultivo.

(III) Propiedades fisiológicas:

- (1) Nivel de temperatura de desarrollo: Se obtiene un buen desarrollo a una temperatura del orden de 20 a 40°C en un medio inclinado de levadura-malta-agar.
5. (2) Licuación de gelatina: No se observa ninguna licuación durante la incubación a 20°C por espacio de 30 días.
- (3) Hidrólisis del almidón Positiva (fuerte)
- (4) Coagulación de leche desnatada: Negativa (a 28 y a 37°C)
- (5) Peptonización de leche desnatada: Positiva (a 28 y a 37°C)
10. (6) Formación de pigmento de tipo melanina: Negativa

(IV) Utilización de fuentes de carbono (calculado en medio de agar de Pridham-Gottlieb).

- (1) Utilizan: D-glucosa, D-fructosa, D-mannitol, sacarosa y rafinosa.
- (2) Dudoso: D-xilosa y L-arabinosa
15. (3) No utilizan: I-inositol y ramosa.

Las características microbiológicas antes mencionadas del Streptomyces hygroscopicus SF-1293 (en adelante denominado simplemente raza SF-1293) pueden resumirse como sigue:

20. el micelio aéreo produce espirales y la estructura superficial de la espora es lisa. El calor del desarrollo es crema a verde claro a pardo amarillento. El micelio aéreo es de color pardo grisáceo y se torna gradualmente higroscópico. La formación de pigmento soluble no se observa en medios de cultivo sintéticos ni en medios de cultivo orgánicos y por lo

25. tanto la raza SF-1293 es no cromógena.

405289

28 JUN



Las propiedades anteriormente mencionadas de la raza SF-1293 coinciden bien con las de la conocida especie Streptomyces hygroscopicus. Así, la raza SF-1293 exhibe las tres propiedades siguientes:

5. (a) El micelio aéreo produce espirales.
- (b) El micelio aéreo producido es de color pardo grisáceo, y
- (c) El micelio aéreo se torna higroscópico.

Estas propiedades son características de la conocida especie Streptomyces hygroscopicus.

10. Se efectúa una comparación de la raza SF-1293 con la conocida raza Streptomyces hygroscopicus de acuerdo con la descripción de Waksman ("The Actinomycetes" de Waksman, Vol. 2, páginas 230-231 (1961)). Se reconoce que la raza SF-15. 1293 se diferencia de la conocida especie Streptomyces hygroscopicus respecto a los colores del desarrollo sobre los medios de sacarosa-agar de nitrato y glucosa-agar de asparraguina, así como respecto a la formación de pigmento soluble, pero que la raza SF-1293 coincide bien con la conocida especie 20. Streptomyces hygroscopicus respecto a sus otras condiciones de desarrollo y propiedades fisiológicas.

25. En consecuencia, la raza SF-1293 coincide bien con la conocida raza de Streptomyces hygroscopicus mencionada en la descripción de Waksman, respecto a las tres características básicas antes mencionadas, aunque pueden diferenciarse entre sí respecto a ciertas propiedades menores de las mismas. Por consiguiente, es razonable considerar que la raza SF-1293 pertenece a la especie Streptomyces hygroscopicus. En consecuencia, hemos designado la raza SF-1293 como 30. Streptomyces hygroscopicus SF-1293 a fin de distinguir dicha raza

405289

28



SF-1293 de la conocida Streptomyces hygroscopicus.

La raza SF-1293 posee propiedades que son susceptibles de variar, como puede observarse ordinariamente con los otros Streptomyces. Así, por ejemplo, la raza SF-1293 puede

5. producir una variante o mutante cuando se trata con varios mutágenos tales como radiaciones ultravioletas, rayos X, rayos radioactivos, ondas electromagnéticas de alta frecuencia y sustancias químicas. Puede emplearse cualquier variante o mutante natural o artificial de la raza SF-1293 para la pro-

10. ducción de la sustancia SF-1293 de acuerdo con la presente invención, siempre que la variante o mutante tenga capacidad de producción de la citada sustancia SF-1293.

De acuerdo con una versión de la presente invención, por consiguiente, se proporciona un procedimiento de produc-

15. ción de la sustancia SF-1293, que comprende el cultivo de una raza de Streptomyces hygroscopicus identificada como ATCC 21705, bajo condiciones aeróbicas, en un medio de cultivo que contenga fuentes de nitrógeno y carbono asimilables, para producir y acumular la sustancia SF-1293 en el cultivo, y la ulterior

20. recuperación de esta sustancia antibiótica del cultivo.

En el procedimiento de acuerdo con la presente invención, puede cultivarse una raza de Streptomyces hygroscopicus productora de la sustancia SF-1293, y particularmente la

25. raza SF-1293 (ATCC 21705), de manera conocida, bajo condiciones aeróbicas, en un medio de cultivo que contenga unos nutrientes tales que puedan ser utilizados por microorganismos ordinarios. Como fuentes nutrientes pueden emplearse cualesquiera de las conocidas sustancias nutrientes que se han usado comunmente en el cultivo de las conocidas razas de Streptomyces. Por ejemplo, glucosa, almidón, glicerina, sacarosa,

30.



405289

28 JUL

- jarabe de almidón, melazas y similares, todos ellos útiles como fuente de carbono. Además, pueden emplearse como fuentes de nitrógeno la harina de haba de soja, embriones de trigo, extracto de carne, peptona, levadura seca, licor de maceración de maíz, proteína vegetal soluble, sulfato amónico, nitrato sódico y similares. Si se precisa, pueden añadirse al medio de cultivo materiales orgánicos e inorgánicos que ayuden al desarrollo de la raza SF-1293 y favorezcan la producción de la sustancia SF-1293.
- 5.
10. Como método de cultivo de la raza SF-1293, son más preferibles los métodos de cultivo en líquidos y particularmente bajo condiciones aeróbicas sumergidas, similares a los procedimientos generales de producción de los antibióticos conocidos. El cultivo puede efectuarse adecuadamente bajo condiciones aeróbicas y la adecuada temperatura de incubación es del orden de 25 a 35°C. Para la producción comercial o en laboratorio de la sustancia SF-1293, es preferible sin embargo con frecuencia efectuar el cultivo a una temperatura próxima a 28°C. En estas circunstancias, la concentración de la sustancia SF-1293 en el caldo de cultivo alcanza un máximo al cabo de 3 a 5 días de fermentación, tanto en un método de cultivo con agitación como en un método de cultivo en tanque.
- 15.
- 20.
25. Para el ensayo de la sustancia SF-1293, puede emplearse el siguiente método: puede usarse un medio de cultivo de ensayo que comprende un 2,5% de glucosa, un 0,2% de nitrato sódico, un 0,1% de fosfato monopotásico, un 0,05% de sulfato magnésico, un 0,05% de cloruro potásico, un 0,01% de sulfato ferroso, un 1,5% de agar y un pH de 6,0. Como microorganismo de ensayo puede emplearse la Pellicularia sasa-
- 30.

405 289 2



972

- kii. En este método de ensayo, a una concentración de 1 mcg/ml a 32 mcg/ml de la sustancia SF-1293, la relación entre el logaritmo de la concentración y el diámetro de la zona de inhibición puede trazarse linealmente, dando a la zona de inhibición un diámetro de 24 a 50 mm (determinado por el método de plaza y copa).
- 5.

- Para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos, puede aplicarse directamente a las plantas el caldo de cultivo que contiene la sustancia SF-1293, que se ha obtenido del cultivo de la raza SF-1293, sin aislamiento de dicha sustancia SF-1293. Sin embargo, esta sustancia puede recuperarse del cultivo mediante aislamiento y purificarse ulteriormente usando cualquiera de los métodos conocidos que se han utilizado comúnmente para la recuperación y purificación de antibióticos conocidos.
- 10.
- 15.

- La sustancia SF-1293 producida mediante el cultivo de la raza SF-1293 se halla presente principalmente disuelta en la fase líquida del caldo de cultivo. Como la citada sustancia es soluble en agua y anfotérica, según se indicó anteriormente, puede recuperarse del cultivo mediante absorción sobre una resina de cambio catiónico, tal como resina de poliestireno sulfonada (por ejemplo, un producto comercialmente obtenible con el nombre comercial "Amberlite IR 120") y copolímero sulfonado de estireno y divinilbenceno (por ejemplo, un producto comercialmente obtenible con el nombre comercial "Dowex 50W"), o sobre una resina de cambio aniónico, tal como hidróxido amónico cuaternario derivado de poliestireno que contiene grupos $-N-(CH_3)_3OH$ como grupo funcional (por ejemplo, un producto comercialmente obtenible con el nombre comercial "Amberlite IRA-400"), poliestireno poliaminado (por ejemplo, un producto comercialmente obtenible con el nombre
- 20.
- 25.
- 30.

405289⁸ JUL



- comercial "Amberlite IR-45") y copolímero de formaldehído-fenol poliaminado (por ejemplo, el producto comercialmente obtenible con el nombre comercial "Amberlite IR-4b"), y ulterior elución de la resina con una solución acuosa de un ácido, álcali o sal adecuados.
- 5.

- Para la recuperación de la sustancia SF-1293 del caldo de cultivo de la raza SF-1293, es eficaz filtrar el caldo de cultivo, separar la pasta del filtro (es decir, la fase sólida del caldo que contiene pasta de micelio) del filtrado (es decir, la fase líquida del caldo de cultivo), pasar el filtrado a través de una columna de una resina de cambio catiónico fuertemente ácida, tal como un copolímero sulfonado de estireno y divinilbenceno (por ejemplo, un producto comercialmente obtenible con el nombre "Dowex 50W" de ciclo H) y pasar luego una corriente de amoníaco acuoso a través de la columna de resina para su elución. El material eluido puede evaporarse en vacío para dar un polvo crudo de la sustancia SF-1293.
- 10.
- 15.

- Para la purificación del polvo crudo de la citada sustancia así obtenida, aquél puede cromatografiarse sobre celulosa, gel de sílice, alúmina o gel de dextran que ha sido enlazado en cruz con epíclorihidrina. De esta manera, puede obtenerse la sustancia SF-1293 en forma de polvo amorfo blanco y puro, de un punto de fusión de 159 a 161°C.
- 20.

- La presente invención se ilustra seguidamente mediante los siguientes Ejemplos, pero sin ningún carácter limitativo.
- 25.

Ejemplo 1

- Se inculó un cultivo en existencia de Streptomyces
30. hygroscopicus SF-1293 (identificado como ATCC nº 21705) en

405289

28 JUL



15 litros de un medio de cultivo líquido que comprendía un 2,0% de almidón, un 1,0% de peptona, un 0,3% de extracto de carne, un 0,05% de fosfato dipotásico y un pH de 7,0 y luego se cultivó con agitación a 28°C durante 24 horas bajo la aireación para preparar un cultivo de semilla.

Este cultivo de semilla se inoculó en 200 litros de un medio de cultivo líquido que comprendía un 3,0% de glucosa, un 1,0% de jarabe de almidón, un 2,5% de embrión de trigo, un 0,5% de proteína vegetal, un 0,1% de aceite de haba de soja, un 0,1% de extracto de levadura, un 0,001% de sulfato ferroso, un 0,0001% de cloruro de níquel, un 0,0001% de cloruro de cobalto y un pH de 7,0 y luego se cultivó con agitación a 28°C durante 96 horas bajo aireación. El resultante caldo de cultivo se ajustó a un pH de 3 mediante adición de ácido clorhídrico 6N y luego se filtró para dar 150 litros del filtrado del caldo (potencia, 110 mcg/ml).

El filtrado del caldo se pasó a través de una columna de carbono activo (de un volumen de 7,5 litros) y seguidamente se pasaron 30 litros de agua a través de dicha columna a efectos de lavado. La solución que pasó al exterior de la columna y las aguas de lavado se combinaron conjuntamente (a un volumen total de 180 litros) y la solución combinada se pasó a través de una columna de 9 litros de una resina de cambio catiónico que comprendía un copolímero polisulfonado de estireno-divinilbenceno del ciclo H (comercialmente obtenible con el nombre de "Dowex 50W-X2") en forma de perlas de 50 a 100 mallas, a fin de formar una sustancia activa absorbida por la resina de cambio catiónico. Se lavó la columna de resina con agua y luego se sometió a elución usando amoníaco acuoso 0,05N. Se combinaron conjuntamente las

405 289 28



fracciones activas del material eluido (a un volumen total de 45 litros) y se concentró la solución mediante evaporación bajo presión reducida, para dar 50 g de un polvo crudo de color pardo amarillento claro (potencia, 200 mcg/mg).

5. Se disolvieron 20 g del polvo crudo así obtenido en 2 litros de agua destilada y la resultante solución se pasó a través de una columna de 1,7 litros de resina de cambio catiónico que comprendía un copolímero sulfonado de estireno-divinilbenceno del ciclo H (comercialmente obtenible con el nombre de "Dowex 50W-X2") en forma de perlas de 200 a 400 mallas, de manera que la sustancia activa fuer a absorbida por la resina de cambio catiónico. Se lavó la columna de resina con agua y luego se eluyó con amoníaco acuoso 0,01N, mientras el material eluido se recogía en fracciones de 2,5 litros cada una. Las fracciones núms. 37 a 42, que mostraron actividad fungicida, se combinaron conjuntamente y luego se concentraron mediante evaporación bajo presión reducida para dar 3,1 g de un polvo blanco que contenía la sustancia SF-1293 (potencia, 680 mcg/mg). Se disolvieron 500 mg de este polvo en 4 ml de agua destilada y la resultante solución se pasó a través de una columna de 800 ml de un gel de dextrano enlazado en cruz con epiclorohidrina (producto comercialmente obtenible con el nombre de "Sephadex G-10") a efectos cromatográficos. La sustancia activa absorbida fue cromatográficamente revelada mediante paso de agua destilada a través de la columna del gel de dextrano y el material eluido se recogió en fracciones de 6 ml de volumen cada una. Las fracciones Núms. 55 a 58, que mostraron una sola mancha de la sustancia SF-1293 en cromatografía en capa delgada de celulosa (usando una mezcla disolvente de n-butanol-ácido acé-

405289

28 JUL



tico-agua (2:1:1) como disolvente revelador), se combinaron conjuntamente y luego se concentraron mediante evaporación bajo presión reducida, para dar 210 mg de un polvo blanco y puro de la sustancia SF-1293 (potencia, 1000 mcg/mg).

5.

Ejemplo 2

Se disolvieron 5 g del polvo crudo de color pardo amarillento claro obtenido en el Ejemplo 1, en 1 litro de agua destilada, y la resultante solución se pasó a través de una columna de 300 ml de una resina de cambio aniónico que comprendía un derivado hidróxido amónico cuaternario de poliestireno que contenía los grupos funcionales $-N-(CH_3)_3OH$ (comercialmente obtenible con el nombre de "Amberlite IRA-400"), de manera que la sustancia activa fue adsorbida por la resina de cambio aniónico. Se lavó la columna de resina con agua y luego se eluyó con ácido sulfúrico 0,2N. Se combinaron conjuntamente fracciones activas del material eluido (a un volumen total de 800 ml) y a la solución eluida se añadió una cantidad de carbonato bórico. El sulfato bórico que se formó fue filtrado y el filtrado que se separó fue inmediatamente sometido a evaporación hasta su secamiento bajo presión reducida, para dar 2,1 g de un polvo de color amarillo claro.

15.

20.

25.

30.

Este polvo se disolvió en 300 ml de agua destilada y se pasó la solución a través de una columna de 100 ml de un gel de dextrano de cambio aniónico que contenía diétilaminoetilo como grupo funcional (comercialmente obtenible con el nombre de "DEAR-Sephadex A-25") en forma de cloruro. Se lavó la columna con agua y se reveló cromatográficamente usando una solución acuosa 0,02 M de cloruro sódico. Se combinaron fracciones activas del material eluido en un volumen total de 450 ml y luego se concentraron hasta su secamien-

405289



5. to. El residuo fue extractado con metanol y la solución metanólica se separó mediante filtración del cloruro sódico que permaneció sin disolver. El extracto metanólico fue evaporado bajo presión reducida para dar 520 mg de un polvo blanco (potencia, 650 mcg/mg).

10. Este polvo fue disuelto en una pequeña cantidad de agua y la solución acuosa obtenida se mezcló con una pequeña cantidad de polvo de celulosa. Se secó la mezcla y se colocó encima de una columna de celulosa (400 g) y se reveló la columna usando una mezcla disolvente de n-butanol-ácido acético-agua (2:1:1). Se recogió el material eluído en fracciones de 15 ml de volumen cada una. Las fracciones activas núms. 71 a 80 fueron combinadas conjuntamente y evaporadas hasta su secamiento bajo presión reducida. El residuo
15. obtenido fue disuelto en 10 ml de agua destilada y la solución acuosa se secó por congelación para dar 240 mg de la sustancia SF-1293 en forma de polvo puro blanco (potencia, 1000 mcg/ml).

Ejemplo 3

20. Se inculó un cultivo en existencia de Streptomyces hygroscopicus SF-1293 (identificado como ATCC nº 21705) en 800 ml de un medio de cultivo líquido que comprendía un 2,0% de glucosa, un 2,0% de caldo secado y un pH de 7 y luego se cultivó con agitación a 28°C durante 30^h horas bajo aireación
25. para dar un cultivo de semilla.

30. Este cultivo de semilla fue inoculado en 35 litros de un medio de cultivo líquido que comprendía un 2,5% de melaza, un 1,0% de glucosa, un 2,5% de harina de semilla de algodón desengrasada, un 0,1% de extracto de levadura, un 0,5% de embrión de trigo y un pH de 7 y luego se incubó a 28°C

405289

28



durante 72 horas bajo aireación y agitación. El caldo de cultivo obtenido se ajustó a un pH de 3 mediante adición de ácido clorhídrico 6N y luego se filtró para dar 30 litros del filtrado del caldo (potencia, 180 mcg/ml).

5. Este filtrado de caldo se trató luego de igual manera que en el ejemplo 1 para la recuperación y purificación de la sustancia SF-1293. Se obtuvieron 820 mg de esta sustancia en forma de polvo puro blanco (potencia, 1000 mcg/ml).

Ejemplo 4

10. Este ejemplo demuestra que la sustancia SF-1293 es altamente eficaz para controlar el tizón de vaina de las plantas de arroz.

Se efectuó una inoculación del microorganismo causante del tizón de vaina (Pellicularia sasakii) mediante pulverización sobre plantas de arroz acuáticas en un arrozal.

15. En una fase inicial de infección, cuando todas las plantas de arroz aparecían uniformemente infectadas, se pulverizó sobre ellas una solución de ensayo que contenía una sustancia activa a una concentración como la indicada en la Tabla 4.
20. Cinco días después de esta primera aplicación de la solución de ensayo, se efectuó una segunda aplicación de la misma, si era necesario. El ensayo se llevó a cabo en dos repeticiones. La solución de ensayo se aplicó a razón de 150 litros por cada 10 acres. Catorce días después de la primera aplicación
25. de la solución de ensayo, se midió la longitud de la lesión que se desarrolló en la máxima medida entre muchas lesiones producidas en cada planta de arroz, en 40 de estas plantas por cada parcela, tratada o sin tratar. El nivel del efecto controlador se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

405289²⁸



$$\text{Nivel de efecto controlador (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Longitud media de la lesión más desarrollada en la parcela de plantas de arroz tratada}}{\text{Longitud media de la lesión más desarrollada en la parcela de plantas de arroz sin tratar}}\right) \times 100$$

Los resultados obtenidos del ensayo se muestran en la siguiente Tabla 4:

Tabla 4

5. Sustancia activa ensayada (concentración)	Veces de aplicación	Longitud media de la lesión más desarrollada	Nivel del efecto controlador
Sustancia SF-1293 (40 ppm)	1	12,1 mm	70,6%
Sustancia SF-1293 (20 ppm)	2	10,7 mm	74,0%
Polioxinas (40 ppm) (comparativo)	2	20,7 mm	49,4%
Sin tratar.	-	41,1 mm	0

10. Por los resultados de la Tabla anterior, es evidente que la sustancia SF-1293 exhibe un efecto notablemente superior en el control del tizón de vaina en las plantas de arroz de un arrozal respecto a las polioxinas conocidas y que se han utilizado como uno de los antibióticos efectivos contra el tizón de vaina.

15. En otros ensayos, se pulverizó una solución acuosa de 30 ppm de la sustancia SF-1293 sobre plantas de arroz que fueron plantadas en macetas. Después de secarse la solución pulverizada, se pulverizó un inculador de Pellicularia sasakii

20. sobre las plantas de arroz tratadas. Las plantas inoculadas se incubaron luego a 30°C durante 5 días en un invernadero bajo una humedad elevada. Seguidamente, las plantas de arroz incubadas fueron visualmente examinadas y se observó que se había evitado en ellas perfectamente la infección del tizón de vaina.

405289



Ejemplo 5

Se pulverizó uniformemente, por medio de una pistola pulverizadora, una solución de ensayo que contenía una sustancia activa a una concentración como la indicada en la

5. Tabla 5, sobre plantas de arroz acuáticas de una edad de 4 hojas verdaderas, que fueron plantadas en macetas de 9 cm. de diámetro. La solución de ensayo se pulverizó a razón de 35 ml por cada dos macetas. Después de secarse en aire la solución pulverizada, se colocaron las plantas de arroz tra-

10. tadas en un invernadero a 25°C bajo una elevada humedad. En este invernadero, se pulverizó una suspensión acuosa de esporas del microorganismo causante del añublo del arroz (Piricularia oryzae sobre las plantas de arroz tratadas para su inoculación. Cinco días después de la inoculación, se contó el número de lesiones por hoja de las plantas de arroz infectadas.

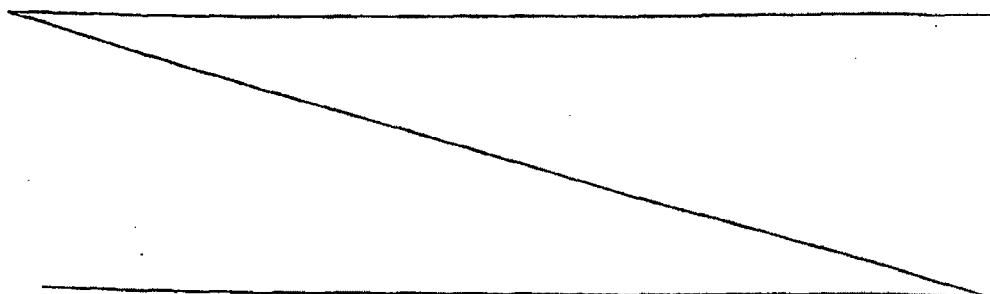
15. Se calculó el nivel de efecto controlador de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Nivel de efecto controlador (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Número medio de lesiones por hoja en la parcela de plantas de arroz tratadas}}{\text{Número medio de lesiones por hoja en la parcela de plantas de arroz sin tratar}}\right) \times 100$$

Los resultados obtenidos del ensayo se muestran en

20. la siguiente Tabla 5.

Sigue Tabla 5 en página 24.....



405289

28 JUN



Tabla 5

Sustancia activa ensayada	Concentración (ppm) de la sustancia activa en la solución de ensayo pulverizada	Número medio de lesiones por hoja	Nivel del efecto controlador
5. Sustancia SF-1293	25	0,5	96
" " "	50	0,1	99
" " "	100	0	100

Kasugamicina (comparativa)	25	1,9	84
"	50	1,1	91
"	100	0,5	96

Acetato fenilmercúrico (comparativo)	15 (como Hg)	1,1	91

10. Sin tratar	-	11,8	0

Por los resultados de la tabla anterior, se ve que la sustancia SF-1293 es mucho más efectiva para controlar el añublo del arroz que la kasugamicina y el acetato fenilmercúrico, que se han utilizado frecuentemente para tal fin.

15.

Ejemplo 6

Se formuló la sustancia SF-1293 en un ungüento hidrofílico que contenía un 3% de la sustancia SF-1293 bien mezclada con una mezcla de cetanol-glicol polietilénico (comercialmente obtenible con el nombre de "Emulgen 408") -vaselina blanca-agua (18:5:38:39) como base del ungüento.

20.

Como animales de ensayo se emplearon grupos de cobayas blancas machos (10 cobayas en cada grupo) de un peso



4052892^B

corporal medio de 240 g.

- Se separaron los pelos de cuatro secciones separadas, cada una de ellas de un tamaño de 4 x 4 cm aproximadamente, en la porción dorsal de la cobaya y se frotó ligeramente la piel
5. en estas secciones con piedra pómez. Luego se aplicó sobre la piel en dichas secciones una suspensión de Trichophyton asteroides, que es uno de los microorganismos causantes de la trichofitosis, para su inoculación. Dos días después de la inoculación, se aplicó el ungüento antes mencionado a la piel situada
 10. en dichas secciones, a razón de 0,2 g aproximadamente por sección. La aplicación del ungüento se realizó durante 10 días, una vez al día. Una de las cuatro secciones se empleó como control (sin tratar) y se dejó libre de aplicación del ungüento después de la inoculación. Doce días después de ésta, se sacrificaron las cobayas y se cortaron tres piezas de la piel (cada pieza era de un tamaño de 3 x 3 mm) en cada sección. Cada una de estas piezas de piel se incubó a 27°C durante 7 días en medio de agar de Sabourand para examinar la presencia del microorganismo inoculado. El nivel de inhibición a la infección del
 15. Trichophyton asteroides se expresó mediante la siguiente ecuación:
 - 20.

$$\text{Nivel de inhibición (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Número de piezas de piel incubadas que muestran presencia del hongo}}{\text{Número total de las piezas de piel incubadas}} \right) \times 100$$

- Se observó que el nivel de inhibición de las secciones tratadas con la sustancia SF-1293 fue del 73,3% y del 0%
25. para la sección de control (sin tratar). Esto indica que la sustancia SF-1293 es eficaz para el tratamiento terapéutico de la infección del Trichophyton asteroides.



405289

N O T A

La Patente de Invención, que se solicita por veinte años, para España, de acuerdo con la vigente Legislación, deberá recaer sobre: "PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE UNA SUSTANCIA INHIBIDORA DEL DESARROLLO DE HONGOS", con Prioridad de la solicitud de Patente en Japón nº 56032/71, de fecha 28 de Julio de 1971, según las características esenciales de las siguientes:

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

10. 1ª.- Procedimiento de producción de una sustancia inhibidora del desarrollo de hongos, que comprende el cultivo de una raza de Streptomyces higroscopicus productora de la citada sustancia bajo condiciones aeróbicas en un medio de cultivo que contiene fuentes asimilables de nitrógeno y carbono, para producir y acumular la sustancia en el cultivo, y la ulterior recuperación de esta sustancia antibiótica del cultivo.

20. 2ª.- Procedimiento de producción de una sustancia inhibidora del desarrollo de hongos, según la reivindicación 1ª, que comprende el cultivo de una raza de Streptomyces higroscópicas, identificada por ATCC núm. 21705, bajo condiciones aeróbicas, en un medio de cultivo que contiene fuentes asimilables de nitrógeno y carbono, para producir y acumular la sustancia en el cultivo, y la ulterior recuperación de esta sustancia antibiótica del cultivo.

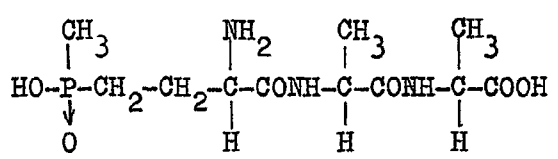
25. 3ª.- Procedimiento de producción de una sustancia inhibidora del desarrollo de hongos, según reivindicaciones anteriores, cuya sustancia es eficaz en la inhibición del desarrollo de hongos y forma un polvo amorfo y blanco con punto de fusión entre 159 y 161°C, es soluble en agua y metanol pe-

30

405289



- tanol pero escasamente soluble en etanol, butanol, acetona, acetato etílico, cloroformo, benceno, hexano y éter etílico; es anfotérica y positiva en las reacciones con reactivo de ninhidrina, reactivo de biuret y reactivo de Lemieux, pero negativa en las reacciones con cloruro férrico, reactivo de Fehling, reactivo de Molisch y reactivo de Folin; muestra una rotación óptica de $[\alpha]_D^{25} = \text{menos } 34^\circ$ en su solución acuosa al 1%, que da un análisis elemental de un 40,28% de C, 6,82% de H, 11,89% de N, 8,90% de P y 32,11% (resto) de O, muestra un peso molecular de 355, determinado por la curva de titulación, y por consiguiente tiene una fórmula emírica $C_{11}H_{22}O_6N_3P$, y exhibe características bandas de absorción en la zona infrarroja del espectro cuando se peletiza en bromuro potásico en los siguientes números de onda en cm^{-1} : 1650 y 1540, atribuible a los enlaces amidos, y se identifica como compuesto de fórmula:



20. 4ª.- PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE UNA SUSTANCIA INHIBIDORA DEL DESARROLLO DE HONGOS.
Según queda sustancialmente descrito en la
.../...

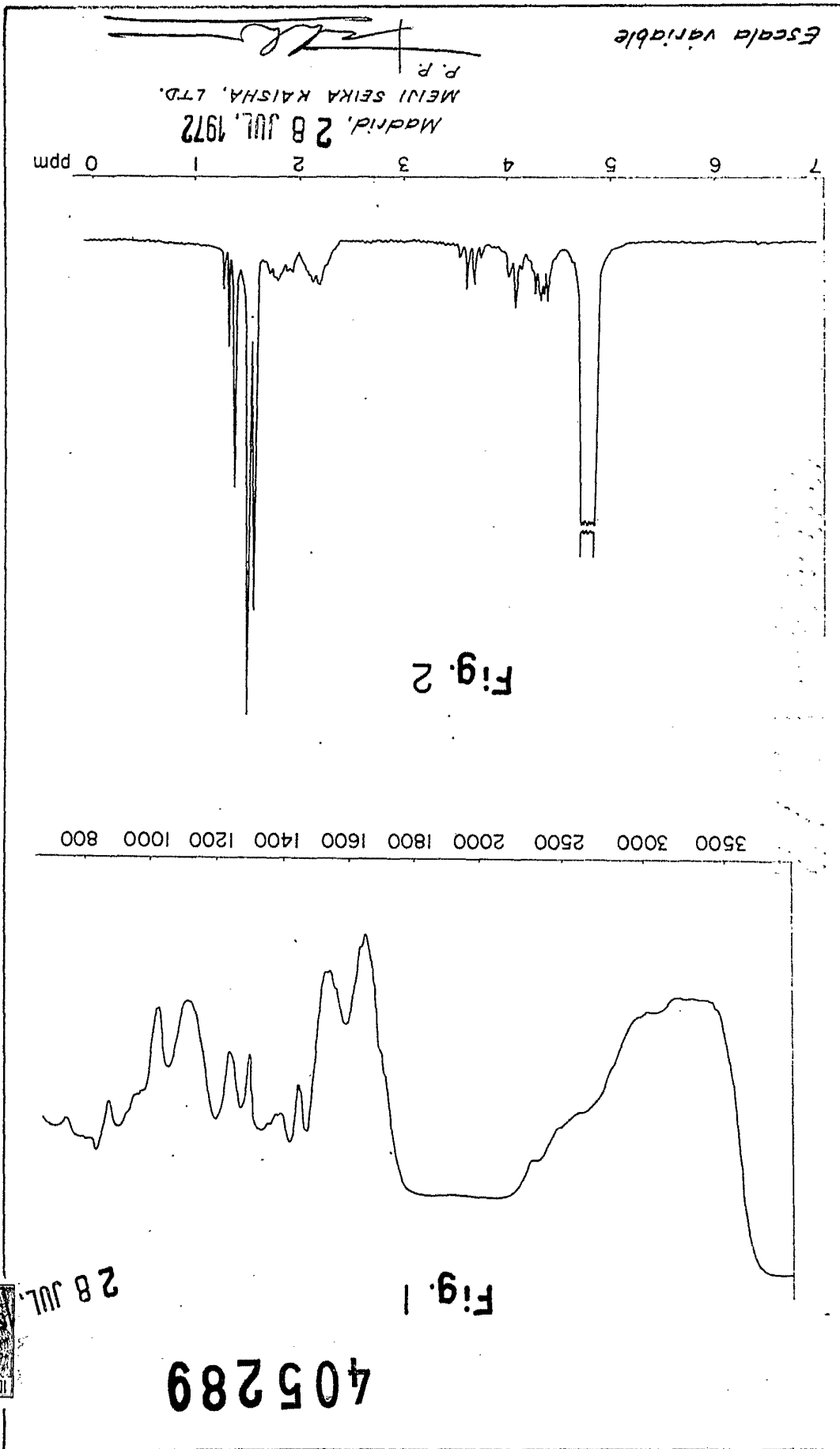
405289 28 JUL



presente memoria, que consta de veintinueve hojas, escritas a máquina por una sola cara. y dibujos.

Madrid, 28 de Julio de 1972

MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.
P. P.



MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.
 Madrid, 28 JUL. 1972
 P.F. *[Signature]*
 Escala variable

Fig. 2

Fig. 1

405289

28 JUL.

