

C 12 D // P 61 K



PATENTE DE INVENCION

Ref: ICI CASE PH. 2545-SPAIN.

418769

Memoria Descriptiva

sobre:

Procedimiento de fabricación de un complejo anti-
viral.

=====

Solicitante: IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED, entidad britá-
nica, residente en Imperial Chemical House, Millbank,
London, S.W.1., Inglaterra.

=====

El presente invento se refiere a un procedimien-
to para preparar un nuevo complejo antiviral.

Conforme al invento se proporciona un procedi-
miento para la producción de un complejo antiviral que
5. comprende el cultivo de una familia de Sirodesmium di-



- versum productora del complejo antiviral en un medio nutritivo acuoso que contiene una fuente de carbono asimilable y una fuente de nitrógeno asimilable, la extracción del filtrado del cultivo con un disolvente orgánico sustancialmente inmisible en agua, y la evaporación del extracto hasta sequedad.
5. Una familia apropiada del hongo es por ejemplo la Sirodesmium diversum (Cooke) Hughes originada en el Commonwealth Mycological Institute, ubicado en Ferry Lane, Kew, England y catalogado como C.M.I. 102.519.
10. El cultivo se desarrolla bien en un medio micrológico de agar convencional, y luego de cinco días las colonias muestran un área central de micelio con esporos rodeada por una zona de hifenas inmaduros que pueden ser tanto aéreos como sumergidos, o principalmente sumergidos. Esta zona no es coloreada. El área de los esporos es normalmente marrón oscuro, con células que llevan esporos surgiendo del agar y de un crecimiento aeróbico, que puede ser muy vigoroso -como por ejemplo en agar de malta, o que puede ser disperso como por ejemplo en agar Czapek-Dox.
15. Las esporas, que están producidas por ramas no especializadas de conidióforos, se muestran en cadenas largas, raramente ramificadas. Son amerosporas y didimosporas (fragnosporas son raras) que maduran de manera basipetal. Cuando se encuentran maduros, las esporas se encuentran toscamente recubiertas con una pared celular marrón/amarilla que generalmente es bastante gruesa, pero que ocasionalmente presenta zonas delgadas. Las amerosporas son globosas con un diámetro de 10(9-11) μm , en tanto que los didimosporas son subcilíndricas con una constricción en el septum de 18(15-22) x 10(9-15) μm (aparentan ser esencialmente como dos amerospo-
- 20.
- 25.
- 30.



ras que no se han separado.

5. Una fuente apropiada de carbono asimilable es, por ejemplo, un alcohol polihídrico, tal como sacarosa, glucosa, lactosa, glicerol o manitol; una fuente de carbohidrato polimerizado, por ejemplo almidón; un aceite o grasa natural o sintético; o mezclas de dos o más de las sustancias anteriormente mencionadas. La fuente de carbono se encuentra por lo general presente en el medio dentro de un orden del 0,1 al 30 % ponderal, y preferentemente dentro del orden del 2 % al 8 % ponderal.

10. Una fuente apropiada de nitrógeno asimilable está constituida por una fuente inorgánica así como una fuente orgánica. Puede hallarse convenientemente provista bajo la forma de, por ejemplo, un nitrato de un metal alcalino o de un metal alcalinotérreo, o una sal de amonio de un ácido inorgánico o de un ácido orgánico, por ejemplo nitrato de sodio, potasio, calcio o amonio así como tartrato de amonio, sulfato de amonio o fosfato de amonio. Puede también estar provista bajo la forma de un aminoácido, por ejemplo glicina, un alimento de semilla tal como el algodón, un licor de infusión de maíz, peptona, urea, un extracto de levadura o un extracto de carne. Las mezclas de dos o más de las sustancias anteriormente mencionadas pueden también ser utilizadas. La fuente de nitrógeno se encuentra por lo general presente en el medio en una cantidad tal que se halla comprendida entre 0,001 % y 1,0 %, y preferentemente entre 0,01 % y 0,5 % del nitrógeno elemental en el medio.

20. Por lo general el medio contiene pequeñas cantidades de elementos esenciales tales como el fósforo (por ejemplo bajo la forma de fosfato diácido de potasio o fosfato ácido diamó-

25.

30.



5. nico), magnesio (por ejemplo bajo la forma de sulfato de magnesio o carbonato de magnesio), azufre (por ejemplo bajo la forma de un sulfato) y potasio (por ejemplo bajo la forma de cloruro de potasio o carbonato de potasio) y muy pequeñas cantidades de los llamados elementos en trazas, tal como hierro, manganeso, zinc, molibdeno o cobre.

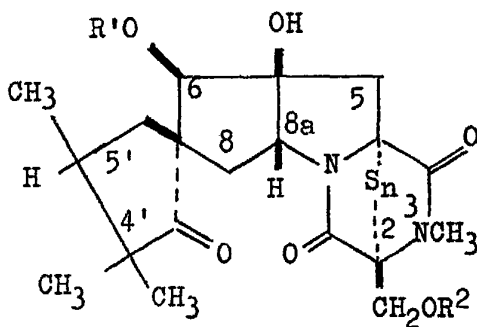
Como un medio nutriente acuoso apropiado puede mencionarse, por ejemplo, el medio conocido bajo el nombre de Czapek-Dox.

10. El cultivo del organismo puede ser llevado a cabo a temperaturas comprendidas entre los 15°C y 35°C , preferentemente a una temperatura de aproximadamente 25°C .

15. Un disolvente orgánico sustancialmente immiscible en agua apropiado es, por ejemplo, cloroformo, acetato de etilo, tolueno o dietiléter, prefiriéndose entre ellos al cloroformo.

20. Se ha encontrado que el complejo antiviral comprende ocho compuestos nuevos que poseen propiedades antivirales. De tal manera, conforme a una característica ulterior del invento, se proporcionan ocho nuevos productos antivirales aislados desde el complejo antiviral obtenido a partir del filtrado de cultivo de Sirodesmium diversum e identificados como Sirodesminas A, B, C, D, E, F, G y H respectivamente.

25. La Sirodesmina A tiene la estructura que se muestra en la fórmula I, en donde R^1 es acetilo, R^2 es hidrógeno y n es 2:



I

5.

La estereoquímica ilustrada es aquella relativa.

10. La Sirodesmina B tiene la estructura I en donde R¹ es acetilo, R² es hidrógeno y n es 4, y la Sirodesmina C tiene la estructura I en donde R¹ es acetilo, R² es hidrógeno y n es 3.

15. Estos 3 compuestos, o sea las Sirodesminas A, B y C, incorporan un sistema anular epi-(n)-tiadioxopiperazina. Otras moléculas que poseen el sistema anular epi-(n)-tiadioxopiperazina, y que tienen propiedades antivirósicas son también conocidas, por ejemplo Aranotina y Apoaranotina (Patente Británica Nº 1.238.327) y la Gliotoxina, pero estos compuestos conocidos no son tan activos como los compuestos del presente invento, o tienen un régimen terapéutico menor tal como se define más adelante.

20. El tratamiento del complejo antiviral con anhídrido sulfuroso produce otro compuesto que posee propiedades antivirales, o sea la Sirodesmina J. De tal manera, conforme a una característica ulterior del invento, se proporciona un compuesto ulterior que es la Sirodesmina J.

25. Las Sirodesminas A, B, C, D, E, F, G, H y J son identificables por las siguientes características:

Sirodesmina A

30.

Fórmula molecular C₂₀H₂₆N₂O₈S₂.



- Análisis: Encontrado C, 49,7; H, 5,4; N, 5,8; S, 12,8 %
Calculado para $C_{20}H_{26}N_2O_8S_2$; C, 49,4; H, 5,4; N, 5,8; S, 13,2 %.
- Espectro de masa: No se muestra principal pero un fuerte pico a $(M-S_2)$ \oplus . Encontrado m/e 422.1731, $C_{20}H_{26}N_2O_8$ requiere m/e 422.1689. Por simulación con trimetilsilil imidazol (benceno, 60°, 3 horas) se forma un derivado bis-trimetil sililo. No se vé un ión principal en el espectro de masa de este derivado pero se observa un débil pico correspondiente a $(M-CH_3)$ \oplus en m/e 615.1689, $C_{25}H_{39}N_2O_8S_2Si_2$ requiere 615.1686.
5. Acetilación: Tratamiento de la Sirodesmina A con anhídrido acético en piridina durante 1 semana a 22°C proporciona un bis-acetato, p.f. 186-189°C. Encontrado C, 50,5; H, 5,3; N, 4,9 %. $C_{24}H_{30}N_2O_{10}S_2$ requiere C, 50,7; H, 5,2; N, 4,9 %. El pico más alto del espectro de masa $(M-S_2)$ \oplus a m/e 506.1871.
10. $C_{24}H_{30}N_2O_{10}$ requiere m/e 506.1901.
- El tratamiento de la Sirodesmina A con anhídrido acético en piridina durante 1 hora a 22°C proporciona un monoacetato. Encontrado C, 49,9; H, 5,3; N, 5,3; S, 11,7 %; $C_{22}H_{28}N_2O_9S_2$ requiere C, 50,0; H, 5,3; N, 5,2; S, 12,1 %. El espectro de masa muestra un pequeño pico para $(M-S)$ \oplus a m/e 496 y un fuerte pico para $(M-S_2)$ \oplus a m/e 464.
15. La hidrólisis de la Sirodesmina A con ácido clorhídrico metanólico 0,1N proporciona la Desacetilsirodesmina A, p. f. 198-201°C.
20. Encontrado C, 48,4; H, 5,6; N, 6,0; S, 14,3 %; $C_{18}H_{24}N_2O_7S_2$ requiere C, 48,8; H, 5,6; N, 6,3; S, 14,4 %. El espectro de masa no muestra ningún ión principal pero solamente un fuerte pico para $(M-S_2)$ \oplus a m/e 380.
25. El tratamiento de la Sirodesmina A con trifenilfosfina en cloroformo proporciona un monosulfuro. Encontrado,
- 30.



C, 52,7; H, 5,7; N, 5,8; S, 7,1 %; $C_{20}H_{26}N_{2}O_{8}S$ requiere C, 52,9; H, 5,8; N, 6,2; S, 7,0 %. Espectro de masa muestra un ión molecular en m/e 454.

Sirodesmina B

5. Fórmula molecular $C_{20}H_{26}N_{2}O_{8}S_4$. Análisis: Encontrado C, 43,4; H, 4,9; N, 4,9; S, 22,8 %. $C_{20}H_{26}N_{2}O_{8}S_4$ requiere C, 43,6; H, 4,8; N, 5,1; S, 23,3 %.

Espectro de masa: No se encuentra principal pero solamente un fuerte pico para $(M-S_3)^+$ a m/e 422. El espectro es virtualmente idéntico a aquél de la Sirodesmina A. Por sili-lación con bis-trimetilsilil trifluoroacetamida (benceno, 50°, 3 horas), se forma un derivado bis-trimetilsililo. No aparece principal en el espectro de masa de este derivado pero sola-mente un pico débil correspondiente a $(M-CH_3)^+$ puede ser vis-
10. to a m/e 647.1445, $C_{25}H_{39}N_{2}O_{8}S_3Si_2$ requiere m/e 647.1407.

Sirodesmina C

Fórmula molecular $C_{20}H_{26}N_{2}O_{2}S_3$. Análisis: Encontrado C, 46,3; H, 5,1; N, 5,5; S, 18,0 %; $C_{20}H_{26}N_{2}O_{8}S_3$ requiere C, 46,3; H, 5,0; N, 5,4; S, 18,5 %. El espectro de masa muestra un fuerte pico que corresponde a $(M-S_3)^+$ a m/e 422 ($C_{20}H_{26}N_{2}O_8$).
20.

Sirodesmina D

Fórmula molecular $C_{20}H_{26}N_{2}O_{8}S_x$ en el cual x es proba-blemente 4. Espectro de masa: No muestra ión principal pero un fuerte pico para $(M-S_x)^+$ a m/e 422.
25.

Sirodesmina E

Fórmula molecular $C_{20}H_{26}N_{2}O_{8}S_x$ en donde x es probable-mente 3. Espectro de masa: No muestra ión principal pero so-lamente un fuerte pico para $(M-S_x)^+$ a m/e 422.

30. Sirodesmina F



Fórmula molecular $C_{20}H_{26}N_2O_8S_x$ en donde x es probablemente 3. Espectro de masa: No muestra ión principal pero un fuerte pico para $(M-S_x)^+$ a m/e 422.

Sirodesmina G

5. Fórmula molecular $C_{20}H_{26}N_2O_8S_2$. Análisis: Encontrado C, 49,7; H, 5,4; N, 5,7; S, 12,6 %. Calculado para $C_{20}H_{26}N_2O_8S_2$, C, 49,4; H, 5,4; N, 5,8; S, 13,2 %. Espectro de masa: No muestra ión principal pero un fuerte pico para $(M-S_2)^+$ a m/e 422.
10. Hidrólisis: El tratamiento de la Sirodesmina G con ácido clorhídrico metanólico 0,1N proporciona desacetilsirodesmina G, p.f. 195-196,5°C. Encontrado: C, 48,4; H, 5,5; N, 6,5; S, 14,6 %. Calculado para $C_{18}H_{24}N_2O_7S_2$, C, 48,3; H, 5,5; N, 6,3; S, 14,4 %. Espectro de masa: No hay ión principal pero un fuerte pico para $(M-S_2)^+$ a m/e 380.

15. Acetilación: El tratamiento de la Sirodesmina G con anhídrido acético en piridina durante 9 días a temperatura ambiente proporciona bisacetato de Sirodesmina G, p.f. 159 - 159,5°C.

20. Sirodesmina H

Fórmula molecular $C_{20}H_{26}N_2O_8S_x$. Espectro de masa: No hay ión principal pero un fuerte pico para $(M-S_x)^+$ a m/e 422.

Sirodesmina J

25. Fórmula molecular $C_{20}H_{26}N_2O_8S_2$. Análisis: Encontrado C, 49,8; H, 5,5; N, 5,5 %. Calculado para $C_{20}H_{26}N_2O_8S_2$, C, 49,4; H, 5,4; N, 5,8%. Espectro de masa: No hay ión principal pero un fuerte pico para $(M-S_2)^+$ a m/e 422 y un pico débil para $(M-S)^+$ a m/e 454.

30. Las Sirodesminas A,B,C,D,E,F,G,H y J y sus derivados



son separadas mediante cromatografía analítica en capa delgada sobre gel de sílice G.F. Luego del revelado, las placas son rociadas con una solución de ácido crómico y luego calentadas; las manchas primero aparecen amarillas y luego negras.

5. Los valores R_f empleando tres sistemas solventes, son los siguientes:

Compuesto	Tolueno: Acetato de etilo 1:2	Cloroformo: metanol; ácido fórmico 95:4:1	Cloroformo:aceta to de etilo 1:1
10. Sirodesmina A	0,23	0,35	0,19
Sirodesmina B	0,07	0,24	0,06
Sirodesmina C	0,17	0,29	0,14
Sirodesmina D	0,31	0,29	0,25
Sirodesmina E	0,36	0,33	0,27
15. Sirodesmina F	0,42	0,35	0,34
Sirodesmina G	0,38	0,39	0,32
Sirodesmina H	0,23	0,28	0,17
Sirodesmina J	0,38	0,35	0,28
20. Disacetil-si rodesmina A	0,23	0,24	0,15
Bisacetato de sirodesmina A	0,39	0,51	0,36
Desacetil-si rodesmina G	0,33	0,27	0,23
Bisacetato de Sirodesmina G	0,52	0,55	0,49
25. Monoacetato de Sirodesmina A	0,31	0,45	0,26
Monosulfato de Sirodesmina	0,24	0,29	0,19

30. Las Sirodesminas A-H son separadas mediante cromatografía líquida a alta presión. Empleando un cromatógrafo líquido



Du Pont 820 con un permafase E.T.H. (diámetro interno 1 m. x 2,1 mm) que tiene como fase móvil un gradiente entre 0 y 1,25 % de etanol redestilado en 2,2,4-trimetilpentano durante 50 minutos, y a una presión de 140 kg/cm², se obtuvieron los siguientes tiempos de retención:

5.

10.

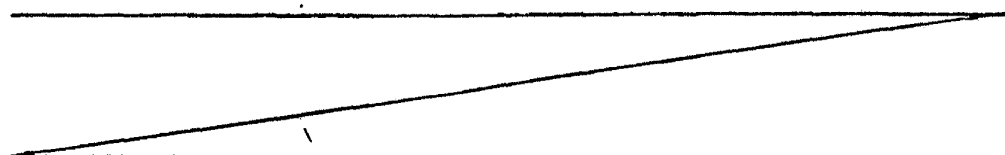
15.

20.

25.

<u>Compuesto</u>	<u>Tiempo de Retención (minutos)</u>
Sirodesmina G	15,5
Sirodesmina E	23,5
Sirodesmina A + D	30,0
Sirodesmina C	35,0
Sirodesmina H	40,0
Sirodesmina B	44,0
Sirodesmina F	49,0

Las Sirodesminas son fácilmente identificables mediante el examen de sus espectros de resonancia magnética nuclear. Los datos que figuran en las tablas siguientes proporcionan las características principales de los protones correspondientes a las Sirodesminas A,B,C,D,E,F,G,H y J examinadas en un espectro fotómetro de resonancia magnética nuclear Varian HA100, utilizando deuterocloroformo como solvente, excepto en el caso que se indica lo contrario, y empleando tetrametilsilano como un patrón interno ($\tau = 10,0$). En el tubo de muestra de resonancia magnética nuclear se hace un bis-uretano mediante agregado del tricloroacetilisocianato. Los números de carbono que aparecen en las tablas son aquellos que se muestran en la figura I.





Sirodesmina A

	Carbo no N ^o	Sustitu yente	Señal (τ)	Constan- te de aco plamiento (Hz)	Señal Bis- -uretano (τ)	Constante de acopla miento (Hz)
5.	2	<u>CH₂</u> OH	5,72		4,9 } 5,10 }	12
	3	CH ₃	6,86		6,85	
	5	H	6,86)	16	6,32)	16
10.		H	6,94)		6,52)	
	6	H	4,26		4,32	
	5'	H	5,78)	7	5,84)	7
		CH ₃	8,71)		8,76)	
	4'	CH ₃	8,98		9,01	
15.		CH ₃	9,06		9,09	
	6	CH ₃ CO.O	7,90		7,93	
	8	H	7,44)	14 \neq	7,42)	14
		H	8,04)		7,98)	
	8a	H	5,52		5,10	

20. \neq Constante de acoplamiento con hidrógeno en la posición
8a:8,5 Hz,

Sirodesmina B

	Carbo no N ^o	Sustitu yente	Señal (τ)	Constante de Acopla miento (Hz)	Señal Bis- -uretano (τ)	Constante de Acopla miento (Hz)
25.	2	<u>CH₂</u> OH	5,88	\neq	5,16	
	3	CH ₃	6,97		6,90	
	5	H	6,74)	15	6,33)	16
30.		H	7,32)		6,67)	



Continuación

Carbo no N ^o	Sustituyen te	Señal (τ)	Constante de Acoplamiento (Hz)	Señal Bis-uretano (τ)	Constante de Acoplamiento (Hz)
5. 6	H	4,46	7	4,73	7
5'	H	5,84		5,72	
	CH ₃	8,74			
4'	CH ₃	9,04		8,98	
	CH ₃	9,08		9,04	
10. 6	CH ₃ CO.O	7,98		7,86	
8	H	7,49	14+	7,47	14+
	H	8,14		8,01	
8a	H	5,24		4,56	

15

* Constante de acoplamiento 12Hz por agregado de D₂O.

+ Constante de acoplamiento con hidrógeno en la posición 8a:
9 Hz.

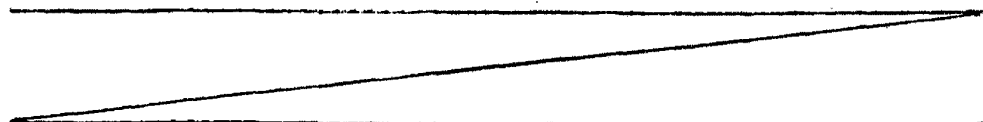
20.

La Sirodesmina C existe como una mezcla de dos integrantes en solución a temperatura ambiente. Esto tiene un precedente en, por ejemplo, el trisulfuro de Sporidesmina E. De tal manera, varias señales se encuentran duplicadas en el espectro de resonancia magnética nuclear de las soluciones de Sirodesmina C en benceno o tetracloroetileno, al ser medidas a la temperatura ambiente. Los espectros son menos complejos cuando se miden a temperaturas más elevadas.

25.

Sirodesmina C en tetracloroetileno

(i) Temperatura ambiente





5.

Carbono Nº	Sustituyente	Señal (τ)
5'	CH ₃	8,70, 8,76
4'	CH ₃	9,01, 9,09
6	CH ₃ CO.O	8,00
3	CH ₃	6,78, 6,96
6	H	4,68, 4,93

10.

(ii) 120°C

Las señales metilo 5' y 4' son mucho más acusadas, las dos líneas para 3-metilo se traducen en una sola línea, y las dos líneas para 6-H quedan convertidas en una sola línea ancha.

15.

Sirodesmina C uretano en tetracloroetileno

(i) Temperatura ambiente

20.

Carbono Nº	Sustituyente	Señal (τ)
5'	CH ₃	8,83, 8,86, 8,94
4'	CH ₃	9,07, 9,15
6	CH ₃ CO.O	0,99, 1,03, 1,09, 1,21

(ii) 120°C

25.

Las señales debidas a los acetatos de metilo 5', 4' y 6 son muy acusadas y las señales NH correspondientes al ureta no se transforman en dos líneas.

Sirodesmina C en benceno (d₆)

(i) Temperatura ambiente



5.

Carbono Nº	Sustituyente	Señal (τ)
5'	CH ₃	9,1, 9,06, 9,04, 9,00
4'	CH ₃	9,25, 9,37, 9,41
6	CH ₃ CO.O	8,52
3	CH ₃	7,03, 7,13
6	H	4,23, 4,50

10.

(ii) 78°C

Señales "duplicadas" comienzan claramente a relacionarse pero el procedimiento no se encuentra completo.

Sirodesmina D

15.

Carbono Nº	Sustituyente	Señal (τ)	Constante de Acoplamiento (Hz)
3	CH ₃	6,92	16
5	H	6,58	
	H	7,24	
6	H	4,62	14 [≠]
20. 6	CH ₃ CO.O	7,94	
8	H	7,35	
	H	8,20	
8a	H	5,39	7
25. 4'	CH ₃	8,90	
	CH ₃	8,98	
5'	CH ₃	8,77	7
	H	6,09	

25.

30.

[≠] Constante de acoplamiento con hidrógeno en la posición 8a: 9 Hz.



Sirodesmina G

	Carbono Nº	Sustituyente	Señal (τ)	Constante de Acoplamiento (Hz)
5.	2	<u>CH₂OH</u>	5,83	
		<u>CH₂OH</u>	6,53	
	3	CH ₃	6,91	
	5	H ₂	6,80	
	6	H	4,50	
10.	5'	H	6,10	7
		CH ₃	8,78	
	4'	CH ₃	8,93	
		CH ₃	9,01	
	6	CH ₃ CO.O	7,96	
15.	8	H	7,29	14 *
		H	8,29	
	8a	H	5,72	

* Constante de acoplamiento con hidrógeno en la posición 8a:

20. 9 Hz.

Los principales valores de las resonancias magnéticas nucleares (valores τ de solución CDCl₃) de las Sirodesminas E, F, H, J y la Desacetilsirodesmina G son las siguientes.

25. Sirodesmina E - 9,02(CH₃), 8,93(CH₃), 8,95, 8,83, 8,77, 7,99(CH₃CO.O), 6,96(NCH₃), 6,79, 5,34.

Sirodesmina F - 9,06(CH₃), 9,00(CH₃), 8,73(CH₃), 7,93(CH₃CO.O), 7,29, 6,95, 6,79(NCH₃), 5,30.

Sirodesmina H - 9,01(CH₃), 8,93(CH₃), 8,79(CH₃), 7,98(CH₃CO.O), 6,93(NCH₃), 6,41, 5,25.

30. Sirodesmina J - 9,03(CH₃), 8,98, 8,94, 8,79, 8,73, 7,91(CH₃-



CO.O), 7,88, 6,84(NCH₃), 6,60, 5,11.

Desacetilsirodesmina G - 9,01(CH₃), 8,98(CH₃), 8,77, 8,33, 7,38, 7,13, 6,87(NCH₃), 6,80, 6,14, 5,4-5,9, 4,7-5,0.

Espectros infrarrojos

5.

Los espectros infrarrojos de las Sirodesminas son muy similares. Los máximos de absorción principales de los compuestos examinados bajo la forma de dispersiones en parafina líquida son los siguientes:

10.

Compuesto	Absorción (cm. ⁻¹)										
Sirodesmina A	3450	1765	1690	1395	1225	1112	1075	1045	1008	943	722
Sirodesmina B	3450	1765	1680	1375	1228	1118	1082	1045		946	722
Sirodesmina C	3450	1760	1685	1375	1225		1080	1045	1008	945	722
Sirodesmina D	3400	1750	1670	1375	1230	1153	1083	1045	1015		721
Sirodesmina E	3450	1750	1675	1375	1230	1155	1083	1047	1012		722
Sirodesmina G	3450	1750	1683	1375	1230	1155	1083	1047	1015		722
Sirodesmina J	3450	1760	1680	1380	1235	1085	1047				722
Monoacetato de Sirodesmina A	3500	1745	1675	1360	1210	1035				937	725
Bisacetato de Sirodesmina A		1760	1695	1380	1235	1082	1055			940	
Desacetilsirodesmina A	3500	1748	1675	1412	1390	1375	1355	1305	1265	1240	1210
	1130	1085	1050	1008	939	857	800	727			

30.

Las Sirodesminas A,B,C,D,E,F,G y H pueden ser aisladas desde el complejo antiviral mediante cromatografía, por ejemplo, mediante una combinación de cromatografía en columna y cromatografía preparativa en capa delgada. De tal manera, de acuerdo con una característica del presente invento, se proporciona un procedimiento para la aislación de la Sirodesmina A, que comprende someter a cromatografía al compuesto antiviral.

5.

Tal como se mencionara anteriormente, el tratamiento de la Sirodesmina A con ácido clorhídrico metanólico proporciona Desacetilsirodesmina A. Por lo tanto, de acuerdo con una característica ulterior del presente invento, se proporciona un derivado desacetilo de la Sirodesmina A, B ó C, que tiene la fórmula I en la cual ámbos R^1 y R^2 son hidrógeno y n es 2, 4 ó 3 respectivamente.

10.

15.

Como se mencionara anteriormente, el tratamiento de la Sirodesmina G con ácido clorhídrico metanólico proporciona Desacetilsirodesmina G. Por lo tanto, de acuerdo con una característica ulterior del invento, se proporciona Desacetilsirodesmina G que presenta un punto de fusión de aproximadamente 195-196,5°C, y tiene resonancias magnéticas nucleares en solución de deuterocloroformo en 9,01, 8,98, 8,77, 8,33, 7,38, 7,13, 6,87, 6,80, 6,14, 5,4-5,9 y 4,7-5,0 τ .

20.

Conforme a una característica ulterior del invento, se proporciona un procedimiento para la fabricación del derivado desacetilo de la Sirodesmina A,B,C ó G, el cual comprende al tratamiento de una solución alcohólica de Sirodesmina A,B,C ó G con un ácido inorgánico. El disolvente es preferentemente un alcohol o un alcohol acuoso, por ejemplo metanol o metanol acuoso, y el ácido es, preferentemente, ácido clorhí-

25.

30.



drico.

5. Tal como se ha mencionado anteriormente, el tratamiento de la Sirodesmina A con anhídrido acético en piridina durante 1 hora, proporciona un monoacetato. Por lo tanto, de acuerdo con una característica ulterior del invento, se proporciona monoacetato de Sirodesmina A, monoacetato de Sirodesmina B ó monoacetato de Sirodesmina C, que tienen la fórmula I en la cual R^1 y R^2 son individualmente acetilo y n es 2, 4 ó 3 respectivamente.
10. Conforme a una característica ulterior del invento, se proporciona un procedimiento para la fabricación de monoacetato de Sirodesmina A, monoacetato de Sirodesmina B o monoacetato de Sirodesmina C, el cual comprende al tratamiento de una solución de Sirodesmina A, B ó C con anhídrido acético o un haluro de acetilo, por ejemplo cloruro de acetilo, en un solvente orgánico no hidroxílico, durante un periodo comprendido entre 15 minutos y 4 horas. Las condiciones preferidas son de tratamiento con anhídrido acético en solución de piridina durante 1 hora.
15. Tal como se mencionara anteriormente, el tratamiento de la Sirodesmina A con trifenilfosfina en cloroformo proporciona monosulfuro de Sirodesmina A. Por consiguiente, de acuerdo con una característica ulterior del presente invento se proporciona monosulfuro de Sirodesmina A que tiene la fórmula I en la cual R^1 es acetilo, R^2 es hidrógeno y n es 1.
20. De acuerdo con una característica ulterior del presente invento se proporciona un procedimiento para la fabricación de monosulfuro de Sirodesmina que comprende tratar una solución de Sirodesmina A en un solvente orgánico, con trifenilfosfina. El solvente puede, por ejemplo, ser benceno,
- 25.
- 30.



tolueno o cloroformo, de los cuales se prefiere al cloroformo.

5. Las Sirodesminas B y C son ambas fácilmente convertibles en Sirodesmina A por tratamiento con cloruro de tionilo en piridina a 0° C. La conversión puede ser realizada directamente en el complejo antivirósico y esto facilita de gran manera el aislamiento de la Sirodesmina A.

10. De tal manera, de acuerdo con una característica ulterior del presente invento, se proporciona un procedimiento para la fabricación de Sirodesmina A, mediante tratamiento de la Sirodesmina B y/o Sirodesmina C, o del complejo antiviral obtenido del cultivo filtrado, con cloruro de tionilo en una base orgánica como disolvente, a una temperatura inferior a la temperatura ambiente.

15. La Sirodesmina A es convertida en una mezcla de A, B y C por tratamiento con azufre y piridina a temperatura ambiente.

20. Por consiguiente, de acuerdo con una característica ulterior del presente invento, se provee un procedimiento para la fabricación de Sirodesminas B y C, por tratamiento de una solución de Sirodesmina A en un disolvente orgánico con azufre y en la presencia de una base orgánica. La base orgánica en sí misma puede actuar como disolvente.

25. Podrá observarse que las Sirodesminas A, B y C, sus monoacetatos, sus derivados desacetilos y el monosulfuro de Sirodesmina, son interconvertibles. Por lo tanto, como una característica ulterior del presente invento, se proporciona un compuesto de la fórmula I en la cual n es 1, 2, 3 ó 4 y en donde R¹ es acetilo y R² es hidrógeno, así como también
30. R¹ y R² son ambos hidrógeno o ámbos acetilo.



- El complejo obtenido mediante extracción del caldo fungoso, los nuevos compuestos Sirodesminas A,B,C,D,E.F y G aislados de los mismos, la Sirodesmina J, los derivados desacetilos de las Sirodesminas A y G, el monoacetato de Sirodesmina A y el monosulfuro de Sirodesmina, poseen todos actividad antivirósica en la presencia de células huespedes, en particular poseen actividad contra los rinovirus en la presencia de células embriónicas humanas del pulmón, y contra los virus Coxsackie A y B y Echo. La actividad contra los rinovirus se determina esencialmente de la siguiente manera:
- Se cultivan células embriónicas humanas del pulmón de manera convencional en un Medio Esencial Mínimo de Eafle's con el agregado de 1 % de suero de fósforo, en tubos de vidrio de 75 mm x 12 mm, y se incuban estos tubos a una temperatura de 33°C. Ocho grupos de tres de dichos tubos por grupo son tratados con soluciones de ensayo de un compuesto de ensayo en el mismo medio, y conteniendo respectivamente 200, 50, 12,5, 3,1, 0,8, 0,2, 0,05 y 0,00 μ g del compuesto de ensayo por mililitro de solución de ensayo. Se continúa la incubación a 33°C y luego de 24 horas cada tubo es enfrentado con una dosis de un rinovirus, por ejemplo rinovirus del tipo 2, de 100 veces el cultivo de tejido al 50 % de dosis infecciosa. Luego de dos días más de incubación a 33°C, se evalúa visualmente cada tubo para observar un efecto citopático ocasionado por la toxicidad del compuesto, y que es un efecto citopático generalizado en la totalidad de la capa celular, y para determinar el efecto citopático ocasionado por el crecimiento del virus, el cual es una característica, el efecto citopático focal, fácilmente distinguible de la toxicidad del compuesto. La "dosis activa" de un compuesto de en-



5. sayo es determinada bajo la forma de la concentración del compuesto que protege al 50 % de las células contra el efecto citopático ocasionado por el crecimiento del virus, y la "dosis tóxica" es determinada como la concentración del compuesto de ensayo que produce toxicidad compuesta, tal como se describe anteriormente, en el 50 % de las células de los cultivos tratados con dicha concentración del compuesto.

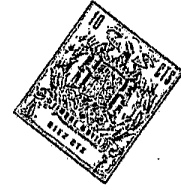
10. El complejo antiviral y los compuestos del presente invento, inhiben el crecimiento de los rinovirus tipo 2 a una concentración igual o menor a 0,25 $\mu\text{g/ml}$ sin producir al mismo tiempo ningún efecto tóxico visible en las células del cultivo del tejido a dosis de por lo menos diez veces la dosis activa menor.

15. La Sirodesmina A fué administrada intranasalmente a ratas machos y hembras en una dosis de 0,25 mg/kg/día durante 14 días. Todas las ratas sobrevivieron y no se observaron anomalías histológicas post-mortem.

20. Cuando se los emplea para producir un efecto antiviral en la presencia de células huéspedes, el complejo o compuesto es administrado al huésped para producir una concentración en la vecindad del virus comprendida entre 0,003 a 0,25 $\mu\text{g/ml}$. La aplicación a los tejidos nasales o laríngeos en una dosis de 0,01 hasta 0,1 mg administradas entre 3 y 6 veces por día, resulta apropiada. En el hombre esto es equivalente a una dosis diaria oral comprendida entre 2 y 20 mg por persona adulta.

25. En consecuencia, de acuerdo con una característica ulterior del invento, se proporciona una composición farmacéutica que comprende al complejo antiviral, o por lo menos un compuesto del invento, asociado con un diluyente o portador far-

30.



macéuticamente aceptable.

5. La composición farmacéutica del invento puede hallarse bajo la forma de una tableta, pastilla, cápsula, solución o suspensión acuosa u oleosa, emulsión, gotas nasales, aspersión nasal o laríngea, aerosol o polvos convencionales, y puede ser fabricada mediante técnicas convencionales e incorporar excipientes también convencionales.

10. Las composiciones preferidas del invento son aquellas que permiten al complejo o compuesto antiviral producir una concentración antiviral del complejo o compuesto en aquellas partes del huésped en donde normalmente crecen los rinovirus, por ejemplo la mucosa de la nariz y laringe, tanto sea mediante aplicación directa de la composición a aquellas partes cuanto indirectamente produciendo un nivel sanguíneo del complejo o compuesto antiviral suficiente, luego de un dosaje oral.

15. Tales composiciones preferidas para aplicación directa son, por ejemplo, pastillas que pueden ser disueltas lentamente en la boca, a fin de recubrir la boca y pasajes asociados con una solución del ingrediente activo, y aspersiones nasales así como aspersiones laríngeas bajo la forma de una solución del complejo antiviral o del compuesto en un líquido inerte, farmacéuticamente aceptable que puede ser inhalado y depositado en los pasajes nasales y en la garganta, y las composiciones preferidas para el dosaje oral son, por ejemplo, tabletas.

20. Una tableta o pastilla apropiada contiene entre 0,05 mg hasta 5 mg de un compuesto antiviral del invento, y el régimen normal para la profilaxis o el tratamiento de una infección de rinovirus, es de una tableta entre 3 y 6 veces por día.

30.

5. Una aspersión nasal o laríngea apropiada contiene entre 0,01 y 1 mg de un compuesto antiviral del invento por cada mililitro de solución, y para la profilaxis o el tratamiento de la infección por rinovirus, se rocían en la nariz o la garganta aproximadamente 0,1 ml de dicha solución entre 3 y 6 veces por día.

10. Las composiciones del presente invento pueden también contener otros compuestos conocidos farmacéuticamente útiles, por ejemplo descongestivos nasales, antipiréticos o antisépticos.

15. El complejo, compuesto o composiciones del presente invento pueden ser utilizados de manera profiláctica en forma general, o, en particular, por huéspedes que se encuentran o pueden hallarse en contacto próximo con otro huésped que tiene una infección rinovirus.

20. La administración del complejo o de un compuesto o composición del presente invento para el tratamiento de un huésped que tiene una infección de rinovirus puede no producir en muchos casos alivio de los síntomas asociados, puesto para el tiempo en que los síntomas aparecen la infección de rinovirus puede hallarse totalmente desarrollada, pero este tratamiento puede ser útil para impedir el contagio de la infección a otros huéspedes.

25. El invento queda ilustrado pero no limitado por los siguientes ejemplos, en donde los Ejemplos 6 a 16 ilustran la preparación de los derivados:

Ejemplo 1

Se hizo un medio nutriente de la siguiente manera:

30. Nitrato de sodio 2,0 g
Fosfato diácido de potasio 1,0 g



- | | | |
|----|---|---------|
| | Sulfato de magnesio heptahidratado | 0,5 g |
| | Cloruro de potasio | 0,5 g |
| | Sulfato ferroso heptahidratado | 0,01 g |
| | Dextrosa (tipo "Cerelesa" Marca Registrada) | 50,0 g |
| 5. | Extracto de levadura (tipo "Oxid" Marca Registrada) | 1,0 g |
| | Concentrado de elementos menores (ver abajo) | 1,0 ml |
| | Agua destilada hasta | 1 litro |
- El concentrado de elementos menores fué hecho de la siguiente manera:
- | | | |
|-----|-------------------------------------|--------|
| 10. | Sulfato ferroso heptahidratado | 1,0 g |
| | Sulfato de cobre pentahidratado | 0,15 g |
| | Sulfato de zinc heptahidratado | 1,0 g |
| | Sulfato de manganeso tetrahidratado | 0,1 g |
| 15. | Molibdato de potasio | 0,1 g |
- fueron disueltos en agua destilada, con el agregado de suficiente ácido clorhídrico concentrado para dar una solución clara, y finalmente se diluyeron hasta 1 litro con agua destilada.
20. El medio nutriente fué ajustado hasta pH 5,8 con hidróxido de potasio acuoso 10N y luego puesto en autoclave a 7 kg/cm² durante 25 minutos.
25. Se cultivó Sirodesmium diversum C.M.I. 102519 a una temperatura de 25°C en cultivo superficial realizado en botellas Thompson 90 conteniendo cada una 1 litro del medio nutriente. El producto fué cosechado al cabo de 35 días y el cultivo filtrado (70 litros, pH aprox. 6,5) fué extraído con 2 x 14 litros de tolueno. Los extractos de tolueno combinados fueron secados con sulfato de sodio anhidro, y luego evaporados a 60°C/20 mm. El residuo, consistente en 7,1 g
30. fué lavado con 4 x 25 ml de éter de petróleo, p.e. 60-80°C,



y los lavados fueron descartados para dar el complejo antiviral.

Ejemplo 2

5. El complejo antiviral obtenido por una doble realización del Ejemplo 1, fueron justados (6,52 g) y luego separados en dos porciones iguales. Cada porción fué fraccionada separadamente mediante cromatografía en columna seca, hallándose cada columna preparada de la siguiente manera:

10. Un frasco de 2 litros conteniendo gel de sílice (900 g Hopkins and Williams Ltd., "Silica Gel M.F.C.") y 100 ml de agua, fué rotado a temperatura ambiente durante 2 horas. Se agregaron 115 ml de una mezcla de éter dietílico/acetato de etilo 3:2 y el frasco fué girado durante 3 horas más. Finalmente se almacenó al gel de sílice en una vaina de nylon para
15. dar una columna seca de 90 x 4 cm.

Se agregó el extracto en la cúspide de la columna y un volumen mínimo de una mezcla de éter/acetato de etilo 3:2 y la columna fué revelada con la misma mezcla desolvente hasta que el frente disolvente llegó a la base de la columna. Cada
20. columna fué dividida en 6 secciones iguales y las secciones equivalentes de las dos columnas fueron combinadas, luego eluidas con 3 x 500 ml de una mezcla de acetato de etilo/metanol 97:3. La evaporación de los disolventes proporcionó 6 fracciones; la fracción 1 era la menos polar y la fracción 6 era la más polar. Se descartaron las fracciones 1-3; la
25. fracción 4 contenía Sirodesminas A y C juntamente con menos material polar, la fracción 5 contenía Sirodesminas A, B y C juntamente con material indeseado, la fracción 6 contenía Sirodesmina B juntamente con material de base.

30. Las fracciones 4-6 fueron separadas de nuevo en la for-



ma que se describe más adelante, mediante cromatografía pre-
parativa en capa delgada sobre gel de sílice (cada placa era
de 20 x 40 x 0,1 cm). Para el revelado se utilizaron dos
mezclas disolventes: disolvente I era acetato de etilo/tolue-
5. no 2:1, disolvente II era ácido fórmico/metanol/cloroformo
1:4:95. El material separado fué recuperado por elución de
las bandas apropiadas con una mezcla de acetato de etilo/me-
tanol 97:3.

La separación por cromatografía en capa delgada de
10. una fracción 4 en columna seca (780 mg, 8 placas, disolven-
te I) proporcionó una fracción (i) (92 mg, principalmente Si-
rodesmina A) y fracción (ii) (165 mg, principalmente Sirodes-
mina A y C). Una separación ulterior por cromatografía en
15. capa delgada de la fracción (i) (1 placa revelada dos veces,
disolvente II) proporcionó la fracción (iii) (43 mg, Sirodes-
mina A). Una separación ulterior por cromatografía en capa
delgada de la fracción (ii) (2 placas reveladas dos veces,
disolvente II) proporcionó la fracción (iv) (36,4 mg, Siro-
desmina A y trazas de Sirodesmina C) y la fracción (v) (65
20. mg, Sirodesmina C contaminada con ligeras trazas de las Siro-
desminas A y B).

La separación por cromatografía en capa delgada de la
fracción 5 en columna seca (716 mg, 8 placas, disolvente I)
proporcionó la fracción (vi) (296 mg, principalmente Sirodes-
25. minas A y C) que fué ulteriormente separada (6 placas, disol-
vente II) para dar la fracción (vii) (63,4 mg, principalmen-
te Sirodesmina A) y la fracción (viii) (146 mg, principalmen-
te Sirodesmina C). Las fracciones (iv) y (vii) fueron com-
binadas, y luego ulteriormente separadas (2 placas reveladas
30. dos veces, disolvente II) para dar la fracción (ix) (37 mg,

Sirodesmina A). Las fracciones (iii) y (ix) fueron combinadas y disueltas en 2 ml de benceno y éter de petróleo con p. e. 60-80°C, fué agregado luego por gotas a la solución agitada para precipitar 68 mg de Sirodesmina A en estado sólido.

5. La fracción (viii) fué ulteriormente separada (1 placa revelada dos veces, disolvente II) para dar una fracción (x) (68 mg, Sirodesmina C contaminada con ligeras trazas de Sirodesminas A y B). Las fracciones (v) y (x) fueron combinadas y disueltas en 2 ml de acetato de etilo y se recuperaron 60 mg de Sirodesmina C sólida mediante precipitación con éter de petróleo.

10. La separación por cromatografía en capa delgada de la fracción 6 en columna seca (6 placas, disolvente II) proporcionó la fracción (xi) (193 mg, un aceite, Sirodesmina B) el cual al ser tratado con una mezcla de benceno/éter de petróleo proporcionó 113 mg de Sirodesmina B sólida.

15. Ejemplo 3

- Se trataron 2,5 g del complejo antivirósico, obtenido de una fermentación de 90 litros, en 50 ml de piridina seca, con 50 ml de cloruro de tionilo durante 15 minutos a 0°C, luego se agregaron a 500 ml de agua helada y se dejaron durante 15 minutos más. La mezcla se ajustó a pH 2 con ácido sulfúrico 2N, luego se extrajo con 3 x 500 ml de cloroformo. Los extractos fueron secados sobre sulfato de sodio, luego concentrados para proporcionar 1,43 g de un aceite el cual fué aplicado a una "columna seca" de 430 g de gel de sílice preparada de la siguiente manera:

25. Un frasco de 2 litros conteniendo un kg de gel de sílice Hopkin and Williams Ltd., Silica Gel M.F.C. y 120 ml de agua, fué girado a temperatura ambiente durante 2 horas. Se
- 30.



- agregaron 112,5 ml de una mezcla de acetato de etilo/tolueno 2:1 y el frasco fué girado durante 3 horas más. La columna fué revelada con una mezcla de acetato de etilo/tolueno 2:1, luego seccionada en 9 porciones cada una de las cuales fué
5. eluida con 3 x 500 ml de una mezcla de acetato de etilo/metanol 97:3. Las fracciones conteniendo Sirodesmina A fueron juntadas, luego separadas mediante cromatografía en capa delgada (gel de sílice, acetato de etilo/tolueno 2:1) para dar 218 mg de Sirodesmina A pura en forma de aceite.
10. Una segunda partida de extracto de tolueno lavado con éter de petróleo, desde una fermentación de 90 litros fué procesada de manera similar y las dos muestras de Sirodesmina A, que totalizaban 505 mg fueron juntadas y disueltas en 5 ml de benceno. Se precipitaron 385 mg de Sirodesmina A sólida
15. de esta solución, por agregado en gotas de éter de petróleo con p.e. 60-80 °C.
- Ejemplo 4
- Se trataron 50 mg de Sirodesmina B en 1,0 ml de piridina seca, con 0,1 ml de cloruro de tionilo durante 12 minutos a 0 °C, luego se agregaron a 25 ml de agua helada y se dejaron durante 15 minutos. La solución fué ajustada hasta pH
20. 2 con ácido sulfúrico 2N, luego extraída con 3 x 20 ml de cloroformo. Los extractos fueron secados sobre sulfato de sodio y luego concentrados para dar 29,4 mg de un aceite que estaba
25. esencialmente constituido por Sirodesmina A pero contenía trazas de Sirodesmina B y C. El producto bruto fué purificado mediante cromatografía en capa delgada preparativa sobre gel de sílice (solvente, ácido fórmico/metanol/cloroformo, 1:4:95) para rendir 12,5 mg de Sirodesmina A bajo forma de un
30. aceite.



Ejemplo 5

5. Se trataron 5,0 mg de Sirodesmina C en 0,1 ml de piridina seca con 0,01 ml de cloruro de tionilo, durante 10 minutos a 0°C, luego se agregaron a 5 ml de agua helada y se dejó durante 15 minutos. La solución fué ajustada a pH 2 con ácido sulfúrico 2N, luego se extrajo con 3 x 5 ml de cloroformo. Los extractos fueron secados sobre sulfato de sodio y luego concentrados para rendir 4,3 mg de Sirodesmina A bajo la forma de un aceite.

10. Ejemplo 6

15. Se hicieron reaccionar 250 mg de Sirodesmina A en 9,5 ml de piridina seca, con 6,25 ml de anhídrido acético a temperatura ambiente y en ausencia de luz durante 1 semana, luego se trató con 1,25 ml de agua durante 1 hora a 5°C. La mezcla se ajustó a pH 2 con ácido sulfúrico 2N, luego fué diluida con 25 ml de agua y extraída con 4 x 50 ml de acetato de etilo. Los extractos fueron secados sobre sulfato de sodio, luego concentrados para dar 280 mg de un aceite que fué purificado mediante cromatografía en capa delgada preparativa sobre gel de sílice (disolvente: ácido fórmico/metanol/cloroformo 1:4:95).

20. El componente principal así obtenido fué recristalizado dos veces desde una mezcla de acetato de etilo/éter de petróleo para dar 127 mg de bis-acetato de Sirodesmina A en forma de agujas amarillo pálido, p.f. 186-189°C.

25. Ejemplo 7

30. Se mantuvo una solución de 50 mg de Sirodesmina A y 15 mg de azufre en 2 ml de piridina, a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 24 horas, luego se evaporó a sequedad a 35°C. Se obtuvieron Sirodesminas A, B y C mediante cro



matografía en capa delgada preparatoria del resina (1 placa de gel de sílice, 40 x 20 x 0,1 cm; sistema solvente: acetato de etilo/tolueno 2:1).

Ejemplo 8

5. Un cultivo desarrollado de la manera descrita en el Ejemplo 1 fué cosechado al cabo de 28 días y 70 litros del filtrado se extrajo con 2 x 14 litros de cloroformo, secado sobre sulfato de sodio anhidro y evaporado bajo presión reducida para proporcionar el complejo antivirósico. Se agitaron
10. juntos tolueno, metanol, cloroformo y agua en relaciones volumétricas de 9:9:4:4 respectivamente para dar un sistema bifásico (superior e inferior). Se disolvieron 15 g del complejo antivirósico en 300 ml de la fase inferior y esta solución así como dos porciones ulteriores de 300 ml de la fase inferior,
15. fueron agitadas con 2 x 100 ml de la fase superior. Las fases superiores combinadas (900 ml) fueron evaporadas a sequedad y el residuo se disolvió en 100 ml de la fase inferior de un segundo sistema bifásico preparado agitando éter de petróleo liviano, p.e. 60-80°C, tolueno, metanol y agua en
20. la relación volumétrica de 2:3:4:1 respectivamente. Esta solución y una segunda porción de 100 ml de la fase inferior del segundo sistema bifásico fueron agitadas sucesivamente con 2 x 100 ml de la fase superior y 200 ml de las fases inferiores combinadas se evaporaron hasta sequedad. Se cromatografiaron
25. 10 g del residuo sobre 850 g de gel de sílice desactivada (preparada tratando porciones de 250 g de gel de sílice con 30 ml de agua y mezclando intensamente en una botella con tapa de rosca haciéndola rodar en un molino de bolas) y las fracciones que fueron eluidas se purificaron
30. ulteriormente mediante cromatografía preparatoria en capa delgada

da múltiple sobre gel de sílice y en donde luego de cada ensayo, el material pertinente fué aislado de la placa de la manera usual y reaplicado a otra placa antes de ser revelado. Los resultados de la cromatografía se exponen en la siguiente tabla.

5.

10.

15.

20.

25.

Cromatografía de Columna			Cromatografía C.d.	Compuestos Aislados
Frac- ción Nº	Solvente de Revelado		Solvente de Revelado	
	% Acetato de etilo en tolueno	Volumen (l)		
1	20	4,5		
2	30	2,0		
3	30	1,7	a,b	Sirodesmina G
4	40	3,6	b,b,b,c	Sirodesmina F
			b,b,b,b,c,c, b,c	Sirodesmina E
			b,a,b	Sirodesmina D
5	40	1,0	b,a	Sirodesmina H
6	50	1,4	b	Sirodesmina A
7	50	5,0	b,b	Sirodesmina A
			d,b ≠	Sirodesmina C
8	50	1,4		
9	100	1,8		
10	100	5,6	≠≠≠	Sirodesmina B

Notas de esta Tabla:

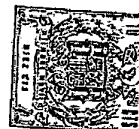
a: Tolueno/acetato de etilo 1:2

b: Cloroformo/metanol/ácido fórmico 95:4:1

c: Cloroformo/acetato de etilo 1:1

d: Cloroformo/metanol 95:5

30.



* Purificación final empleando solvente o puesto que ello inhibe la reacción de desproporción durante la cromatografía de la Sirodesmina C en una mezcla de Sirodesminas A y B.

5. ** Purificado en una columna de 225 g de sílice desactivado revelado con cloroformo.

Ejemplo 9

A una solución de 11 g del complejo antiviral purificado, preparado de la manera descrita en el Ejemplo 8 mediante partición por disolvente, en 30 ml de piridina, se agregó una solución fría de SO₂ en piridina, preparada haciendo burbujear SO₂ en 51 ml de piridina hasta que el volumen era de 62 ml. Luego de mantener durante media hora a temperatura ambiente, la mezcla de reacción fué vertida sobre hielo y se ajustó el pH a 2 con 410 ml de ácido clorhídrico 2N. La mezcla fué extraída con cloroformo, y el cloroformo lavado, seco y evaporado para dar 8,9 g de un residuo que fué cromatografiado sobre gel de sílice desactivada, con los siguientes resultados:

20.

Frac- ción Nº	Revelado		Peso de Fracción (g)
	% Acetato de etilo en tolueno	Volumen (1)	
1	40	1,1	1,2 0,88 2,5
2	40	1,6	
3	40	0,5	
4	40	0,9	
5	40	1,1	
6	70	1,6	

25.

30.



5. La fracción 2 fué purificada mediante cromatografía preparatoria en capa delgada sobre gel de sílice GF, empleando primeramente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCOOH}$ en proporciones 95:4:1 como solvente para preparar las fracciones R_f superiores e inferiores.

Las fracciones R_f inferiores fueron ulteriormente purificadas mediante cromatografía preparatoria en capa delgada empleando acetato de etilo/ CHCl_3 en proporciones 7:3 como solvente para proporcionar Sirodesmina J.

10. Las fracciones R_f altas fueron purificadas mediante cromatografía preparatoria en capa delgada empleando $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCOOH}$ en proporciones 95:4:1 como solvente, seguido por tolueno/acetato de etilo 1:2 como solvente, para dar Sirodesmina G.

15. Las fracciones 5 y 6 fueron combinadas y cromatografiadas en una columna conteniendo 288 g de gel de sílice desactivada con cloroformo para dar Sirodesmina A.

Ejemplo 10

20. El residuo de 4,46 g del extracto de cloroformo descrito en el Ejemplo 9 fué disuelto en 400 ml de metanol conteniendo 4 ml de ácido clorhídrico concentrado, y la solución se dejó reposar durante 40 horas a temperatura ambiente. La solución fué evaporada hasta 35 ml y se agregaron 35 ml de agua. La mezcla fué extraída con una mezcla de éter de petróleo liviano, p.e. 60-80°C, y tolueno (2:3, 2 x 20 ml) y estos extractos así como algún material insoluble fueron descartados. La fase acuosa remanente se extrajo con cloroformo, este último se evaporó y el residuo fué dividido en porciones iguales.

30. Una porción de 1,15 g fué cromatografiada sobre gel de



sílice desactivada de la siguiente manera:

5.

Fracción Nº	Disolvente	Volumen de Solvente (ml)
1	Tolueno/Acetato de etilo 1:1	370
2	CHCl ₃	480
3	CHCl ₃	870

10.

El residuo de la fracción 3 fué recrystalizado desde acetona para dar Desacetilsirodesmina A, p.f. 199-201°C.

La otra porción del producto bruto fué cristalizada desde acetona para dar Desacetilsirodesmina A, p.f. 198-201°C.

Ejemplo 11

15.

Un medio nutritivo hecho de la manera descrita en el Ejemplo 1, fué ajustado a pH 5,6 con hidróxido de potasio acuoso 10N y luego colocado en autoclave a 7 kg/cm² durante 25 minutos. Se cultivó Sirodesmium diversum C.M.I. 102519 a una temperatura de 25°C en matraces cónicos de 500 ml, con

20.

teniendo cada uno 150 ml del medio, en un agitador rotativo. Al cabo de 4 días, se utilizaron 12 ml del caldo para inocular individualmente un ulterior número de matraces de agitación conteniendo la misma cantidad del mismo medio. Al cabo de 12 días bajo las mismas condiciones de desarrollo, los matraces fueron cosechados. El filtrado (50 ml) se ajustó a pH 6,0 y se extrajo dos veces con la mitad de su volumen de cloroformo. Los extractos combinados fueron evaporados para proporcionar el complejo antivirósico.

25.

Ejemplo 12

30.

Se cultivó Sirodesmium diversum C.M.I. 102519 a una temperatura de 25°C en matraces cónicos de 2 litros sobre un



agitador rotativo, conteniendo cada matraz 1 litro de un medio nutriente hecho de la manera descrita en el Ejemplo 11. Al cabo de 3 días se utilizaron 3 litros del caldo para inocular 30 litros de un medio nutriente hecho de la siguiente manera:

- 5.
- | | |
|------------------------------------|--------|
| Glicerol | 40,0 g |
| Nitrato de sodio | 2,21 g |
| Fosfato diácido de potasio | 5,0 g |
| Sulfato de magnesio heptahidratado | 1,0 g |
10. Agua destilada hasta 1,0 litros.

El medio nutriente fué sometido en autoclave a una presión de 10,5 kg/cm² durante 25 minutos. El pH del medio no fué ajustado, y el pH del medio esterilizado era 4,9.

15. El medio fué colocado en un fermentador de vidrio y acero inoxidable con capacidad de 40 litros. Se proporcionó aire estéril a 15 l/minutos y el contenido se agitó mediante una turbina de 4 palas impulsada a 380 r.p.m., no empleándose pantallas. Cada vez que fué requerido se agregó como agente antiespumante propilenglicol 750.

20. Al cabo de 15 días, el pH del caldo era 6,7. Se ajustó este pH a 6,0, el filtrado del caldo se extrajo con cloroforno y este último fué evaporado para proporcionar el complejo antivirósico.

Ejemplo 13

25. Una solución de 0,083 g de Sirodesmina A en 100 ml de metanol conteniendo 1 ml de ácido clorhídrico concentrado, fué dejada reposar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 4 días, luego evaporada hasta sequedad a una temperatura inferior a 20^o C. Se agregó al residuo metanol y la solución fué evaporada para eliminar las últimas trazas de ácido
- 30.



5. clorhídrico. El residuo fué purificado mediante cromatografía preparatoria en capa delgada sobre gel de sílice GF utilizando $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCOOH}$ en proporciones de 95:4:1 como solvente para dar Desacetilsirodesmina A, p.f. 198-201°C, por recristalización desde acetato de etilo/éter de petróleo.

Ejemplo 14

10. Una solución de 0,15 g de Sirodesmina A y 0,078 g de trifenilfosfina en cloroformo, fué dejada reposar durante 4 horas a temperatura ambiente y luego evaporada hasta sequedad. El residuo fué purificado mediante cromatografía preparatoria en capa delgada sobre gel de sílice GF utilizando $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCOOH}$ en proporciones de 95:4:1 como solvente, para dar monosulfuro de Sirodesmina, obtenido como un gel que secó bajo la forma de un polvo incoloro mediante precipitación desde una solución de acetato de etilo con éter de petróleo.
- 15.

Ejemplo 15

20. Se disolvió 0,1 g de Sirodesmina G en 100 ml de metanol conteniendo 1 ml de ácido clorhídrico concentrado, y la solución se dejó reposar durante 3 días a temperatura ambiente y en la oscuridad. El solvente fué destilado y el residuo purificado mediante cromatografía preparatoria en capa delgada sobre gel de sílice GF utilizando metanol/cloroformo al 5% como solvente de revelado, para dar Desacetilsirodesmina G, p.f. 195-196,5°C, por recristalización desde acetona.

25. Ejemplo 16

30. Se disolvieron 0,044 g de Sirodesmina G en una mezcla de 2 ml de piridina y 1 ml de anhídrido acético, y la solución fué dejada reposar en la oscuridad durante 9 días a temperatura ambiente. La solución fué enfriada en hielo/sal, se agregaron 0,4 ml de agua fría y la mezcla se dejó reposar durante



4 horas. Luego de agregar 60 ml de ácido sulfurico 3N la mezcla fué extraída con 3 x 25 ml de acetato de etilo y los extractos combinados lavados con 50 ml de agua, 2 x 50 ml de solución de bicarbonato de sodio al 5 % y luego nuevamente con 50 ml de agua. Se evaporó la capa orgánica y el residuo fué recristalizado desde acetato de etilo/éter de petróleo para dar bisacetato de Sirodesmina G, p.f. 159-159,5°C.

Ejemplo 17

10. Una formulación de aspersión intranasal de Sirodesmina A se hace utilizando los siguientes constituyentes:

	Sirodesmina A	6 mg
	Timerosal	2 mg
	p-hidroxibenzoato de metilo	80 mg
	p-hidroxibenzoato de propilo	20 mg
15.	Fosfato de sodio	500 mg
	Sal disódica de ATDE	5 mg
	Agua destilada libre de pirógeno hasta	100 ml

- N O T A -

20. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una Solicitud de Patente, presentada en Inglaterra, con fecha 14 de septiembre de 1.972, bajo el número 42694/72, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en

25.

30. España, sobre: PROCEDIMIENTO DE FABRICACION DE UN COMPLEJO



ANTIVIRAL; caracterizándose por lo siguiente:

5. 1ª.- Procedimiento de fabricación de un complejo antiviral, caracterizado porque comprende cultivar una cepa de Sirodesmium diversum productora de complejo antiviral en un medio nutritivo acuoso que contiene una fuente de carbono asimilable y una fuente de nitrógeno asimilable, extraer el filtrado del cultivo con un disolvente orgánico sustancialmente inmiscible en agua, y evaporar el extracto hasta sequedad.
10. 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el complejo se somete a cromatografía aislándose Sirodesmina A.
15. 3ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque para la obtención del derivado desacetilo de Sirodesmina A, B, C ó G, se trata una solución alcohólica de Sirodesmina A,B,C, ó G con un ácido inorgánico.
20. 4ª.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque para la obtención del monoacetato de Sirodesmina A, B ó C, se trata una solución de Sirodesmina A, B ó C con anhídrido acético o un haluro de acetilo en un disolvente orgánico no hidroxílico, durante un periodo comprendido entre 15 minutos y 4 horas.
25. 5ª.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque para la obtención de monosulfuro de Sirodesmina, se trata una solución de Sirodesmina A en un disolvente orgánico con trifenilfosfina.
30. 6ª.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque para la obtención de Sirodesmina A, se trata Sirodesmina B y/o Sirodesmina C, o el complejo antiviral de la reivindicación 1, con cloruro de tionilo en una base orgánica.

mE

nica, a una temperatura inferior a la ambiente.

5. 7ª.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque para la obtención de Sirodesminas A, G y J, se trata el complejo antiviral de la reivindicación 1, con anhídrido sulfuroso en una base orgánica.

8ª.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque para la obtención de Sirodesminas B y C, se trata una solución de Sirodesmina A, en una base orgánica, con azufre.

10. 9ª.- Procedimiento de fabricación de un complejo antiviral, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

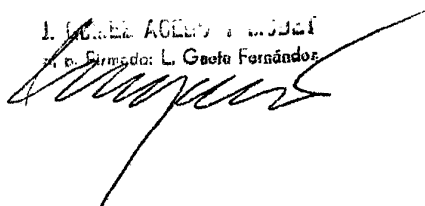
Esta Memoria consta de 39 hojas, escritas a máquina por una sola cara.

15.

Madrid - 7 FEB. 1974

IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED

L. GARCÍA AGUIRRE, S.A.
Firmado: L. García Fernández



mg