

Int. Cl.² C12D

PATENTE DE INVENCIÓN

Case 100-4106.

3700/RA/HP.

3.^A COPIA

Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTIBIÓTICOS.

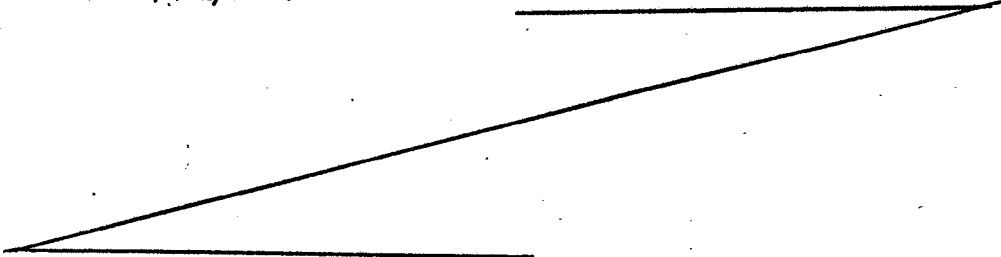
=====

432559

Solicitante: SANDOZ, A.G., entidad suiza, residente en Basilea, Suiza.

=====

La presente invención se relaciona con un procedimiento para preparar nuevos antibióticos más adelante denominados S 7481/F-1 y S 7481/F-2.



La invención proporciona un procedimiento para la producción de antibiótico S 7481/F-1, S 7481/F-2, o S 7481/F-1 y S 7481/F-2, caracterizado porque se cultiva un cepa productora de S 7481/F-1, S 7481/F-2, o S 7481/F-1 y S 7481/F-2 de la especie de hongos Cylindrocarpon lucidum Booth o Trichoderma polysporum (Link ex Pers.) Rifai en contacto con un medio nutritivo, y porque se aísla S 7481/F-1, S 7481/F-2, o S 7481/F-1 y S 7481/F-2,

5 S 7481/F-1 y S 7481/F-2 de la especie de hongos Cylindrocarpon lucidum Booth o Trichoderma polysporum (Link ex Pers.) Rifai en contacto con un medio nutritivo, y porque se aísla S 7481/F-1, S 7481/F-2, o S 7481/F-1 y S 7481/F-2,

10 teniendo el antibiótico S 7481/F-1 las características siguientes:-

Polvo amorfo, incoloro; P.F. 137-140°C (descomp.);

$[\alpha]_D^{20} = -236^\circ$ (CHCl₃; c = 0,5);

Espectro ultravioleta [CH₃OH; c = 1,063g/l; d = 0,01 cm]

15 tal como se indica en la Figura 1 de los dibujos que se acompañan;

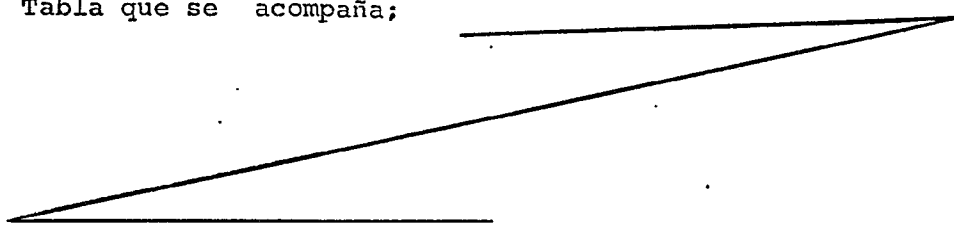
Espectro infrarrojo [CH₂Cl₂] tal como se indica en la Figura 2 de los dibujos que se acompañan;

Espectro de resonancia magnética nuclear de protones

20 [90 megaciclos por segundo; CDCl₃] tal como se indica en la Figura 3 de los dibujos que se acompañan;

Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono 13 [250 mg en 1,5 cc de CDCl₃; alcance de la curva descrita 6000 megaciclos por segundo] tal como se indica en la

25 Tabla que se acompaña;



Espectro de masa de alta resolución [aceleración de iones
4 kv; temperatura fuente de iones 290°C; presión 5.10^{-6} mm
Hg] pico de la masa más alta = m/e 1183,831 [$\pm 0,004$]
correspondiente a $C_{62}H_{109}N_{11}O_{11}$ que puede reconocerse
5 como producto de eliminación de agua de $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$;
Análisis elemental C 61,8, H 9,4, N 13,0, O 15,7 %
en concordancia con la fórmula empírica $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$;
y liberación de los aminoácidos alanina, ácido α -
aminobutírico, N-metil-leucina, N-metil-glicina y valina
10 al reaccionarse con ácido clorhídrico acuoso 6 normal al
reflujo; y
teniendo el antibiótico S 7481/F-2 las características
siguientes:-
Polvo amorfo, incoloro; P.F. 127-130°C (descomp.);
15 $[\alpha]_D^{20} = -243^\circ$ ($CHCl_3$, c = 0,5);
Espectro ultravioleta [CH_3OH ; c = 1,062 g/l; d = 0,01 cm]
tal como se indica en la Figura 4 de los dibujos que se
acompañan;
Espectro infrarrojo [CH_2Cl_2] tal como se indica en la
20 Figura 5 de los dibujos que se acompañan;
Espectro de resonancia magnética nuclear de protones
[90 megaciclos por segundo; $CDCl_3$] tal como se indica en
la Figura 6 de los dibujos que se acompañan;
Espectro de masa de alta resolución [aceleración de iones

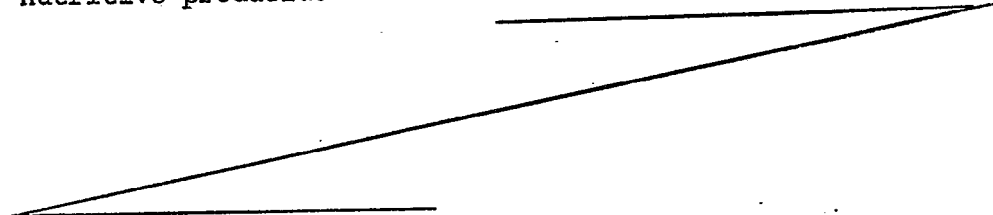
4 kv; temperatura: fuente de iones 290°C; presión
5.10⁻⁶ mm Hg] pico de la masa más ^{alta} 7 m/e 1169,815 (+
0,006 correspondiente a C₆₁H₁₀₇N₁₁O₁₁, el producto de
la eliminación de agua de C₆₁H₁₀₉N₁₁O₁₂; Y
5 Análisis elemental hallado C 61,7, H 9,1, N 13,1,
O 16,5 % en concordancia con la fórmula empírica
C₆₁H₁₀₉N₁₁O₁₂.

Cuando la cepa es una cepa de Cylindrocarpon
lucidum Booth, ésta preferentemente es la cepa NRRL 5760
10 descrita más adelante, o un equivalente taxonómico obvio
de la misma, o una mutante o variante de la misma.

Cuando la cepa es una cepa de Trichoderma
polysporum (Link ex Pers.) Rifai, ésta preferentemente
es la cepa NRRL 8044 descrita más adelante, o un equi-
15 valente taxonómico obvio de la misma, o una mutante o
variante de la misma.

La invención también proporciona los anti-
bióticos S 7481/F-1 y S 7481/F-2 tal como definidos ante-
riormente y descritos en la presente Memoria.

20 La invención también proporciona caldos de
fermentación producidos mediante el cultivo ya sea de
la cepa NRRL 5760 o de la cepa NRRL 8044, o un equiva-
lente taxonómico obvio de las mismas, sobre un medio
nutritivo producido sintéticamente.



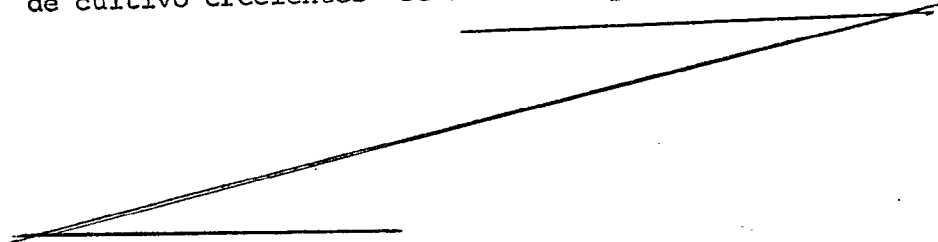
La nueva cepa de la especie de hongos Cylindrocarpon lucidum Booth, empleada en el procedimiento de la invención, fue aislada de una muestra de tierra hallada en el Estado de Wisconsin, EE.UU.A., y una muestra de dicha cepa ha sido depositada en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Northern Research and Development Division), Peoria, Ill., EE.UU.A., bajo la referencia NRRL 5760.

En sus características esenciales, la nueva cepa NRRL 5760 de Cylindrocarpon lucidum Booth concuerda con la descripción original (C. Booth 1966, The Genus Cylindrocarpon, Mycological Papers No. 104, 21). Sobre agar de dextrosa de patatas la cepa NRRL 5760 no forma ni clamidosporas ni microconidios. Sin embargo, también faltan las células parecidas a las clamidosporas de los macroconidios. Los macroconidios en forma de bananas, que generalmente están divididos por 3 paredes transversales, miden 28 - 45 x 4,8 - 5,7 μ y, por lo tanto, son considerablemente más pequeños que lo indicado en la descripción citada anteriormente (45 - 65 x 6 - 6,5 μ). Otra diferencia importante consiste en el grado de desarrollo; mientras que el tipo debe formar colonias midiendo 1 - 1,5 cm dentro de 7 días, la cepa NRRL 5760 se desarrolla hasta formar colonias midiendo 7 - 8 cm dentro del mismo tiempo, con lo cual se forma casi exclusivamente un micelio

del substrato incoloro o de color pardo sobre agar de dextrosa de patatas. Los conidióforos con las fialidas son formados ya después de algunos días en grupos y manojos compactos, son ramificados en forma penicilada o verticilada y forman macroconidios durante un período largo, acumulándose estos macroconidios en forma de masa viscosa de color beige.

La nueva cepa de la especie de hongos Trichoderma polysporum, empleada en el procedimiento de la invención, fue aislada de una muestra de tierra hallada en Noruega, y se ha depositado una muestra de dicha cepa en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Northern Research and Development Division), Peoria, Ill., EE.UU.A., bajo la referencia NRRL 8044.

La nueva cepa NRRL 8044 de Trichoderma polysporum (Link ex Pers.) Rifai crece sobre un agar de extracto de malta al 2 % a una temperatura entre 6° y 33° C, obteniéndose el desarrollo óptimo a alrededor de 24°C, formándose en el transcurso de 12 días colonias puramente blancas, superficialmente con aspecto de terciopelo y sin pliegues, con un diámetro de 40-45 mm. Sin embargo, a la temperatura más alta que permita un buen desarrollo (33°C) no se forma micelio aéreo, sino una colonia muy fuertemente plegada. Con temperaturas de cultivo crecientes se forma más y más un pigmento



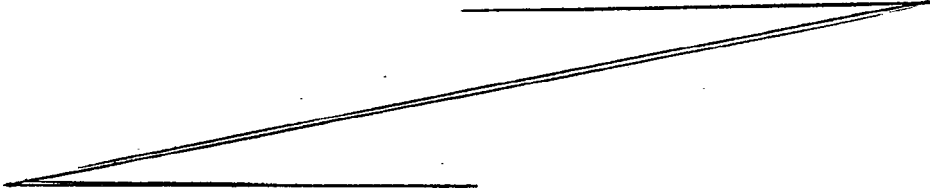
amarillo en la parte inferior de la colonia, difundiéndose este pigmento en el agar a 27°C y aun más pronunciadamente a 30-33°C.

Con el fin de formar conidióforos, los que se encuentran diseminados o en grupos compactos, especialmente sin embargo al borde del recipiente de cultivo, la nueva cepa de Trichoderma polysporum requiere de 15 a 20 días sobre agar de extracto de malta a 24°C. La morfología de la forma de paracarpio difiere ligeramente en algunas de sus características de la descripción de esta especie (M.A. Rifai 1969, A Revision of the Genus Trichoderma, Mycological Papers No. 116). Así, la rama principal de los conidióforos alcanza un diámetro de 2,0 - 3,8 μ solamente, mientras que se indican 4 - 6,3 μ para la especie. Las fialidas de la nueva cepa de Trichoderma polysporum son alargadas, especialmente al final de su desarrollo, siendo esto atípico para esta especie. Finalmente, los conidios son un poco más pequeños que lo indicado en la descripción de la especie, a saber 2,0 - 3,1 x 1,5 - 2,0 μ , al compararse con 2,4 - 3,8 x 1,8 - 2,2 μ . La presente cepa NRRL 8044 de Trichoderma polysporum no forma verdaderas clamidosporas bajo cualesquiera de las condiciones de cultivo indicadas.

Las nuevas cepas de hongos NRRL 5760 y NRRL 8044 pueden cultivarse sobre diversos medios nutritivos conteniendo los nutrimentos usuales para hongos.

Por ejemplo, tales cepas hacen uso de los nutrimentos generalmente empleados para organismos carbono-heterotróficos, por ejemplo sacarosa, glucosa, maltosa, lactosa, almidón, extracto de malta como fuente de carbono, com-
5 puestos orgánicos o inorgánicos conteniendo nitrógeno, tales como Cornsteep, peptona de soja, extractos de levadura o de carne, nitrato de sodio, sulfato de amonio, nitrato de amonio, aminoácidos, etc. como fuente de nitrógeno, así como las sales minerales y oligoelementos
10 usuales.

Los nuevos antibióticos S 7481/F-1 y S 7481/F-2 pueden producirse mediante

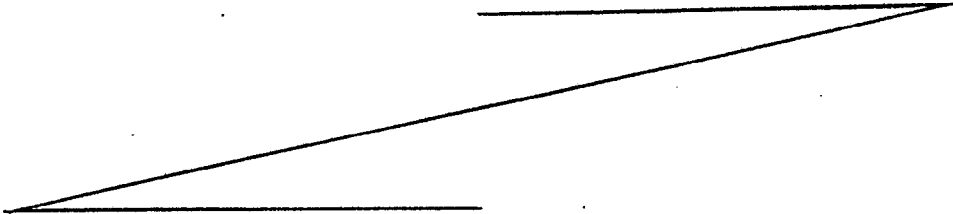
1. inoculación de un medio líquido con una suspensión de conidios o de micelio de la cepa NRRL 5760, e incuba-
15 ción del cultivo durante 9 a 13, preferentemente 11 días, a 24-30°C, preferentemente 27°C, y a un valor pH de 4,8 - 8,8, preferentemente 8,1. Este cultivo se efectúa en frascos de penicilina bajo condiciones aeróbicas mediante fermentación de cultivo de super-
20 ficie,
 2. inoculación de un medio líquido con una suspensión de conidios o de micelio de la cepa NRRL 8044, e incubación del cultivo durante 11 a 18, preferentemente 13 días, a 25-30°, preferentemente 27°C, y a un valor
25 pH de 4,3 - 6,2, preferentemente 5,6, en un fermentador de acero, con agitación (170 revoluciones por
- 

minuto) y con aeración (1 litro de aire/minuto/litro de solución nutritiva).

5 Tan pronto como se ha formado la cantidad máxima de antibióticos, éstos se obtienen del caldo de cultivo en forma conocida mediante métodos de extracción y/o de adsorción.

10 Un método conveniente consiste en la extracción del micelio obtenido del cultivo de la cepa de hongos NRRL 5760, facultativamente después de la conminución mecánica previa, con metanol al 90 %, la subsiguiente separación del metanol mediante evaporación, y la extracción repetida de la mezcla acuosa resultante con cloruro de etileno. El extracto de cloruro de etileno
15 obtenido del filtrado de cultivo puede añadirse a este extracto. Sin embargo, pueden usarse alternativamente otros disolventes orgánicos inmiscibles con agua, por ej. cloroformo, acetato de etilo, cloruro de metileno o acetato de butilo.

20 La solución orgánica se evapora hasta sequedad y el residuo se desengrasa, ya sea mediante cromatografía, por ej. sobre gel de sílice con cloroformo conteniendo una pequeña cantidad de metanol, por ej. a una proporción de 98 : 2, o mediante distribución entre éter de petróleo y metanol que ha sido mezclado con una



cantidad de agua suficiente para una separación de las fases. En el primer caso, las fracciones que son anti-
bióticamente activas contra *Aspergillus niger* se combi-
nan, se evaporan hasta sequedad, y el residuo se cromato-
grafía en solución metanólica sobre Sephadex LH 20.

5

En el segundo caso, la fase acuosa metanólica se concen-
tra, facultativamente después de la adición de una canti-
dad adicional de agua, hasta tal punto que se haya separa-
do la mayor cantidad del metanol mediante destilación,

10

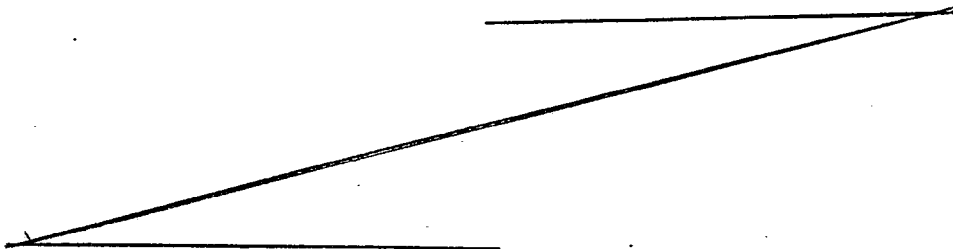
después de lo cual se extrae la mezcla acuosa con cloruro
de etileno o con otro de los disolventes inmiscibles con
agua, arriba mencionados, la solución orgánica resultante
se evapora hasta sequedad, y el residuo se cromatografía
en solución metanólica sobre Sephadex LH 20. La uite-

15

rior separación y purificación de los dos antibióticos se
efectúa mediante cromatografía repetida sobre óxido de
aluminio o gel de sílice o mediante el uso sucesivo de
ambos adsorbentes.

20

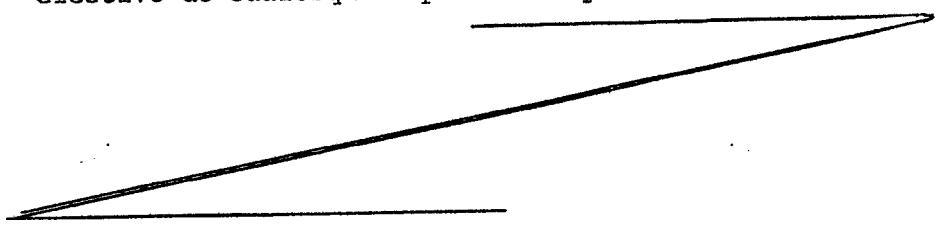
Otro método conveniente consiste en la
extracción del caldo de cultivo obtenido del cultivo de
la cepa de hongos NRRL 8044 con un disolvente inmisible
con agua, facultativamente después de la conminución
mecánica previa. Se prefiere usar cloruro de etileno
como disolvente, pero pueden usarse alternativamente:



cloroformo, acetato de etilo, cloruro de metileno o acetato de butilo. La fase orgánica se separa, se seca y se concentra mediante evaporación. El residuo se cromatografía, preferentemente con una solución de metanol sobre Sephadex LH 20, con lo cual las fracciones que son 5 activas contra *Aspergillus niger* se combinan y se cromatografían nuevamente sobre óxido de aluminio con tolueno al que se le han añadido 10 - 50 % de acetato de etilo. La detección de los antibióticos activos se efectúa 10 igualmente examinando la actividad contra *Aspergillus niger*. La purificación de los dos antibióticos se efectúa mediante cromatografía adicional.

Para la producción de los nuevos anti- bióticos, también es posible usar otras cepas obtenidas, 15 por ejemplo, por selección o mutación mediante irradiación ultravioleta o rayos X, o por otros medios, por ejemplo mediante tratamiento de cultivos de laboratorio con sustancias químicas adecuadas.

Las cepas NRRL 5760 y 8044 arriba menciona- 20 das son fácilmente obtenibles para el público de la depositaria del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, arriba mencionada, y también del poseedor de la patente, y seguirán siendo disponibles como cepas de trabajo durante todo el período de vigencia efectivo de cualesquier patente expedida sobre

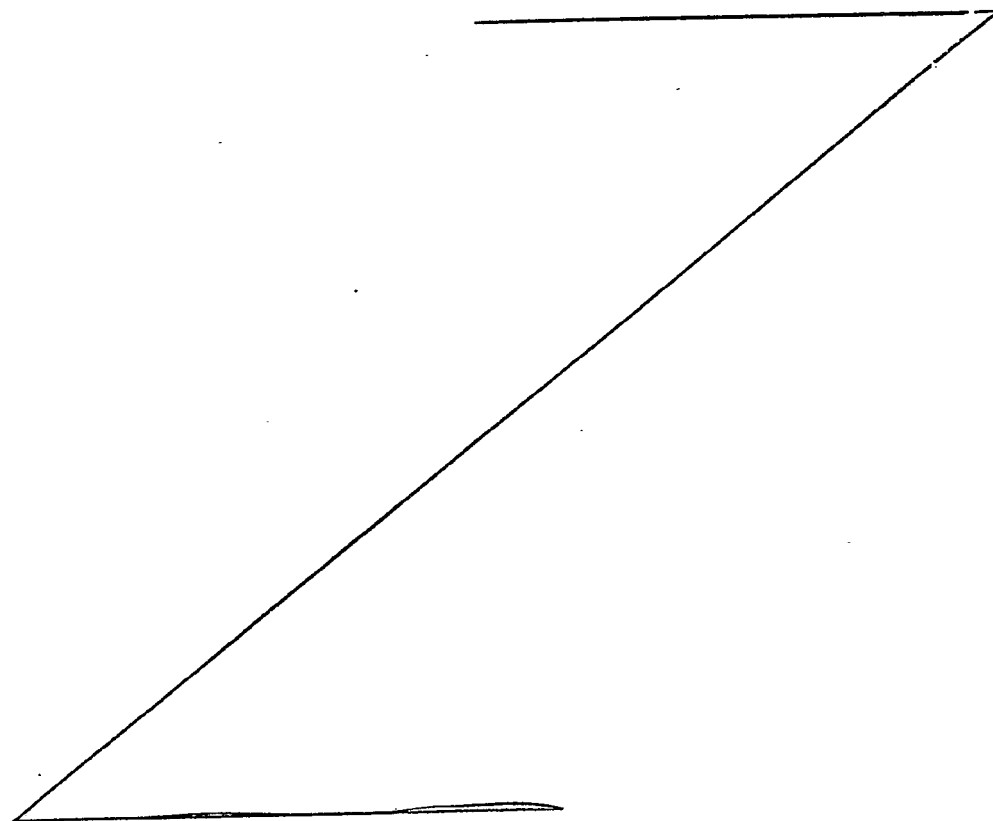


las mismas. Cualesquier restricciones en cuanto a la disponibilidad de las cepas arriba mencionadas para el público ya han sido eliminadas irrevocablemente.

En los siguientes Ejemplos no limitativos,
5 todas las temperaturas están indicadas en grados Celsius. Todos los valores mencionados en la presente Memoria están sujetos al error experimental usual a menos que se hagan otras indicaciones.

"Polygram" es una marca registrada para
10 soportes de lámina plástica para el gel de sílice, adecuados para la cromatografía de capa delgada.

"Sephadex LH 20" es una marca registrada para un gel de sílice adecuado para la cromatografía de columna.

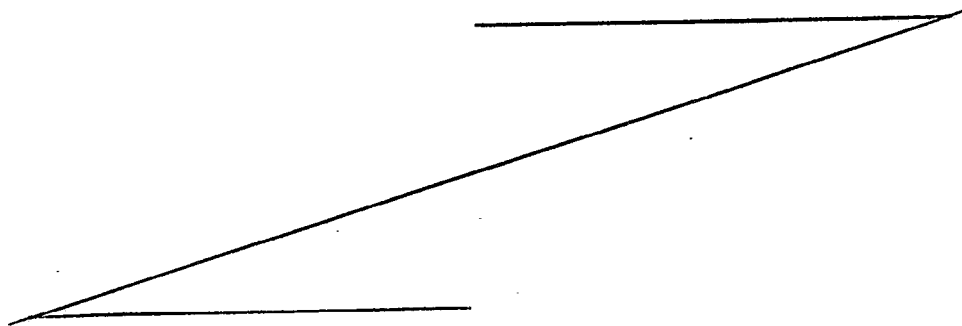


EJEMPLO 1:

10 litros de una solución nutritiva (de la cual cada litro contiene 30 g de sacarosa, 10 g de Corn steep, 3 g de NO_3Na , 1 g de PO_4HK_2 , 0,5 g de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de ClK y 0,01 g de $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) se inoculan con 100 cc de una suspensión de conidios y micelio de la cepa NRRL 5760, y se incuba en frascos de penicilina de 700 cc a 27° durante 11 días.

El micelio, que ha sido separado del líquido de cultivo, se extrae en un aparato Turrax mediante desmenuzamiento y agitación con 3,5 litros de metanol al 90 %, y el micelio desmenuzado, que se separa del disolvente mediante filtración con succión, se trata nuevamente 2 veces del mismo modo con metanol al 90 %. Los filtrados combinados se concentran mediante evaporación en vacío a una temperatura del baño de 40° hasta tal punto que el vapor consista principalmente de agua sola. La mezcla resultante se extrae 6 veces con el mismo volumen de cloruro de etileno mediante sacudimiento, después de lo cual las soluciones combinadas de cloruro de etileno se purifican mediante extracción con agua y se extraen mediante evaporación en vacío a una temperatura del baño de 40° . El residuo resultante se cromatografía sobre 250 g de gel de sílice (gel de sílice 60 "Merck", tamaño del grano 0,063-0,200 mm), usando cloroformo

conteniendo 2 % de metanol como eluyente, y se recoge en fracciones de 200 cc. Las fracciones que son anti-bióticamente activas contra *Aspergillus niger* en el ensayo de difusión en placas, se combinan, se evaporan hasta sequedad en la forma arriba descrita, y después de disolver en metanol se cromatografian sobre 110 g de Sephadex LH 20 con el mismo disolvente, después de lo cual las fracciones de 20 cc que exhiben un efecto anti-biótico contra *Aspergillus niger* en el ensayo arriba indicado, se combinan. Un ensayo en el cromatograma de capa delgada, p.ej. con gel de sílice sobre láminas de "Polygram" y hexano/acetona (1:1) como eluyente, indica que el residuo de la solución de metanol evaporada en la forma arriba descrita consiste principalmente de los dos nuevos antibióticos S 7481/F-1 y S 7481/F-2. Estos se separan y se purifican simultáneamente mediante una cromatografía adicional de la mezcla de los mismos, usando una cantidad 1000 veces mayor de gel de sílice de la calidad arriba indicada y cloroform conteniendo 2 % de metanol. Un examen de las fracciones del producto de elución, con un volumen en mililitros que asciende a la mitad del peso del gel de sílice en gramos, en el cromatograma de capa delgada, indica que el antibiótico S 7481/F-1 aparece en primer lugar en el producto de elución, seguido por una mezcla de los dos antibióticos



y finalmente por S 7481/F-2 homogéneo. Pueden obtenerse cantidades adicionales de los dos antibióticos de la mezcla repitiendo la cromatografía bajo las mismas condiciones.

5 El nuevo antibiótico S 7481/F-1 puede caracterizarse como sigue:

Polvo amorfo, incoloro, con un P.F. de 137-140° (descomp.); $[\alpha]_D^{20} = -236^\circ$ (CHCl₃, c = 0,5);

10 espectro ultravioleta: véase la Figura 1; espectro infrarrojo: véase la Figura 2; resonancia magnética nuclear de protones: véase la Figura 3; resonancia magnética nuclear de C¹³: véase la Tabla.

15 Espectro de masa (espectrógrafo de masa CEC 21-110B, fuente de iones E.B., sistema de admisión: directo, energía de electrones: 70 eV, aceleración de iones: 4 kV, temperatura de la fuente de iones: 290°, presión: 5.10⁻⁶ mm Hg, procedimiento de emparejamiento de picos, substancia de referencia "PCR 8" [tris-pentadecafluoroheptil-1,3,5-triacina, M = 1184, 9374]: pico de masa 20 más alto m/e = 1183,831 (\pm 0,004), correspondiendo a la masa del ion C₆₂H₁₀₉N₁₁O₁₁, el producto de eliminación de agua de la molécula C₆₂H₁₁₁N₁₁O₁₂.

25 Solubilidad: fácilmente soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos usuales, prácticamente insoluble en éter de petróleo y agua. Comportamiento en el

cromatograma de capa delgada (manchas de la substancia hechas visibles con vapor de yodo):

- a) gel de sílice sobre placas de vidrio; cloroformo + 4 % de metanol como eluyente: $R_f = 0,52$;
- 5 b) gel de sílice sobre láminas de "Polygram"; hexano/acetona 1:1 como eluyente: $R_f = 0,37$; cloroformo/acetona 2:1 como eluyente: $R_f = 0,34$.

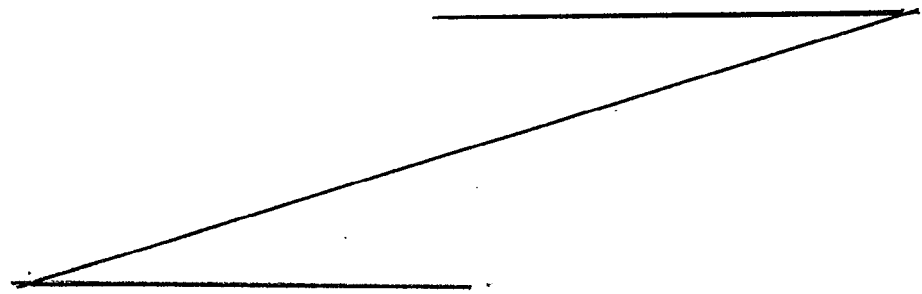
Análisis elemental (muestra disuelta en benceno, solución evaporada hasta sequedad, residuo secado en alto vacío a 100° durante 5 horas): hallado C 61,8, H 9,4, N 13,0, O 15,7 %.

Los valores hallados concuerdan con la fórmula empírica $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$.

Los aminoácidos alanina, ácido α -aminobutírico, N-metil-leucina, N-metilglicina y valina pueden descubrirse en el producto de hidrólisis obtenido mediante ebullición del compuesto S 7481/F-1 con ácido clorhídrico 6 normal (20 horas).

El nuevo antibiótico S 7481/F-2 puede caracterizarse como sigue:

Polvo amorfo, incoloro, con un P.F. de $127-130^\circ$ (descomp.); $[\alpha]_D^{20} = -243^\circ$ (cloroformo, $c = 0,5$); espectro ultravioleta: véase la Figura 4; espectro infrarrojo: véase la Figura 5; resonancia magnética nuclear de protones: véase la Figura 6.



Espectro de masa (tomado bajo condiciones iguales como para el antibiótico S 7481/F-1): pico de masa más alto $m/e = 1169,815 (\pm 0,006)$, correspondiendo a la masa del ion $C_{61}H_{107}N_{11}O_{11}$, el producto de eliminación de agua de la molécula $C_{61}H_{109}N_{11}O_{12}$.

Solubilidad: fácilmente soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos usuales, prácticamente insoluble en éter de petróleo y agua. Comportamiento en el cromatograma de capa delgada (manchas de la sustancia hechas visibles con vapor de yodo):

- a) gel de sílice sobre placas de vidrio; cloroformo + 4 % de metanol como eluyente: $R_f = 0,46$;
- b) gel de sílice sobre láminas de "Polygram"; hexano/acetona 1:1 como eluyente: $R_f = 0,28$; cloroformo/acetona 2:1 como eluyente: $R_f = 0,26$.

Análisis elemental (muestra secada en alto vacío a 100° durante 5 horas): hallado C 61,7, H 9,1, N 13,1, O 16,5 %.

Los valores hallados concuerdan con la fórmula empírica $C_{61}H_{109}N_{11}O_{12}$.

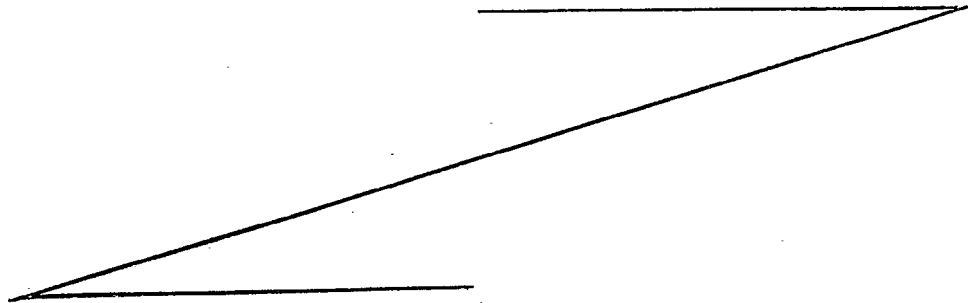
La suspensión de conidios y micelio, usada como material inicial para la inoculación, se produce a partir de un cultivo de la cepa NRRL 5760 aislada originalmente, que se cultiva durante 10 días sobre un medio de agar, del cual cada litro contiene 20 g de extracto

de malta, 20 g de agar, 4 g de extracto de levadura, y agua desmineralizada. Los conidios y el micelio se recogen en una solución fisiológica de sal común. Esta suspensión se usa para la inoculación de la solución nutritiva arriba indicada.

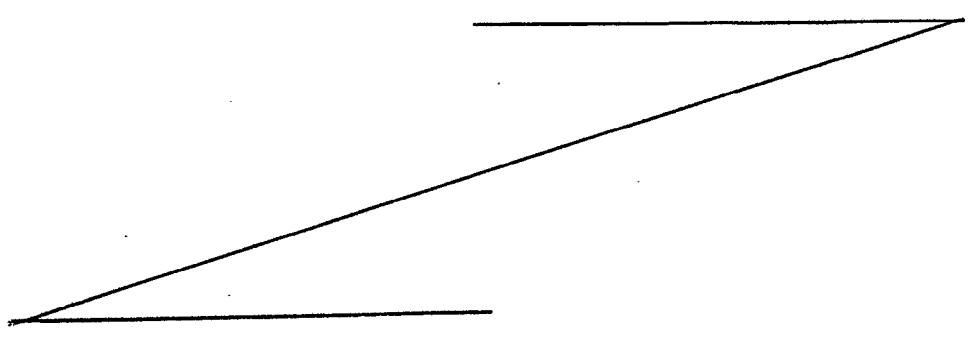
EJEMPLO 2:

250 litros de una solución nutritiva (de la cual cada litro contiene 30 g de sacarosa, 10 g de Corn steep, 3 g de NO_3Na , 1 g de PO_4HK_2 , 0,5 g de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de ClK y 0,01 g de $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) se inoculan con 2,5 litros de una suspensión de conidios y micelio de la cepa NRRL 5760, y se incuban en frascos de penicilina de 700 cc a 27° durante 11 días.

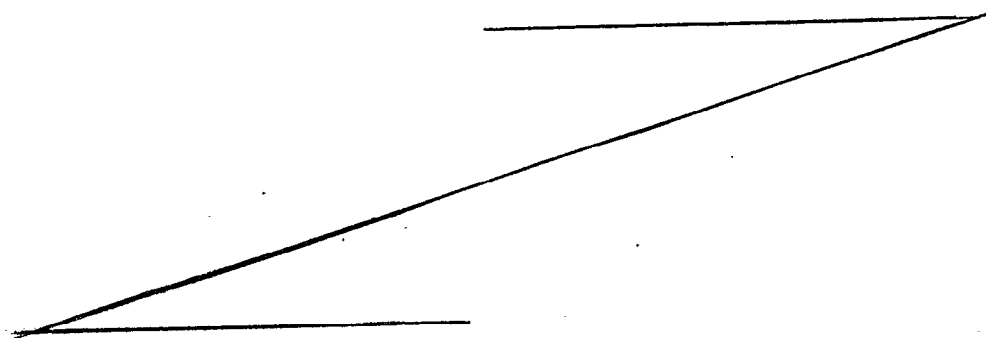
El micelio se separa del líquido de cultivo mediante centrifugación y se homogeniza en un aparato Ultraturrax con 80 litros de metanol al 90 %, después de lo cual la solución del extracto metanólico se separa del material sólido mediante centrifugación, y los sólidos se extraen nuevamente 2 veces del mismo modo con metanol al 90 %. Las soluciones combinadas del extracto se concentran hasta 15 litros en un vacío a $30-40^\circ$. La fase acuosa resultante se extrae 8 veces con el mismo volumen de cloruro de etileno. Cada uno de los extractos de cloruro de etileno se lava con 5 litros de agua. Las soluciones de cloruro de etileno se combinan y luego se



concentran mediante evaporación en vacío a 30-40°. Se
desengrasa dividiendo el residuo del extracto entre
éter de petróleo y metanol al 90 % de tal modo que
después de la disolución en 2 litros de metanol al 90 %,
5 se sacude sucesivamente 3 veces con 2 litros de éter de
petróleo cada vez (P.E. 30-35°) en tres embudos de sepa-
ración, después de lo cual las tres fases de éter de
petróleo se extraen nuevamente 2 veces sucesivamente con
2 litros de metanol al 90 % cada vez. A las soluciones
10 metanólicas combinadas se les añaden 3 litros de agua, y
la mezcla se concentra a 30-40° hasta un volumen de dos
litros. El concentrado acuoso se extrae sacudiendo
5 veces con 2 litros de cloruro de etileno; las solucio-
nes de cloruro de etileno se lavan con cantidades de
15 0,5 litros de agua, se combinan y se evaporan hasta
sequedad en vacío a 30-40°. El residuo se somete a cromatografía sobre una cantidad 25 veces mayor por volumen de
Sephadex LH 20, usándose metanol como eluyente. El pro-
ducto de la elución se recoge en fracciones de 250 cc;
20 las fracciones que exhiben un efecto antibiótico contra
Aspergillus niger en el ensayo de difusión en placas, se
combinan y se evaporan hasta sequedad en vacío a 30-40°.
El residuo se cromatografía a continuación sobre una can-
tidad 70 veces mayor de óxido de aluminio (néutro) de
25 actividad 1, usándose mezclas de tolueno y acetato de



etilo para la elución. Las primeras diez fracciones (volumen de las fracciones: la mitad de litros como de adsorbente en kg), eluidas con tolueno conteniendo 15 % de acetato de etilo, primero indican la cantidad mayor del antibiótico S 7481/F-1, seguido por una mezcla de S 7481/F-1 y S 7481/F-2. Una cantidad adicional de la misma mezcla, conteniendo una pequeña cantidad de material extraño, puede obtenerse mediante subsiguiente elución con tolueno/acetato de etilo (1:1). El descubrimiento de los antibióticos en las fracciones del producto de elución se efectúa mediante cromatografía de capa delgada, p.ej. con gel de sílice sobre láminas de "Polygram" y hexano/acetona (1:1) como eluyente. El antibiótico S 7481/F-1 se obtiene de las fracciones combinadas conteniendo el antibiótico S 7481/F-1 en forma homogénea, mediante evaporación en vacío a 30-40° y subsiguiente secamiento del residuo en alto vacío a 50°. Las fracciones combinadas del producto de elución, conteniendo la mezcla, también se evaporan bajo las mismas condiciones. Para la obtención de una cantidad adicional del antibiótico S 7481/F-1 y de S 7481/F-2 homogéneo, se somete el residuo a cromatografía sobre una cantidad 1000 veces mayor de gel de sílice, usándose como eluyente cloroformo conteniendo 2 % de metanol, y procediendo en forma análoga a la descrita en el Ejemplo 1.



EJEMPLO 3:

500 litros de una solución nutritiva (de la cual cada litro contiene 40 g de glucosa, 5 g de peptona de caseína, 5 g de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 2 g de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 3 g de NO_3Na , 0,5 g de ClK , 0,01 g de SO_4Fe , y agua desmineralizada) se inoculan con 50 litros de un cultivo previo de la cepa NRRL 8044, y se incuba en un fermentador de acero a 27° durante 13 días con agitación (170 revoluciones/minuto) y aeración (1 litro de aire/minuto/litro de solución nutritiva).

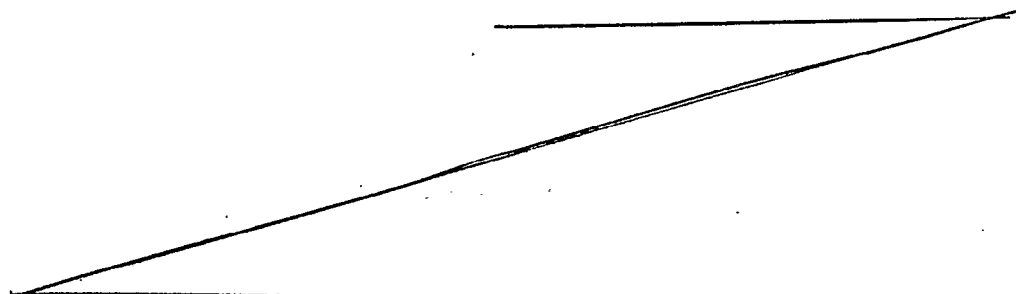
500 litros del líquido de cultivo se desmenuzan con un aparato Ultraturrax y se extraen varias veces con cantidades de 500 litros de 1,2-dicloroetano. La fase orgánica se separa, se seca sobre sulfato de sodio y se concentra mediante evaporación en vacío. El residuo de la evaporación se cromatografía sobre una cantidad 100 veces mayor de Sephadex LH 20 con metanol. Las fracciones que son activas contra *Aspergillus niger* se combinan, y la mezcla se cromatografía sobre una cantidad 100 a 200 veces mayor de óxido de aluminio neutro (actividad 1). Se efectúa la elución con tolueno al que se le han añadido 10-50 % de acetato de etilo. Primero se eluyen principalmente productos laterales, luego S 7481/F-1, y finalmente S 7481/F-2. El descubrimiento de los antibióticos activos en las fracciones se efectúa

nuevamente examinando la actividad contra *Aspergillus niger*; la pureza se examina mediante cromatografía de capa delgada sobre placas de gel de sílice con cloroformo/metanol (96:4), haciéndose visibles los anti-
5 bióticos con vapor de yodo. Las fracciones puras se combinan y se trituran con hexano, con lo cual se obtienen los antibióticos S 7481/F-1 y S 7481/F-2 en forma de un polvo blanco, amorfo, el que se seca en alto vacío a 50°.

El cultivo previo usado como material inicial
10 se obtiene como sigue:

La suspensión de esporos y micelio, usada para la inoculación, se produce a partir de un cultivo de la cepa NRRL 8044, aislada originalmente, que se cultiva durante 21 días a 27° sobre un medio de agar (del cual
15 cada litro contiene 20 g de extracto de malta, 20 g de agar, 4 g de extracto de levadura, y agua desmineralizada). Los esporos y el micelio de este cultivo se recogen en una solución fisiológica de sal común.

Esta suspensión se usa para la inoculación de
20 50 litros de una solución nutritiva con la misma composición como el contenido del fermentador de acero de 500 litros, y se incuba en un fermentador de acero a 27° durante 3 horas con agitación (200 revoluciones/minuto) y aeración (1 litro de aire/minuto/litro de solución
25 nutritiva). Esta solución de fermentación se usa como material de inoculación para el fermentador de acero de 500 litros.



Los antibióticos S 7481/F-1 y S 7481/F-2 exhiben propiedades farmacológicas, por ejemplo inhiben el desarrollo de *Aspergillus niger*.

Además, los antibióticos exhiben un efecto
5 inhibidor de la artritis, tal como lo demuestran las pruebas usuales, por ejemplo por un efecto inhibidor de inflamaciones en la prueba del período latente de la artritis por adyuvante de Freund en ratas y en la prueba de la terapia de la artritis por adyuvante de Freund en
10 ratas.

Por lo tanto, el uso de los antibióticos está indicado como agentes inhibidores de la artritis.

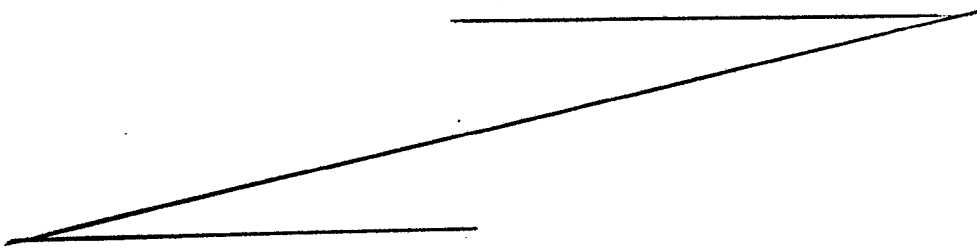
Los antibióticos exhiben un efecto inmunosupresivo con poca actividad citostática, como lo indican
15 las pruebas siguientes usando S 7481/F-1:-

a) Hemólisis local en gel in vitro, prueba de Jerne:

La inhibición de las zonas de hemólisis en % en comparación con los controles es de 99 % a una dosis de 2 x 60 mg/kg i.p., de 90 % a una dosis de 1 x 150
20 mg/kg p.o., y de 99,5 % a una dosis de 3 x 200 mg/kg p.o. Se inhibe la formación de anticuerpos inmunoglobulina M y anticuerpos inmunoglobulina G.

b) Prueba de hemaglutinación en ratones:

Se detectan los anticuerpos formados contra



los eritrocitos de ovejas. La inhibición se expresa en el índice supresivo (IS), indicándose los controles no tratados por 1,00; IS = 0,3 después de 5 x 200 mg/kg p.o.

5 c) Prueba de trasplante de piel en ratones:

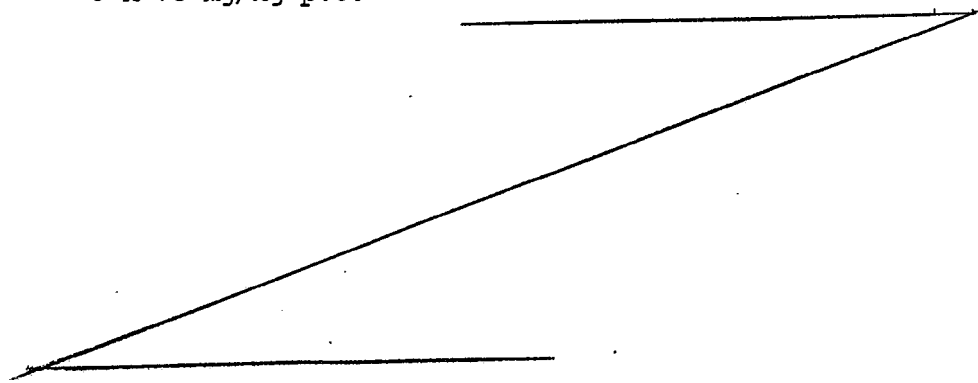
La prolongación del período de supervivencia del injerto de piel en ratones compatibles con histoina H-2 es aumentada considerablemente después de una dosis de 10 x 200 mg/kg p.o., al compararse con los animales de control no tratados: aprox. 16 días más que los controles.

d) Encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) en ratas:

Los daños a los tejidos nerviosos, inducidos experimentalmente, paralizan a 8 de 10 animales en los animales de control no tratados, pero en el caso de un número igual de animales de ensayo tratados con 13 x 25 mg/kg i.p., se obtiene una protección del 100 %.

e) Prueba de la oxazolona en ratones:

La reducción de la hinchazón de la oreja se expresa como índice supresivo (IS); IS = 0,6 después de 6 x 75 mg/kg p.o.



f) Citopenias en la médula ósea y en la sangre:

La alta aplicación oral de 6 x 500 mg/kg no muestra una depresión significativa de las células formadoras de sangre en la médula ósea ni tampoco hipoleucocitosis en la sangre el primer, tercer y sétimo día después de la última aplicación del compuesto.

Por lo tanto, el uso de los antibióticos está indicado además en el tratamiento de enfermedades autoinmunizantes, por ej. en el tratamiento de la repulsión provocada por los trasplantes de piel.

Para todos los usos arriba indicados, una dosificación diaria indicada es de aprox. 50 a aprox. 900 mg, aplicados convenientemente en dosis divididas 2 a 4 veces por día en forma de unidad de dosis que contiene desde aprox. 12 hasta aprox. 450 mg, o en forma de preparación de acción prolongada.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que contiene el antibiótico S 7481/F-1 o S 7481/F-2 en forma pura o como concentrado, bruto, farmacéuticamente aceptable, en asociación con un diluyente o soporte farmacéutico. Tales composiciones pueden elaborarse empleando las técnicas usuales y pueden presentarse en forma de una solución o de una tableta.

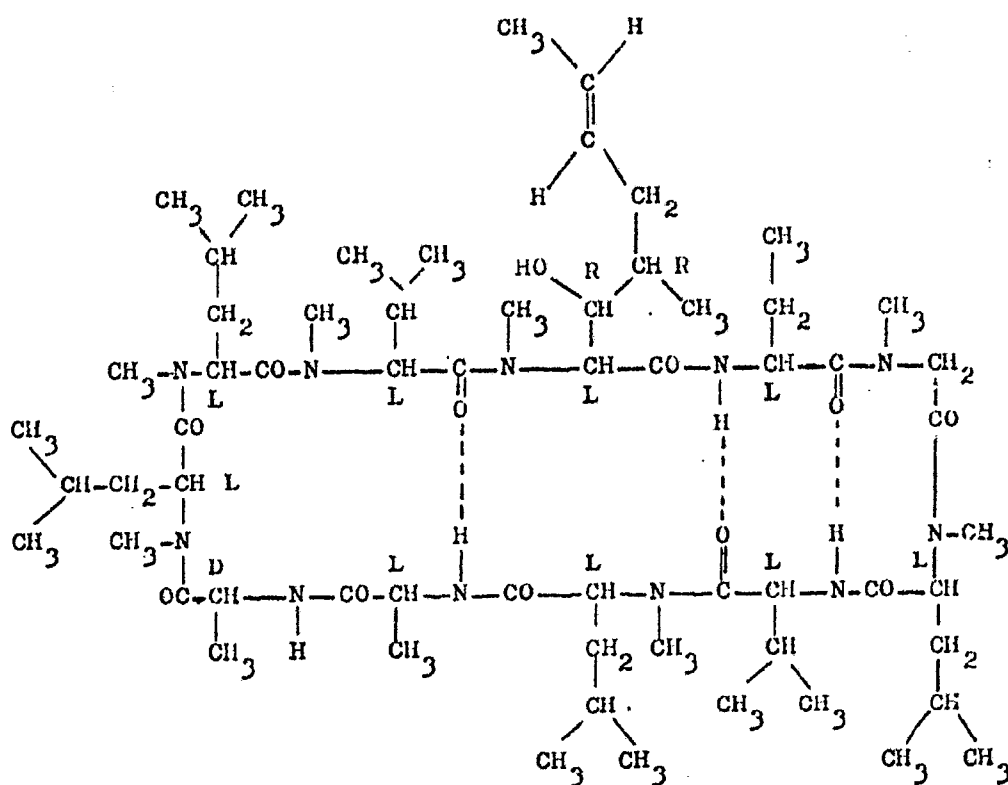
Datos del espectro C^{13} de S 7481/F-1; 260 mg en 1,5 cc de $CDCl_3$; Bruker HX-90E; alcance de la curva descrita 6000 ciclos por segundo.

Dirección	Frecuencia [ciclos por segundo]	δ [ppm]	Intensidad
126 ϕ	3915.5273	173.0237	184
1264	3909.6679	172.7648	192
1293	2867.1875	170.8876	91
1299	3858.3984	170.4992	215
1312	3839.3554	169.6577	207
1317	3832.0312	169.3341	268
1937	2923.8281	129.2014	220
1992	2843.2617	125.6412	225
2745	1740.2343	76.8994	20
2785	1681.6406	74.3102	165
3027	1327.1484	58.6455	187
3042	1305.1757	57.6745	223
3047	1297.8515	57.3509	253
3051	1291.9921	57.0920	40 *
3081	1248.0468	55.1501	844
3159	1133.7890	50.1011	172
3184	1097.1679	48.4828	566
3189	1089.8437	48.1592	276
3239	1016.6015	44.9227	206
3305	919.9218	40.6505	158
3327	887.6953	39.2264	192
3332	880.3710	38.9028	222
3357	843.7500	37.2845	167
3363	834.9609	36.8961	30 *
3380	810.0585	35.7957	567
3387	799.8046	35.3426	304
3411	764.6484	33.7891	182
3449	708.9843	31.3294	167
3454	801.6601	31.0057	518
3475	670.8984	29.6464	544
3478	666.5039	29.4522	179
3486	654.7851	28.9343	310
3543	571.2890	25.2447	287
3549	562.5000	24.8563	631
3553	556.6406	24.5974	843
3566	537.5976	23.7559	1000
3574	525.8789	23.2381	762
3582	514.1601	22.7202	58 *
3596	493.6523	21.8140	606
3607	477.5390	21.1020	231
3622	455.5664	20.1310	165
3628	446.7773	19.7427	254
3645	421.8750	18.6422	285
3650	414.5507	18.3186	314
3654	408.6914	18.0597	278
3658	402.8320	17.8007	277
3674	379.3945	16.7651	224
3688	358.8867	15.8588	202
3781	222.6562	9.8389	139
3933	0.0000	0.0000	111 \equiv tetrametilsilano

* Señales registradas de $CDCl_3$ y resonancias.

La estructura de S 7481/F-1 es según

se detalla:



N O T A

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 solicitudes de patentes, presentadas en Suiza, bajo los números 17111/73, de fecha de 6 de diciembre de 1-973, y 14043/74, de fecha de 21 de octubre de 1.974, accogiéndose 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 España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ANTIBIOTICOS; caracterizándose por lo siguiente:

1ª.- Procedimiento para la producción de antibióticos denominados, S 7481/F-1, de fórmula indicada anteriormente, S 7481/F-2, ó S 7481/F-1 y S7481/F-1 teniendo el antibiótico S 7481/F-1 las características siguientes:

Polvo amorfo, incoloro; P.F. 137-140°C (descomp.);

$[\alpha]_D^{20} = -236^\circ$ (CHCl₃; c = 0,5);

Espectro ultravioleta [CH₃OH; c = 1,063 g/l; d = 0,01 cm] tal como se indica en la figura 1 de los dibujos que se acompañan;

Espectro infrarrojo [CH₂Cl₂] tal como se indica en la figura 2 de los dibujos que se acompañan;

Espectro de resonancia magnética nuclear de protones [90 megaciclos por segundo; CDCl₃] tal como se indica

en la Figura 3 de los dibujos que se acompañan;
Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono
13 [250 mg en 1,5 cc de CDCl_3 ; alcance de la curva
descrita 6000 megaciclos por segundo] tal como se
indica en la Tabla que se acompaña;

Espectro de masa de alta resolución [aceleración
de iones 4 kv; temperatura fuente de iones 2900°C;
presión $5 \cdot 10^{-6}$ mm Hg] pico de la masa más alta
= m/e 1183,831 [0,004] correspondiente a

$\text{C}_{62}^{12}\text{H}_{109}^{1}\text{N}_{11}^{14}\text{O}_{11}^{16}$ que puede reconocerse como producto
de aliminación de agua de $\text{C}_{26}^{12}\text{H}_{111}^{1}\text{N}_{11}^{14}\text{O}_{12}^{16}$;

Análisis elemental C 61,8, H 9,4, N 13,0, O 15,7 %

en concordancia con la fórmula empírica $\text{C}_{62}^{12}\text{H}_{111}^{1}\text{N}_{11}^{14}\text{O}_{12}^{16}$
y liberación de los aminoácidos alanina, ácido α -

aminobutírico, N-metil-leucina, N-metil-glicina y
valina al reaccionarse con ácido clorhídrico acuoso
6 normal al reflujo; y

teniendo el antibiótico S 7481/F-2 las característi-
cas siguientes:-

Polvo amorfo, incoloro; P.F. 127-130°C (descomp.);

$[\alpha]_D^{20} = -243^\circ$ (CHCl_3 , c = 0,5);

Espectro ultravioleta [CH_3OH ; c = 1,062 g/l; d =
0,01 cm] tal como se indica en la Figura 4 de los
dibujos que se acompañan;

Espectro infrarrojo [CH_2Cl_2] tal como se indica
en la Figura 5 de los dibujos que se acompañan;

Espectro de resonancia magnética nuclear de protones
[90 megaciclos por segundo; CDCl_3] tal como se in-
dica en la Figura 6 de los dibujos que se acompañan;

Espectro de masa de alta resolución [aceleración de

iones 4 kv; temperatura fuente de iones 2900°C;
presión $5 \cdot 10^{-6}$ mm Hg] pico de la masa más alta
m/e 1169,815 ($\pm 0,006$) correspondiente a $C_{61}H_{107}N_{11}O_{12}$
el producto de la eliminación de agua de $C_{61}H_{109}N_{11}O_{12}$
y

5
Análisis elemental hallado C 61, 7, H 9,1, N 13,1,
O 16,5 % en concordancia con la fórmula empírica

$C_{61}H_{109}N_{11}O_{12}$; caracterizado porque se cultiva una
cepa productora de S 7481/F-1, S 7481/F-2, o S

10
7481/F-1 y S 7481/F-2 de la especie de hongos
Cylindrocarpon lucidum Booth o Trichoderma polysporum
(Link ex Pers.) Rifai en contacto con un medio nutri-
tivo y porque se aísla S 7481/F-1, S 7481/F-2, o
S 7481/F-1 y S 7481/F-2.

15
2a.- Procedimiento según la reivin-
dicación 1a, caracterizado porque la cepa es una
cepa de Cylindrocarpon lucidum Booth.

20
3a.- Procedimiento según la reivin-
dicación 2a, caracterizado porque la cepa es NRRL
5760, un equivalente taxonómico obvio de la misma,
o una mutante o variante de la misma.

25
4a.- Procedimiento según la reivin-
dicación 3a, caracterizado porque la cepa es NRRL
5760 o un equivalente taxonómico obvio de la misma.

5a.- Procedimiento según la reivin-
dicación 1a, caracterizado porque la cepa es una
cepa de Trichoderma polysporum (Link ex Pers.) Rifai.

30
6a.- Procedimiento según la reivin-
dicación 5a, caracterizado porque la cepa es NRRL
8044 o un equivalente taxonómico obvio de la misma,

o una mutante o variante de la misma.

7ª.- Procedimiento según la reivindicación 6ª, caracterizado porque la cepa es NRRL 8044 o un equivalente taxonómico obvio de la misma.

5

8ª.- Procedimiento para la producción de antibióticos; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria e ilustrado en los dibujos adjuntos.

10

Esta Memoria consta de 31 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

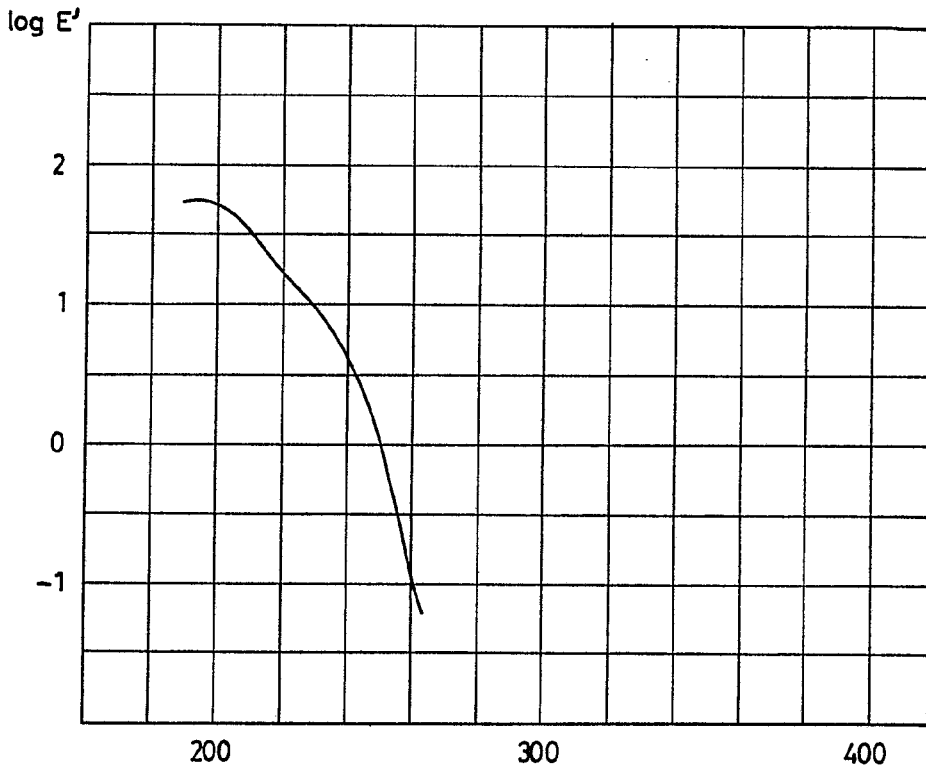
27 AGO. 1976

SANDOZ, A.G.

BONEZ ACEROS Y MOJES
P. P. Firmados L. García Fernández

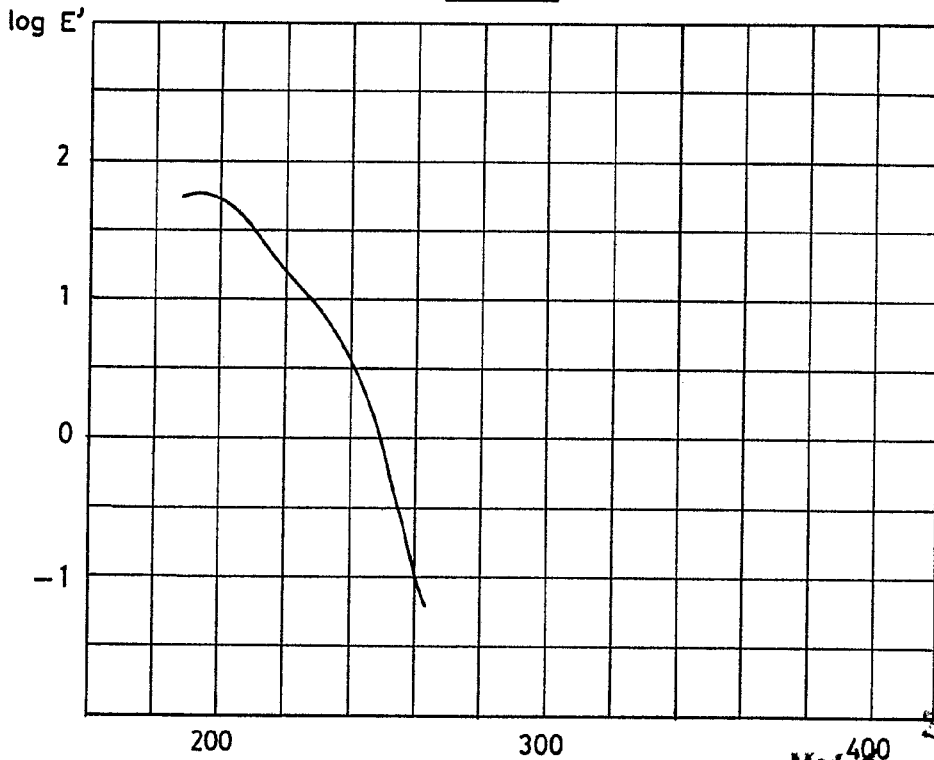


FIG. 1



ESCALA
VARIABLE

FIG. 4



ESCALA VARIABLE.

400
Madrid 7 ABO. 1976

RODRIGUEZ ACERIL Y CA
Sociedad L. Gasta Familiar
[Handwritten signature]

FIG. 2

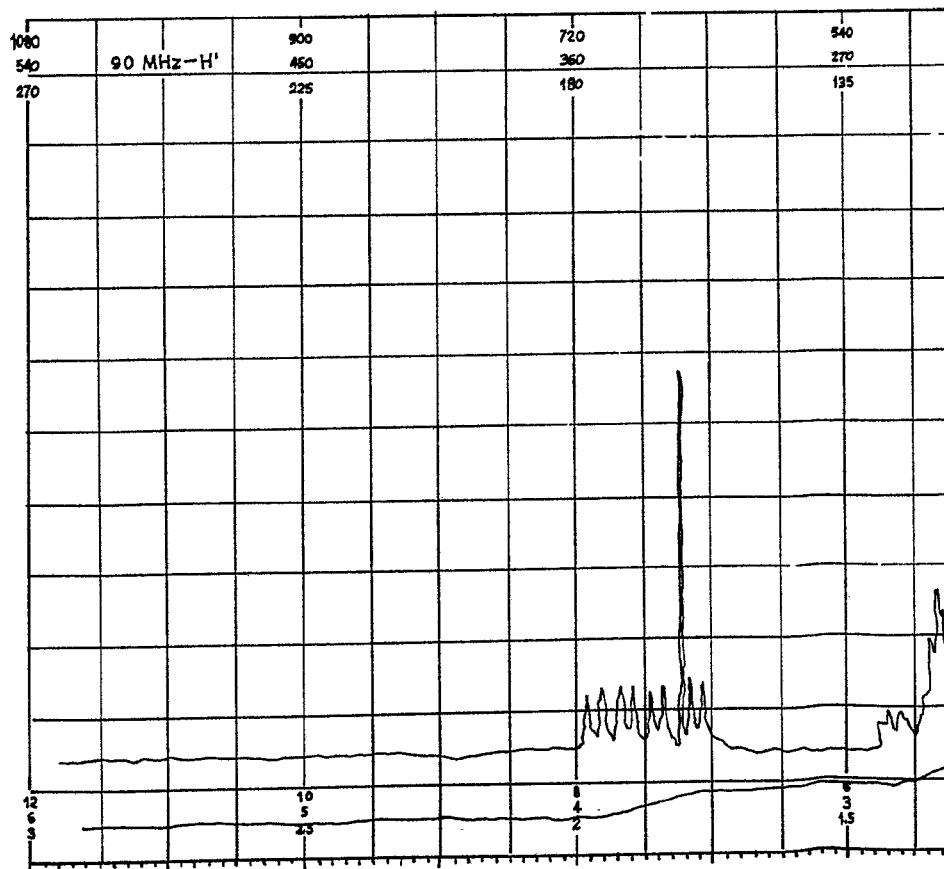
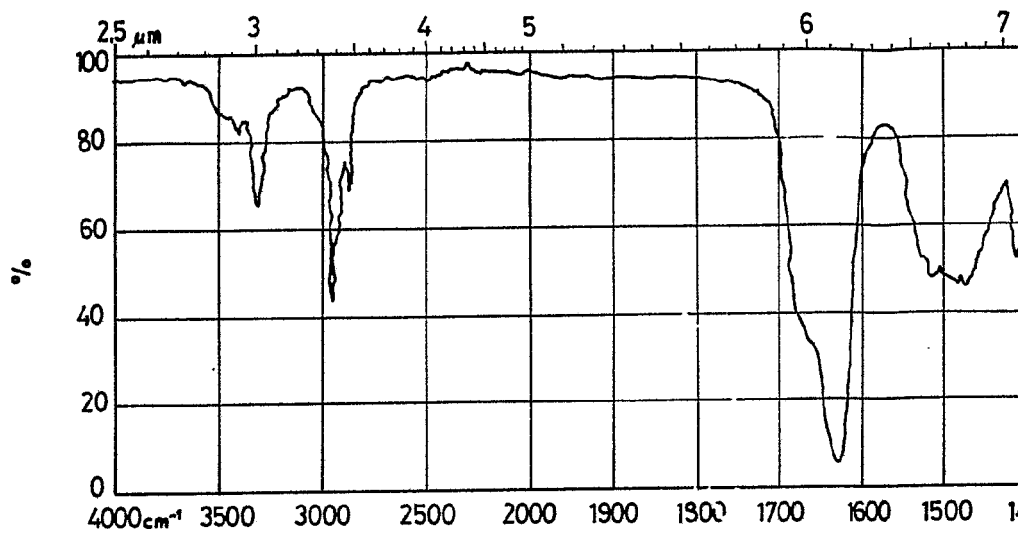
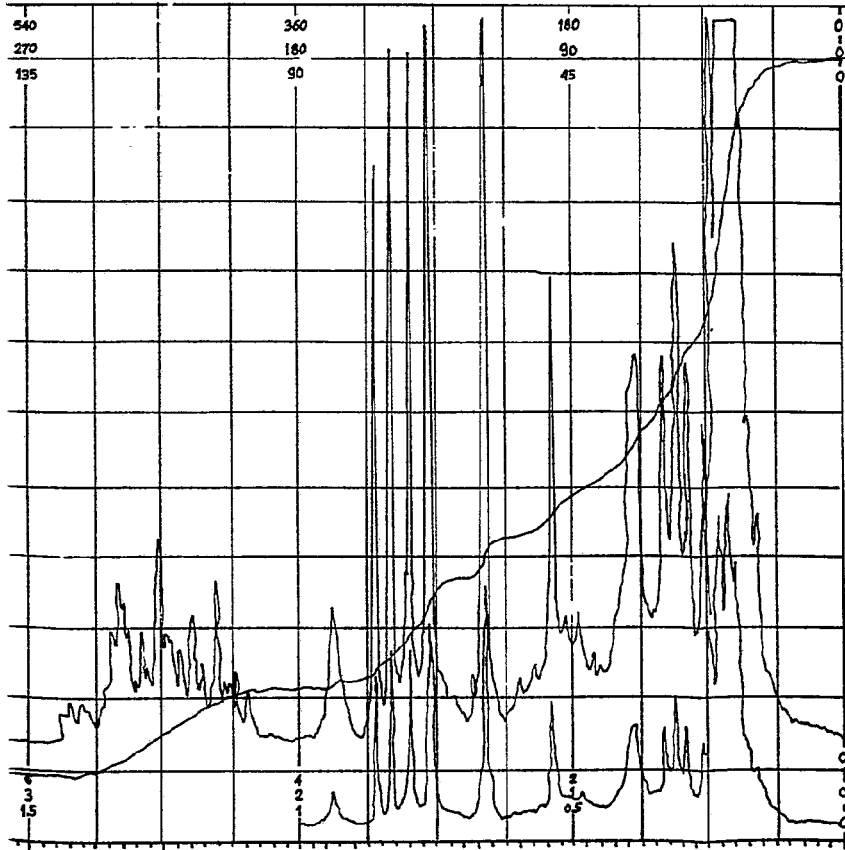
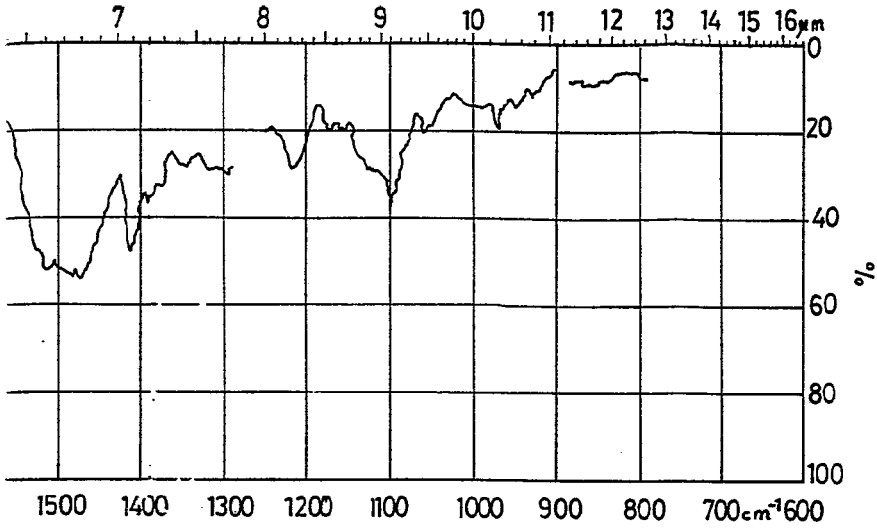


FIG. 3

ESCALA VARIABLE.



ESCALA
VARIABLE

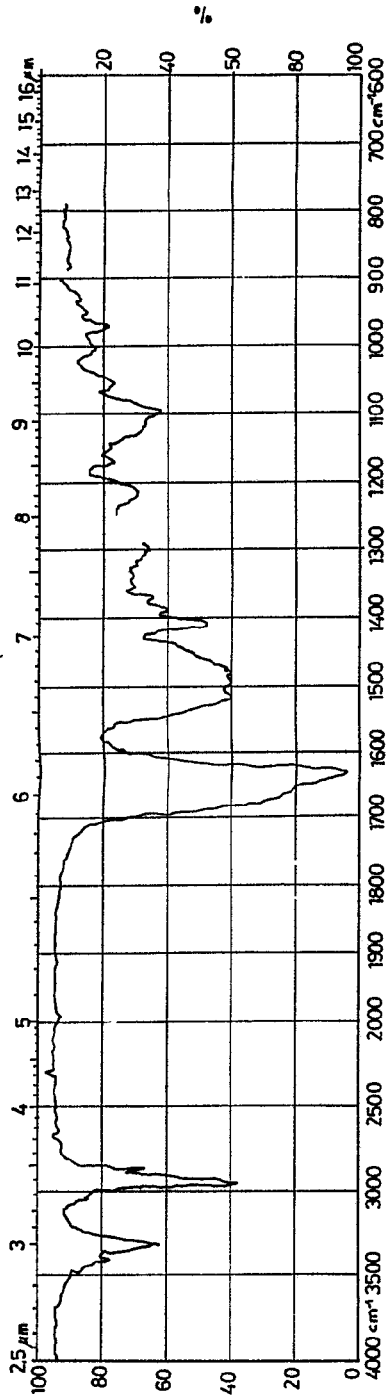
27 ABO. 1975

Madrid

G. 3

GÓMEZ ACEBO Y ROSSET,
S. A. Estudios y Gestión Forestal

FIG. 5



Handwritten text, possibly a signature or initials, located below the plot area.

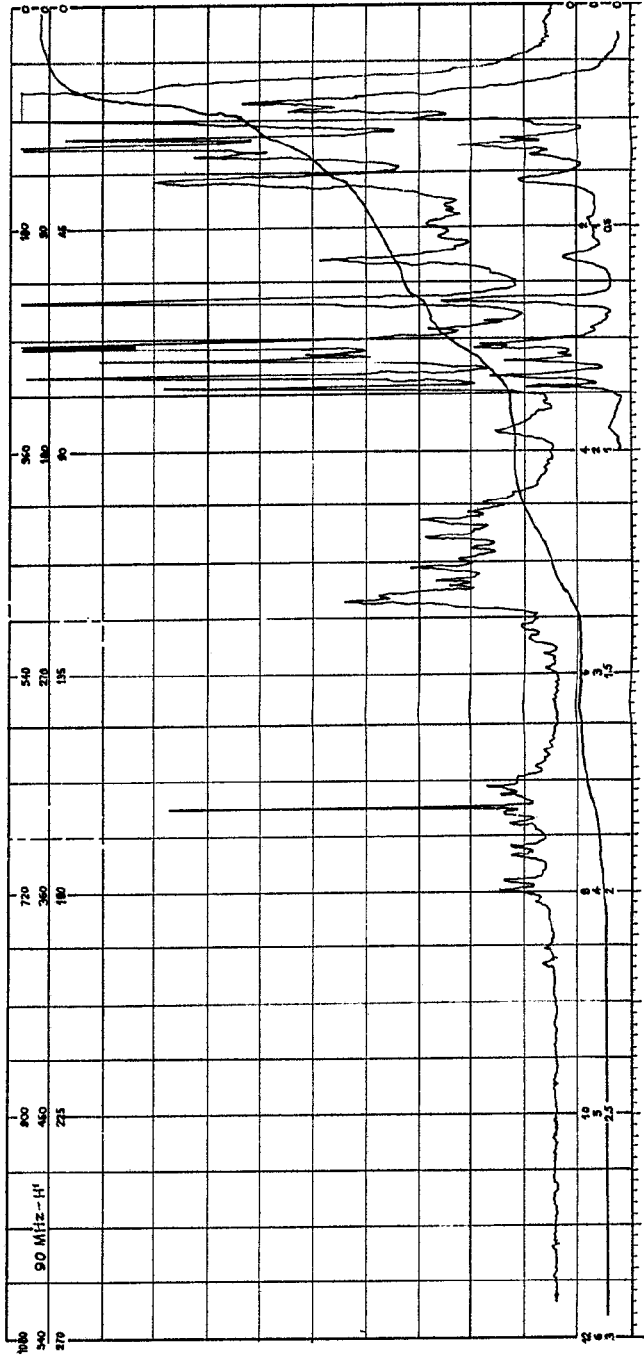


FIG. 6

ESCALA VARIABLE.

Handwritten notes and signatures in the top right corner of the page, including a date and a signature.

2. 10. 1970

M. Sandoz

RODOLFO J. P. SANDOZ

Pharmaceutical Division

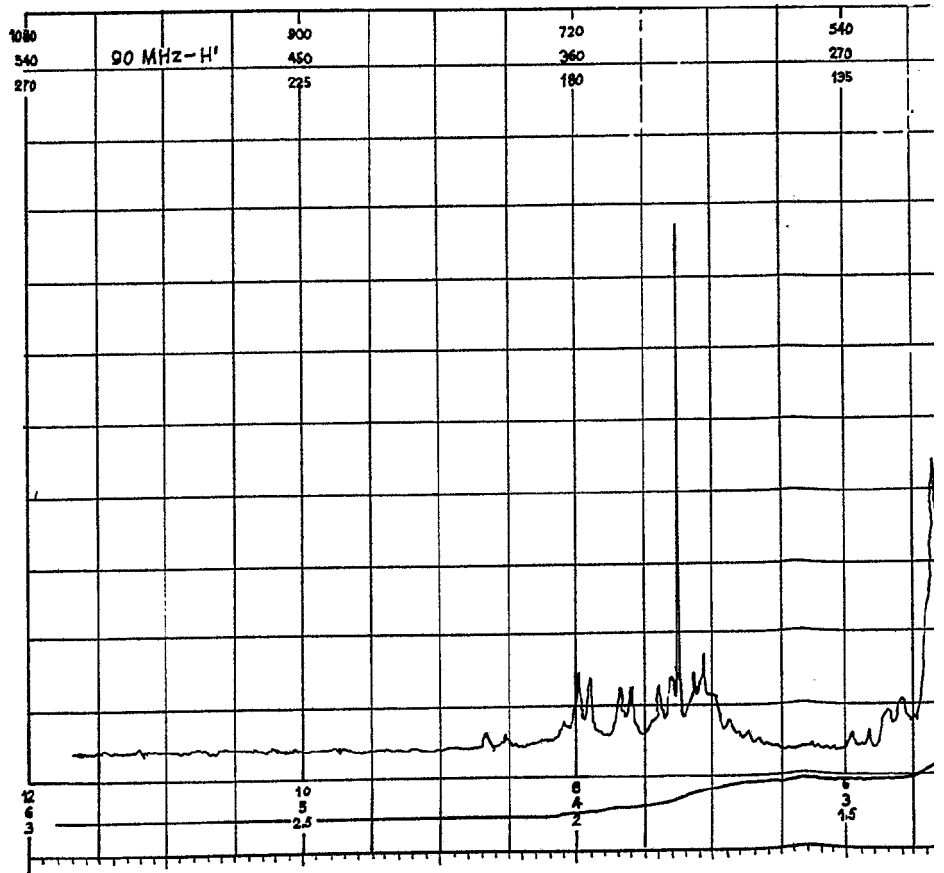
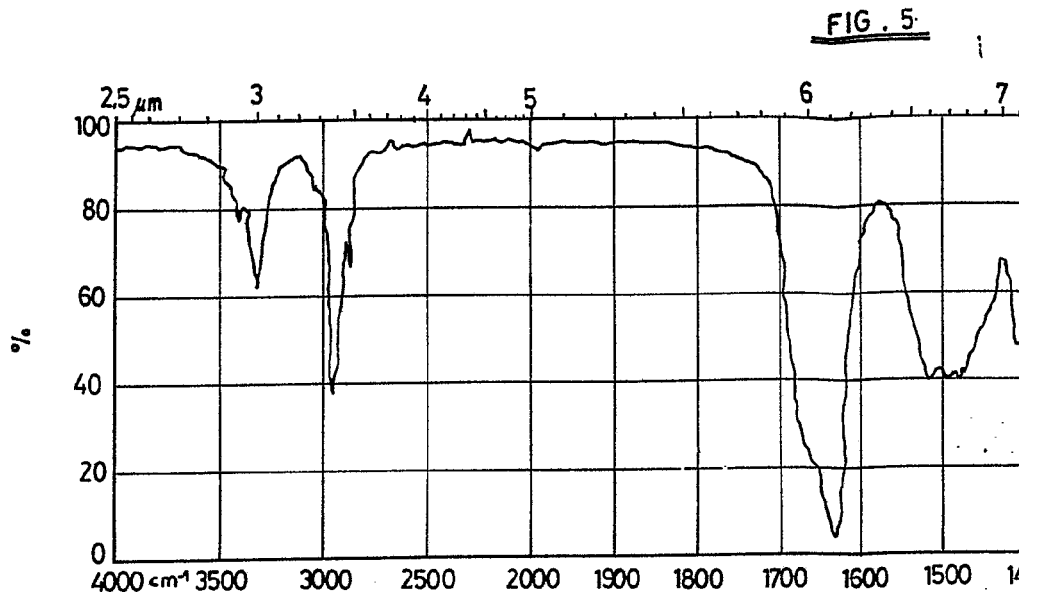


FIG. 6

ESCALA VARIABLE.

