

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGIS/NO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



10 ES	11 12	NUMERO 441.524	10 A 1
	22	FECHA DE PRESENTACION	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
13425/74	7.10.74	SUIZA
16556/74	12.12.74	"
1713/75	12.2.75	"
4364/75	7.4.75	"
9679/75	24.7.75	"

47 FECHA DE PUBLICIDAD	48 CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D, C07G, A61K	49 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	--	--------------------------------------

50 TITULO DE LA INVENCION
PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR LOS DERIVADOS TETRAHIDRO DE SL 7810/F,
SL 7810/F-II y SL 7810/F-III.

71 SOLICITANTE (S)
SANDOZ, A.G.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Basilea, Suiza.

72 INVENTOR (ES)
Dr. Camilla Keller-Juslón., Max Kuhn., Dr. Walter Pache.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
D. JAIME GOMEZ-ACEBO Y MODET

PATENTE DE INVENCION

Case 100.4237

Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR LOS DERIVADOS
TETRAHIDRO DE SL 7810/F, SL 7810/F-II y
SL 7810/F-III.

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

La presente invención se relaciona con un procedimiento para preparar nuevos derivados tetrahidro de los compuestos SL 7810/F, SL 7810/F-II y SL 7810/F-III, siempre que estos sean preparados por el proceso b), que se describirá a continuación.

De acuerdo con la invención los nuevos anti-
bióticos SL 7810/F, SL 7810/F-II, SL 7810/F-III y
los derivados tetrahidro de los mismos pueden obtenerse
mediante un procedimiento caracterizado porque

- a) se cultiva una cepa de *Aspergillus rugulosus* Thom
and Raper productora de SL 7810/F y/o
SL 7810/F-II y/o SL 7810/F-III en presencia
de un medio nitritivo para producir SL 7810/F
y/o SL 7810/F-II y/o SL 7810/F-III,
- o b) se hidrogena un antibiótico seleccionado de
SL 7810/F, SL 7810/F-II y SL 7810/F-III para
producir el derivado tetrahidro correspondiente.

Los nuevos antibióticos y los derivados tetra-
hidro de los mismos poseen las características siguientes:

SL 7810/F

Polvo amorfo incoloro con un P.F. de 160-163° (descomp.);
 $[\alpha]_D^{20} = -48,3^\circ$ (c = 0,806 en metanol).

Análisis: Hallado C 57,3 H 7,9 N 9,2 O 25,2 %

Peso molecular (determinado osmóticamente en etanol): 1190.

Espectro UV en metanol: $\lambda_{\max} = 194 \text{ nm}$, $\log \xi' = 1,98$
(véase la Figura 1) 276 nm , $\log \xi' = 0,14$

Espectro IR en Nujol (véase la Figura 2).

Espectro de RMN ^1H en DMSO (100 megaciclos por segundo, tetrametilsilano como standard interno) [véase la Fig. 3].

Hidrólisis de SL 7810/F con ácido clorhídrico 6 normal (4 horas a 110° bajo una atmósfera de N_2) proporciona un producto de hidrólisis, inter alia ácido linoleico.

Reacciones cromáticas: ninhidrina negativa

Cl_2 -bencidina azul

(Solubilidad, estabilidad, cromatograma de capa delgada y valores de CIM, véase más adelante)

SL 7810/F-II

Polvo amorfo incoloro con un P.F. de $158-160^\circ$ (descomp.);

$[\alpha]_D^{20} = -47,9^\circ$ ($c = 0,81$ en metanol).

Análisis: Hallado C 58,5 H 8,0 N 9,3 O 23,8 %

Peso molecular (determinado osmométricamente en metanol): 1018.

Espectro UV en metanol: λ_{max} 193 nm, $\log \epsilon' = 1,95$

(véase la Figura 4) 278 nm, $\log \epsilon' = 0,18$

Espectro IR en Nujol (véase la Figura 5).

Espectro de RMN ^1H en DMSO (100 megaciclos por segundo, tetrametilsilano como standard interno) [véase la Fig. 6].

Reacciones cromáticas: ninhidrina negativa

Cl_2 -bencidina azul

(Solubilidad, estabilidad, cromatograma de capa delgada y valores de CIM, véase más adelante)

SL 7810/F-III

Polvo amorfo incoloro con un P.F. de 164-168° (descomp.);

$[\alpha]_D^{20} = -53,0^\circ$ (c = 1,00 en metanol).

Análisis: Hallado C 61,1 H 8,0 N 9,0 O 22,0 %

Espectro UV en metanol: λ_{\max} 193 nm, $\log \xi' = 1,98$

(véase la Figura 7) 278 nm, $\log \xi' = 0,24$

Espectro IR en Nujol (véase la Figura 8).

Espectro de RMN ^1H en DMSO (100 megaciclos por segundo, tetrametilsilano como standard interno) [véase la Fig. 9].

Reacciones cromáticas: ninhidrina negativa

Cl_2 -bencidina azul

(Solubilidad, estabilidad, cromatograma de capa delgada y valores de CIM, véase más adelante)

Tetrahidro-SL 7810/F

Polvo amorfo incoloro con un P.F. de 173-178° (descomp.);
después de cristalizar de etanol/agua (95:5)

P.F. 190-205°/210-212° (descomp.);

$[\alpha]_D^{20} = -47,8^\circ$ (c = 0,984 en metanol).

Análisis: Hallado C 56,8 H 8,0 N 9,0 O 25,5 %

Espectro UV en metanol: λ_{\max} 194 nm, $\log \xi' = 1,85$

(véase la Fig. 10) 277 nm, $\log \xi' = 0,09$

227 (hombro)

$\log \xi' = 1,00$

Espectro IR en Nujol (véase la Figura 11).

Espectro de RMN ^1H en DMSO (100 megaciclos por segundo, tetrametilsilano como standard interno) [véase la Fig. 12].

Espectro de RMN ^{13}C en CD_3OD con tetrametilsilano como standard interno (véase la Tabla 1).

Reacciones cromáticas: ninhidrina negativa

Cl_2 -bencidina azul

(Solubilidad, estabilidad, cromatograma de capa delgada y valores de CIM, véase más adelante)

La hidrólisis de tetrahydro-SL 7810/F con ácido clorhídrico 6 normal (4 horas a 110° bajo una atmósfera de N_2) proporciona un producto de hidrólisis, inter alia ácido esteárico.

Tetrahydro-SL 7810/F-II

Polvo amorfo incoloro con un P.F. de $160-163^\circ$ (descomp.);

$[\alpha]_D^{20} = -41,4^\circ$ ($c = 0,823$ en metanol).

Análisis: Hallado C 58,7 H 8,1 N 9,6 O 23,7 %

Espectro UV en metanol: λ_{max} 194 nm, $\log \xi' = 1,90$

(véase la Figura 13) 278 nm, $\log \xi' = 0,25$

227 (hombro)

$\log \xi' = 1,07$

Espectro IR en Nujol (véase la Fig. 14).

Espectro de RMN ^1H en DMSO (90 megaciclos por segundo, tetrametilsilano como standard interno) [véase la Fig. 15].

Espectro de RMN ^{13}C en CD_3OD con tetrametilsilano como standard interno (véase la Tabla 2).

Reacciones cromáticas: ninhidrina negativa

Cl_2 -bencidina azul

(Solubilidad, estabilidad, cromatograma de capa delgada y valores de CIM, véase más adelante)

Tetrahidro-SL 7810/F-III

Polvo amorfo incoloro con un P.F. de $175-180^\circ$ (descomp.);

$[\alpha]_D^{20} = -41,5^\circ$ ($c = 1,094$ en metanol).

Análisis: Hallado C 60,5 H 8,5 N 9,2 O 21,9 %

Espectro UV en metanol: λ_{max} 193 nm, $\log \xi' = 1,93$

(véase la Fig. 16) 278 nm, $\log \xi' = 0,19$

224 nm, $\log \xi' = 1,01$

(hombro)

Espectro IR en Nujol (véase la Fig. 17).

Espectro de RMN ^1H en DMSO (100 megaciclos por segundo, tetrametilsilano como standard interno) [véase la Fig. 18].

Reacciones cromáticas: ninhidrina negativa

Cl_2 -bencidina verde

(Solubilidad, estabilidad, cromatograma de capa delgada y valores de CIM, véase más adelante)

Solubilidad

A temperatura ambiente, los antibióticos SL 7810/F, SL 7810/F-II y SL 7810/F-III y los derivados tetrahydro de los mismos son fácilmente solubles en metanol y etanol, difícilmente solubles en cloroformo, éter, éter de petróleo y hexano, y prácticamente insolubles en agua.

Estabilidad

En presencia de la luz y especialmente al estar expuestos al aire, los nuevos antibióticos SL 7810/F, SL 7810/F-II y SL 7810/F-III tienen poca estabilidad y se descomponen. La descomposición también se observa cuando se calienta hasta una temperatura superior a 50°. La inestabilidad se elimina en gran parte mediante hidrogenación a los derivados tetrahydro.

Una característica de los tres antibióticos y los derivados tetrahydro de los mismos es la inestabilidad bajo condiciones básicas. A un pH superior a 8 ocurre la conversión en productos de descomposición, los que sólo son ligeramente activos o ya no son activos biológicamente.

Cromatograma de capa delgada

El análisis se efectúa sobre placas de gel de sílice Merck 60 (espesor de la capa 0,25 mm). Con el eluyente indicado a continuación pueden determinarse los valores R_f siguientes:

Eluyente	Valores R_f		
	SL 7810/F	SL 7810/F-II	SL 7810/F-III
cloroformo/metanol/agua (70 : 25 : 5)	0,28	0,47	0,59
cloroformo/metanol (10 : 3)	0,15	0,27	0,44
cloroformo/metanol (2 : 1)	0,41		
acetato de etilo/n-butanol saturado con agua (3 : 1)	0,22	0,33	0,34

En esta determinación, los antibióticos SL 7810/F, SL 7810/F-II y SL 7810/F-III muestran los mismos valores R_f como sus derivados tetrahidro.

Al revelar con una solución al 0,2 % de $(SO_4)_2Ce$ en ácido sulfúrico al 50 % como reactivo de pulverización, pueden detectarse las manchas siguientes (después de calentar hasta 130°):

SL 7810/F	manchas pardas
SL 7810/F-II	manchas pardas
SL 7810/F-III	manchas pardas
tetrahidro-SL 7810/F	coloración amarillenta
tetrahidro-SL 7810/F-II	coloración débil
tetrahidro-SL 7810/F-III	coloración pardo claro

Para la detección de los antibióticos SL 7810/F, SL 7810/F-II y SL 7810/F-III puede usarse alternativamente vapor de yodo.

Los tres antibióticos SL 7810/F, SL 7810/F-II y SL 7810/F-III pueden diferenciarse de sus derivados tetrahidro mediante la cromatografía de capa delgada sobre placas de gel de sílice GF 254 (espesor de la capa 0,3 mm), mezclándose el gel de sílice con 3 % de NO_3Ag . Usando cloroformo/metanol/agua (70:25:5) como eluyente, pueden determinarse los valores R_f siguientes con 40 γ del compuesto:

<u>Antibiótico</u>	<u>Valor R_f</u>
SL 7810/F	0.33
SL 7810/F-II	0.42
SL 7810/F-III	0.64
p-hidroxibenzaldehído	0.80
<u>Derivado tetrahidro</u>	<u>Valor R_f</u>
Tetrahidro-SL 7810/F	0.40
Tetrahidro-SL 7810/F-II	0.45
Tetrahidro-SL 7810/F-III	0.66
Griseofulvina	0.92

Los compuestos se detectan rociando con vanilina/ácido sulfúrico. Al calentar hasta 120-130° aparecen manchas de color amarillo pardo en el caso de los compuestos tetrahidro. Los compuestos no hidrogenados muestran una coloración rojiza.

La variante a) del procedimiento de la invención puede llevarse a cabo de acuerdo con métodos conocidos para la obtención fermentativa de antibióticos. Un cultivo de la nueva cepa de *Aspergillus rugulosus* Thom and Raper, que puede usarse en el procedimiento de la invención, ha sido depositado en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Northern Utilization Research and Development Division), Peoria, Ill., EEUUA, bajo la referencia NRRL 8039, en donde se encuentra a libre disposición para ser examinado.

Se prefiere usar la cepa NRRL 8039, pero pueden usarse alternativamente otras cepas que pueden obtenerse a partir de la cepa inicial *Aspergillus rugulosus* Thom and Raper mediante tratamiento con sustancias mutagénicas o rayos o mediante selección.

Características de la cepa NRRL 8039

La nueva cepa NRRL 8039 de *Aspergillus rugulosus* Thom and Raper fue aislada de una muestra de tierra hallada en el paso de Jaun (Suiza), y debido a sus características morfológicas concuerda con la descripción de la especie *Aspergillus rugulosus* Thom and Raper en la monografía *Aspergillus* de K.B.Raper y D.I.Fennell (THE GENUS ASPERGILLUS, The Williams and Wilkins Company, Baltimore 1965).

La cepa NRRL 8039 crece sobre un medio nutritivo de agar a una temperatura entre 15 y 50°C; el crecimiento óptimo se logra a una temperatura entre 35 y 42°C. Sobre agar de Czapek-Dox la cepa NRRL 8039 se desarrolla más bien lentamente, los cultivos concuerdan aproximadamente con la descripción de la especie (Raper y Fennell, 1965): las colonias de 20 días de edad están fuertemente plegadas, y el micelio aéreo, aterciopelado, corto, tiene una pigmentación gris, pardo claro o pardo violeta. El margen de la colonia permanece blanco a temperaturas de incubación más bajas (p.ej. 18-27°C), y tiene una apariencia amarillo parda a temperaturas más altas (p.ej. 33-45°C). El lado inferior de la colonia permanece amarillento a temperaturas de incubación más bajas; a temperaturas más altas se forma un pigmento violeta, el que es secretado dentro del agar. Aun después de una incubación de 20 días sobre agar de Czapek-Dox no se forman cleistotecios, y sólo a temperaturas de incubación más altas se forman conidióforos atrofiados, esporádicos.

La cepa NRRL 8039 se desarrolla mucho más rápidamente y mejor sobre un agar de malta al 2 %/dextrosa, en el que se forma un número considerable de cleistotecios y las cabezas conidiales que llegan a su madurez después de 20 días de incubación a 27°C. Las colonias son cuando mucho ligeramente plegadas, pero generalmente no

son plegadas, y el micelio aereo aterciopelado tiene una coloración amarillenta uniforme. El lado inferior de la colonia es amarillo a temperaturas de incubación más bajas, y ligeramente pardo a temperaturas más elevadas.

La cepa NRRL 8039 que se desarrolla sobre un agar de malta al 2 %/dextrosa muestra cabezas conidiales de color verde oscuro que generalmente aparecen en pequeños grupos en la colonia y al margen de la misma.

La morfología y dimensión de todas las estructuras del estado asexual concuerdan bien con la descripción de la especie de *Aspergillus rugulosus* arriba mencionada.

Sin embargo, el estado ascigeroso difiere algo de la descripción de la especie. Así, los cleistotecios esféricos que se desarrollan en gran número en diversas capas del micelio aereo aterciopelado, permanecen considerablemente más pequeños de lo que se indica para la especie (50-80 μ de diámetro en comparación con 225-350 μ). Las células Hülle también son hialinas, mientras que deberían ser de color pardo oscuro en esta especie. Sin embargo, existe una buena concordancia con la descripción de la especie en cuanto al distintivo característico de la especie de los ascosporos lenticulares, de color violeta-naranja-rojo, midiendo 4,1-5,0 x 3,4-3,8 μ , la superficie de los mismos

siendo más o menos claramente rugosa y surcada, y las dos crestas ecuatoriales paralelas de los mismos teniendo un ancho de 0,4-0,7, μ .

La nueva cepa NRRL 8039 puede cultivarse sobre diversos medios de cultivo conteniendo los nutrimentos usuales, p.ej. tal como se describe en el ejemplo siguiente.

Los nuevos antibióticos SL 7810/F, SL 7810/F-II y SL 7810/F-III pueden producirse de tal modo que se inocula un medio nutritivo líquido con una suspensión de esporos o de micelio de la cepa NRRL 8039, y el cultivo se incuba durante 2 a 4 días, preferentemente 3 días, a 27°C. El cultivo se efectúa bajo condiciones aeróbicas, ya sea mediante fermentación de cultivo de superficie o mediante fermentación de cultivo sumergido. Tan pronto como se ha producido la cantidad máxima de antibióticos (lo que puede comprobarse determinando la actividad contra *Candida albicans*), los antibióticos se obtienen de la solución de cultivo de acuerdo con métodos conocidos, p.ej. tal como se describe en el ejemplo siguiente, pudiéndose usar alternativamente como disolvente en lugar de acetato de etilo otros disolventes orgánicos, p.ej. acetato de butilo o butanol.

La separación de impurezas grasas del extracto bruto puede efectuarse filtrando sobre una columna de gel de sílice, usándose una cantidad aprox. 4 a 5 veces mayor

por peso de gel de sílice, calculada sobre la cantidad de extracto. La elución se efectúa con mezclas de cloroformo/metanol (véase el ejemplo siguiente).

Otro procedimiento puede llevarse a cabo, p.ej., como sigue:

Las impurezas grasas y otros productos laterales se separan mediante reacciones de precipitación adecuadas. Esto se efectúa, p.ej., triturando el extracto de acetato de etilo con éter de petróleo, con lo cual permanecen en la porción insoluble los antibióticos que son activos contra *Candida albicans*. Este residuo se suspende en metanol, y después de separar las porciones inactivas, insolubles, mediante filtración, el filtrado se concentra mediante evaporación en vacío. Este material se disuelve en metanol, y la solución clara se añade por gotas a una cantidad 10 veces mayor de acetato de etilo. El material precipitado contiene SL 7810/F, SL 7810/F-II y SL 7810/F-III, aparte de impurezas inactivas.

La ulterior purificación y separación de los componentes del precipitado se efectúa mediante métodos cromatográficos conocidos, siendo métodos muy adecuados la cromatografía de gel sobre Sephadex LH 20 y la cromatografía sobre gel de sílice. Estos métodos se usan combinados, y repetidamente para la purificación de los

componentes individuales. Así, p.ej., uno de los productos brutos arriba descritos se cromatografía primero sobre Sephadex LH 20 con metanol, apareciendo los tres antibióticos en las mismas fracciones al efectuarse la elución. Las fracciones activas combinadas se cromatografían luego sobre gel de sílice, tamaño del grano 0,06-0,2 mm. La elución puede efectuarse ya sea usando cloroformo al que se le han añadido cantidades crecientes de metanol, o usando continuamente una mezcla de cloroformo/metanol/agua (80:17,5:2). De acuerdo con los valores R_f en el cromatograma de capa delgada, la elución a partir de columnas de gel de sílice proporciona primero SL 7810/F-III, luego SL 7810/F-II, y finalmente SL 7810/F. La separación de las fracciones mixtas, particularmente SL 7810/F-II y SL 7810/F-III, se efectúa mediante cromatografía repetida sobre una cantidad 250 a 400 veces mayor de gel de sílice. Las fracciones que son activas contra *Candida albicans* y que son puras de acuerdo con el cromatograma de capa delgada, corresponden a los antibióticos requeridos de acuerdo con los valores R_f .

La variante b) del procedimiento de la invención puede llevarse a cabo de acuerdo con métodos conocidos, p.ej. mediante hidrogenación catalítica.

Los disolventes que se usan preferentemente son: alcoholes alifáticos inferiores, p.ej. metanol o etanol.

La hidrogenación se efectúa convenientemente en un medio neutro o débilmente ácido, p.ej. en presencia de ácidos orgánicos débiles, tal como el ácido acético. La hidrogenación se efectúa a temperaturas entre 10 y 40°C, preferentemente entre 20 y 25°C. La hidrogenación se efectúa convenientemente bajo presión atmosférica o bajo una presión ligeramente elevada, en presencia de un catalizador de platino, p.ej. PtO_2 , que se prehidrogena a Pt, o preferentemente un catalizador de paladio, p.ej. paladio sobre carbón o sulfato de bario. La hidrogenación se efectúa hasta que queda finalizada la absorción de hidrógeno. Esto se efectúa tomando en consideración que la absorción de hidrógeno de dos moléculas-gramo por cada molécula-gramo de antibiótico SL 7810/F, SL 7810/F-II y SL 7810/F-III corresponde a un peso molecular de aprox. 1000 a 1200. En el caso de los derivados hidrogenados de los antibióticos indicados, no pueden detectarse en el espectro de resonancia magnética nuclear protones que indiquen ácido linoleico.

Los derivados hidrogenados resultantes de los antibióticos SL 7810/F, SL 7810/F-II y SL 7810/F-III se purifican en forma conocida en caso de ser necesario. Esto se efectúa preferentemente mediante cromatografía sobre Sephadex LH 20 (elución con metanol) y/o cromatografía sobre gel de sílice de grano fino, efectuándose la

elución convenientemente con mezclas de cloroformo/metanol (9:1) a (3:1) o con mezclas de cloroformo/metanol con la adición de una pequeña cantidad de agua.

La presente invención también incluye licores de fermentación obtenidos del cultivo de una cepa de la especie *Aspergillus rugulosus* Thom and Raper productora de un antibiótico SL 7810/F, SL 7810/F-II y/o SL 7810/F-III.

Los nuevos antibióticos y sus derivados tetrahydro exhiben propiedades farmacológicas interesantes.

Los antibióticos SL 7810/F, SL 7810/F-II, SL 7810/F-III y sus derivados tetrahydro pueden caracterizarse biológicamente por su espectro de actividad. Mientras que todos los compuestos son ineficaces contra bacterias grampositivas y gramnegativas, p.ej. *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, bajo las condiciones de ensayo usuales, exhiben efectos pronunciados contra levaduras y hongos.

La Tabla siguiente indica las concentraciones de inhibición mínimas contra diversas levaduras y hongos. El ensayo de dilución en series se condujo en forma conocida con las cepas de ensayo indicadas. La incubación en el ensayo de dilución en series se efectuó en un medio de extracto de malta (al 2 %) con un pH de 4,4-4,7, a 27-37°C, dependiendo de la temperatura óptima para la

cepa de ensayo correspondiente. La evaluación se efectuó después de un tiempo de incubación de 72 horas. Las cepas de ensayo han sido depositadas en la colección de hongos de la firma Sandoz, adonde se encuentran a disposición para ser examinadas.

Cepa	Concentración mínima de inhibición en ,ug/cc		
	SL 7810/F	SL 7810/F-II	SL 7810/F-III
<i>Candida albicans</i>	0,3	0,3	1
<i>Candida albicans</i> H 12	0,3	0,1	0,3
<i>Candida albicans</i> 5897	0,3	0,3	1
<i>Candida albicans</i> 439	0,3	0,03	0,3
<i>Candida albicans</i> resistente a blasticidina S	0,03	30	10
<i>Candida tropicalis</i>	0,3	0,03	0,3
<i>Candida tropicalis</i> CK 4	0,03	0,03	0,1
<i>Candida krusei</i>	1	0,3	1
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>			
<i>Trichophyton quinckeanum</i>			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10	10	10
<i>Hansuela anomala</i>	0,01	0,01	0,1
<i>Rhodotorula rubra</i>	0,1	31,6	31,6
<i>Kloeckera apiculata</i>	30	3,16	10
<i>Cryptococcus neoformans</i>	100		
<i>Aspergillus flavipes</i>			
<i>Giberella fujikuroi</i>			
<i>Aspergillus niger</i>			
<i>Curvularia lunata</i>			

Cepa	Concentración mínima de inhibición en $\mu\text{g}/\text{cc}$		
	Tetrahydro-SL 7810/F	Tetrahydro-SL 7810/F-II	Tetrahydro-SL 7810/F-III
<i>Candida albicans</i>	0,03	0,01	0,03
<i>Candida albicans</i> H 12	0,1	31,6	0,01
<i>Candida albicans</i> 5897	100	31,6	0,3
<i>Candida albicans</i> 439	0,03	3,2	0,01
<i>Candida albicans</i> resistente a blasticidina S	100	1	0,03
<i>Candida tropicalis</i>	100	100	0,1
<i>Candida tropicalis</i> CK 4	100	10	0,03
<i>Candida krusei</i>	0,03	10	0,3
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>			> 100
<i>Trichophyton quinckeanum</i>			> 100
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,1	0,01	
<i>Hansuela anomala</i>	0,01	0,03	
<i>Rhodotorula rubra</i>	> 100	100	
<i>Kloeckera apiculata</i>	1	0,1	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	> 100		
<i>Aspergillus flavipes</i>		3,2	
<i>Giberella fujikuroi</i>		3,2	
<i>Aspergillus niger</i>			100
<i>Curvularia lunata</i>			> 100

Como es evidente según los resultados de los ensayos precedentes [valores de concentración de inhibición mínima (CIM)], los compuestos citados exhiben un efecto contra ciertos hongos, particularmente contra *Candida albicans*. El efecto contra *Candida albicans* también puede comprobarse in vivo mediante los ensayos siguientes:

1. Infección intestinal experimental con *Candida albicans* Δ 124 en el ratón hembra

En este método se rompe el equilibrio de la flora intestinal normal a favor de *Candida albicans* Δ 124, aplicada peroralmente, mediante tratamiento con antibióticos. El tratamiento con antibióticos de espectro amplio conduce a una supresión de la flora bacteriana y, con esto, a una reproducción selectiva de los hongos *Candida* en el intestino del ratón hembra. Los organismos *Candida* que se establecen en el intestino, son expelidos regularmente con las heces (número de gérmenes 10^4 /g de heces) durante un período de por lo menos tres semanas.

Material y método

Animales de ensayo:

Se emplean ratones NMRI hembras con un

peso de 18 a 24 g, alimentados ad libitum con pímulas para ratones. El agua para beber contiene 1 mg/cc de estreptomina.

Inóculo e infección

La infección intestinal del ratón hembra con *Candida albicans* se realiza como sigue:

Se prepara una dilución conteniendo 5×10^7 gérmenes en 0,25 cc a partir de una ampolla mantenida en nitrógeno líquido y deshelada. Luego se le aplica peroralmente a cada ratón 5×10^7 gérmenes. Después de la infección, se colocan los animales separadamente en jaulas (6 ó 10 animales que se mantienen separadamente forman un grupo).

Determinación del número de gérmenes en las heces (NG/g de heces):

Al sexto día o cuando se va a determinar el número de gérmenes en las heces, los animales de ensayo se colocan en jaulas esterilizadas de Makralon, y se recogen y pesan las heces de 4 horas. A continuación se prepara una suspensión de 10^{-1} en una solución de ClNa y se diluye hasta 10^{-7} . Luego se cuentan los gérmenes de acuerdo con el procedimiento de placas con agar de Sabouraud, añadiéndose 50 µg de estreptomina por cada cc de agar de Sabouraud. La adición de estreptomina al

agar elimina el desarrollo de los demás gérmenes intestinales, de modo que se obtiene un cultivo puro del hongo *Candida albicans* sobre la placa de agar.

Dosificación y modo de tratamiento:

La dosis más alta de un compuesto que se aplica generalmente depende de la dosis máxima tolerada. Generalmente asciende a 300 mg/kg de peso del cuerpo del ratón; una dosis adicional asciende a 100 mg/kg de peso del cuerpo. Estas dosis diarias se aplican peroralmente durante 5 días, comenzando en el día de la infección. Las dosis diarias se dividen en tres unidades de dosis y se aplican peroralmente a un volumen de 0,25 cc [en el caso de compuestos insolubles en agua se usa 0,2 % de CMC (carboximetilcelulosa sódica) + 0,2 % de Tween 80 como agente de suspensión] por cada 20 g de ratón.

Cada ensayo de infección se complementa con 10 animales de control, a los que se les aplica un compuesto standard. En este ensayo de infección se aplica como compuesto standard nistatina a dosis diarias de 300 y 100 mg/kg de peso del cuerpo por vía peroral. La aplicación de estas dosis se

efectúa igual como para el compuesto de ensayo. Cuando se aplica una dosis de 300 mg/kg de peso del cuerpo de nistatina por vía peroral, no pueden detectarse gérmenes de *Candida albicans* en las heces un día después de la conclusión del tratamiento, mientras que 100 mg/kg de peso del cuerpo de nistatina producen una reducción de gérmenes de por lo menos 2 potencias de diez y en algunos casos hasta una completa eliminación de estos gérmenes.

Para cada dosificación se usa un grupo de 6 animales mantenidos separadamente en jaulas. A 6 animales adicionales se les suministra, al igual como a los demás, estreptomycin en el agua para beber y el disolvente sin compuesto como control. Los animales también se mantienen separados.

Evaluación y análisis:

Para la evaluación de un ensayo como el presente se determinan las reducciones en el número de gérmenes o las eliminaciones de gérmenes y se comparan con los animales de control no tratados o con los animales de control tratados con los compuestos standard, y se calculan en porcentajes.

2. Infección vaginal de la rata con *Candida albicans* (cepa Δ 124)

La micosis vaginal de la rata hembra es

una infección de las mucosas. Mediante una ovariectomía y un estro continuo subsiguiente inducido por la aplicación de hormonas en la rata pubescente, es posible inducir una micosis vaginal experimental. Esta infección local generalmente sólo abarca la capa más superficial de la mucosa vaginal. El desarrollo de la infección puede ser controlado fácilmente mediante frotis. La buena reproductibilidad y regularidad en el desarrollo de la infección llenan todos los requisitos necesarios en la búsqueda de un nuevo agente activo.

Animales de ensayo:

Se usan hembras de ratas Wistar con un peso de aprox. 200 g. Los animales reciben alimentos y agua ad libitum. Se usan 10 animales para cada grupo de ensayo.

Preparación y realización de la infección:

Se ejecuta una ovariectomía en los animales bajo narcosis con Nembutal. Un día después de la ovariectomía se le aplica subcutáneamente a cada rata 100 µg de estradiol en 0,5 cc de aceite de sésamo. Una semana después de la aplicación de la hormona, los animales se encuentran en el estro, lo que puede comprobarse fácilmente mediante

frotis y coloración con azul de metileno bajo un microscopio.

En esta condición de estro continuo, casi no pueden encontrarse leucocitos en el contenido vaginal, lo cual es ventajoso para el desarrollo de una infección, ya que los gérmenes extraños que penetran en la vagina no son fagocitados inmediatamente por los leucocitos.

Siete días después de la ovariectomía, los animales se infectan. Se les aplica intravaginalmente gérmenes de *Cándida albicans* en cantidades de 0,05 cc ó 10^5 gérmenes para cada rata, mediante una jeringa de tuberculina y una sonda esofágica.

La producción del inóculo se efectúa de acuerdo con los procedimientos usuales y el inóculo se mantiene en nitrógeno líquido. Los gérmenes se usan para la infección directamente del N_2 después de deshelar rápidamente.

El desarrollo de la micosis vaginal local se controla al tercer, séptimo, décimo, décimoquinto y vigésimo día después de la infección. El contenido vaginal se frota con un hilo de platino en forma de asa sobre una placa de agar de Sabouraud conteniendo estreptomycin (20 $\mu\text{g}/\text{cc}$).

Se preparan frotis paralelos con contenido vaginal, se tiñen con colorante de Gram y se examinan bajo un microscopio para determinar la presencia de pseudomicelio. Después de la incubación de las placas (tubos) de Sabouraud a 30° C durante 2 días, éstas se evalúan semicuantitativamente. La infección puede considerarse seria (desarrollo en forma de revestimiento cespadoso), moderada (colonias contables) o insignificante (desarrollo esporádico de colonias), dependiendo del desarrollo de las colonias de *Candida albicans*.

Tratamiento y dosificación:

El tratamiento local de la candidiasis vaginal experimental comienza 24 horas después de la infección. El tratamiento intravaginal se lleva a cabo dos veces al día (por las mañanas y por las tardes) en cinco días consecutivos. A cada rata se le aplica 0,1 cc de un ungüento al 1,5 % y al 5 % como unidad de dosis del compuesto de ensayo. Los compuestos se elaboran con una mezcla de 2 partes de polietilenglicol 300 y una parte de polietilenglicol 1500 "base de ungüentos" y se aplican por vía intravaginal.

Cada ensayo de infección se complementa haciendo participar en el mismo a un grupo de 10

animales como controles, a los que se les aplica un compuesto standard conocido. Puede usarse alternativamente como compuesto standard nistatina como ungüento al 1,5 % o clotrimazol como ungüento al 1,5 %.

A 10 animales adicionales se les aplica la base de ungüentos sin compuestos y un grupo de 10 animales se usa como control de la infección.

Por lo tanto, el uso de los nuevos antibióticos y sus derivados tetrahydro está indicado en el tratamiento de enfermedades producidas por *Candida albicans*.

Para esto uso, una dosificación diaria indicada es de aprox. 100 a aprox. 1500 , aplicada convenientemente en dosis divididas 2 a 4 veces por día en forma de unidad de dosis que contiene desde aprox. 30 hasta aprox. 750 mg, o en forma de preparación de acción retardada.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que contiene un compuesto seleccionado de los antibióticos SL 7810/F, SL 7810/F-II, SL 7810/F-III y sus derivados tetrahydro en asociación con un diluyente o soporte farmacéutico. Tales composiciones pueden formularse en la forma usual, y pueden presentarse en formas adecuadas para aplicación entérica,

EJEMPLO 1:

Una suspensión de esporos que sirve para la inoculación de la solución nutritiva se produce de un cultivo de la cepa NRRL 8039. Con este fin se inoculan 200 cc de solución nutritiva de agar con la composición siguiente:

20 g de cerelese (glucosa)
2 g de peptona
2 g de extracto de malta
2 g de extracto de levadura
2 g de fosfato de potasio primario
2 g de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
15 g de agar
1 litro de agua desionizada

Después de incubar a 27° durante 10 días, los esporos formados se suspenden en 200 cc de agua estéril, y con esto se inocula un fermentador de acero conteniendo 50 litros de la solución nutritiva siguiente:

20 g de cerelese (glucosa)
10 g de almidón
10 g de peptona de soya
3 g de carbonato de calcio
2 g de nitrato de sodio
1 g de fosfato de potasio primario
0,5 g de cloruro de potasio
0,5 g de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
1 cc de una mezcla de 90 % de emulsión de silicona Rhodorsil Antimousse B y 10 % de poli-propilenglicol 2020 (Chem.Werke Hüls, Marl, República Federal Alemana)
1 litro de agua desionizada

Este fermentador se incuba a 27° durante 42 horas con aeración (1 litro de aire/minuto/litro de medio) y con agitación (250 revoluciones/minuto).

Este cultivo sirve como cultivo previo para la inoculación de un fermentador de 500 litros con la misma solución nutritiva, y se incuba a 27° durante 66 horas, con aeración (1 litro de aire/minuto/litro de medio) y agitación (150 revoluciones/minuto). Después de un tiempo de incubación de 66 horas, se recoge el líquido de cultivo y se sigue elaborando como sigue:

El pH de 450 litros de líquido de cultivo se ajusta a 7,0 con ácido clorhídrico 2 normal, se añaden 500 litros de acetato de etilo, y se homogeneiza con un reactor Dispax. A continuación la fase orgánica se separa del líquido con un separador y se lava con 50 litros de agua. Esta etapa de extracción se repite 2 veces. Los tres extractos resultantes se combinan y se evaporan hasta sequedad bajo vacío (bomba de anillo de agua) a 20-40°.

Este material se fracciona sobre una cantidad 4 veces mayor de gel de sílice Merck 60 (tamaño del grano 0,063-0,20 mm). Los productos de elución con cloroformo + 10 % de metanol y cloroformo + 20 % de metanol contienen impurezas inactivas. La columna de cromatografía se eluye a continuación con cloroformo/metanol (1:1), y las fracciones que exhiben una actividad contra *Candida albicans* se combinan y se evaporan hasta sequedad.

La cromatografía de 16,4 g del material activo sobre 1 kg de gel de sílice Merck 60 (tamaño del grano 0,063-0,20 mm) y la elución con cloroformo + 20 % de metanol proporciona primero fracciones mixtas de SL 7810/F-II y SL 7810/F-III. La elución subsiguiente con cloroformo + 30 % de metanol proporciona fracciones con SL 7810/F como componente principal. Después de la filtración con gel de la fracción de SL 7810/F (8,1 g) sobre 1,2 kg de Sephadex LH 20 con metanol, se obtiene

SL 7810/F en forma aprox. pura. Esta preparación se disuelve en acetona con calentamiento y la solución clara se concentra hasta 1/4 de su volumen. Después de reposar a -15° durante 3 horas, el precipitado resultante se separa mediante filtración, y después de lavar con acetona y con éter se seca a temperatura ambiente sobre P_2O_5 en alto vacío durante 24 horas. SL 7810/F se obtiene en forma de polvo incoloro con un P.F. de $160-163^{\circ}$ (descomp.).

Mediante la subsiguiente cromatografía de las fracciones mixtas activas de SL 7810/F-II y SL 7810/F-III de la cromatografía sobre gel de sílice precedente, pueden aislarse los dos antibióticos. Con este fin se disuelve el material (2,5 g) en cloroformo + 20 % de metanol y la solución se adsorbe sobre una columna de 1 kg de gel de sílice que ha sido preparada con la misma mezcla de disolventes. La elución se efectúa continuamente con cloroformo + 20 % de metanol, con lo cual se obtiene primero principalmente SL 7810/F-III y luego principalmente SL 7810/F-II. Para la obtención de SL 7810/F-III puro se disuelven las fracciones mixtas concentradas (0,75 g) que contienen este antibiótico, en cloroformo + 10 % de metanol, y la solución se adsorbe sobre 1 kg de gel de sílice Merck en la forma anteriormente descrita. La elución con

cloroformo + 10 % de metanol hasta 15 % de metanol proporciona el material fuertemente enriquecido de SL 7810/F-III. Después de la filtración con gel (0,55 g) sobre 500 g de Sephadex LH 20 con metanol, se obtiene SL 7810/F-III puro: polvo amorfo incoloro con un P.F. de 164-168° (descomp.).

Para el aislamiento de SL 7810/F-II se disuelven las fracciones mixtas (1,7 g) conteniendo SL 7810/F-II, en cloroformo + 20 % de metanol, y esta solución se adsorbe sobre una columna de 1 kg de gel de sílice preparada con la misma mezcla de disolventes. La elución con cloroformo + 20 % de metanol proporciona fracciones fuertemente enriquecidas de SL 7810/F-II. La subsiguiente filtración con gel (1,2 g) sobre 1,2 kg de Sephadex LH 20 con metanol proporciona SL 7810/F-II puro, un polvo amorfo con un P.F. de 158-160° (descomp.).

EJEMPLO 2: Tetrahidro-SL 7810/F

Una suspensión de 1 g de paladio/carbón (10 % de Pd) en 250 cc de alcohol o 250 cc de alcohol/ácido acético glacial (1:1) se prehidrogena durante 30 minutos. A continuación se añade una solución de 5 g de SL 7810/F en 50 cc de alcohol/ácido acético glacial (1:1). Después de hidrogenar durante 3 horas a 20° bajo presión atmosférica, se separa el catalizador sobre un filtro de succión de talco y el filtrado claro se

concentra en vacío. El residuo de la evaporación se disuelve en cloroformo/metanol (1:1), con esta solución se impregnan 10 g de gel de sílice 60 Merck (tamaño del grano 0,063-0,20 mm), y se coloca sobre una columna de 500 g de gel de sílice. La elución subsiguiente con cloroformo/metanol (4:1) proporciona el producto de hidrogenación amorfo en forma de polvo incoloro con un P.F. de 173-178° (descomp.). La preparación cristaliza de etanol/agua (95:5). P.F. después de secar durante 3 horas en alto vacío a 50°: 190-205°/210-212° (descomp.).

EJEMPLO 3: Tetrahidro-SL 7810/F-II

La producción se efectúa en forma análoga a la descrita en el Ejemplo 2, excepto que se usa el antibiótico SL 7810/F-II como material inicial.

EJEMPLO 4: Tetrahidro-SL 7810/F-III

La producción se efectúa en forma análoga a la descrita en el Ejemplo 2, excepto que se usa el antibiótico SL 7810/F-III como material inicial, la hidrogenación tiene una duración de 4 horas y se usa cloroformo/metanol/agua (80:17,5:2) como mezcla de disolventes para la cromatografía sobre gel de sílice.

Tabla 1: Espectro de resonancia magnética nuclear ¹³C de tetrahidro-SL 7810/F

Instrumento: Bruker HX-90 E
Tomado a 22,63 megaciclos por segundo
Alcance de los espectros (sweep width): 6000 megaciclos por segundo
Concentración: 250 mg en 1,2 cc de CD₃OD
δ (ppm)

- 175,3
- 173,5
- 172,7
- 171,9
- 171,7
- 169,1
- 157,7
- 132,2
- 129,1
- 115,8
- 76,6
- 75,2
- 74,1
- 70,6
- 69,3
- 68,0
- 62,1
- 58,4
- 56,4
- 55,9
- 52,6
- 51,3
- 50,7*
- 49,8*
- 48,8*
- 47,8*
- 46,9*
- 45,9*
- 38,8
- 36,7
- 35,0
- 33,8
- 32,9
- 31,5
- 30,6
- 30,2
- 28,9*
- 26,9
- 23,6
- 20,1
- 19,5
- 19,2*
- 14,4
- 11,3

0,00**

* Señales de CD₃OD y picos de sonido más altos

** Señal de tetrametilsilano = 0 ppm

Tabla 2: Espectro de resonancia magnética nuclear ^{13}C
de tetrahidro-SL 7810/F-II

Instrumento: Bruker HX-90 E
Tomado a 22,63 megaciclos por segundo
Alcance de los espectros (sweep width): 6000 megaciclos
Concentración: 250 mg en 1,2 cc de CD_3OD por segundo

δ (ppm)

175,3
173,4
173,2
172,0
171,8
171,7
169,3
156,3
130,9
129,1
115,7
75,2
74,0
70,9
70,5
69,1
68,0
62,1
58,5
57,2
56,3
52,6
51,6*
51,3*
50,6*
49,7*
48,7*
47,8*
46,9*
40,7
38,8
36,6
35,0
32,8
30,5
30,2
26,8
23,5
20,1
19,3
14,4
11,2

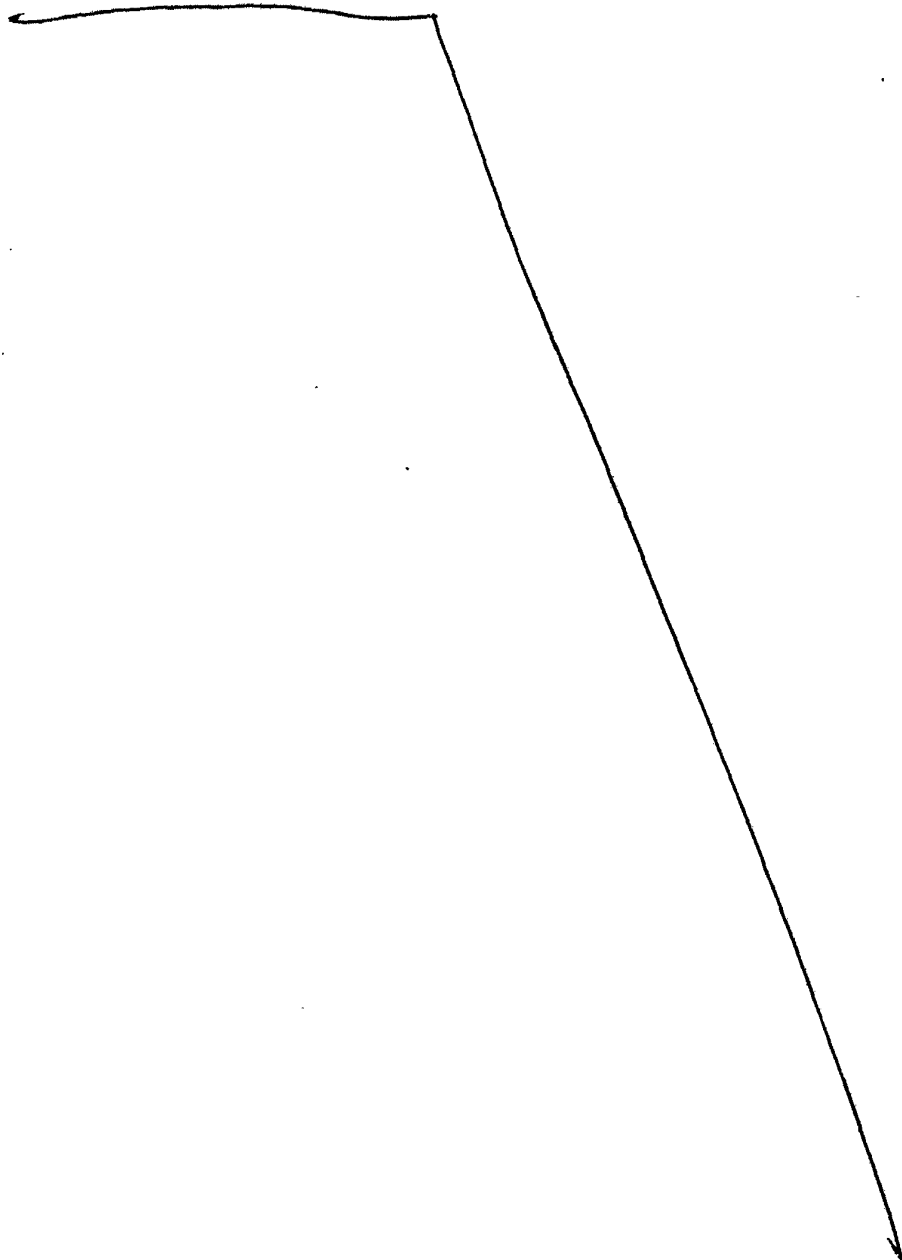
0,00**

* Señales de CD_3OD y picos de sonido más altos

** Señal de tetrametilsilano = 0 ppm

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.

5



REIVINDICACIONES

5 1.- Procedimiento para preparar los derivados tetrahidro de SL 7810/F, SL 7810/F-II y SL 7810/F-III, caracterizado porque se hidrogena un antibiótico seleccionado de SL 7810/F, SL 7810/F-II y SL 7810/F-III para producir el derivado tetrahidro correspondiente, en presencia de un disolvente inerte y con preferencia a una temperatura entre 10 y 40°C.

10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se hidrogena catalíticamente.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque como disolvente inerte, se emplea un alcohol alifático inferior.

15 4.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la hidrogenación se efectúa en un medio neutro ó debilmente ácido.

20 5.- Procedimiento para preparar los derivados tetrahidro de SL 7810/F, SL 7810/F-II y SL 7810/F-III, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

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

Madrid, 17 de Mayo 1977

SANDOZ, AG

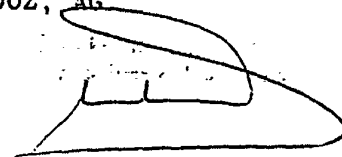


FIG. 1.

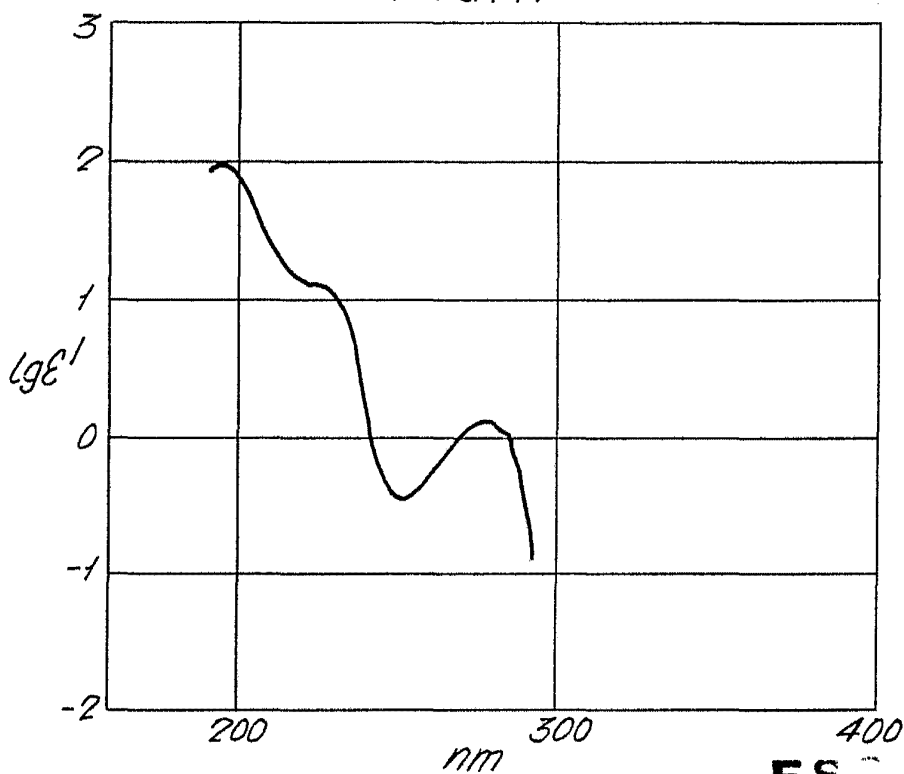
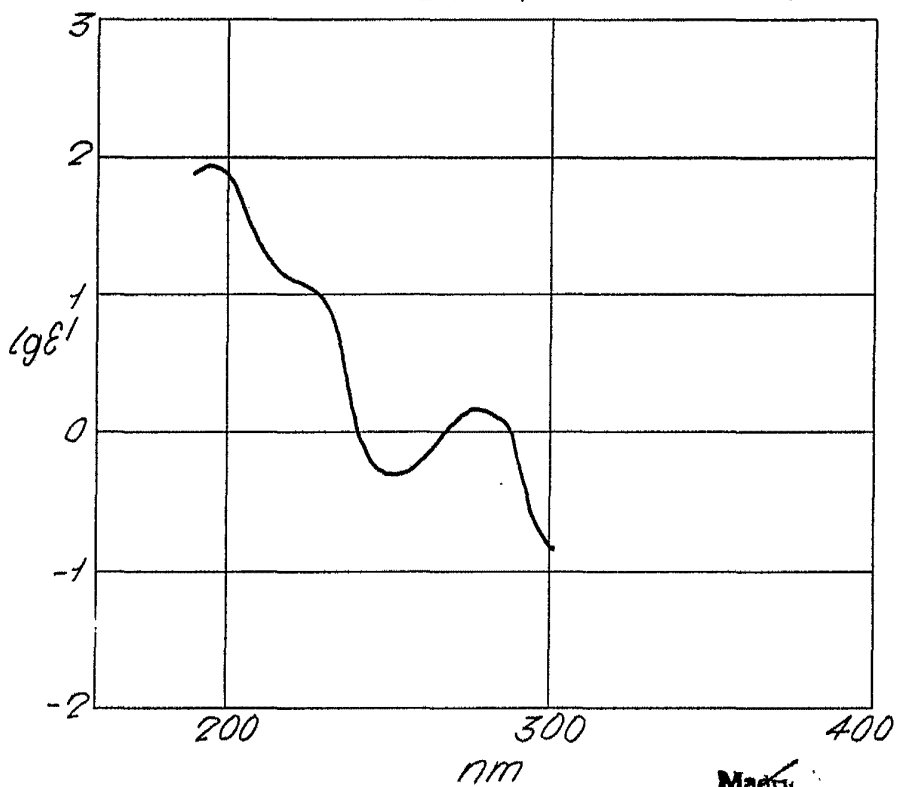


FIG. 4.



ES
VA

Math.

[Handwritten signature]

FIG. 2.

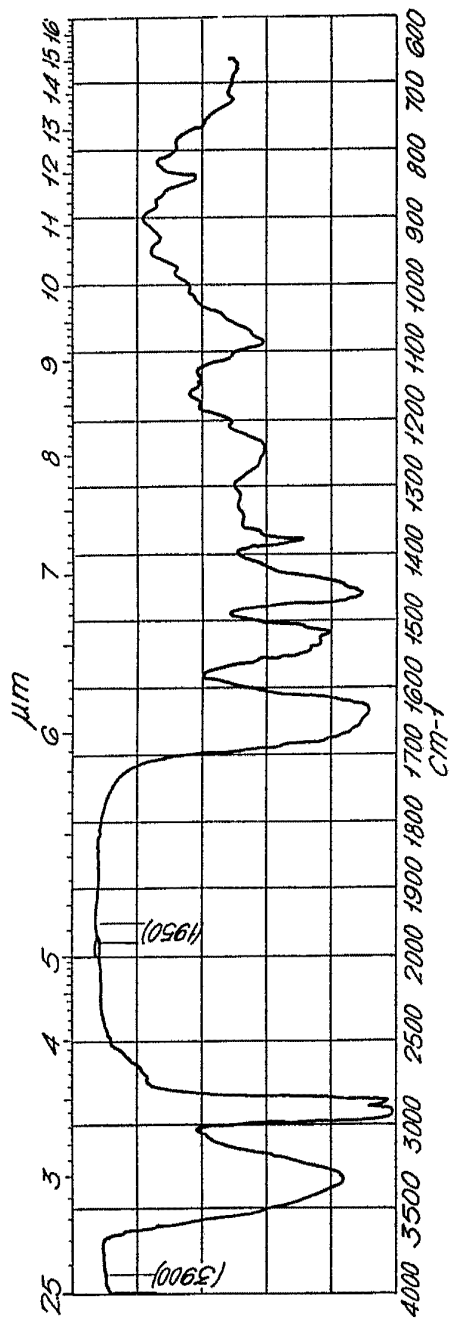
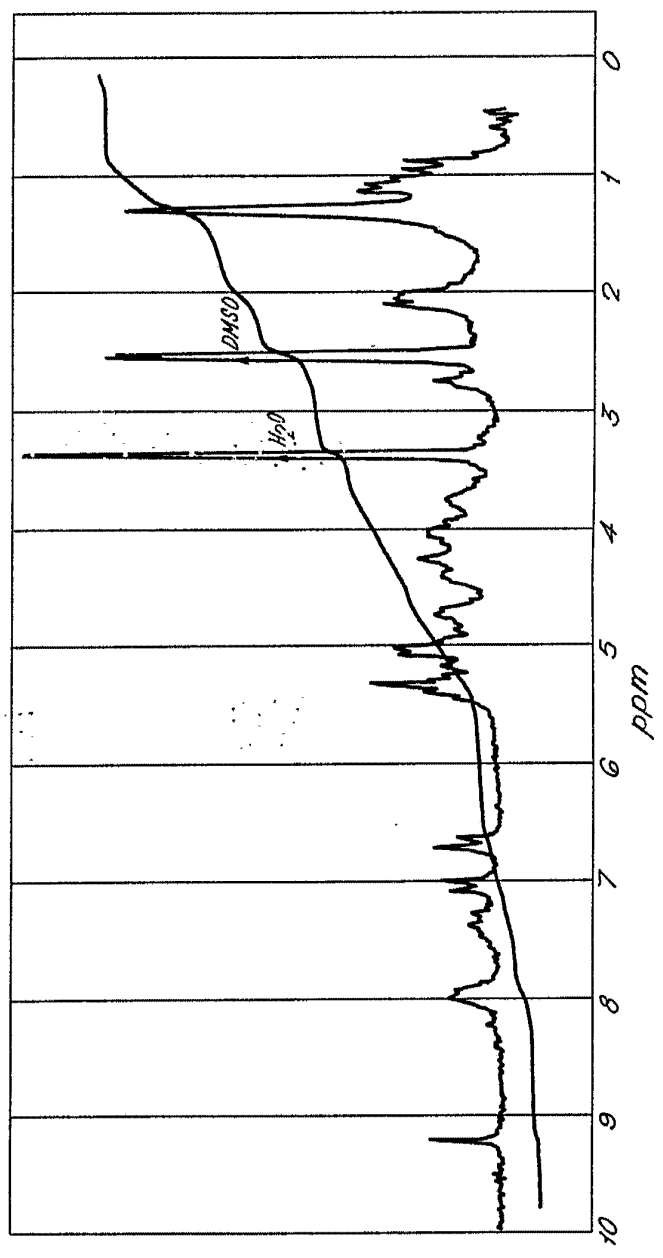


FIG. 3.



ES-1000
M. J. Iejas
Noja 2

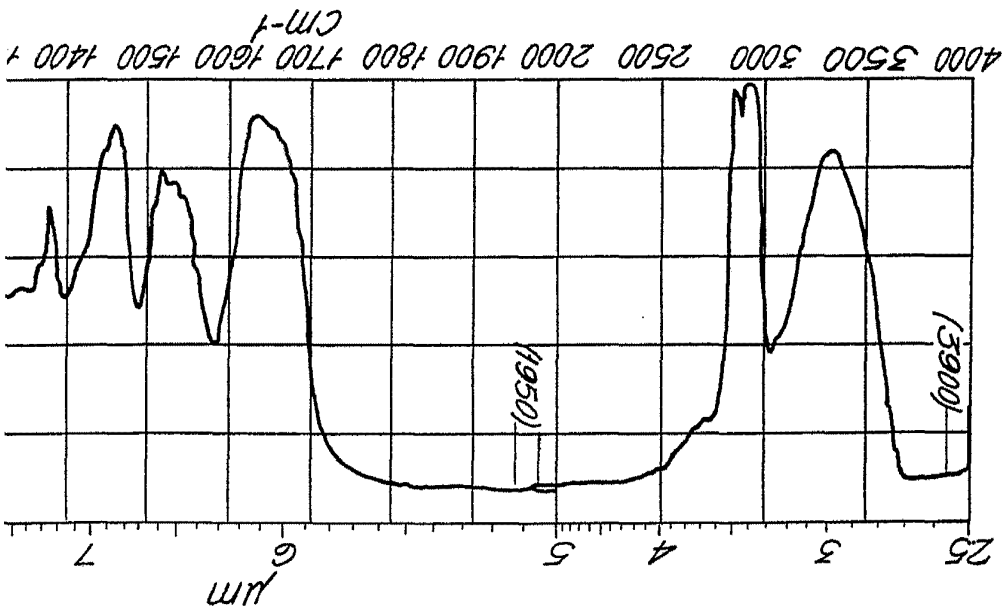


FIG. 2

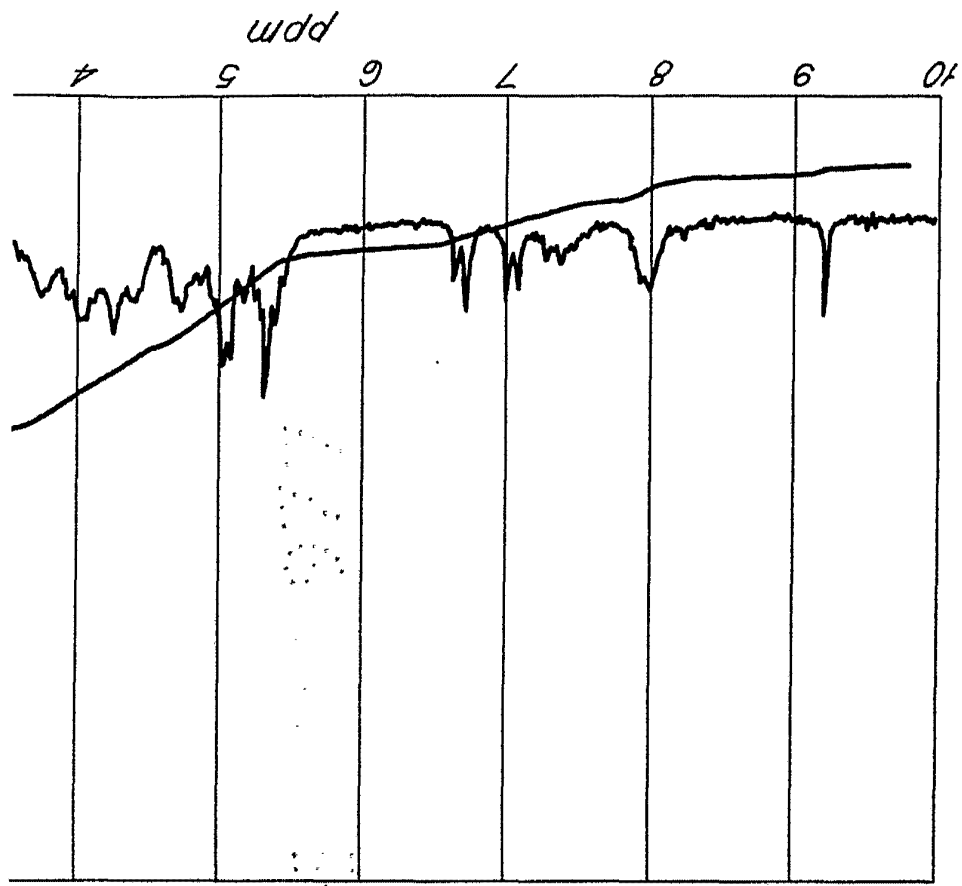
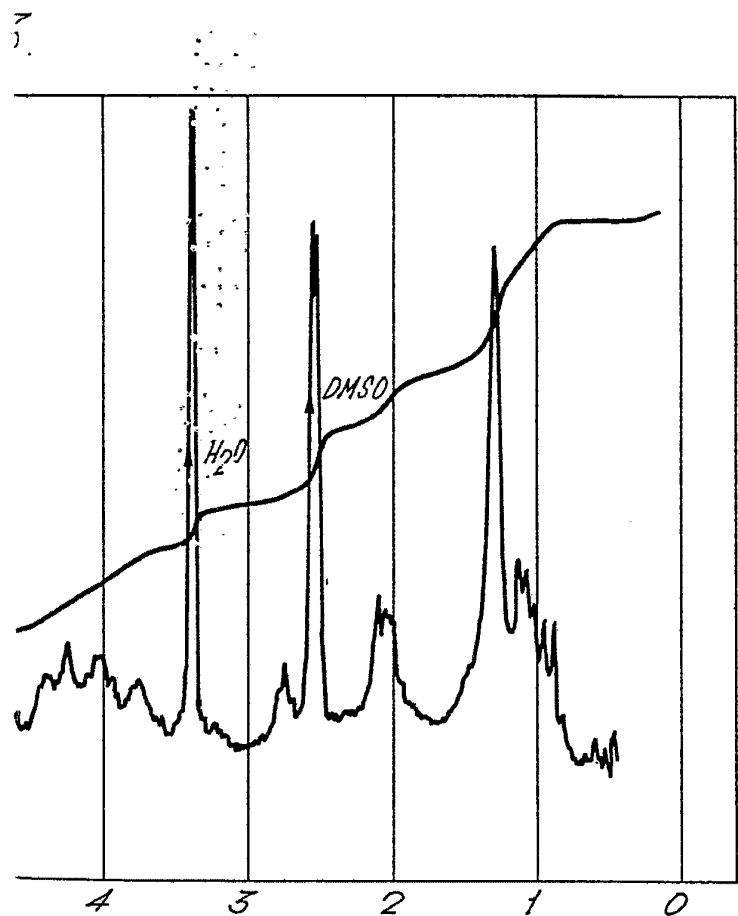
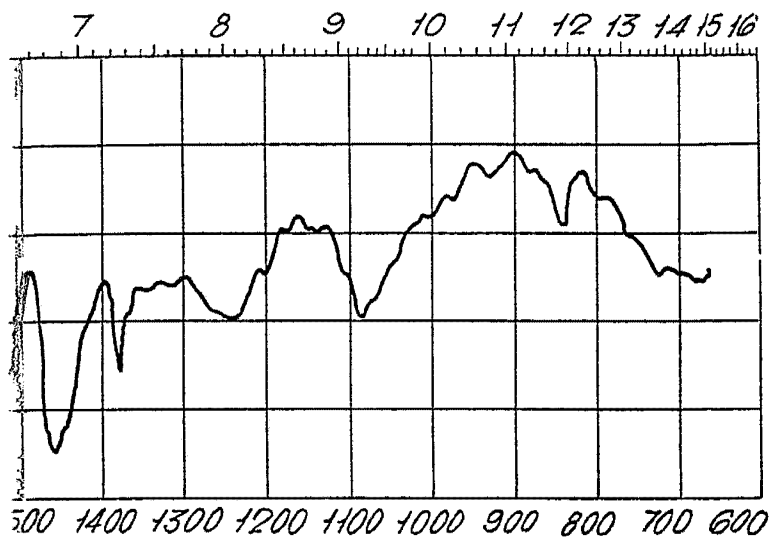


FIG. 3



ESOL
MAGNA
MAGNA
MAGNA

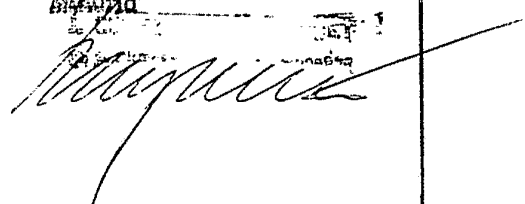


FIG. 5.

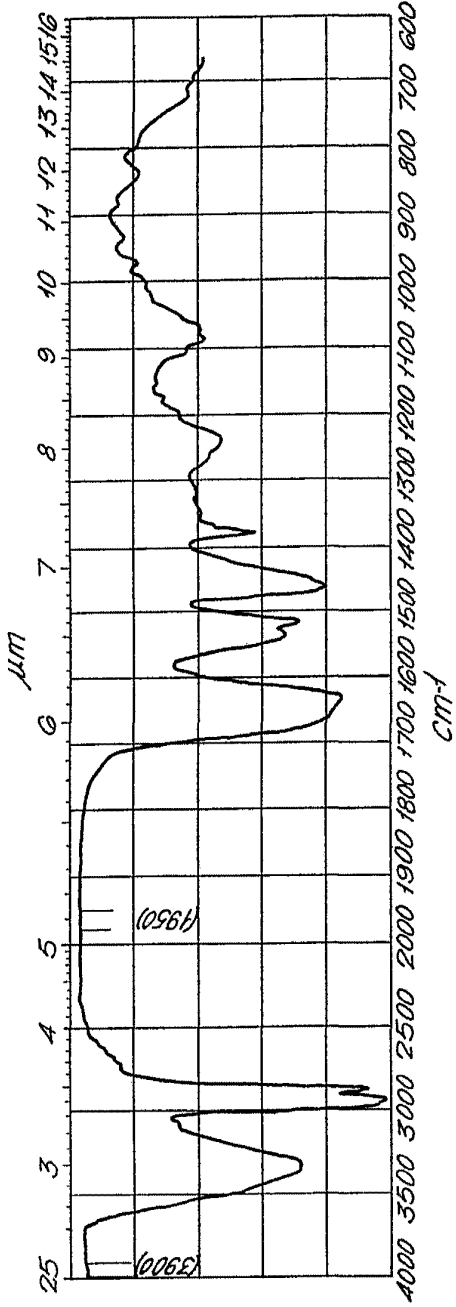


FIG. 6.

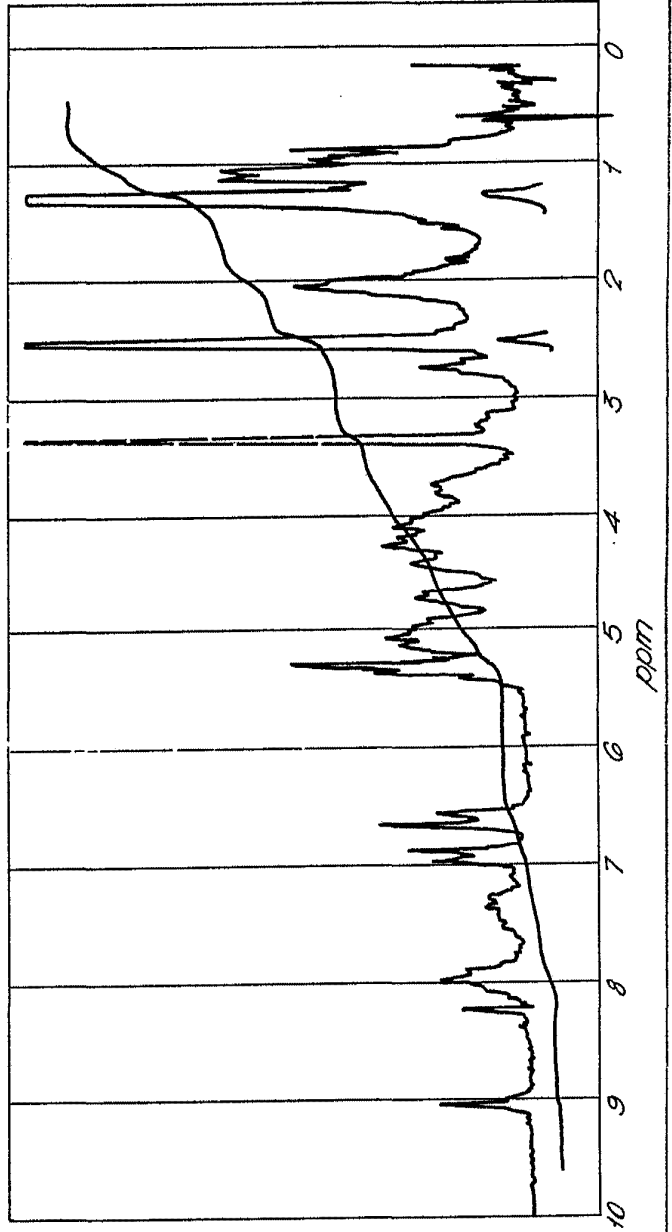


FIG. 5.

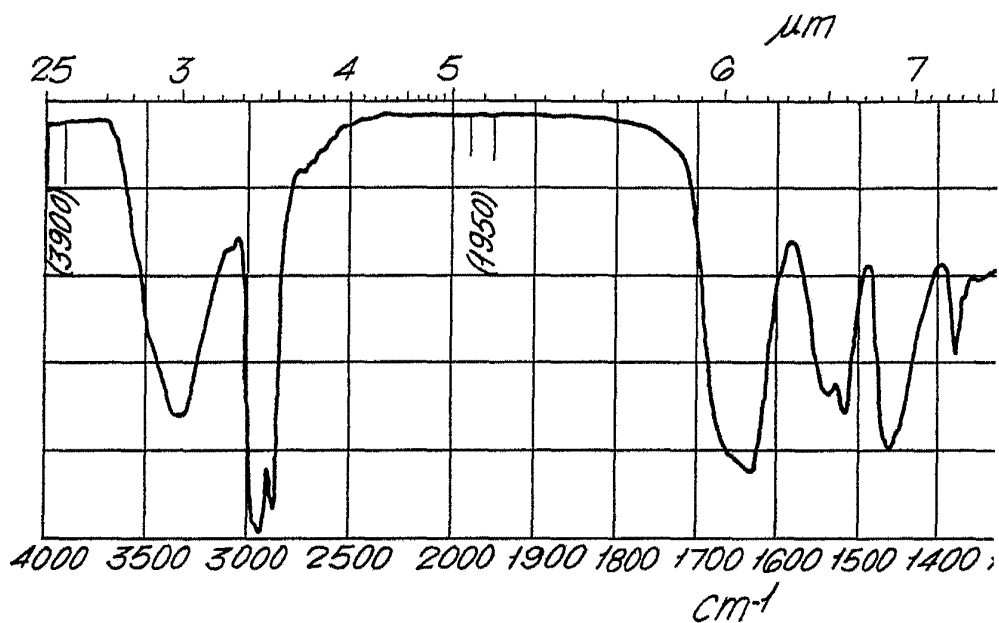
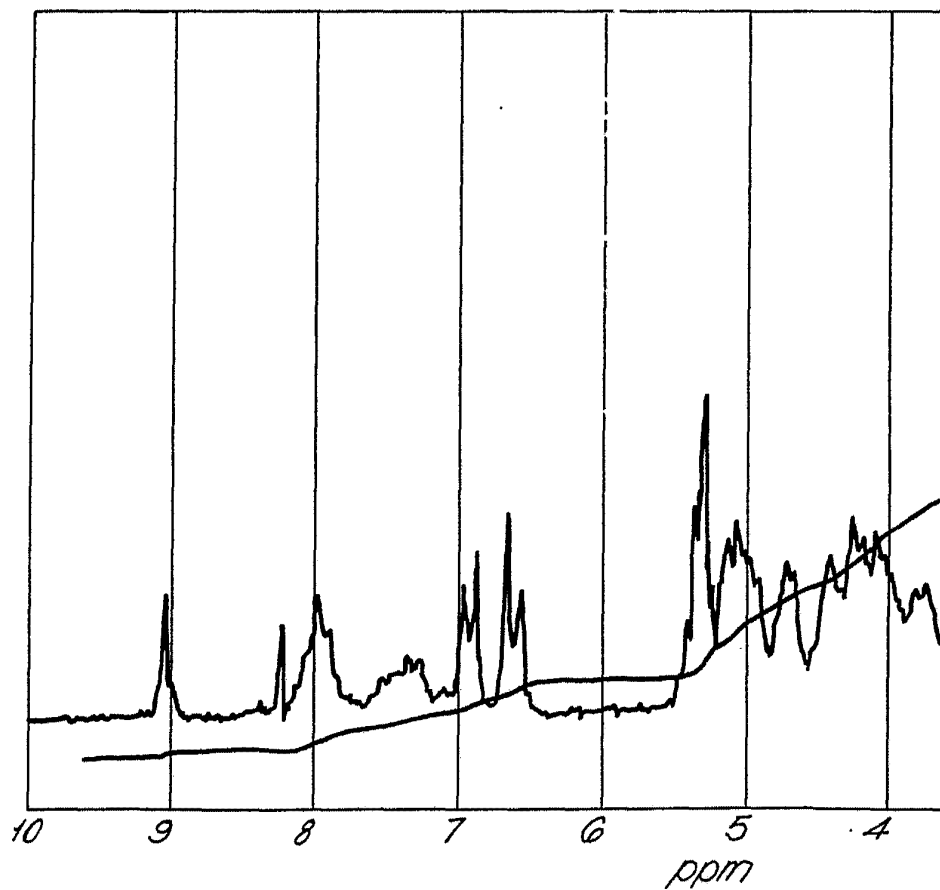
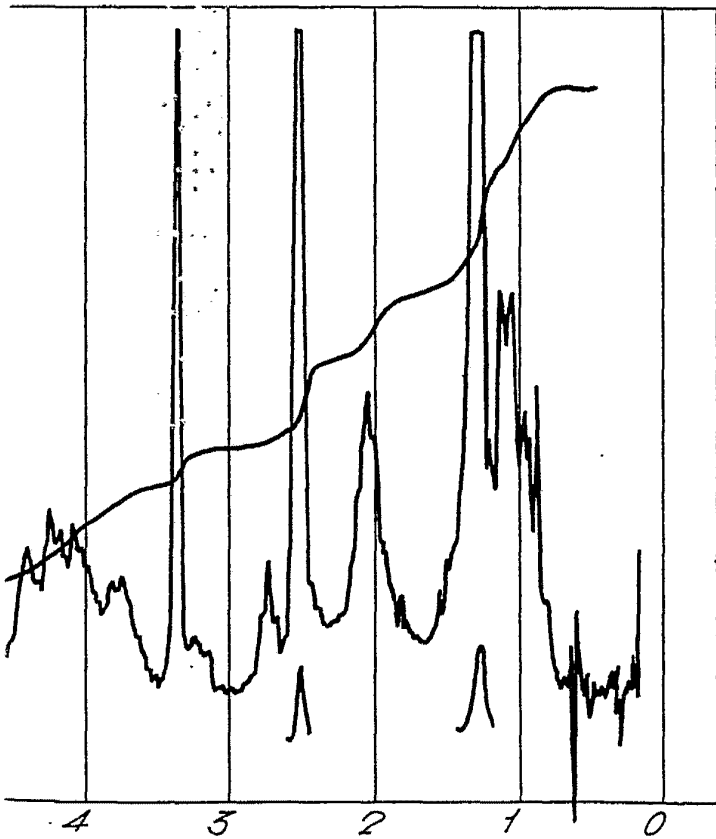
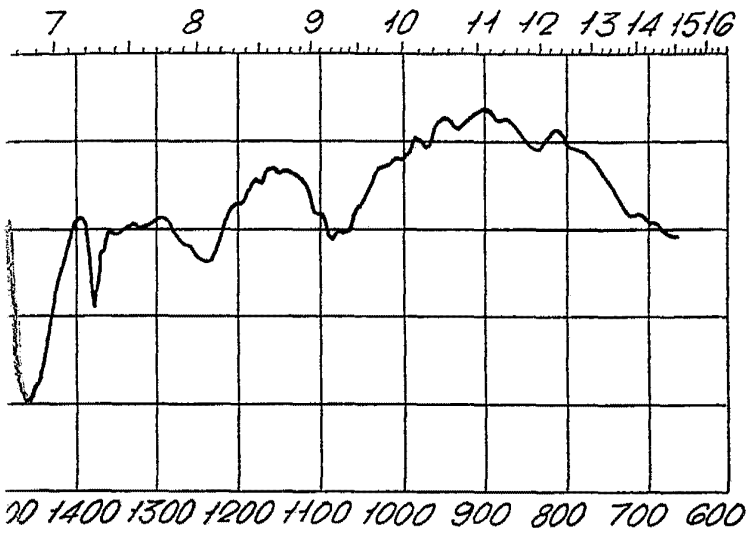


FIG. 6.





[Faint, illegible text and a signature]

FIG. 7.

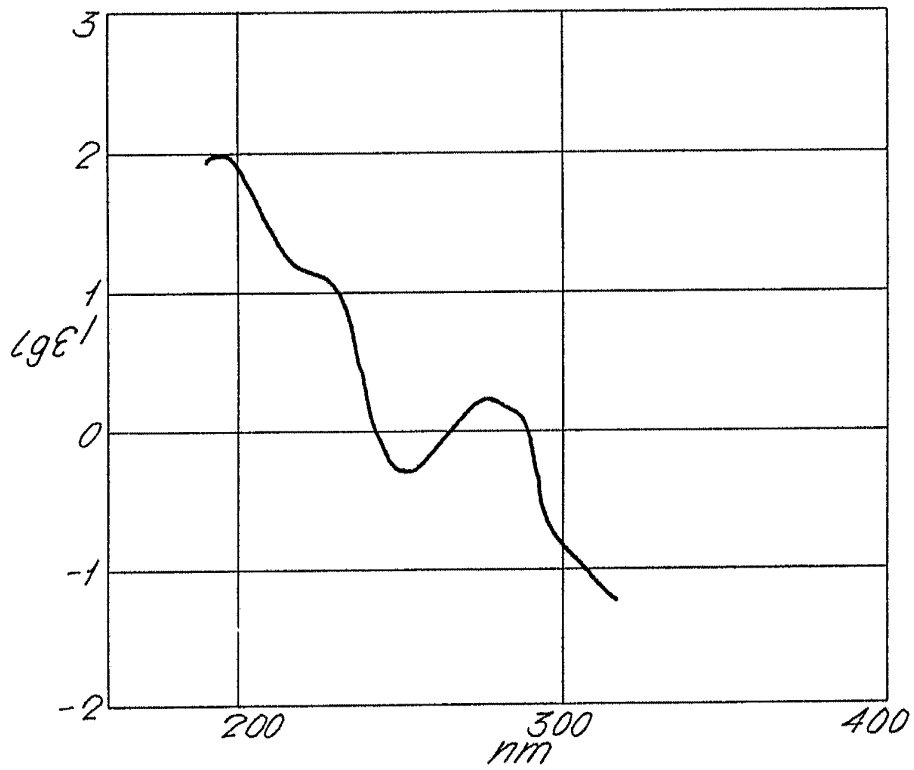
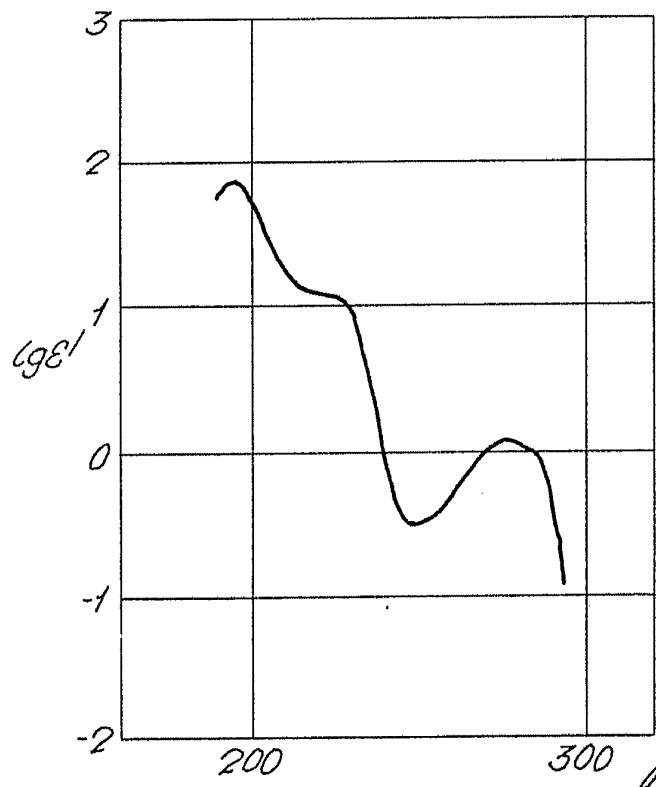


FIG. 10.



[Handwritten signature]

FIG. 8.

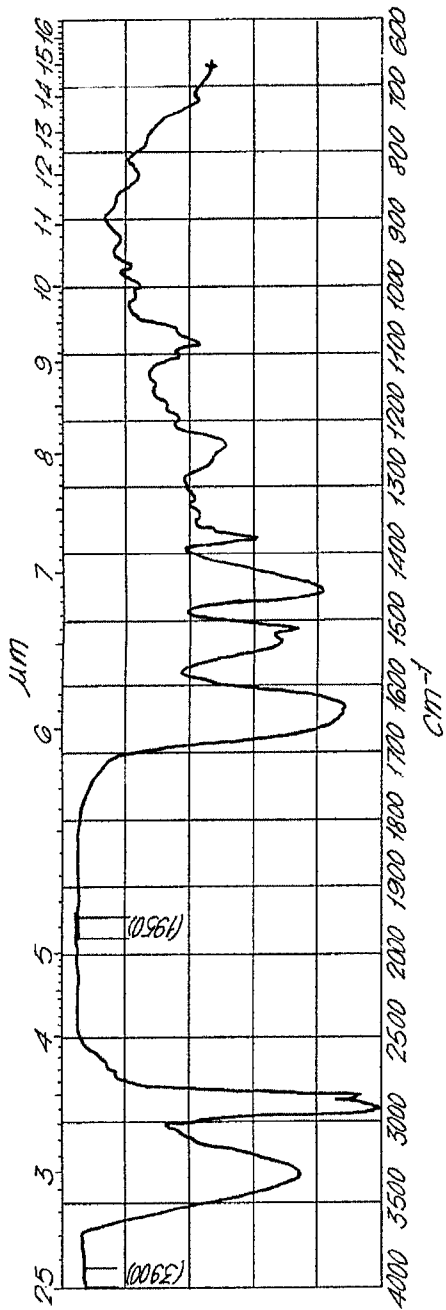
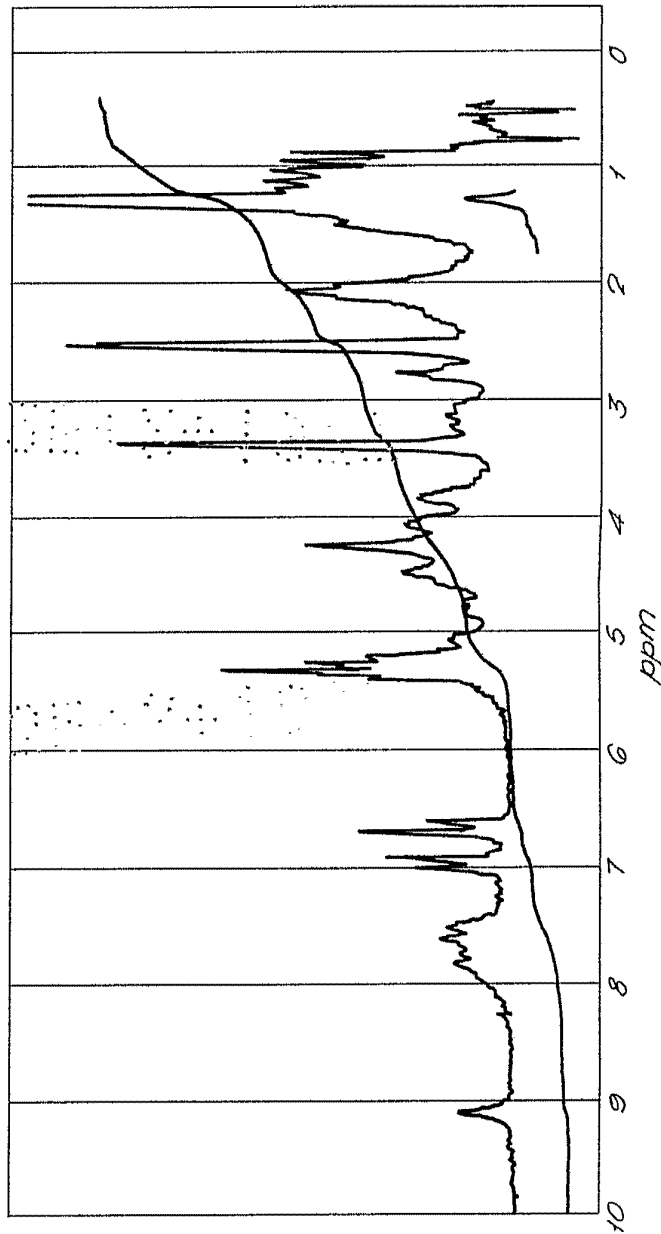


FIG. 9.



ES-113

MS-113

[Handwritten signature]

FIG. 8.

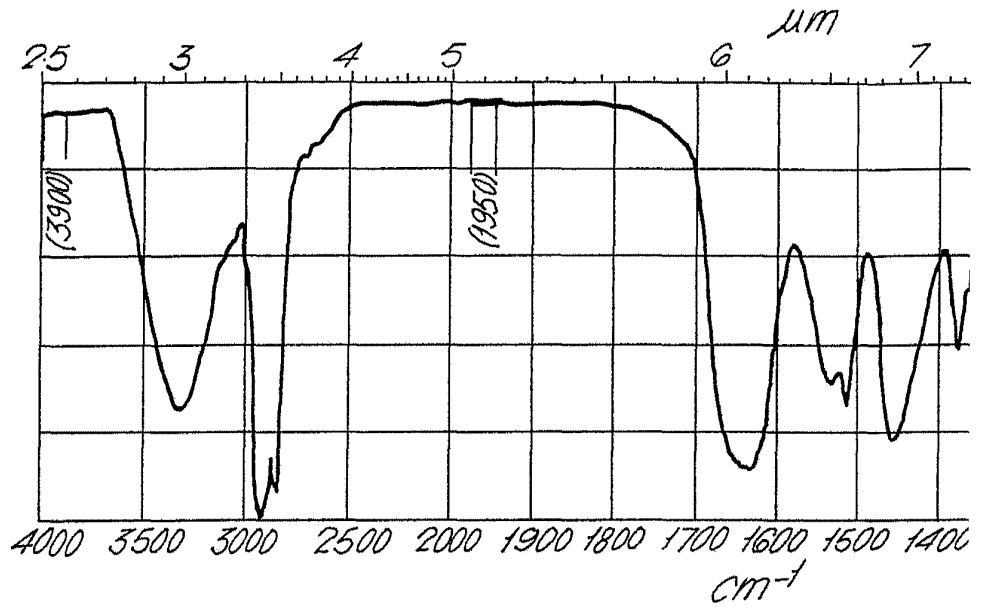
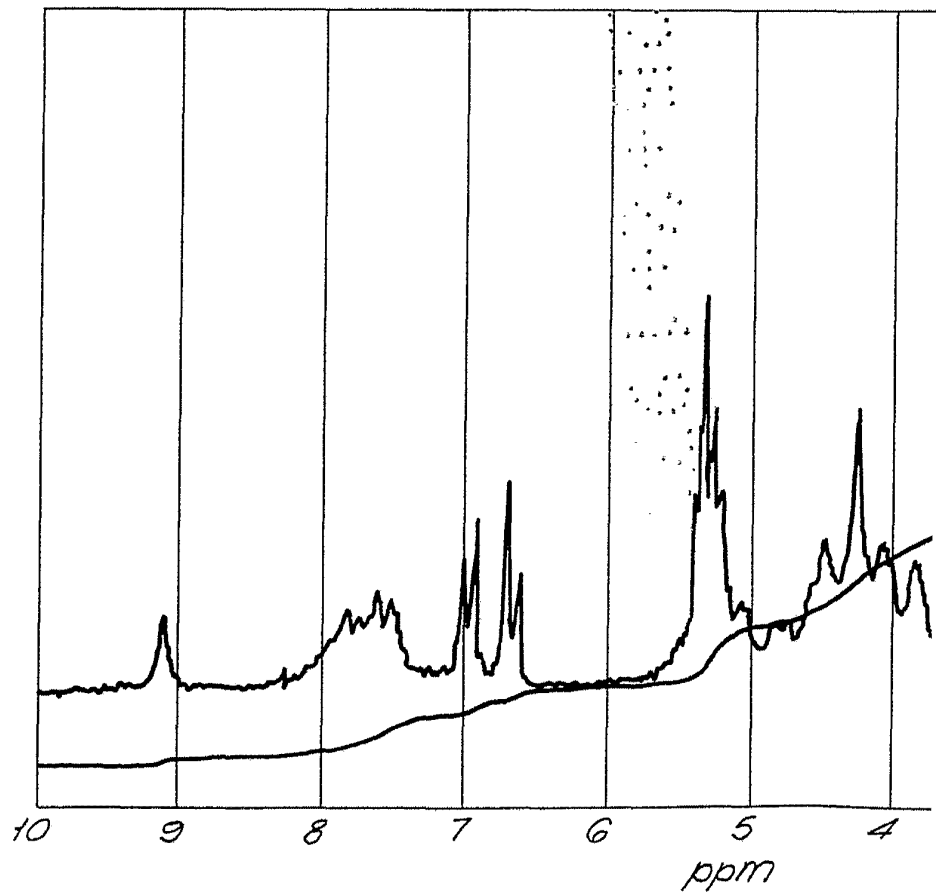
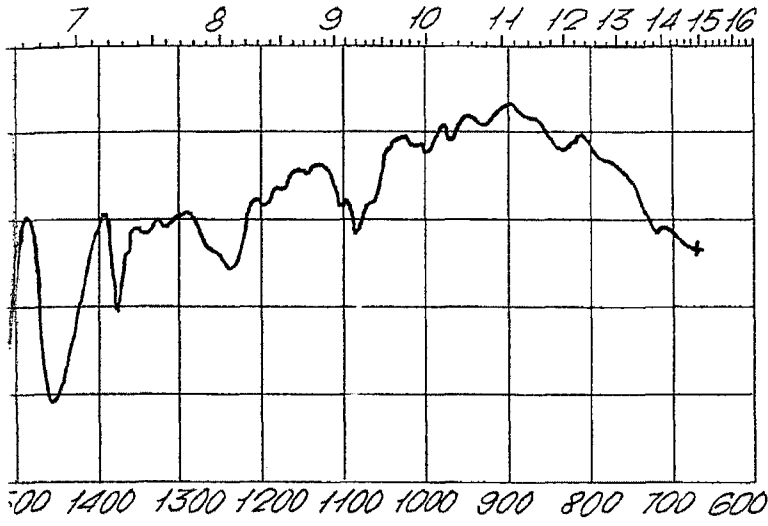
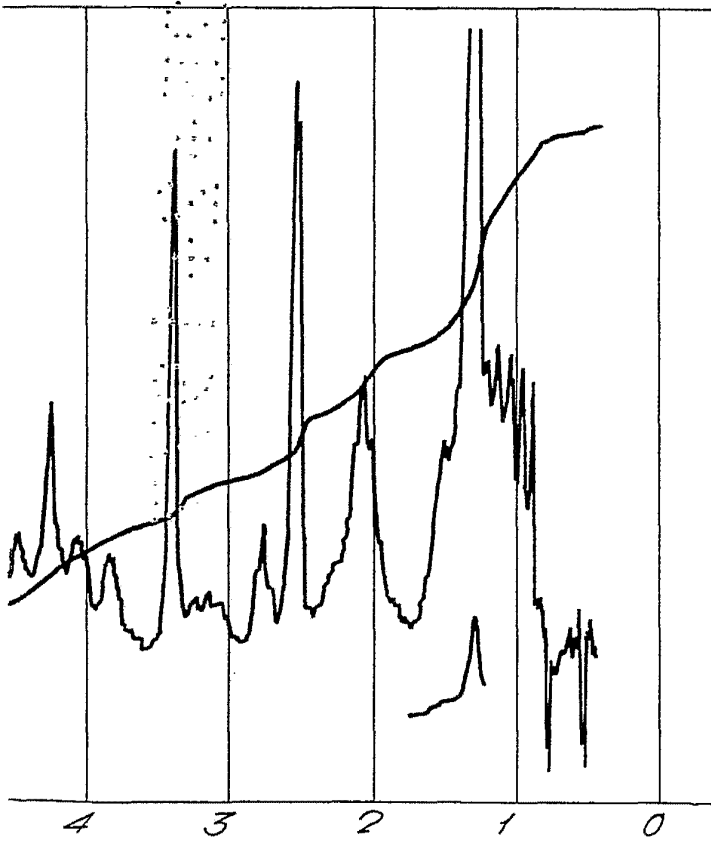


FIG. 9.





9.



ESTADO DE GUATEMALA

MAAYA

[Handwritten signature]

FIG. 11.

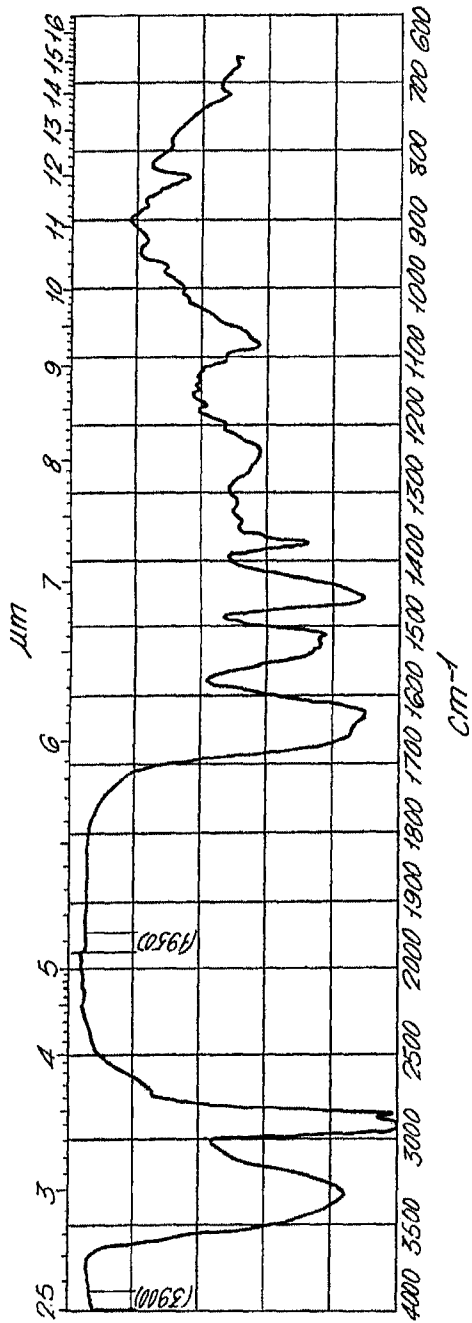
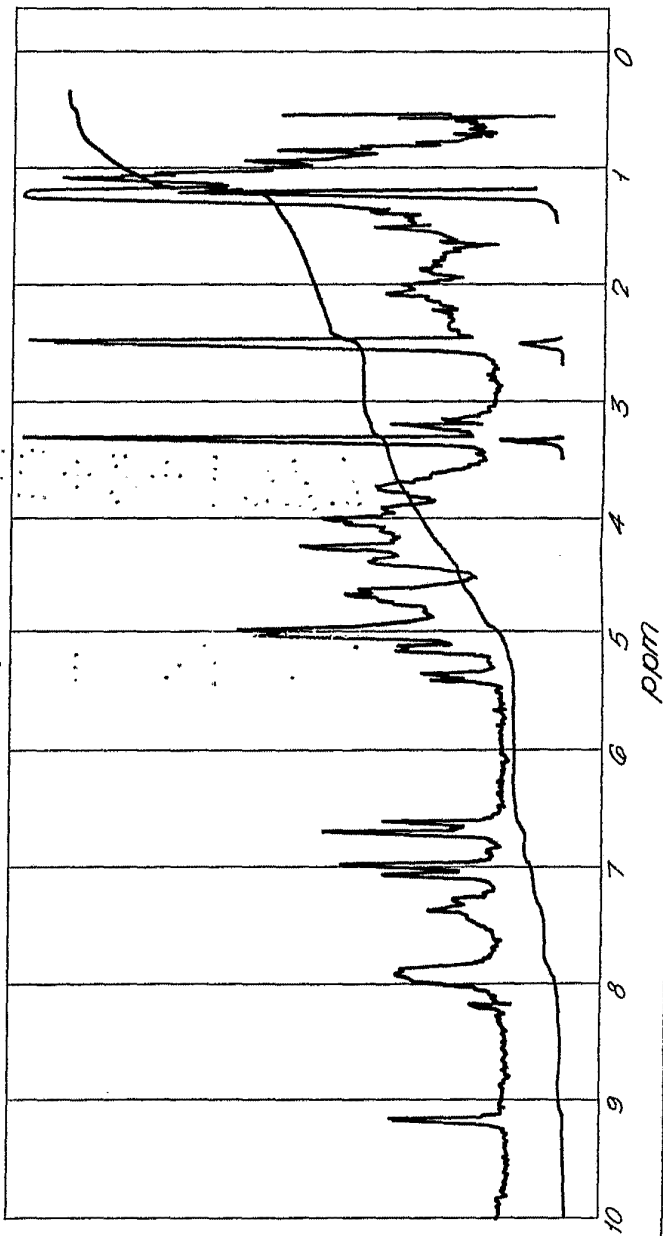


FIG. 12.



PREPARED BY
[Handwritten Signature]

FIG. 11.
 μm

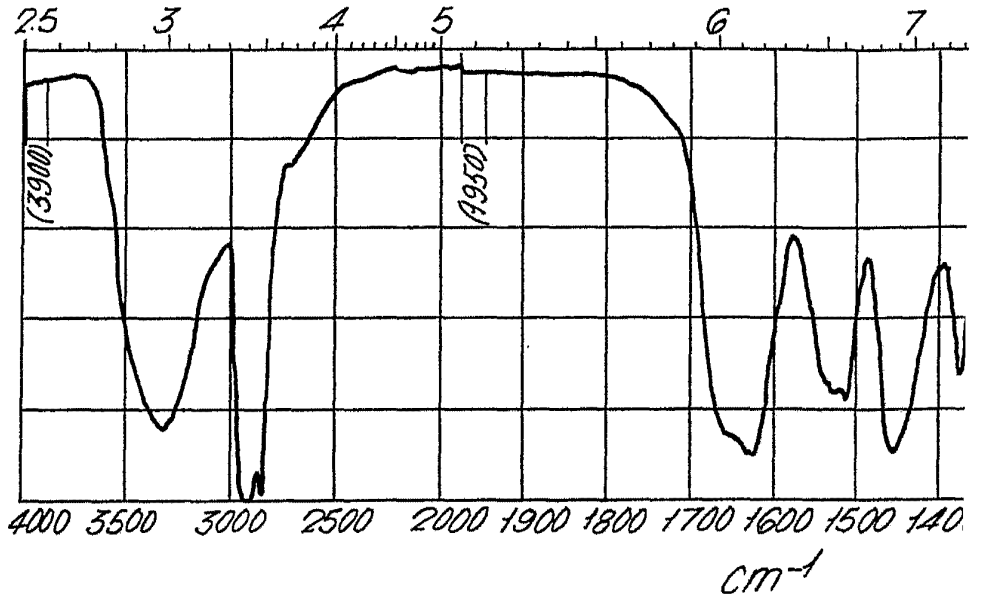
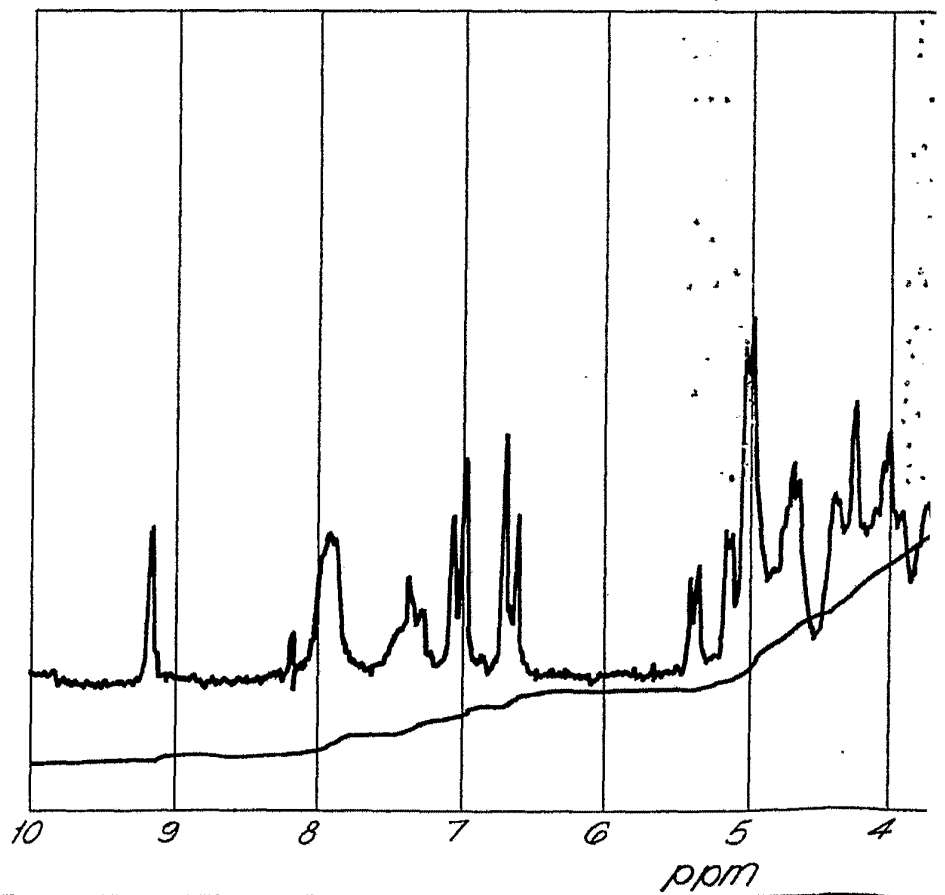


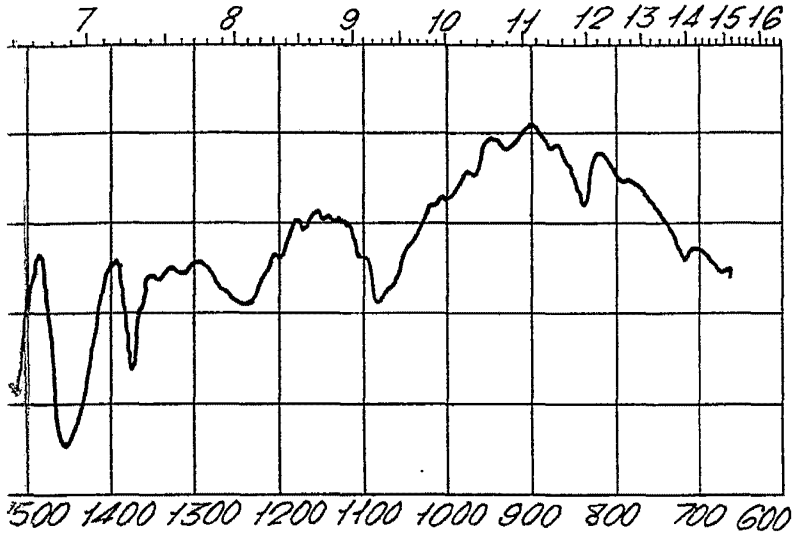
FIG. 12.



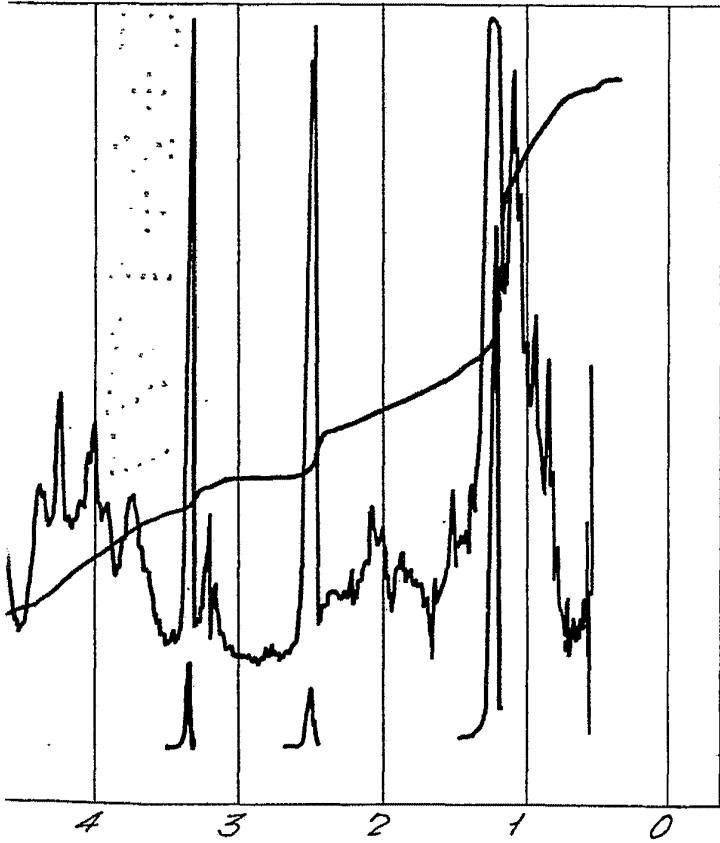
SECRET

11.

1177



2.



Madrid 2-12-57

[Handwritten signature]

FIG.13.

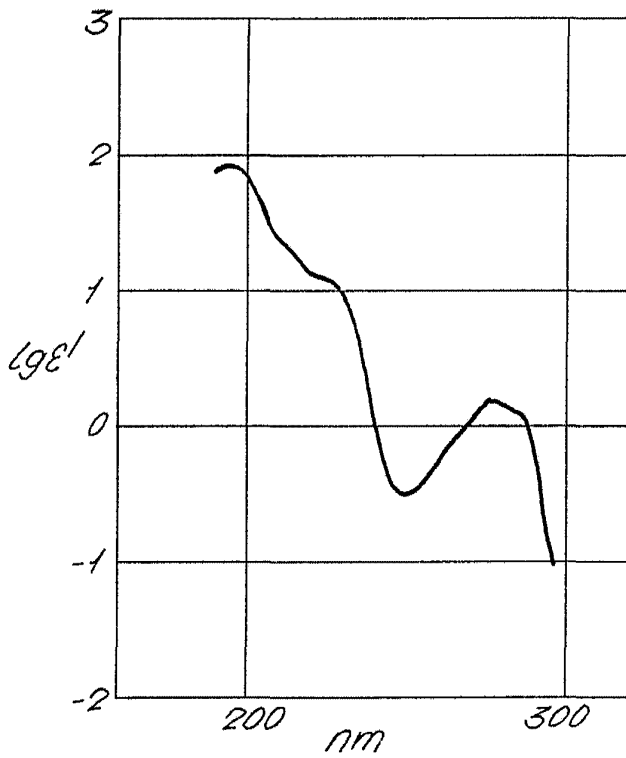
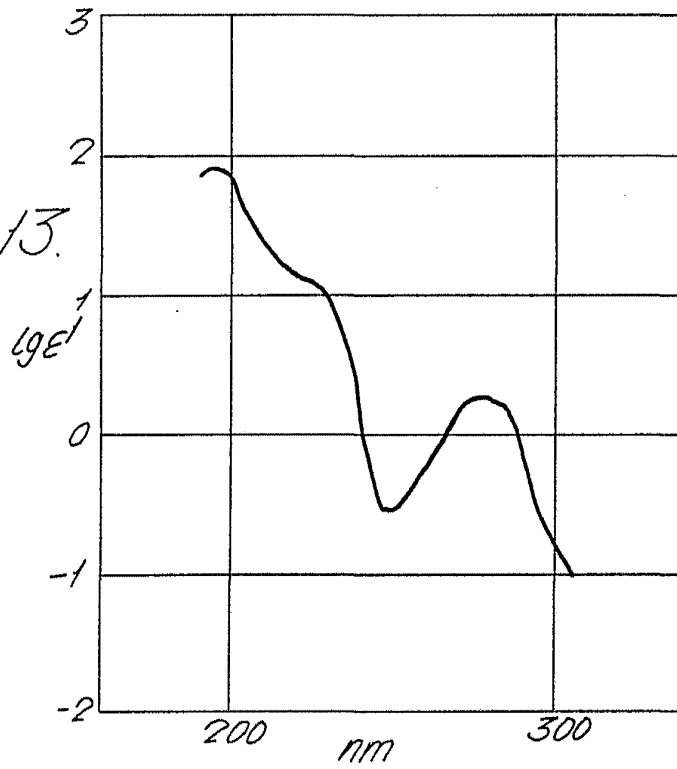


FIG.16.

[Handwritten signature]

FIG. 14.

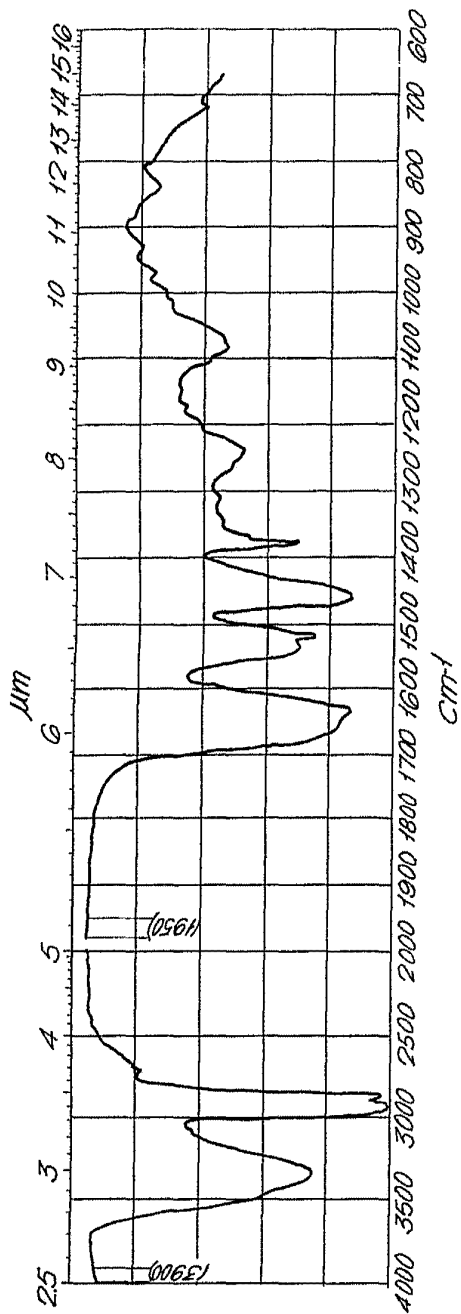
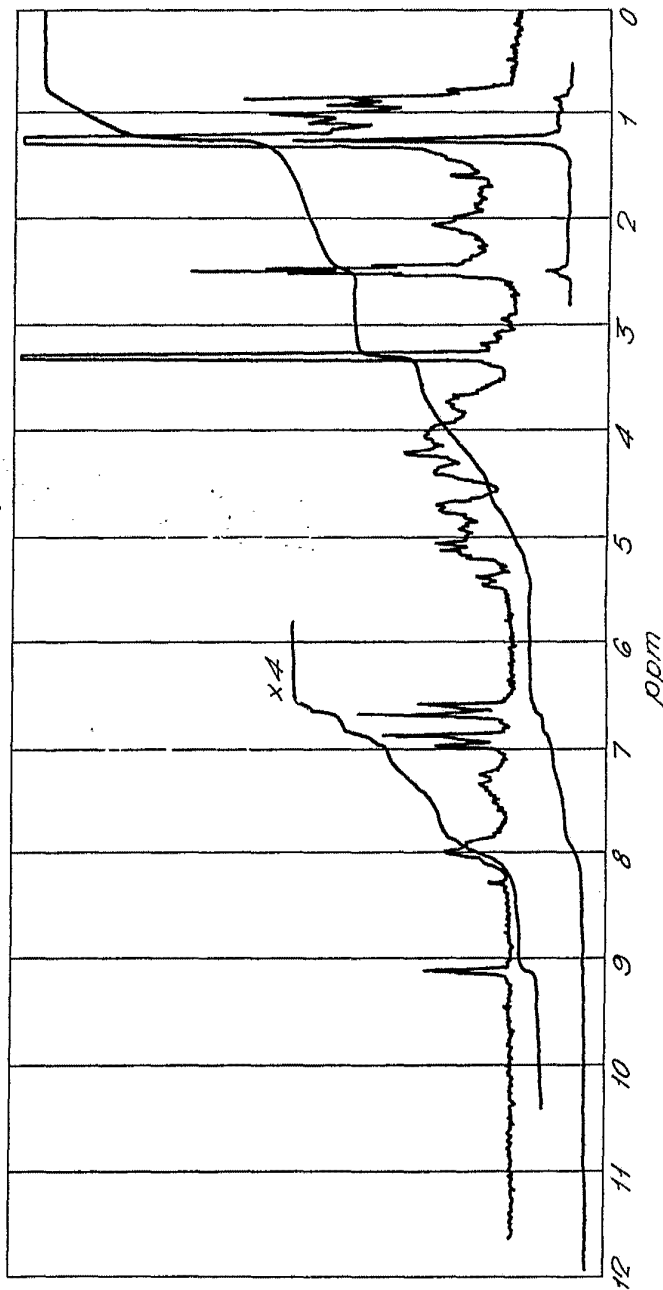


FIG. 15.



[Handwritten signature]

FIG. 14.

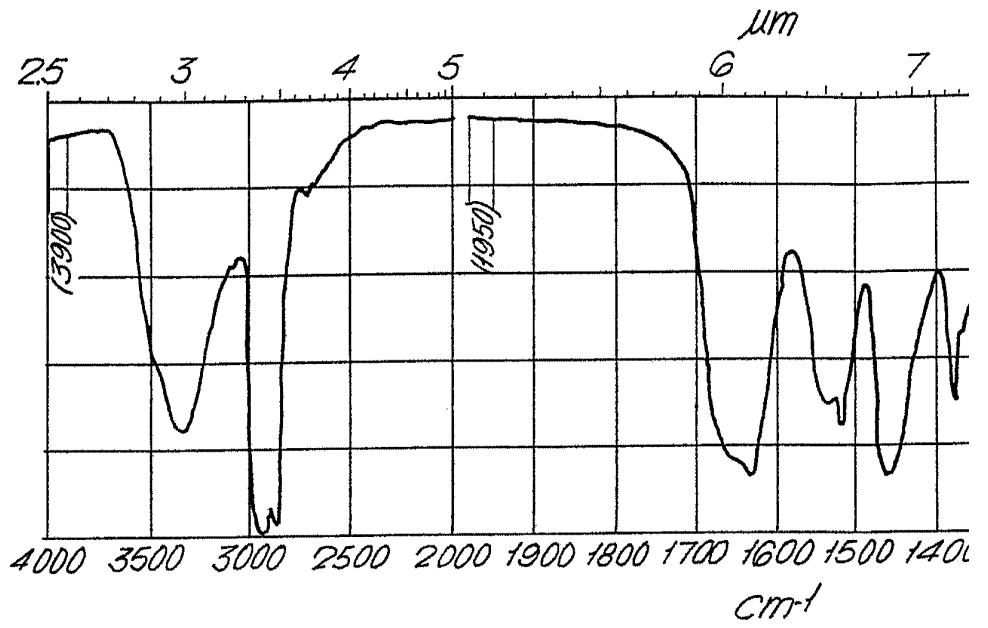
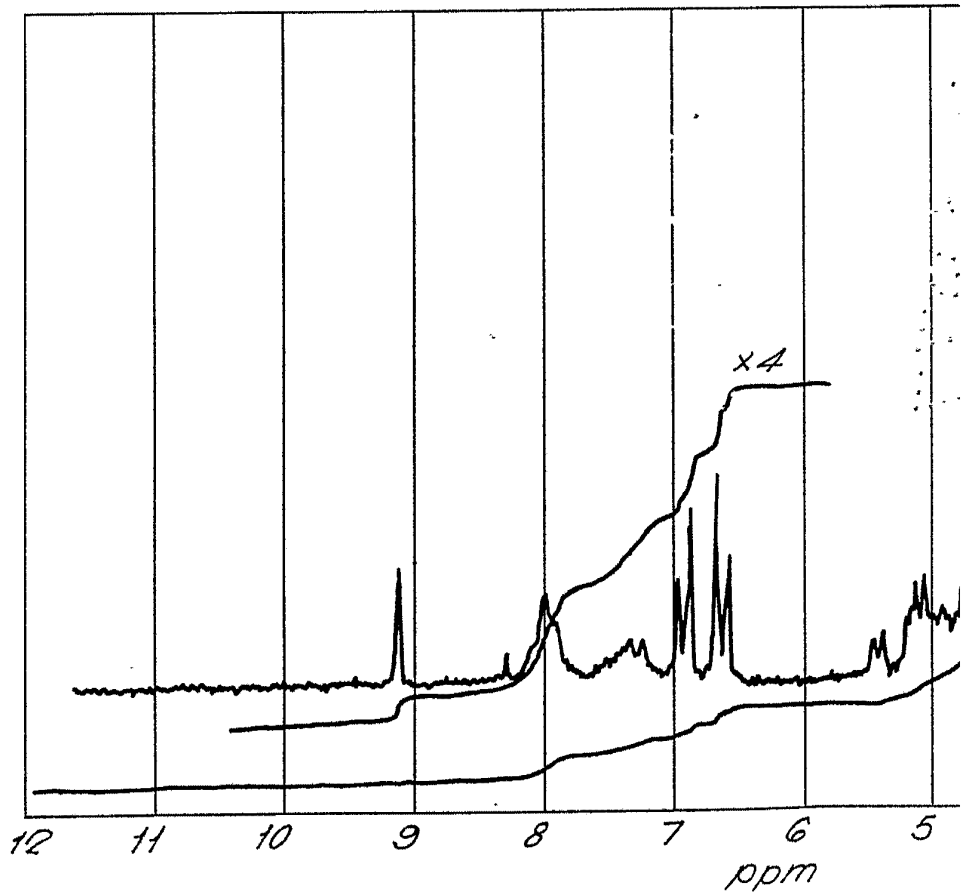
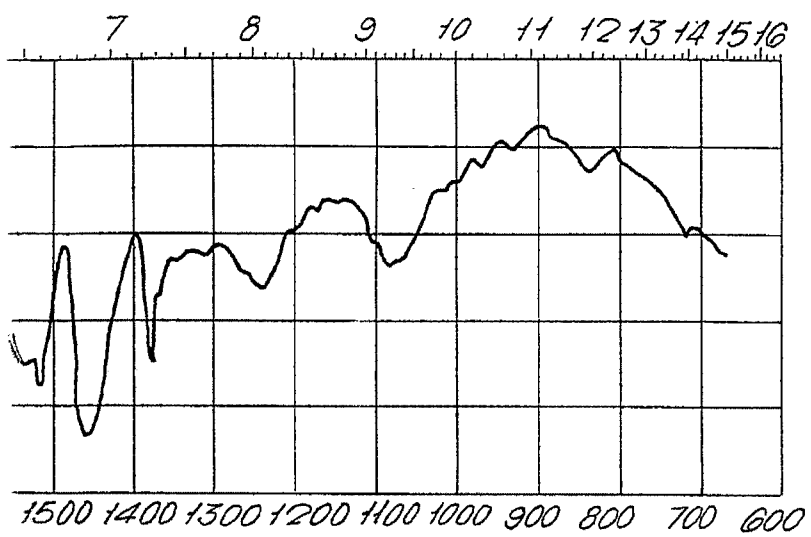


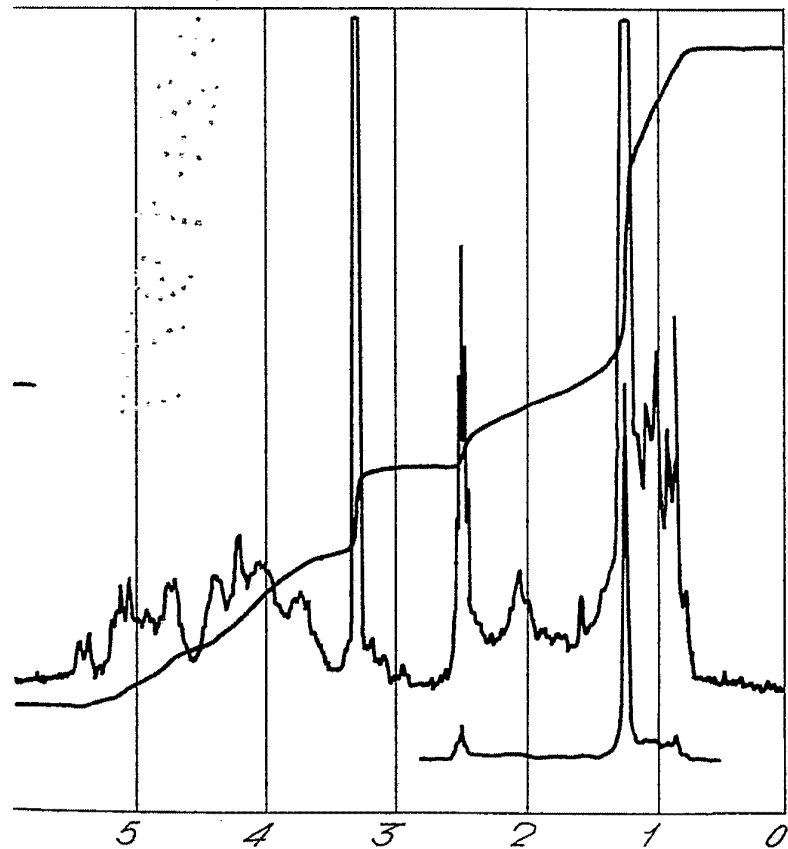
FIG. 15.



1.



5.



SEP 1958

[Handwritten signature]

FIG. 17.

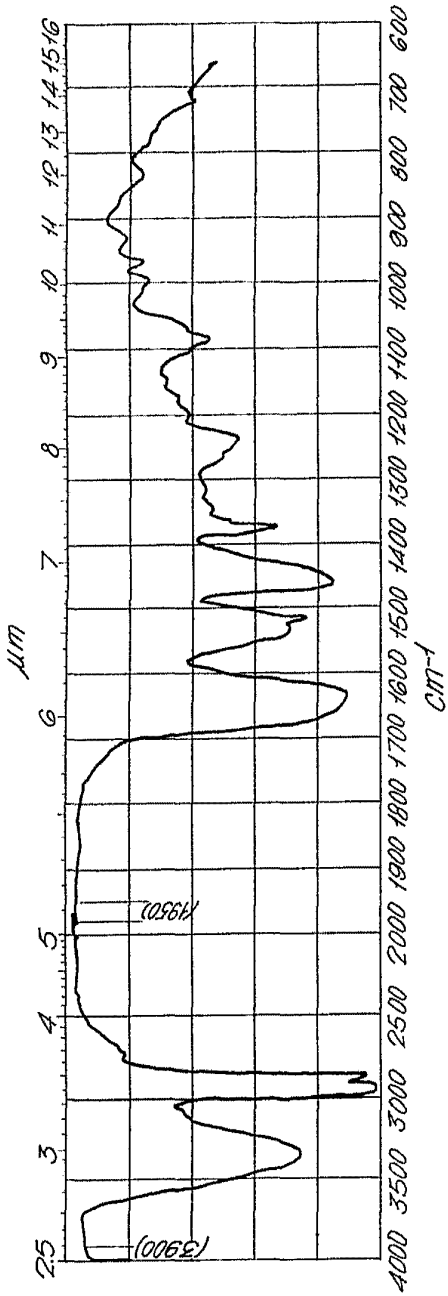
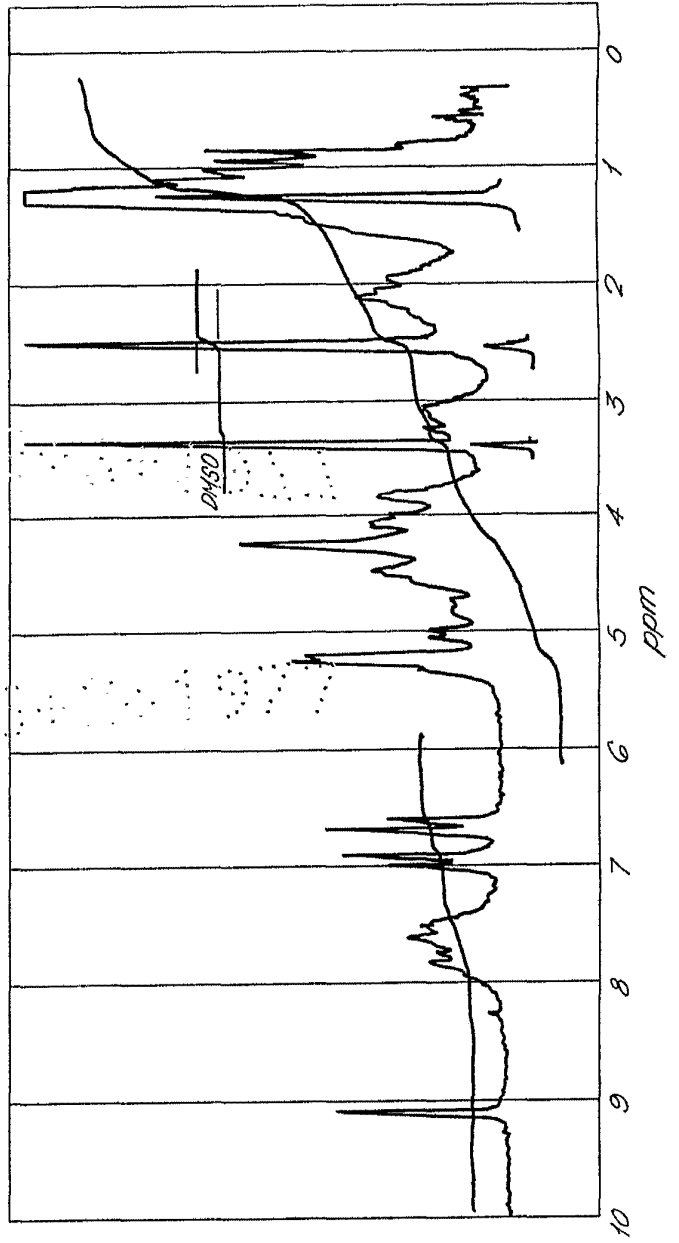


FIG. 18.



Handwritten signature

FIG. 17.

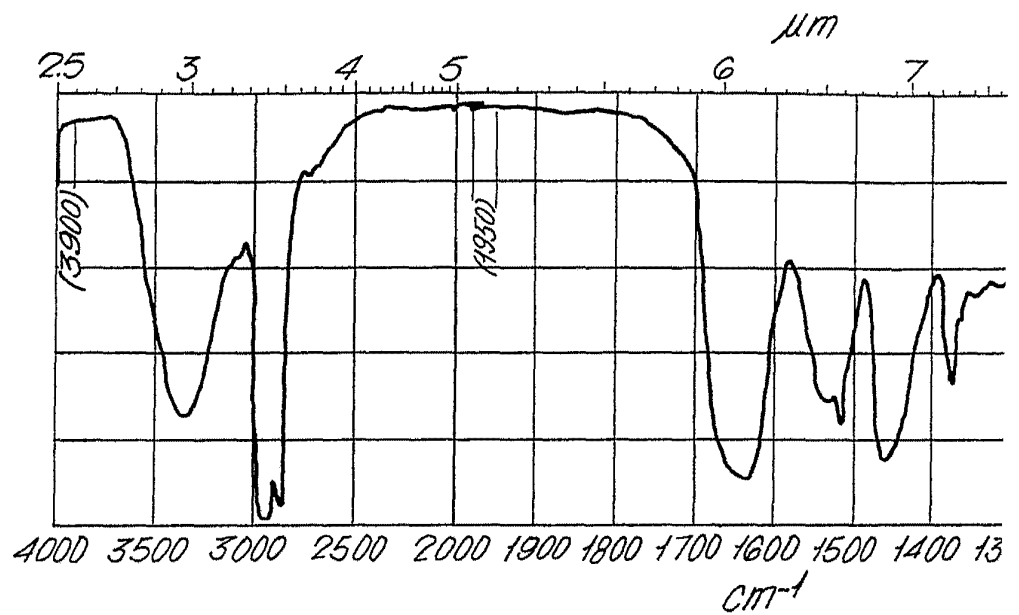
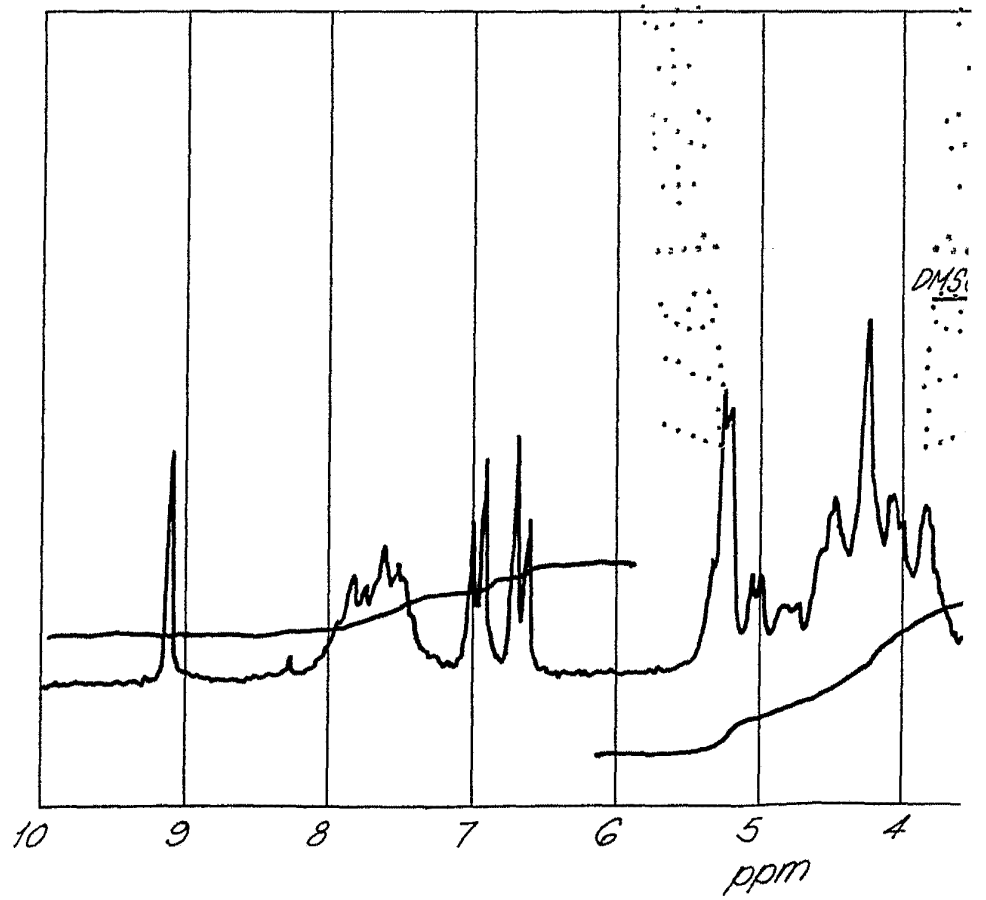
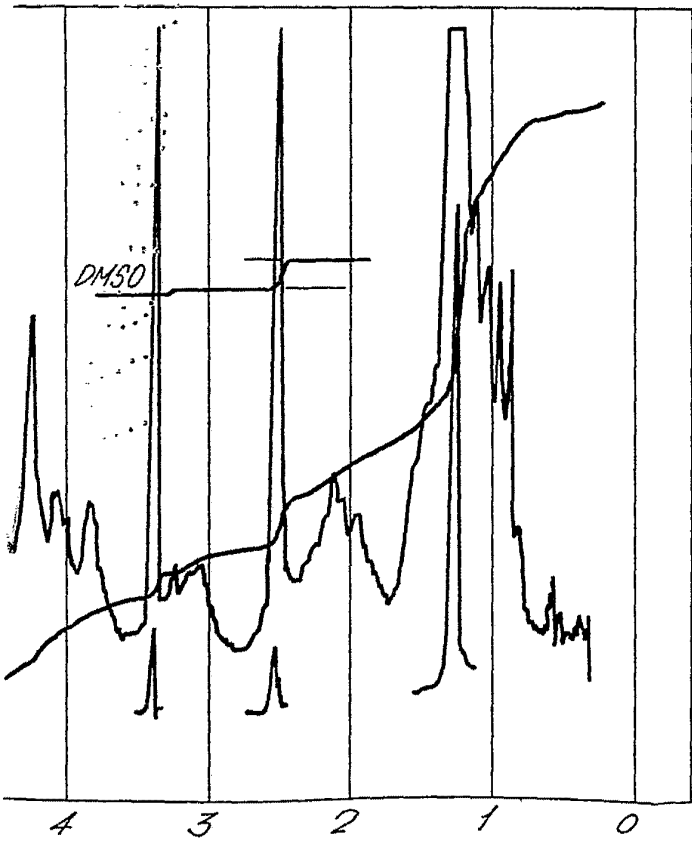
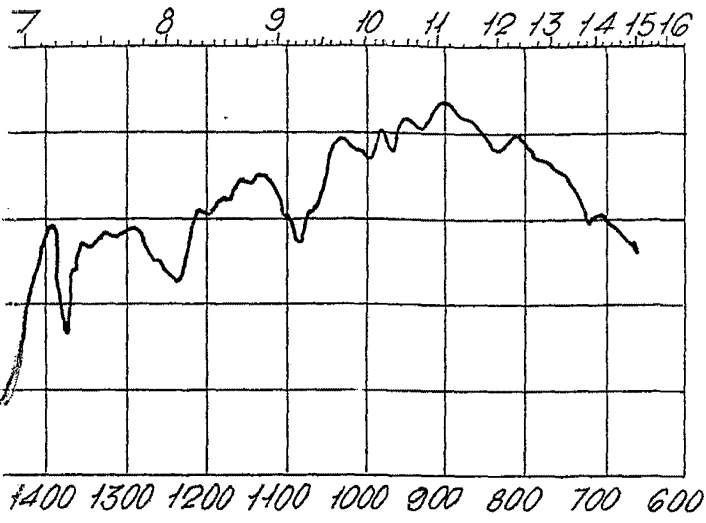


FIG. 18.



7



Signature