

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

10	ES	11	NUMERO	70582	12	AI
		21				
		22	FECHA DE PRESENTACION	6 JUL. 1976		

PATENTE DE INVENCION

60 PRIORIDADES:		
61 NUMERO	62 FECHA	63 PAIS
8894/75	8 de julio de 1975	SUIZA
64 FECHA DE PUBLICIDAD	65 CLASIFICACION INTERNACIONAL	66 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D	
67 TITULO DE LA INVENCION		
PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE S 31794/F-1		
68 SOLICITANTE (S)		
SANDOZ A.G.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
Basilea, Suiza.		
69 INVENTOR (ES)		
Dr. Michael Morris, Hans Tschertter.		
70 TITULAR (ES)		
71 REPRESENTANTE		
D. JAIME GOMEZ-ACEBO Y MODET		

La presente invención se relaciona con un procedimiento para preparar el compuesto S 31794/F-1.

De acuerdo con la invención se obtiene S 31794/F-1 cultivando una cepa de la especie de hongos *Acrophialophora limonispora* nov.spec. Dreyfuss + Müller, productora de S 31794/F-1, en presencia de un medio nutritivo.

El compuesto S 31794/F-1 exhibe las propiedades siguientes:

Polvo amorfo blanco que puede ser cristalizado en la forma indicada en el Ejemplo 3. En cuanto no se hagan otras indicaciones, las cifras indicadas a continuación se refieren tanto a la forma amorfa como a la forma cristalina.

P.F. 176 - 180 ° C (desc.) [amorfo]

P.F. 181 - 183 ° C (desc.) [cristalino]

$[\alpha]_D^{20} = -24^\circ$  (c = 0,5 en metanol)

$[\alpha]_D^{20} = +37^\circ$  (c = 0,5 en piridina) [cristalino]

En el espectro UV en metanol (Fig. 1) aparecen máximos de absorción a  $\lambda_{\max} 194\text{nm}$ ,  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 807$ ;  $\lambda_{\max} 225\text{nm}$  (hombro),

$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 132$ ;  $\lambda_{\max} 276\text{nm}$ ,  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 12,8$ ;  $\lambda_{\max} 284\text{nm}$  (hombro),

$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 10,5$ .

Espectro IR en BrK (amorfo) [Fig. 2].

Espectro IR en Nujol (cristalino) [Fig. 3].

Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (100 megaciclos/segundo en DMSO)  
con tetrametilsilano como standard interno [Fig. 4].

5 Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  en  $\text{D}_4$ -metanol (190 mg en 1,5 cc de  
 $\text{D}_4$ -metanol) con tetrametilsilano como standard interno,  
véase la Tabla 1 (cristalino).

Tabla 1:

Aparato Bruker HX-90-E; 22,63 megaciclos/segundo,  
10 alcance de los espectros 6000 ciclos/segundo, TMS = 0 ppm.

	<u>PPM</u>	<u>PPM</u>	<u>PPM</u>
	176,2	75,5	51,2
	175,0	74,0	39,7
	173,7	71,0	38,8
15	172,6	70,5	36,6
	172,0	69,7	34,8
	171,8	68,0	32,8
	171,7	62,2	30,6
	168,6	58,3	26,7
20	157,7	57,0	23,5
	132,5	56,2	19,7
	129,0	55,4	14,3
	115,9	52,9	11,1
	76,6		

Para el análisis se secó la sustancia amorfa a 20°C en alto vacío. El análisis elemental dio los siguientes valores límites:

C 53,9 % H 7,5 % N 10,1 % O 27,3 %

- 5 Para el análisis se secó la sustancia cristalina en alto vacío a 100°C durante 2 horas. El análisis elemental dio los siguientes valores límites:

Hallado C 55,5 - 56,5 % H 7,5 - 7,7 % N 10,5 - 10,8 %  
O 25,5 - 26,0 %

- 10 El compuesto es fácilmente soluble en metanol, etanol, piridina, dimetilsulfóxido, difícilmente soluble en agua, cloroformo, acetato de etilo, éter, benceno, hexano.

El compuesto es estable en metanol acuoso a un pH de 3 a 7,5, en un alcance pH alcalino o fuertemente ácido

- 15 se produce la descomposición con la pérdida de la actividad contra los hongos.

Mediante hidrólisis ácida (6N ClH/110°C) se halló ácido mirístico como producto de descomposición, el que se identificó en forma del éster metílico.

- 20 En el cromatograma de capa delgada sobre placas ya preparadas de gel de sílice Merck, espesor de la capa 0,25 mm, S. 31794/F-1 exhibe los valores  $R_f$  siguientes en los eluyentes indicados:

(amplitud de referencia de uracilo en paréntesis)

Eluyente		Valor R <sub>f</sub>
cloroformo/metanol/agua	(71 : 25 : 4)	0,17 (0,4)
cloroformo/metanol/ácido acético	(70 : 29 : 1)	0,19 (0,6)
cloroformo/metanol	(2 : 1)	0,27 (0,5)

Las manchas pueden hacerse visibles con yodo o con un reactivo de pulverización adecuado. Se han obtenido buenos resultados con el reactivo de pulverización siguiente:

5 La placa que ha sido librada completamente del disolvente, se rocía previamente con una mezcla de 0,5 % de ácido acético glacial en etanol/acetona (1:1). A continuación se coloca la placa durante aprox. 7 minutos en una atmósfera de cloro y a continuación se elimina el exceso de Cl<sub>2</sub> mediante una buena corriente de aire. 10 Luego se rocía con una solución de 1 parte de solución de yoduro de potasio 0,05 molar en agua + 4 partes de una solución de bencidina al 0,5 % en ácido acético al 20%. Al revelar de este modo el antibiótico S 31794/F-1 da 15 una mancha azul.

S 31794/F-1 no da coloración alguna con ninhidrina.

El procedimiento de la invención puede llevarse a cabo de acuerdo con métodos conocidos para la obtención 20 fermentativa. Un cultivo preferido de la cepa productora de S 31794/F-1 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 8095, en donde se encuentra a libre disposición para ser examinado.

5 Sin embargo, también pueden usarse cepas productoras de S 31794/F-1 que pueden obtenerse a partir de la cepa inicial de la especie de hongo *A. limonispora* nov.spec. Dreyfuss + Müller mediante tratamiento con sustancias mutagénicas o rayos, o mediante selección.

10 Características de la cepa NRRL 8095

La nueva cepa de la especie de hongo *Acrophialophora limonispora* nov.spec. Dreyfuss + Müller, empleada de acuerdo con la invención, fue aislada de una muestra de tierra hallada en British Columbia, Canadá.

15 La nueva cepa NRRL 8095 fue colocada bajo el género de hifomicetos *Acrophialophora* Edward, debido a sus propiedades morfológicas, pero no ha podido hacerse concordar con las tres especies hasta ahora descritas de este género (Samson y Tariq Mahmood, 1970: The Genus  
20 *Acrophialophora*, Acta bot.Neerl. 19 (6), 804-808), de modo que consecuentemente la nueva cepa NRRL 8095 ha sido clasificada como nueva especie, *Acrophialophora limonispora* nov.spec.

Los conidióforos de color pardo claro a oscuro de *A. limonispora* NRRL 8095 generalmente tienen un largo de 700 a 1800  $\mu$  y un espesor de 4 a 8  $\mu$ , son septados, rectos o ligeramente arqueados, no ramificados en la parte inferior y media o con unas pocas bifurcaciones y pueden estar provistos a todo lo largo de verrugas. En la punta del conidióforo se desarrolla un sistema ramificado en forma penicilada, simétrico o asimétrico, generalmente compacto, ya que en las últimas células del eje principal del conidióforo generalmente crecen ramas laterales primarias de una o pocas células, aisladas, en forma alterna, generalmente sin embargo, de dos en dos opuestos o de tres en tres (raramente cuatro) en forma verticilada. Estas ramas laterales tienen a su vez varios tallos secundarios, laterales y apicales, los que pueden estar ramificados análogamente en forma terciaria. Sobre las ramas secundarias o terciarias se encuentran en el vértice, en forma compacta, de 2 a 6 fialidas grandes que miden 7 - 11 x 2,5 - 4  $\mu$ , las que tienen forma de botella y terminan en una punta. Particularmente en los cultivos viejos pueden observarse pequeños pinceles con elementos ramificados, muy alargados.

Los conidios hialinos, formados basipetal-

mente, en cadenas que se desmiembran ligeramente, tienen, al ser observados del lado, forma ancha de limón con pequeños apículos de apariencia más oscura, miden 3,2 - 4,2 x 3,0 - 3,5  $\mu$  y son lisos o ligeramente verrugosos en su superficie.

La cepa NRRL 8095 posee un óptimo de crecimiento de gran alcance entre 20° C y 27° C, formándose colonias que miden aprox. 35 a 40 mm sobre agar con extracto de malta al 2 %, en el transcurso de 7 días. El límite inferior de crecimiento queda a alrededor de 4°, el límite superior entre 33° y 34° C.

Las colonias sobre agar con extracto de malta al 2 % son primero de color blanco verdoso y están cubiertas de un micelio aereo muy flojo, blanco. Al ir aumentando de edad, el micelio del substrato cambia de color a pardo oscuro. El micelio aereo que se forma en primer lugar es cubierto más y más en el transcurso de 5 - 10 días por los conidióforos que se presentan en forma de alfombra espesa. La alfombra de conidios tiene primero un color dorado o verde amarillento, más tarde un color pardo claro, oscuro o ceniciento.

La nueva cepa NRRL 8095 puede ser cultivada en o sobre medios de cultivo con composición adecuada, ya sea como cultivo de superficie o como cultivo sumergido.

Para la obtención del nuevo compuesto

S 31794/F-1 se emplean preferentemente cultivos sumergidos, inoculándose medios de cultivo adecuados, tal como se describe en los Ejemplos 1 y 2, con una suspensión de conidios o de micelio de la nueva cepa NRRL 8095 e incubándose a un valor pH de 3 a 8, preferentemente 5 - 7,0, y a una temperatura de 15 - 30° C, preferentemente 18 - 27° C, mientras se agita, se sacude y/o se aera durante 48 a 360 horas, preferentemente 120 a 288 horas.

La porción del micelio en el caldo de cultivo puede ser triturada, si se desea, y el S 31794/F-1 puede obtenerse en forma de por sí conocida mediante el método de extracción y/o adsorción. Sin embargo, también es posible separar primero el micelio del caldo de cultivo mediante centrifugación, extraer separadamente el filtrado de cultivo y el micelio después de su trituración, y seguir elaborando los extractos, ya sea separadamente o juntamente.

La invención también incluye caldos de fermentación que se obtienen al cultivarse una cepa productora de S 31794/F-1.

S 31794/F-1 posee propiedades farmacodinámicas interesantes y puede ser empleado como medicamento.

S 31794/F-1 exhibe un efecto antimicrobiano, sobre todo contra levaduras y hongos. No ha podido comprobarse efecto alguno contra los representantes usuales de las bacterias grampositivas y gramnegativas de acuerdo con métodos conocidos, pero el efecto contra diversas cepas de *Candida*, patógenas para el ser humano, es especialmente pronunciado. En el ensayo de dilución en series, que se lleva a cabo con un medio de extracto de malta (2 % de extracto de malta, pH 5,2 - 5,4) a una temperatura de incubación de 27° C y con un tiempo de incubación de 48 a 72 horas, se obtienen las concentraciones de inhibición mínimas siguientes para S 31794/F-1:

Cepa	CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Candida albicans</i>	0,3
<i>Candida krusei</i>	1
<i>Candida tropicalis</i>	0,3
<i>Candida albicans</i> 5897	0,3
<i>Candida albicans</i> H 12	0,3
<i>Candida albicans</i> Blast.res.	0,03
<i>Candida tropicalis</i> CK 4	0,01
<i>Candida albicans</i> 439	0,03
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	32
<i>Trichophyton quinckeanum</i>	>100
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	100
<i>Sporotrichum schenkii</i>	>100

Aspergillus niger	100
Aspergillus fumigatus	32
Microsporum canis	100
Curvularia lunata	> 100
Neurospora crassa	> 100

El efecto también puede comprobarse in vivo con el método de la infección séptica experimental en el ratón con *Candida albicans*. Por lo tanto, el compuesto de la invención puede ser usado como agente antimicótico. Las dosis diarias son de 2 a 14 mg/kg s.c. o de 100 a 300 mg/kg p.o. La dosis para mamíferos grandes es de 20 a 150 mg s.c. o de 1 a 3 g p.o.

S 31794/F-1 puede usarse como medicamento, ya sea solo o en forma de preparaciones medicinales adecuadas junto con adyuvantes orgánicos o inorgánicos, farmacológicamente inertes. S 31794/F-1 puede usarse, por ejemplo, como componente de un ungüento, la concentración en el ungüento pudiendo ser de aprox. 5 a 50 mg de agente activo por cada gramo de ungüento.

En los Ejemplos no limitativos siguientes todas las temperaturas están indicadas en grados Celsius.

EJEMPLO 1: Cultivo de NRRL 8095

10 litros de una solución nutritiva, con-  
teniendo por cada litro de agua desmineralizada 20 g de  
glucosa, 5 g de peptona de caseína, 3 g de  $\text{NO}_3\text{Na}$ , 1 g  
5 de  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ , 0,5 g de  $\text{ClK}$ , 0,5 g de  $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  
10 mg de  $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , se inoculan con 1 litro de un  
cultivo previo de la cepa NRRL 8095, y se incuba en un  
fermentador de vidrio de 10 litros con agitación  
(150 revoluciones/minuto) y aeración (1 litro de  
10 aire/minuto/litro de solución nutritiva) durante  
4 días a 18°.

El cultivo previo empleado como material  
inicial se obtiene como sigue:

La suspensión de esporos y de micelio,  
15 empleada para la inoculación, se produce a partir de un  
cultivo de la cepa NRRL 8095, que se cultiva durante  
10 días a 27° sobre un medio de agar que contiene por  
cada litro de agua desmineralizada 20 g de extracto de  
malta, 20 g de agar y 4 g de extracto de levadura. Los  
20 esporos y el micelio de este cultivo se recogen en una  
solución de sal común fisiológica. Con esta suspensión  
se inocula 1 litro de una solución nutritiva, que con-  
tiene por cada litro de agua desmineralizada 20 g de  
extracto de malta y 4 g de extracto de levadura, y se  
25 incuba en un matraz Erlenmeyer de 2 litros sobre una

máquina de agitación rotatoria (180 revoluciones/minuto) durante 2 días a 27°. Este caldo de cultivo se usa como material de inoculación para el fermentador de vidrio de 10 litros.

5 EJEMPLO 2: Cultivo de NRRL 8095

Para la obtención de S 31794/F-1 se inocula un fermentador de acero conteniendo 50 litros de un medio que consiste de 200 g de sucrosa, 10 g de albúmina de soja, 10 g de extracto de levadura, 10 g de extracto de  
10 malta, 2 g de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , 2 g de  $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y agua des-mineralizada hasta completar 1 litro, con 10 litros de un cultivo previo secundario. La fermentación se lleva a cabo durante 12 días a 24° en un alcance pH de 5-7, con una introducción de aire de 0,8-1,0 litros de  
15 aire/minuto/litro de medio, y con un número creciente de revoluciones de 150-400 revoluciones/minuto.

El cultivo previo, empleado como material inicial, se obtiene como sigue:

La incubación de la cepa NRRL 8095 en tubos  
20 de agar inclinados para la obtención de conidios se efectúa durante 19 días a 27° sobre un medio que tiene la composición siguiente: 100 g de sorbita (alcohol hexavalente, hexita), 10 g de triptona (peptona de caseína, digerida tripticamente), 250 mg de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ ,  
25 250 mg de  $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 250 mg de  $(\text{NO}_3)_2\text{Ca} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,

125 mg de ClK, 16 mg de  $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 7 mg de  $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 15 g de agar y agua desmineralizada hasta completar 1 litro.

5 Para la producción de un cultivo previo primario se inocula 1 litro de medio de cultivo previo que consiste de 20 g de extracto de malta y 4 g de extracto de levadura y agua desmineralizada hasta completar 1 litro, en un matraz Erlenmeyer de 2 litros con  $8-9 \cdot 10^9$  conidios en 10 cc de solución de ClNa al 10 0,9 %, y se incuba durante 4 días a  $24^\circ$  sobre una máquina agitadora rotatoria con 180 revoluciones/minuto.

Para la producción del cultivo previo secundario se inoculan 2 litros de un cultivo previo primario en fermentadores de vidrio con 10 litros del medio de 15 cultivo previo, y se incuba durante 4 días a  $24^\circ$ , con 150 revoluciones/minuto y una introducción de aire de 0,5 litros/litro de medio/minuto.

EJEMPLO 3: Aislamiento de S 31794/F-1

20 Se añaden 90 litros de una mezcla de acetato de etilo/isopropanol (4:1) a 90 litros del caldo de cultivo obtenido de acuerdo con el Ejemplo 1 ó 2 y se homogeneiza con un aparato Ultraturrax a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego se separa la fase orgánica con un separador y el extracto se concentra 25 mediante evaporación en vacío a una temperatura máxima

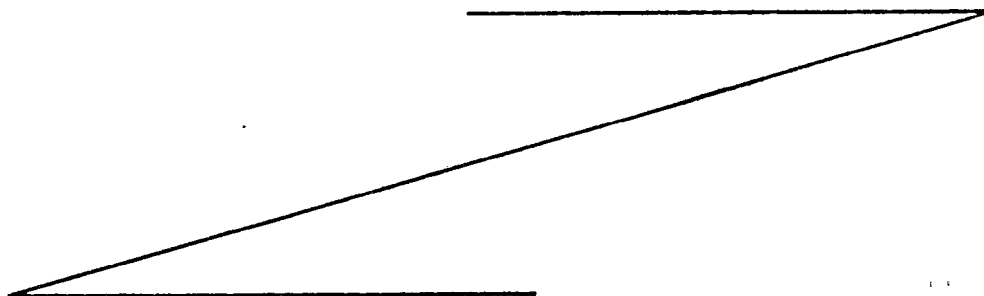
de 40°. El residuo de la extracción se cromatografía sobre una cantidad 10 veces mayor de gel de sílice (Merck; 0,06-0,2 mm). Con este fin se coloca el extracto bruto sobre una cantidad 1-2 veces mayor de gel de sílice (Merck; 0,2-0,5 mm), añadiendo el gel de sílice a la solución del residuo en una cantidad tan pequeña como sea posible de metanol o de una mezcla de metanol/agua, y luego separando nuevamente el disolvente en vacío. El gel de sílice así impregnado se suspende en cloroformo/metanol (95:5) y la masa se coloca sobre la columna de cromatografía. La elución se comienza con cloroformo/metanol (95:5) y luego se continúa duplicando cada vez la porción de metanol hasta el 40 %. Las fracciones del cromatograma con actividad contra el hongo *Candida albicans* y con metabolitos en el alcance del cromatograma de capa delgada de S 31794/F-1 se combinan. Las fracciones así obtenidas se cromatografían sobre una cantidad 100 veces mayor de Sephadex LH-20 con metanol, y las fracciones se combinan nuevamente de acuerdo con su actividad contra los hongos y en base al resultado del cromatograma de capa delgada. El antibiótico fuertemente enriquecido se cromatografía nuevamente sobre una cantidad 100 veces mayor de gel de sílice (Merck; 0,05-0,2 mm), usándose para la elución cloroformo/metanol/agua (71:25:4). Los residuos de

las fracciones se examinan mediante cromatografía de capa delgada para comprobar el contenido de antibiótico S 31794/F-1, y las porciones puras se combinan. El compuesto se disuelve en una pequeña cantidad de metanol y se precipita mediante la adición de éter, con lo cual se obtiene S 31794/F-1 en forma de un polvo amorfo, blanco. Después de secar en alto vacío a 25-30°, el S 31794/F-1 amorfo funde a 178-180° (desc.). Este se cristaliza de una cantidad 10 veces mayor de una mezcla de acetato de etilo/metanol/agua (80:12:8), con lo cual se obtienen cristales filamentosos del antibiótico S 31794/F-1. P.F. 181-183° (desc.) después de secar en alto vacío a 20°.

Leyendo en las Figuras 1 a 4:

- A -  $\lg \xi'$
- B - nm
- C -  $\mu\text{m}$
- D -  $\text{cm}^{-1}$
- E - H<sub>2</sub>O
- F - DMSO
- H - ppm

20 Describa suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.



REIVINDICACIONES

5 1.- Procedimiento para la producción de S 31794/F-1, caracterizado porque se cultiva, en o sobre un medio de cultivo, una cepa de la especie de hongo *Acrophialophora limonispora* nov. spec. Dreyfuss + MÜLLER, productora de S 31794/F-1, y a continuación se aísla del caldo de fermentación y se purifica S 31794/F-1 de acuerdo con métodos de por sí conocidos.

10 2.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque se emplea la cepa NRRL 8095 como nueva cepa de la especie de hongo *Acrophialophora limonispora* nov. spec. Dreyfuss + MÜLLER.

15 3.- Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque se emplea una cepa obtenida a partir de la cepa inicial de la especie de hongo *Acrophialophora limonispora* nov. spec. Dreyfuss + MÜLLER mediante tratamiento con sustancias mutagénicas o rayos o mediante selección.

20 4.- Procedimiento para la producción de S 31794/F-1, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria e ilustrado en los adjuntos dibujos.

Esta Memoria consta de 16 hojas, escritas a máquina por una sola cara.

25

Madrid 28 JUL. 1977

SANDOZ A.G.

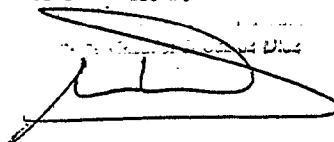
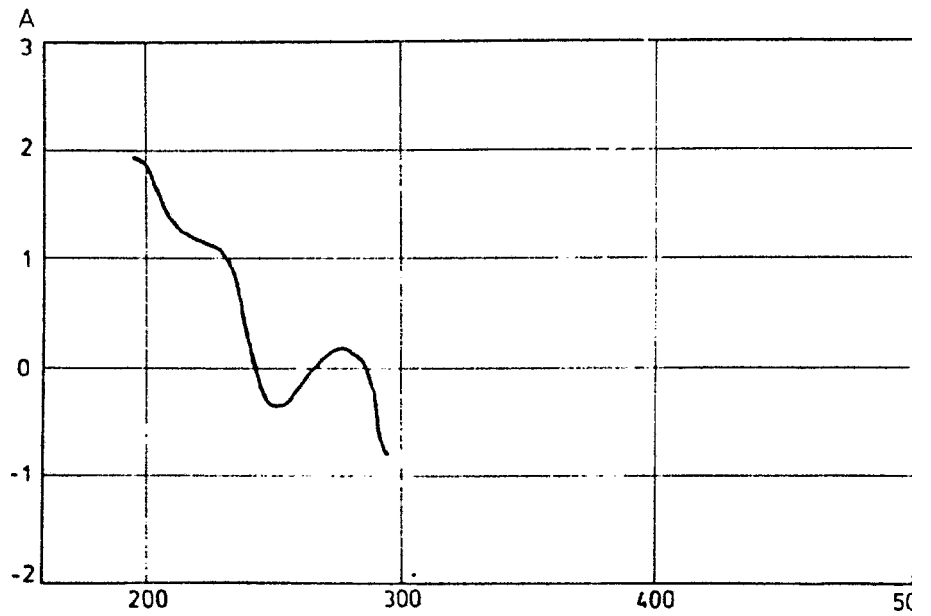




FIG. 1



G.1


)                      500                      600                      700 B

**VARIABLE**  
Medida 26 JUL 1977

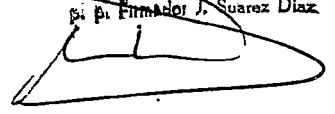
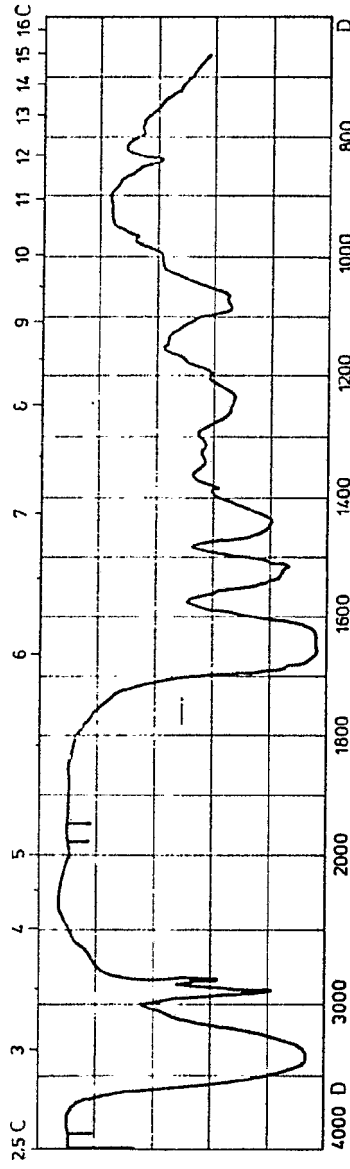
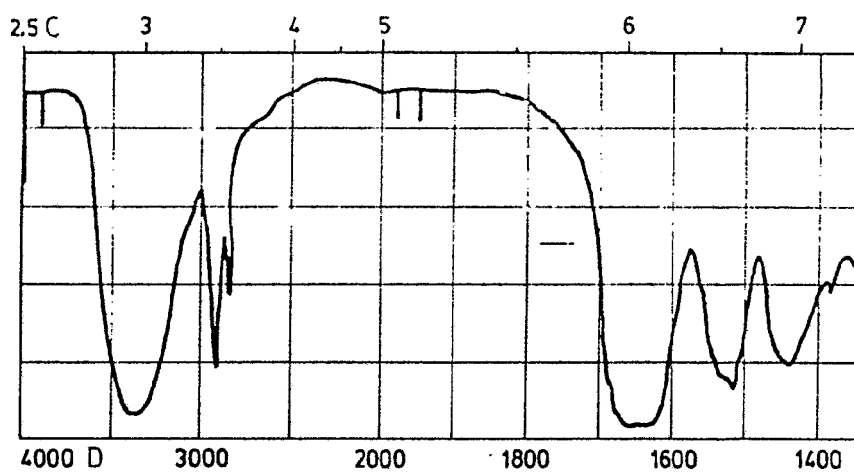
~~Dr. GONZALEZ AGUIRRE, Juan~~  
El Firmador J. Suarez Diaz  


FIG. 2



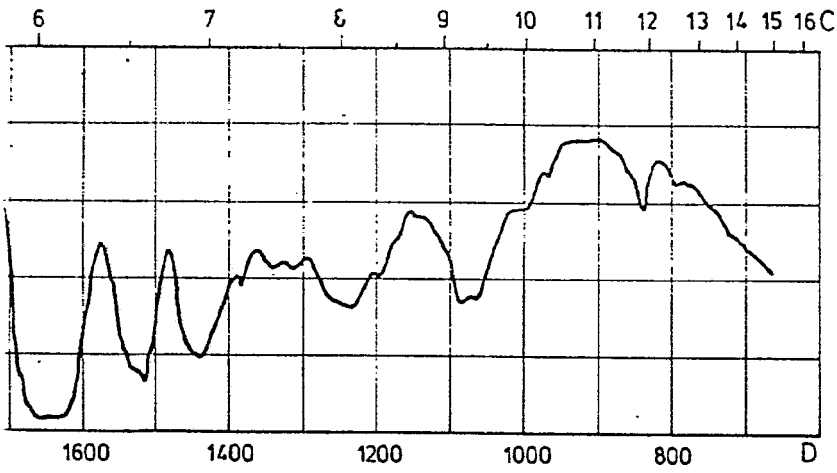
100 P.P.T.  
MAY 25 1977  
MILWAUKEE  
Dr. P. F. Fritzsche, Senior Director

FIG. 2



ESCALA VARIABLE.

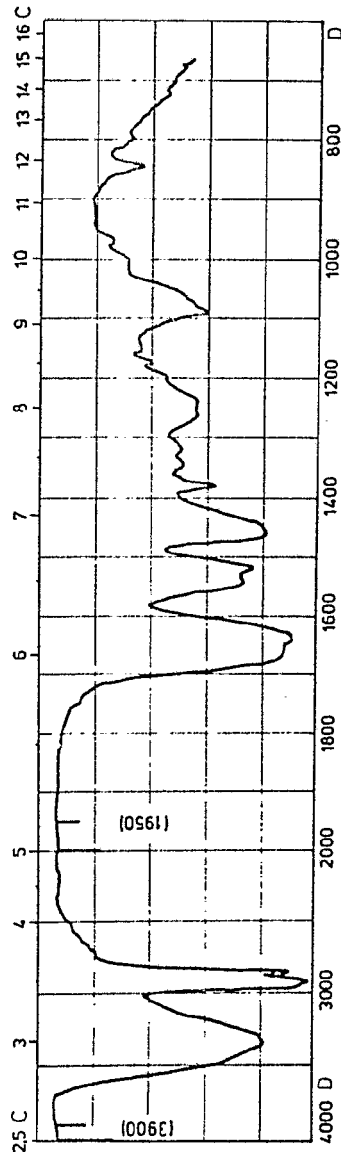
FIG. 2



OCALA  
25 JUL 1977

RECIBIDO  
Dr. J. F. Fiermedo  
Dr. J. Fiermedo: J. Suarez Diaz

FIG.3

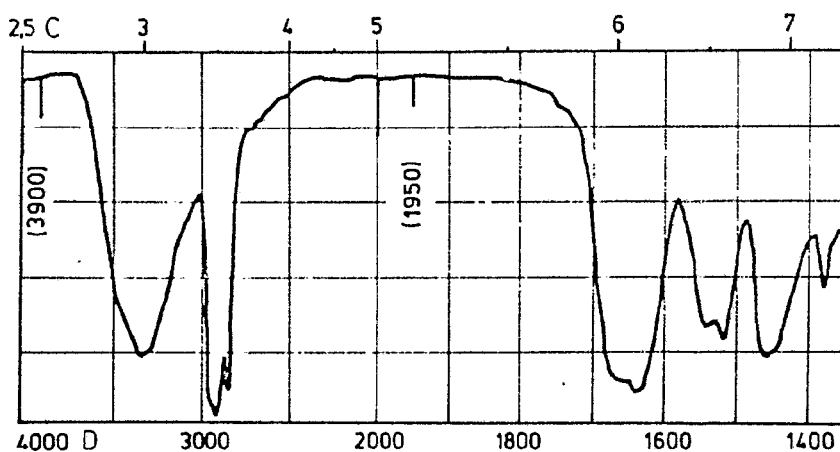


ESCALA  
VARIABLE

MAGGIO

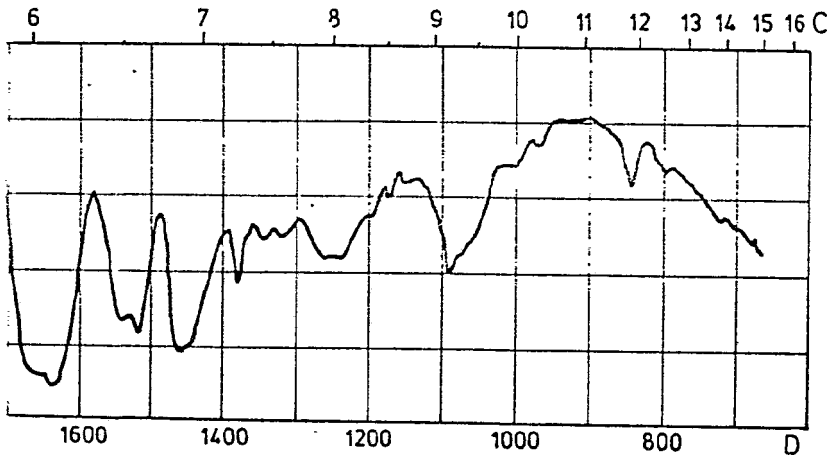
J. L. ...  
P. ...

FIG. 3



ESCALA VARIABLE.

FIG. 3



**ESCALA  
VARIABLE**

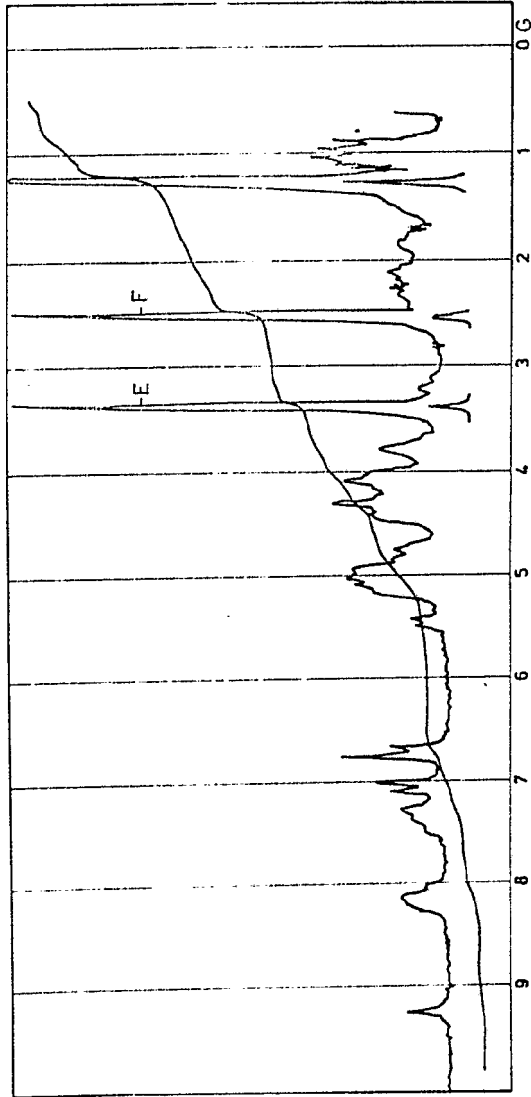
26 JUL 1977

Madrid

J. M. URBAN

Dr. p. Firmado: J. Urbán Díaz

FIG. 4



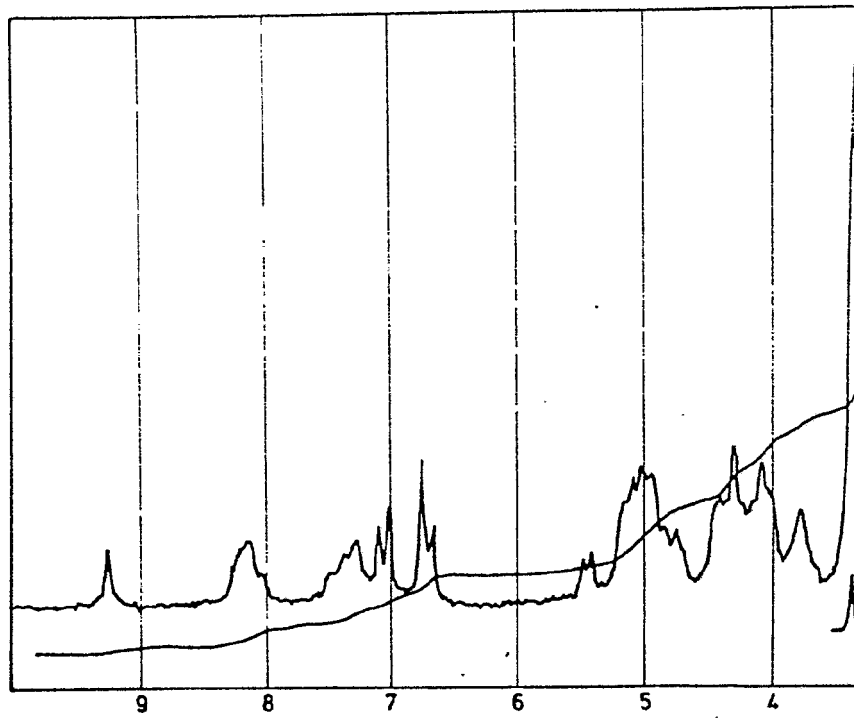
ESCALA VARIABLE

Noviembre 9 - III - 1977

J. M. L.  
P. P. Pymador J. S.

SÁNDOZ A.G.

FIG. 4



ESCALA VARIABLE.

