

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

10 ES	11	NUMERO	A1
	21	451091	
	22	FECHA DE PRESENTACION	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO 11405/75	32 FECHA 2 de septiembre de 1.975	33 PAIS SUIZA
--	--------------------------------------	------------------

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	--	--------------------------------------

54 TITULO DE LA INVENCION PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DEL COMPUESTO S 11743/A EN FORMA DE ACIDO
---

71 SOLICITANTE (S) SANDOZ, A.G.
------------------------------------

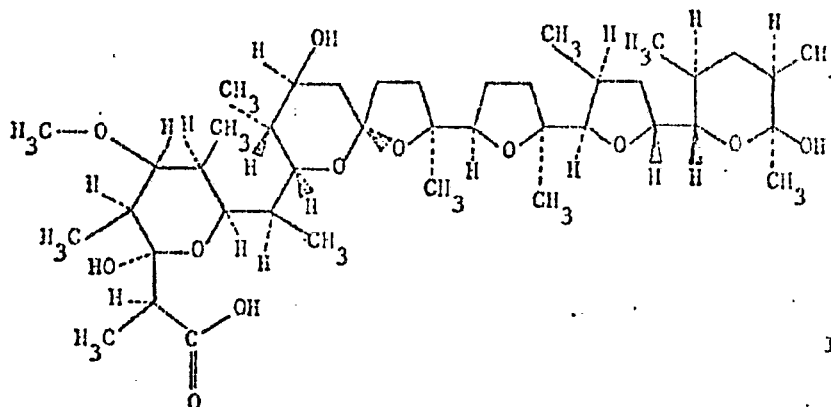
DOMICILIO DEL SOLICITANTE Basle, Suiza.
--

72 INVENTOR (ES) Max Kuhn, Hamilton Delisle King, Eugen Hürri.
---

73 TITULAR (ES)
-----------------

74 REPRESENTANTE D. Jaime Gómez-Acebo y Modet.
---

La presente invención se relaciona con un procedimiento para la preparación del compuesto S 11743/A en forma del ácido (fórmula I) y sus sales.



De acuerdo con la invención el compuesto  
5 S 11743/A en forma del ácido y sus sales, puede obtenerse mediante un procedimiento caracterizado porque se cultiva una cepa productora de S 11743/A de la especie de actinomicetales *Streptomyces mutabilis*, en presencia de un medio nutritivo.

10 El compuesto S 11743/A en forma de sus sales potásicas cristalinas y de sus sales sódicas cristalinas, conteniendo acetona y amorfas, tal como descritas en los Ejemplos, posee las características siguientes:

Sales sódicas de S 11743/A

La composición elemental de la sal sódica amorfa da los valores siguientes para  $C_{41}H_{69}O_{12}Na$ :

	calculado	C 63,4 %	H 9,0 %	Na 2,9 %	O 24,7 %
5	hallado	C 63,5 %	H 9,1 %	Na 3,2 %	O 24,1 %

	Sal sódica amorfa	Sal sódica cristalizada con acetona
P.F.	166-169°	159-163°
10 $[\alpha]_D^{20}$ en metanol	+ 83,5° (c=1,0)	-
en cloroformo	+106,2° (c=1,0)	-
UV (metanol)	absorción final	-

El espectro IR de la sal sódica amorfa en  $CH_2Cl_2$  está ilustrado en la figura 1. La figura 2 muestra el espectro de RMN- $^1H$  (90 megaciclos por segundo) de la sal sódica amorfa en  $CDCl_3$  con tetrametilsilano como standard interno.

Las sales sódicas son bien solubles en disolventes orgánicos tales como tolueno, benceno, diclorometano, acetato de etilo, acetato de isopropilo, etanol y metanol. Las sales son poco solubles en agua.

La Tabla ilustra los valores  $R_f$  de la sal amorfa en el cromatograma de capa delgada sobre placas

de gel de sílice Merck, Kieselgel 60, F 254, espesor de la capa 0,25 mm, en comparación con otros dos ionóforos en forma de sus sales sódicas.

5	Valores Rf en eluyente		
	1	2	3
S 11743/A	0,57	0,80	0,65
Nigericina	0,11	0,13	0,30
X-206	0,25	0,44	0,49

Eluyente:

- 10
- 1) Tolueno/acetona (4 : 1) + 1 % de trietilamina
  - 2) Cloroformo/acetato de etilo (1 : 1)
  - 3) Cloroformo/metanol (95 : 5)

15 Con el fin de hacer visibles las manchas se emplea yodo o una solución de 0,2 % de  $(\text{SO}_4)_2\text{Ce}$  en ácido sulfúrico al 50 % y luego se calienta hasta 120-150 °C.

Sal potásica de S 11743/A

La composición elemental de la sal potásica cristalina da los valores siguientes para  $\text{C}_{41}\text{H}_{69}\text{O}_{12}\text{K}$ :

20

calculado	C 62,1 %	H 8,8 %	K 4,9 %	O 24,2 %
hallado	C 61,9 %	H 8,9 %	K 4,8 %	O (no determinable)

	Sal potásica cristalizada de metanol
P.F.	158-160°
$[\alpha]_D^{20}$ en metanol	+ 89,1° (c = 0,98)
en cloroformo	+102,0° (c = 1,10)

5

El procedimiento de la invención puede llevarse a cabo de acuerdo con métodos conocidos. Un cultivo preferido de la cepa productora de S 11743/A 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 8088, en donde se encuentra a libre disposición para ser examinado.

10

Sin embargo, también pueden emplearse cepas productoras de S 11743/A, que pueden obtenerse a partir de la cepa inicial de la especie de actinomicetales *Streptomyces mutabilis* mediante tratamiento con sustancias mutagénicas o rayos o mediante selección.

15

#### Características de la cepa NRRL 8088

20

La nueva cepa de la especie de actinomicetales *Streptomyces mutabilis*, empleada de acuerdo con la invención, fué aislada de una muestra de tierra hallada en 1965 en la República de Africa Central.

La nueva cepa NRRL 8088 se desarrolla bien

sobre medios nutritivos complejos y sintéticos. El micelio aéreo es de color gris plomo o gris plata y las cadenas de esporos están ramificadas principalmente en forma monopodial, a veces también en forma simpodial.

- 5 Las cadenas de esporos pueden estar compuestas de espirales abiertas, desiguales, que a veces tienen 2 ó 3 torsiones, pero por lo general concuerdan con la terminología "Retinaculum Apertum". Particularmente sobre medios sintéticos, también se forman cadenas de esporos,
- 10 onduladas. En el microscopio electrónico las superficies de los esporos aparecen lisas, la forma del esporo es oval, elíptica o cilíndrica. Los esporos tienen un ancho de 0,7 - 0,9  $\mu$  y un largo de 1,33 - 1,5  $\mu$ .
- 15 Bajo las "series grises" de estreptomycetáceas con cadenas de esporos del "tipo Spira", superficies de los esporos lisas y carencia de formación de melanina, no ha podido identificarse la cepa NRRL 8088 de acuerdo con la clave de H. Nonomura, J. Ferment. Technol. 52, 78 - 92 (1974); al ser clasificada bajo las "series
- 20 blanco-grises" se satisfacía la identificación como *Streptomyces mutabilis*. Al emplearse el sistema de discos de color de Tresner-Backus (1963) la cepa NRRL 8088 claramente pertenecía a las "series grises" y con el manual de Bergey, páginas 749, 772 y 777 (octava

edición) pudo luego clasificarse como *Streptomyces mutabilis* Pridham et al. 1958; Gauze et al. 1957.

Las propiedades de desarrollo de la cepa NRRL 8088 sobre medios biológicos normales y su asimilación de carbono quedan indicadas en las Tablas siguientes.

Propiedades de desarrollo

	Medio de cultivo	Características del cultivo	Forma del micelio
10	Agar con extracto de malta/levadura	D: excelente, pardo dorado MA: gris plomo (G 5 ih)* PS: ninguno	(espirales abiertas y ganchos) Retinaculum Apertum
15	Agar con almidón	D: muy bueno, beige MA: gris (G id)* PS: ninguno	Rectus flexibilis, (espirales abiertas y ganchos) Retinaculum Apertum
20			
25	Agar con harina de avena	D: muy bueno, pardo-amarillo o beige MA: gris plata (G 3 fe)* PS: ninguno	(espirales desiguales y ganchos) Retinaculum Apertum
30	Agar con glicerina/asparagina	D: mediano, pardo dorado MA: gris claro (G 2 dc)* PS: amarillo	Rectus flexibilis y espirales abiertas esporádicas

	Medio de cultivo	Características del cultivo	Forma del micelio
5	Agar con glucosa Czapek	D: mediano, crema o pardo MA: blanco o gris (G d)* PS: pardo	Rectus flexibilis y sin espirales o ganchos
10	Agar con glucosa/sacarosa	D: bueno, crema o pardo MA: gris plata (G 3 fe)* PS: pardo	(espirales abiertas, 2 - 3 torsiones) Retinaculum Apertum
15	Agar con glucosa/glicerina	D: bueno, pardo dorado MA: gris (G d)* PS: pardo	(espirales abiertas, 2-3 torsiones) Retinaculum Apertum
20	Agar de Bennet	D: débil, amarillo MA: blanco (formado débilmente) PS: ninguno	Rectus flexibilis (sin espirales o ganchos)

D: Desarrollo

MA: Micelio aéreo

25 PS: Pigmentos solubles

\*: Referencia relacionada con el sistema de discos de color, Tresner y Backus, 1963.

---



---



---



---

Asimilación de compuestos de carbono

Desarrollo	Fuente de carbono
+++	Glucosa, arabinosa, xilosa, manita, fructosa, ramnosa, almidón, galactosa, glicerina, celobiosa, dextrina, manosa
++	Inosita
±	Sacarosa, sorbita, ácido málico
-	Rafinosa, celulosa, salicina, inulina, dulcita

- 10
- +++ = Desarrollo y utilización buenos  
 ++ = Desarrollo y utilización medianos  
 ± = Desarrollo y utilización dudables  
 - = Sin desarrollo y sin utilización

15 La nueva cepa NRRL 8088 posee las propiedades fisiológicas siguientes:

Reducción de nitrato	positiva
Hidrólisis de almidón	positiva
Descomposición de celulosa	negativa
Reacción de tirosina	negativa
20 Coagulación de leche	negativa
Peptonización de leche	ligeramente positiva
Licuefacción de gelatina	ligeramente positiva
Formación de melanina	negativa

La nueva cepa NRRL 8088 puede cultivarse sobre diversos medios nutritivos con los nutrimentos usuales, por ejemplo tal como se describe en el Ejemplo siguiente.

5 El cultivo de la cepa NRRL 8088 puede efectuarse de acuerdo con las técnicas de cultivo aeróbico de superficie o técnicas de cultivo por inmersión.

Con el fin de impedir una demora en la producción de S 11743/A, es preferible emplear la forma vegetativa en lugar de la forma de esporos del microorganismo para la inoculación del medio de producción. Por lo tanto, se prepara primero un inóculo vegetativo del microorganismo mediante inoculación de una pequeña cantidad de un medio de cultivo con una suspensión de esporos de la cepa NRRL 8088.

10

15

La porción del micelio en el caldo de cultivo puede triturarse facultativamente y el compuesto puede obtenerse en forma de por sí conocida mediante métodos de extracción y/o adsorción. Sin embargo, también puede separarse primero el micelio del caldo de cultivo mediante centrifugación, extraerse separadamente el filtrado de cultivo y el micelio después de la trituración y seguirse elaborando los extractos separadamente o combinados.

20

El compuesto S 11743/A se aisla preferentemente en forma de sales, prefiriéndose las sales de metal alcalino, de metal alcalinotérreo y de amonio.

5 La invención también incluye licores de fermentación obtenidos del cultivo de una cepa productora de S 11743/A de la especie de actinomicetales *Streptomyces mutabilis*.

El compuesto S 11743/A es adecuado para ser usado como medicamento.

10 El compuesto S 11743/A exhibe un efecto de inhibición hacia microorganismos tales como bacterias grampositivas y hongos. En la Tabla siguiente se indican las concentraciones de inhibición mínimas (valores CIM) contra algunos microorganismos. Los valores CIM  
15 se determinan en forma conocida mediante dilución en series. La determinación para las bacterias se efectúa mediante incubación en Brain Heart Infusion Broth a un pH de 7,4 y a 37°C, para los hongos en un medio de extracto de malta (al 2%) a un pH de 5,2 a 5,4 y a 27°C  
20 durante 48 a 72 horas.

-----  
-----  
-----  
-----

Organismo	CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )
Staphylococcus aureus	0,3
Streptococcus faecalis	0,01
Sarcina lutea	0,3
5 Micrococcus lysodeiktikus	0,1
Clostridium pasteurianum	0,01
Neisseria pharyngis	0,3
Mycoplasma laidlawii B	0,01
Helminthosporium sp.	100
10 Curvularia lunata	100

El compuesto S 11743/A en forma del ácido y sus sales se caracterizan además en ensayos farmacológicos, por un aumento de la fuerza del músculo cardíaco y una mejora de la circulación coronaria y, por lo tanto, pueden ser empleados como medicamentos. El uso del compuesto S 11743/A y sus sales fisiológicamente tolerables está indicado en el caso de insuficiencia cardíaca aguda, en la terapia del shock así como en el tratamiento de enfermedades coronarias.

20 El compuesto S 11743/A o sus sales fisiológicamente tolerables pueden usarse como medicamento, ya sea solos o en forma de preparación medicinal adecuada con adyuvantes farmacológicamente inertes.



EJEMPLO 1: Cultivo del metabolito S 11743/A mediante cultivo con agitación

a) Cultivo inicial en agar

5 El cultivo en agar de la cepa NRRL 8088, usado como material inicial, se obtiene inoculando un medio de cultivo que tiene la composición siguiente:

		g/litro	} <u>Medio III</u>
	Cerelesa (glucosa)	4,0	
	Extracto de malta	10,0	
10	Extracto de levadura	4,0	
	Agar (Bacto)	20,0	
	Agua destilada	1 litro	

15 con una suspensión de esporos de la cepa NRRL 8088 aislada originalmente, preparada en forma de por sí concida. Antes de la esterilización, se ajusta el pH del medio a 8,3 a 8,6 con NaOH. Después de la esterilización (20 minutos a 120°) el pH se ajusta a 6,9 a 7,3.

b) Suspensión de esporos

20 A un cultivo inicial en agar de la cepa NRRL 8088, con buena esporulación, se le añade 5 cc de solución de sal común al 0,9 %, estéril, lo que proporciona una suspensión de esporos densa.

-----

c) Cultivo preliminar

De esta suspensión de esporos se emplea 1 cc para la inoculación de un matraz Erlenmeyer de 500 cc, que contiene 100 cc del medio de cultivo preliminar siguiente:

	g/litro	}	<u>Medio I</u>
Pharmamedia	25,0		
Cerelese (glucosa)	25,0		
Agua destilada	1 litro		

El valor pH es de 6,5 a 6,8.

El medio de cultivo preliminar se esteriliza en un autoclave a 120° durante 20 minutos, después de lo cual el valor pH es de 6,7 a 7,2.

d) Cultivo principal

El cultivo preliminar así preparado se incuba durante 3 días a 27° sobre una máquina de sacudimiento rotatorio (200 revoluciones por minuto) en forma aeróbica y luego se emplea directamente para la inoculación del cultivo principal, inoculándose 5 cc del cultivo preliminar en un matraz Erlenmeyer de 500 cc con 100 cc del medio siguiente:

-----  
-----

	g/litro	
Sacarosa	20,0	} <u>Medio II</u>
Peptona	2,0	
Extracto de malta	2,0	
Extracto de levadura	2,0	
5 PO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub>	2,0	
SO <sub>4</sub> Mg · 7H <sub>2</sub> O	2,0	
Agua destilada	1 litro	

Después de la esterilización (20 minutos a 120°) se ajusta el pH a 6,8 a 7,2 con NaOH. El cultivo principal así preparado se incuba durante 6 días a 27° sobre una máquina de sacudimiento rotatorio (200 revoluciones por minuto).

EJEMPLO 2: Cultivo del compuesto S 11743/A mediante cultivo de fermentación

15 a) Cultivo preliminar

Se obtiene un cultivo de la cepa NRRL 8088 aislada originalmente mediante cultivo durante 10 días a 27° sobre un medio III. Los esporos y el micelio de este cultivo se recogen en solución fisiológica de sal común. Con esta suspensión se inocula un litro de una solución nutritiva que contiene el medio siguiente:

-----

	g/litro	
	30,0	} <u>Medio IV</u>
Almidón soluble		
Glucosa	20,0	
Harina de soja	10,0	
5 Corn Steep	10,0	
Polipeptona	5,0	
ClNa	3,0	
CO <sub>3</sub> Ca	5,0	
Agua destilada	1 litro	

10 El pH se ajusta a 7,0 con NaOH.

b) Cultivo principal

Este cultivo preliminar se incubó durante 3 días a 27° sobre una máquina de sacudimiento rotatorio (180 revoluciones por minuto). 10 litros de una solución nutritiva conteniendo el medio II se inoculan con el cultivo preliminar y se incuban en un fermentador de vidrio con agitación (200 revoluciones por minuto) y aeración (1 litro de aire por minuto por litro de solución nutritiva) durante 5 días a 27°.

20 EJEMPLO 3: Aislamiento del compuesto S 11743/A  
(Sal sódica)

100 litros de un licor de cultivo, obtenido de acuerdo con el Ejemplo 1 ó 2, se centrifugan, con lo

cual se obtienen aproximadamente 90 litros de filtrado de cultivo y aprox. 6 kg de micelio. El pH del filtrado de cultivo se ajusta a 9 con solución 1 normal de hidróxido de sodio y se filtra hasta claridad a través de  
5 filtro Celite 545. El filtrado se extrae tres veces a 20°, cada vez con 90 litros de acetato de etilo, y los extractos se lavan con 15 litros de agua. Después de concentrar la fase orgánica mediante evaporación en un vacío a 20 - 40°, se obtienen aproximadamente 16 g de  
10 extracto bruto.

El micelio se extrae primero con 12 litros de metanol, luego dos veces con porciones de 12 litros de metanol/agua (9 : 1), cada vez durante una hora a 20-  
15 25°, homogeneizándose simultáneamente con un aparato Ultra-Turrax. El material celular se separa luego mediante filtración a través de Celite 545. Al filtrado se le añaden 5 litros de agua, se concentra mediante evaporación en un vacío a 20 - 40° hasta un volumen de aprox. 3 litros y se ajusta el pH a 9 con solución 1  
20 normal de hidróxido de sodio. Se extrae tres veces con porciones de 3 litros de acetato de etilo, se lavan los extractos con 1,5 litros de agua y la fase orgánica se concentra mediante evaporación en un vacío a 20 - 40°, con lo cual se obtienen 9,4 g de extracto.

Los dos extractos se combinan, se recogen en 500 cc de agua y se extraen tres veces con 250 cc de tolueno cada vez. La fase de tolueno se lava una vez con 100 cc de agua, se seca sobre sulfato de sodio y se concentra mediante evaporación en un vacío a 40°, con lo cual se obtienen 11 g de residuo aceitoso, amarillo. Este residuo se cromatografía sobre una cantidad 50 veces mayor de gel de sílice 60, Merck, tamaño del grano 0,06 - 0,2 mm. Para preparar la columna y aplicar la substancia se emplea tolueno/acetona (98 : 2) + 1 % de trietilamina. La elución con tolueno/acetona (98 : 2) + 1 % de trietilamina y con tolueno/acetona (9 : 1) + 1 % de trietilamina proporciona principalmente impurezas inactivas. Con tolueno/acetona (4 : 1) y tolueno/acetona (1 : 1) con la adición de 1 % de trietilamina se eluye S 11743/A en forma enriquecida. Las fracciones se concentran mediante evaporación en un vacío a 20 - 40° y el residuo se examina mediante cromatografía de capa delgada y biológicamente contra *Staphylococcus aureus*, con respecto al contenido de S 11743/A. Las fracciones activas se combinan y nuevamente se cromatografían sobre una cantidad 40 veces mayor de gel de sílice, usándose para la elución cloroformo con contenido creciente de metanol. Con cloroformo/metanol (98 :

2) se eluye S 11743/A en forma fuertemente enriquecida. Después de concentrar las fracciones activas mediante evaporación en un vacío a 20 - 40°, el residuo de color amarillo claro se disuelve en cloroformo, se extrae una vez con solución 1 normal de sosa cáustica, la fase orgánica se lava con agua, se concentra mediante evaporación en un vacío y el residuo se cristaliza de una cantidad 1,5 veces mayor de acetona, con lo cual se obtiene la sal sódica de S 11743/A en forma de cristales incoloros conteniendo acetona, y con un P.F. de 159 - 163°. Con el fin de separar la acetona de cristalización, se añade benceno y se concentra en un vacío repetidamente y luego se añade metanol y se concentra en un vacío. La sal sódica pura, amorfa de S 11743/A se seca en un alto vacío a 60° y luego tiene un P.F. de 166 - 169°.

EJEMPLO 4: Sal potásica de S 11743/A

280 mg de la sal sódica de S 11743/A se disuelven en 40 cc de cloroformo y se extrae dos veces con 40 cc de ácido clorhídrico 2 normal cada vez y se lava con 40 cc de agua. La fase orgánica con el ácido libre de S 11743/A se extrae inmediatamente después con dos porciones de 40 cc de KOH 2 normal y se lava una vez con 40 cc de agua. La fase de cloroformo se

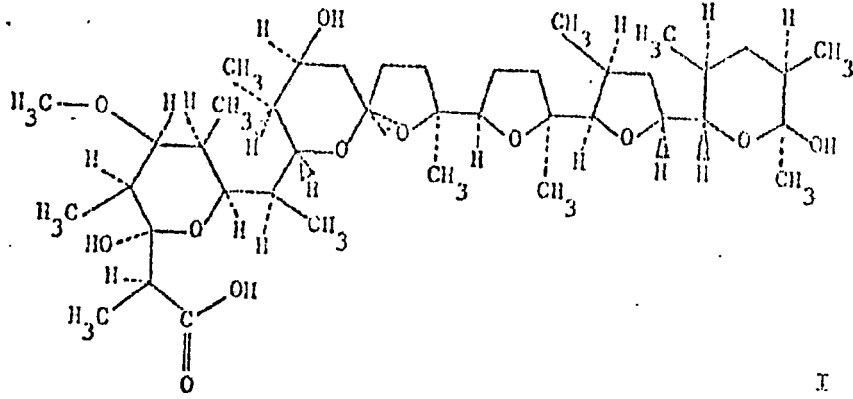
seca con carbonato de potasio sólido y después de la  
filtración, se concentra mediante evaporación en un  
vacío. El residuo se disuelve en 2 cc de metanol y se  
filtra a través de talco. Después de 4 horas, el mate-  
5 rial cristalizado se separa mediante filtración y se re-  
cristaliza de 2 cc de metanol hirviente. Después de de-  
jar reposar durante la noche, se filtra y el residuo se  
seca en un alto vacío a 40° durante una hora, con lo  
cual se obtienen cristales incoloros con un P.F. de 158-  
10 160°.

Descrita suficientemente la naturaleza del inven-  
to así como la manera de realizarse en la práctica, debe  
hacerse constar que las disposiciones anteriormente citadas  
son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no  
15 alteren su principio fundamental.

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para la producción del compuesto S 11743/A en forma de ácido, y sus sales, de fórmula I

5



10

caracterizado porque se cultiva una cepa productora de S 11 743/A de la especie de actinomicetales Streptomyces mutabilis, en presencia de un medio nutritivo, y a continuación se aísla del medio nutritivo y se purifica el compuesto S 11743/A en forma del ácido y de sus sales.

2.- Procedimiento para la producción del compuesto S 11743 en forma de ácido, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

15

Esta Memoria consta de 22 hojas escritas a máquina por una sola cara.

11 AGO. 1977

Madrid,

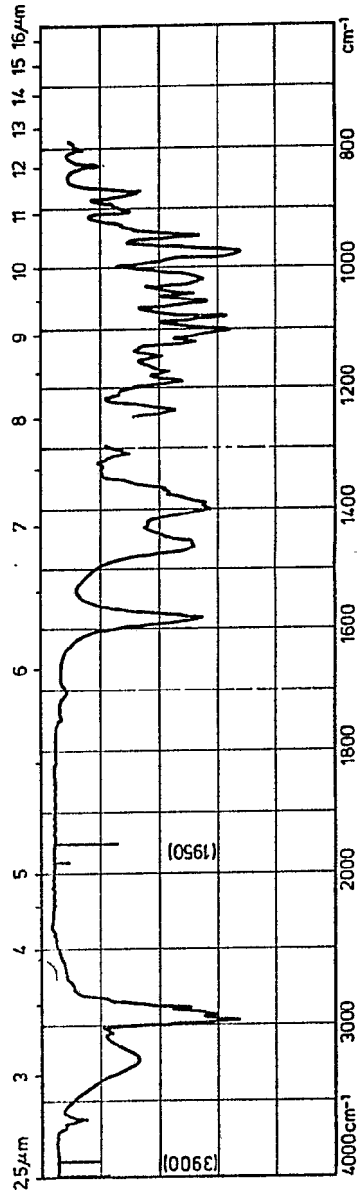
SANDOZ, A.G.

J. M. GOMEZ AGES Y POMEU

p. p. Firmador J. Suarez Diaz

VARIABLE

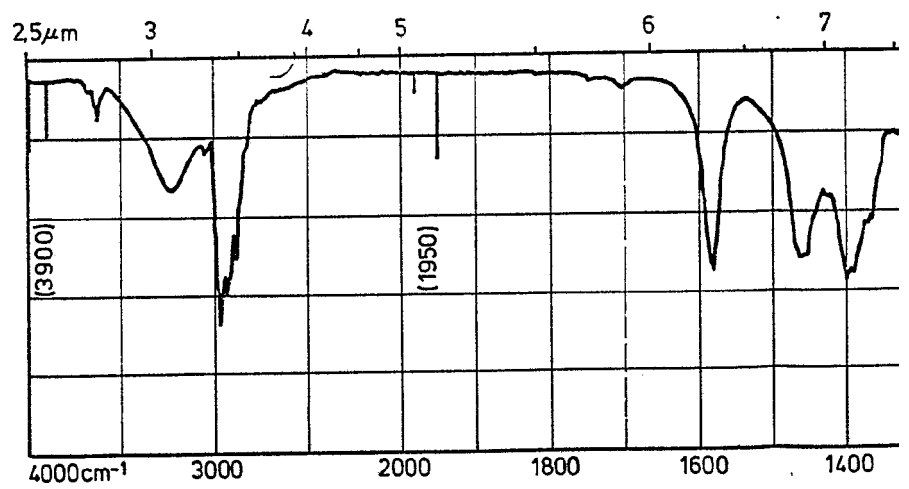
FIG. 1



11 AGO. 1977

~~MASSE~~  
J. M. BONES  
Dr. c. Fernando J. Suarez Diaz

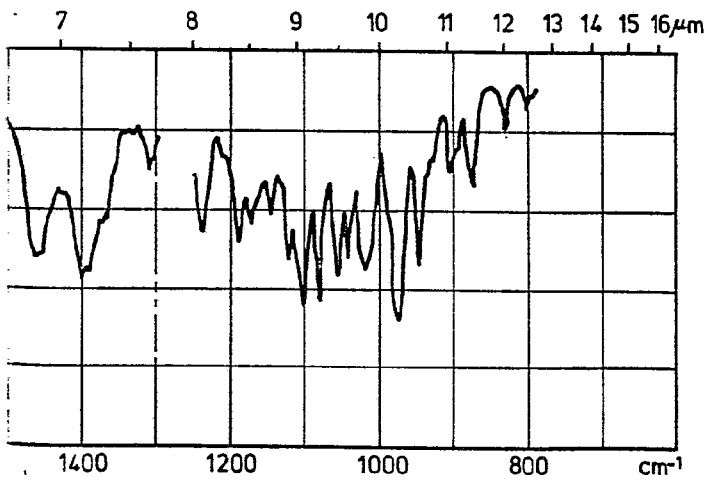
FIG. 1



ESCALA VARIABLE.

ESCALA  
VARIABLE

1



11 AGO. 1977

~~Macedo~~

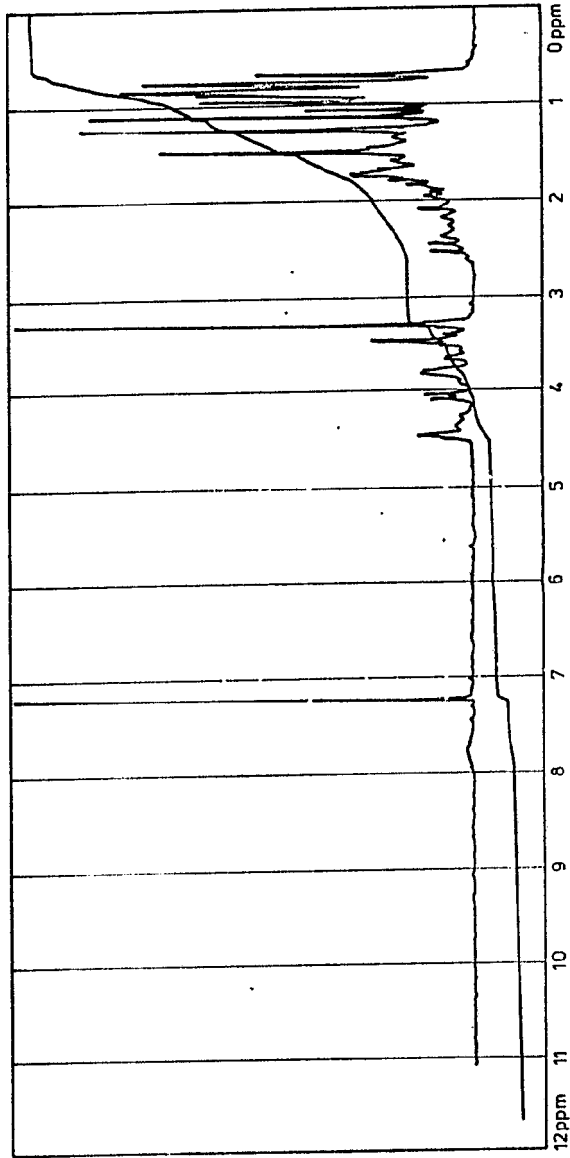
J. M. GOMEZ ABEJO Y ROMERO

a. c. Firmado: J. Suarez Diaz

POOR  
QUALITY

ESCALA  
VARIABLE

FIG. 2



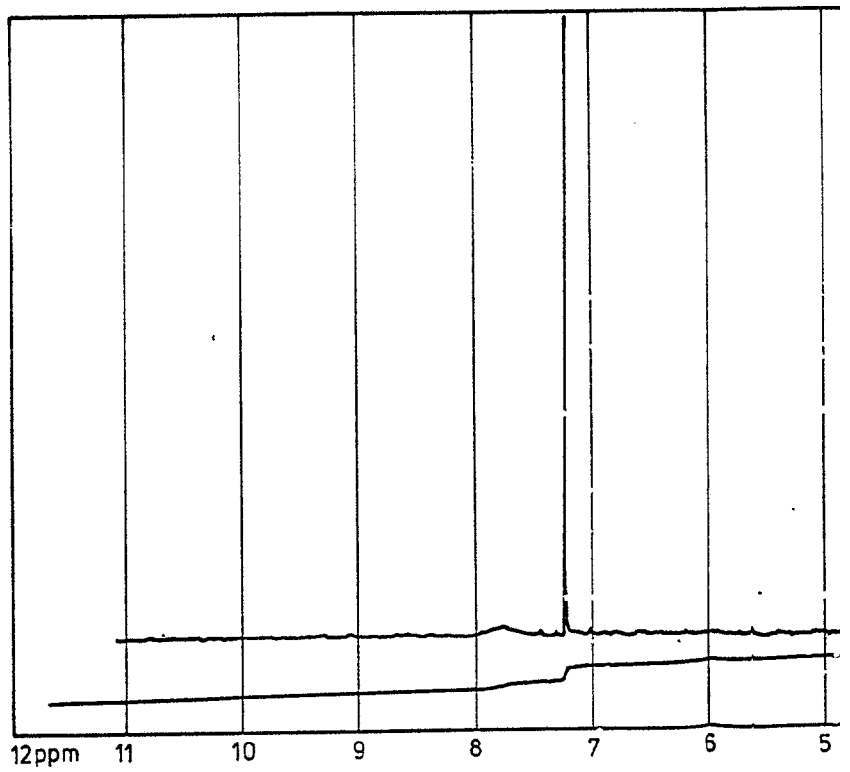
11 AEG. 1977  
Madrid  
J. M. BONEZ AGUIR Y PORDO  
P. F. FERNANDEZ J. SANCHEZ DIAZ

PCOR  
QUALITY

ESCALA VARIABLE.

SANDOZ, AG.

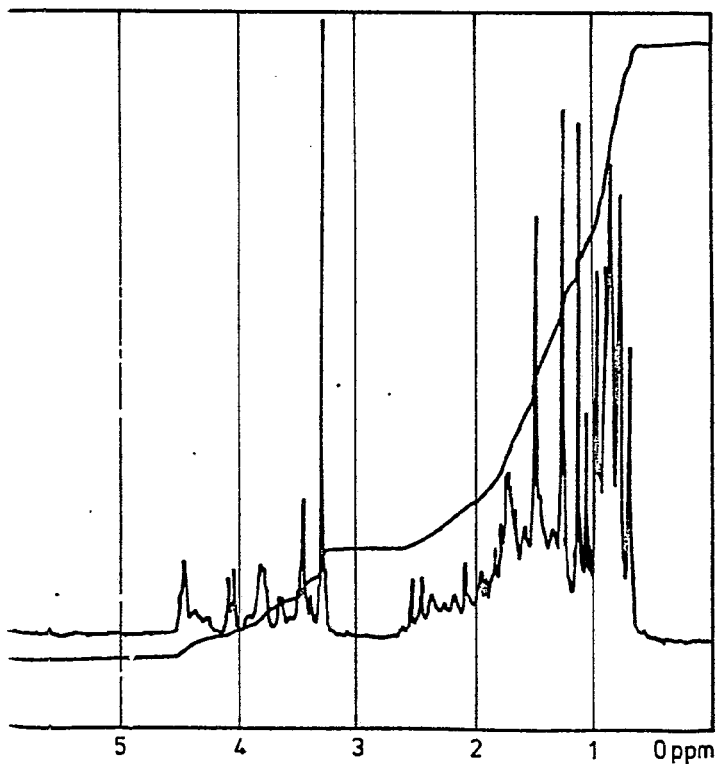
FIG. 2



ESCALA VARIABLE.

2

ESCALA  
VARIABLE



11 AGO. 1977

Madrid

J. M. GOMEZ ACEBO Y PONDO

p. p. Firmado: J. Suarez Diaz

POOR  
QUALITY