



Esta invención se refiere a una nueva sustancia fisiológicamente activa, la esterastina, que es activa para inhibir la actividad enzimática de la esterasa. Esta invención se refiere también a un proceso para la producción de esterastina y más particularmente a un proceso para la producción de esterastina por cultivo de un microorganismo, una especie del género Streptomyces en un medio de cultivo para producir y acumular la esterastina y recuperar después la esterastina del cultivo. Esta invención se refiere además a una droga inmunosupresora que comprende esterastina como ingrediente activo.

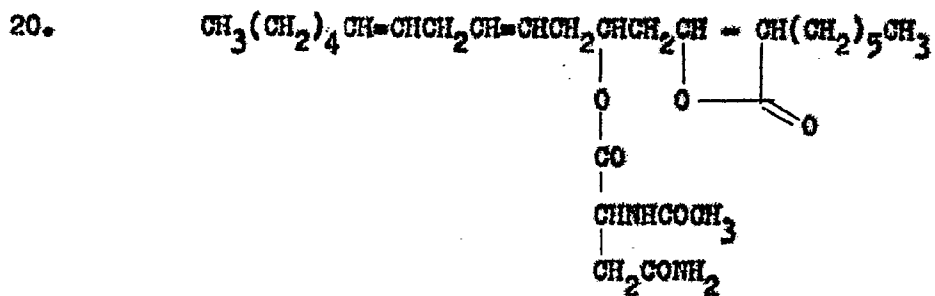
Nosotros, los presente inventores, descubrimos recientemente que una sustancia activa contra la esterasa está presente en el cultivo obtenido cultivando un microorganismo que es aislado de una muestra de tierra recogida en el campo de Haseibutsu Kagaku Kenkyu-sho en Shinagawa-ku, Tokio, Japón y que fué designada Streptomyces MD4-Cl. Conseguimos aislar esta sustancia a partir de dicho cultivo. Como resultado de la investigación, esta sustancia resultó ser una sustancia nueva llamada ahora esterastina. Efectuamos una investigación intensiva para ver si la esterastina es útil como medicina para algún fin. En consecuencia, hemos descubierto ahora que la esterastina es activa para reducir el número de las células que forman el anticuerpo humoral y también para suprimir la inmunidad celular. Como la esterastina es una sustancia de muy baja toxicidad, esta sustancia es un compuesto fisiológicamente activo que puede usarse con seguridad como droga para tratar muchas de las enfermedades mortales ocasionadas por las reacciones inmunes, por ejemplo, la dermatitis, alérgica de contacto, lupus sistémico eritematoso, anemia hemolítica autoinmune, periarteritis nudosa, miastenia gravis, artritis, reu-

- matismo y esclerosis múltiple y que pueda usarse como droga inmuno-supresiva en las operaciones quirúrgicas de trasplante de un órgano interno tal como el corazón, riñón y músculo. - Se espera también que la esterastina resulte útil como agente anti-inflamatorio, porque inhibe la activación del sistema accesorio debido a la actividad inhibidora de la esterasa que presenta la esterastina.

- Realizamos una investigación sistemática para buscar una sustancia fisiológicamente activa que sea inhibidora de la descomposición del acetato de p-nitrofenilo por la esterasa, y durante esta investigación descubrimos la esterastina en el caldo de fermentación del microorganismo antes mencionado como se ha indicado más arriba.

- La posterior investigación de la esterastina revela la que esta sustancia tiene la estructura química mostrada más adelante.

De acuerdo con esta invención se proporciona, por consiguiente, un nuevo compuesto, la esterastina de la fórmula siguiente:



25.

La esterastina es una sustancia incolora y pulveru lenta que es de naturaleza neutra y muestra actividad para inhibir la acción de la esterasa y que presenta las siguientes propiedades físico-químicas características:

30. (a) tener un punto de fusión de 90-95°C y una acti-

vidad óptica específica  $[\alpha]_D^{20} + 11^\circ$  (c 1, cloroformo),

(b) ser soluble en piridina, dimetilsulfóxido, metanol, etanol, acetona, acetato de etilo, acetato de butilo, - cloroformo y benceno pero escasamente soluble en agua, éter de petróleo y hexano,

(c) dar un peso molecular de 506 medido por espectrometría de masa,

(d) dar un análisis elemental: C 67,04%, H 9,21 %, N 5,56 % y O 17,90 %,

10. (e) mostrar un pico de absorción  $\lambda_{\max}$  a 230 nm  $(E_{1\text{cm}}^{1\%} 22,5)$  en espectro de absorción ultra-violeta (en 95 % de metanol),

(f) mostrar bandas de absorción características a - 3470, 3350, 2950, 1840, 1730, 1645, 1610, 1545, 1415, 1375, 15. 1325, 1260, 1225, 1185, 1115, 1040, 1020, 975, 920, 900, 880, 840, 810, y 690  $\text{cm}^{-1}$  en espectro de absorción infrarrojo realizada en bromuro de potasio, y

(g) mostrar el espectro de absorción de resonancia magnética nuclear mostrado en la figura 3 de los dibujos que se acompaña.

25. De acuerdo con esta invención, se proporciona también un proceso para la producción de esterastina, que consiste en cultivar una cepa productora de esterastina del género Streptomyces bajo condiciones aerobias en un medio de cultivo apropiado para la misma que contiene fuentes de carbono y nitrógeno asimilables, durante un período de tiempo suficiente para producir y acumular la esterastina en el medio de cultivo, y recuperar la esterastina del cultivo.

30. La cepa de Streptomyces productora de esterastina puede ser, por ejemplo, la Streptomyces MD4-C1 como se ha men-

- cionado anteriormente. Esta cepa MD4-01 fué depositada el 25 de septiembre de 1976 en un depósito japonés autorizado del "Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology", Inage, Chiba-City, Japón, bajo el número de depósito FERM-P 3723. Esta cepa MD4-01 fué depositada también el 20 de septiembre de 1977 en la Colección Americana de Cultivo de Tipos, Maryland, EE.UU., bajo el número ATCC 31336.

Las características culturales y taxonómicas de la cepa MD4-01 son descritas a continuación.

1.- Morfología microscópica.

- La cepa MD4-01 tiene micelios de sustratos ramificados a partir de los cuales se desarrollan hifas aéreas en forma de espirales abiertas. No se observa ramificación en verticilo. Las cadenas de esporas maduras llevan usualmente más de 10 esporas cónicas. Las esporas tienen usualmente un tamaño de aproximadamente 0,6-0,8 por 0,8-1,2 micras y tienen una superficie lisa.

2.- Características del crecimiento con varios medios de cultivo.

- La designación de colores entre corchetes [ ] mencionada a continuación sigue al patrón de colores dado en el "Color Harmony Manual" publicado por Container Corporation of America.

- (1) Con sucrosa-agar de nitrato (incubado a 27° C): Crecimiento incoloro, lleva hifas aéreas de color rojo grisáceo [6 ge, Rose Gray] a color gris rojizo [5 ge, Rosewood]. No se observa pigmento soluble.

- (2) Con glucosa-agar de asparaguina (incubado a 27° C): Crecimiento incoloro, lleva hifas aéreas de color má-

rón rojizo claro [5 ec, Dusty Peach] a color gris pardusco brillante [3 fe, Silver Gray]. No se observa pigmento soluble.

(3) Con glicerina-agar de asperraguina (medio ISP nº 5, incubado a 27° C):

El crecimiento de incoloro a amarillo claro lleva hifas aéreas de color blanco a color blanco rosado después de aproximadamente 14 días de incubación. No se observa pigmento soluble.

(4) Con almidón-agar de sales inorgánicas (medio ISP nº 4, incubado a 27° C):

El crecimiento incoloro lleva hifas aéreas de color gris pardusco brillante [3 fe, Silver Gray] a color gris rosado. No se observa pigmento soluble.

(5) Con agar de tirosina (medio ISP nº 7, incubado a 27° C):

El crecimiento amarillo claro lleva hifas aéreas de color blanco rosado a color gris rojizo [5 ge, Rosewood]. No se observa pigmento soluble.

(6) Con agar nutriente (incubado a 27° C):

20. Crecimiento amarillo claro. No se forman hifas ni se observa pigmento soluble.

(7) Con extracto de levadura-agar de extracto de malta (medio ISP nº 2, incubado a 27° C):

25. El crecimiento de color marrón amarillento claro a marrón amarillento lleva hifas aéreas de color gris pardusco brillante a color gris rosado [7 ig, Rose Taupe]. No se observa pigmento soluble.

(8) Con agar de harina de avena (medio ISP nº 3, incubado a 27° C):

30. El crecimiento incoloro a amarillo claro o amarillo oscuro -

lleva hifas aéreas de color rojo grisáceo [6 ge, Rose Gray] a color gris rojizo [5 ge, Rosewood a 5 ig, Rose Taupe]. - No se observa pigmento soluble.

(9) Con glicerina-agar de nitrato (incubado a 27°C):

5. El crecimiento de amarillo claro a marrón amarillento claro [3 ie, Camel a 4 ie, Cork Tan] lleva hifas aéreas de color blanco a blanco pardusco.

(10) Con agar de almidón (incubado a 27°C):

10. El crecimiento incoloro lleva hifas aéreas de color blanco pardusco a color gris pardusco claro [5 de, Pusaywillow Gray]. No se observa pigmento soluble.

(11) Con Calcio-agar de malato (incubado a 27°C):

15. El crecimiento incoloro lleva hifas aéreas de color blanco a color marrón rojizo pálido [5 ec, Dusty Peach] a color gris rojizo [5 ge, Rosewood]. No se observa pigmento soluble.

(12) Con celulosa (incubado a 27°C):

El crecimiento es incoloro. No se forman hifas aéreas ni se observa pigmento soluble.

(13) Con pajuelas de gelatina:

20. Con medio de gelatina común (incubado a 20°C), el crecimiento es incoloro con desarrollo de hifas aéreas de color blanco y con producción de pigmento soluble de color marrón. Con medio de glucosa-peptona-gelatina (incubado a 27°C) se obtiene un crecimiento de color amarillo claro a marrón amarillento - 25. claro con ligero desarrollo de hifas aéreas de color blanco y con producción de pigmento soluble de color marrón oscuro.

(14) Con leche desnatada (incubado a 37°C):

El crecimiento de incoloro a amarillo claro lleva hifas ligeramente aéreas de color blanco. El pigmento soluble está muy 30. debilmente teñido de marrón a partir del 19º día de la incuba

ción.

### 3.- Propiedades fisiológicas.

#### (1) Temperatura para el crecimiento.

Se examinó el crecimiento con almidón-agar de leva  
 5. dura (comprendiendo 1 % de almidón soluble, 0,2 % de extrac-  
 to de levadura y 3,0 % de agar, pH 7,0-7,2) a 20° C, 24° C,  
 27° C, 30° C, 37° C y 50° C. La cepa MD4-C1 creció a todas  
 las temperaturas ensayadas, excepto a 50° C. La temperatura  
 óptima para un buen crecimiento resultó estar comprendida -  
 10. alrededor de los 27-37° C.

#### (2) Licuefacción de la gelatina.

El medio de gelatina común (15%) no se licuó cuan-  
 do fué incubado a 20° C. La gelatina (15%) en medio de glu-  
 cosa-peptona-gelatina comenzó a licuarse a partir de aproxi-  
 15. madamente el 5° día de incubación cuando se incubó a 27° C,  
 y el grado de licuefacción fué entonces de medio a débil.

#### (3) Hidrólisis del almidón.

El almidón del medio de sales inorgánicas-almidón-  
 agar y del medio de almidón-agar fué hidrolizado a partir -  
 20. de aproximadamente el 5° día de incubación cuando se incubó  
 a 27° C, y el grado de hidrólisis fue medio.

#### (4) Coagulación y peptonización de la leche desna- tada.

No comenzó la coagulación de la leche desnatada, -  
 25. pero la peptonización se inició a partir de aproximadamente  
 el 12° día de incubación cuando se incubó a 37° C. El grado  
 de peptonización fué entonces medio.

#### (5) Formación de pigmentos melanoídes.

Se observó formación de pigmentos melanoídes en el  
 30. caldo de triptón-extracto de levadura (medio ISP nº 1) y -

con peptona-extracto de levadura-agar de hierro (medio ISP nº 6) cuando se incubó a 27° C. No se observó pigmentación - con el agar de tirosina (medio ISP nº 7).

(6) Utilización de fuentes de carbono para el cre-  
5. cimiento.

La utilización de los hidratos de carbono menciona- dos más abajo fué ensayada en el medio de agar Fridham-Got- tlieb (medio ISP nº 9) cuando se incubó a 27° C.

Se utilizó glucosa para el crecimiento, pero no se  
10. utilizaron L-arabinosa, D-xilosa, D-fructosa, sucrosa, inosi- tol, L-ramnosa, rafinosa y D-manitol.

(7) Licuefacción del malato cálcico.

El malato cálcico del medio de malato cálcico-agar se licuó alrededor del crecimiento a partir de aproximadamen-  
15. te al 10º día de incubación cuando se incubó a 27° C. El gra- do de licuefacción fué de medio a fuerte.

(8) Reducción del nitrato.

No se observó reducción de nitrato en la solución - de peptona acuosa conteniendo 1,0 % de nitrato potásico (me-  
20. dio ISP nº 8), cuando se incubó a 27° C.

Resumiendo las propiedades antes mencionadas de la cepa MD4-01, se observa que esta cepa pertenece al género - Streptomyces y que las hifas aéreas forman espirales pero no desarrollan verticilo. La superficie de las esporas es lisa  
25. mediante observación microscópica. Con varios medios, el cre- cimiento tiene un color de incoloro a amarillo claro o ma- rrón amarillento claro, con desarrollo de hifas aéreas de co- lor gris rojizo a color gris rosado a color gris pardusco - brillante pero sin producir pigmento soluble. La formación -  
30. de pigmentos melanoides es positiva en el caldo de triptón-

extracto de levadura y en el medio de peptona-extracto de levadura-agar de hierro pero es negativa en el medio de agar de tirosina. La proteólisis y la hidrólisis del almidón son de grado medio.

5. Debido a las propiedades antes mencionadas, la cepa MD4-C1 es comparada con las especies análogas conocidas de Streptomyces con referencia a las descripciones del "International Streptomyces Project" (ISP). Se comprueba que la cepa MD4-C1 se parece mucho a la Streptomyces lavendulae (véase -
10. el "Journal of Systematic Bacteriology" vol. 18, pag. 138 - (1968), referenciado en lo que sigue por Literatura nº 1; y la obra de Wakeman titulada "The Actinomycetes" vol. 2, pag. 234, referenciada en lo que sigue por Literatura nº 2) y -
15. Streptomyces avidinii (véase el "Journal of Systematic Bacteriology" vol. 22, pag. 276 (1972), referenciado por Literatura nº 3; y "Antimicrob. Ag. Chemother." pág. 20 (1963) referenciado por Literatura nº 4 en lo que sigue). Estas dos especies conocidas fueron obtenidas realmente y comparadas directamente con la cepa MD4-C1. Un resumen de los resultados de
20. la comparación aparece en la tabla que sigue.

25.

... / ...

30.

30. 25. 20. 15. 10. 5.

T A B L A I

Propiedades.	MDA-01	Streptomyces laven- dulae ISP 5069	Streptomyces avidi n <sup>o</sup> 1 ISP 5526
Forma de hifas aéreas	Espirales	Rectiflexibles o espira- les (Literatura n <sup>o</sup> 1; Retinaculispartii)	Espirales Literatura n <sup>o</sup> 3; Retinaculispartii)
Superficie de esporas	Lisa	Lisa (incompletamente verrugosa en partes)	Lisa
Color de las hifas aéreas	Gris rojizo a gris ro- sado, gris pardusco - brillante	Gris rosado a gris per- dusco brillante	Gris rojizo a gris rosado, gris pardus- co brillante
Color de crecimiento	Incoloro a amarillo claro, marrón amari- lento claro	Incoloro a marrón ama- rillento claro (tenido de oliva claro a oliva grisáceo en partes)	Incoloro a amarillo claro, marrón amari- lento claro
Pigmento soluble	+	+	+
Formación de pigmento melanóide	+	+	+
Con medio ISP n <sup>o</sup> 1	+	+	+
Con medio ISP n <sup>o</sup> 6	+	+	+
Con medio ISP n <sup>o</sup> 7	-	+	-
Hidrólisis del almidón	+	+	+

30.	25.	20.	15.	10.	5.
Coagulación de la leche	-	-	-	-	+
Peptonización de la leche	+	+	+	+	+
Licuefacción de la gelatina	-	-	-	-	-
en medio de gelatina común	-	-	-	-	-
en medio de glucosa-peptona-gelatina	+	+	+	+	+
Reducción de nitrato	-	-	-	-	-
Utilización de fuente de carbono					
Glucosa	+	+	+	+	+
L-arabinosa	-	-	-	-	-
D-Xilosa	-	-	-	-	-
D-fructosa	-	-	-	-	-
Sucrosa	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-
L-Ramnosa	-	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-	-
D-manitol	-	-	-	-	-
Antibióticos producidos	Estreptotricina	Estreptotricina	Estreptotricina	Estreptotricina	MSD-235
			MSD-235		

(Literatura nº 3# 4)

Notas: + significa probable no utilización,  
 - no se observa formación de espirales en el medio ISP nº 5.

- Como se verá por la tabla que precede, la cepa MD4-C1 es muy similar a la Streptomyces lavendulae ISP 5069 y Streptomyces avidinii ISP 5526. Entre las cepas productoras de antibiótico MSD-235, la Streptomyces avidinii es distinta
5. de la Streptomyces lavendulae porque la primera produce hifas aéreas que tienen un tinte de gris. En lo que respecta a los resultados de las comparaciones que preceden y las descripciones de las Literaturas n° 1 y n° 3, la diferencia en el color de las hifas aéreas no es tan significativa que permita dis-
10. tinguir la Streptomyces avidinii de la Streptomyces lavendulae. Sólo se encuentran diferencias más notables entre estas dos especies en lo que respecta a la formación o no formación de pigmentos melanoide y a la coagulación de la leche. No obstante, estas dos especies se consideran muy estrechamente re-
15. lacionadas entre sí, ya que las diferencias antes mencionadas no constituyen un factor decisivo para distinguir una especie de otra del género Streptomyces.

La cepa MD4-C1 demostró producir un antibiótico conocido, estreptotricina, y la cepa MD4-C1 es muy coincidente

20. con la Streptomyces lavendulae excepto que se diferencian una de otra en la formación de pigmento melanoide. Por otra parte la cepa MD4-C1 es coincidente con la Streptomyces avidinii en todos los aspectos con la excepción de que la primera no efectúa la coagulación de la leche.

25. En vista de lo que precede, se juzga que la cepa MD4-C1 pertenece a un grupo de Streptomyces lavendulae, y la cepa MD4-C1 es designada ahora por Streptomyces lavendulae MD4-C1.

La mutación de actinomicetos ocurre frecuentemente

30. en condiciones ya sea artificiales o bien espontáneas. Por

consiguiente, la Streptomyces lavendulae MD4-CI usada de acuerdo con esta invención incluye también todas sus mutantes. Igualmente, esta invención cubre el uso de todas las cepas del género Streptomyces que producen esterastina.

5. La esterastina puede ser producida por cultivo aerobio de esporas o micelios de una cepa productora de esterastina del género Streptomyces tal como la cepa Streptomyces MD4-CI (identificada por FERM-P 3723 o ATCC. Nº 31336). Al llevar a cabo el proceso de esta invención, se inoculara una
10. cantidad de esporas o micelios de una cepa productora de esterastina en un medio de cultivo apropiado para la misma que comprende fuentes de carbono y nitrógeno asimilables y luego se incuba bajo condiciones aerobias, preferiblemente bajo condiciones aerobias sumergidas, con el fin de que la esterastina se produzca y acumule en el caldo de cultivo. Generalmente, puede usarse los constituyentes nutrientes de los medios de cultivo normalmente empleados para el cultivo de actinomicetos ordinarios con el proceso de esta invención. Por ejemplo, son útiles como fuentes de carbono los siguientes
15. productos disponibles comercialmente: glicerina, glucosa, lactosa, sucrosa, almidón, maltosa, melazas y otros hidratos de carbono así como grasas y aceite. Como fuente de nitrógeno puede usarse los siguientes productos disponibles comercialmente: peptona, extracto de carne, harina de semilla de algodón (por ejemplo Pharma-Media), harina de cacahuete, harina
20. de soja, extracto de levadura, N-2 amina, caseína, L-asparagina, nitrato sódico, nitrato amónico, sulfato amónico y similares. Además, puede emplearse cloruro sódico, fosfatos, carbonato cálcico, sulfato de magnesio y otras sales inorgánicas para el aditivo de sal en el medio de cultivo. Se puede
25. Se puede
- 30.

añadir también otras sales metálicas y diversas sales metálicas pesadas en cantidades de trazas, si se desea, siempre que sean utilizadas por la cepa productora de esterastina y no resulten perjudiciales para la producción de esterastina.

5. Puede emplearse en el proceso de esta invención cualquiera de los materiales nutrientes que son conocidos para el cultivo de actinomicetos, siempre que sean asimilables por la cepa productora de esterastina para la producción de esterastina.
10. Particularmente, se prefiere la glicerina como fuente de carbono y la harina de semilla de algodón, L-asparaguina y similares son preferidas como fuente de nitrógeno. -- Se prefiere utilizar un medio de cultivo que comprenda 1,5% de glicerina, 1,5% de harina de semilla de algodón, 0,2% de L-asparaguina y 0,3% de cloruro sódico.

- Para la producción de esterastina en gran escala, -- se prefiere el cultivo líquido. Puede emplearse para el cultivo cualquier temperatura a la que la cepa productora de esterastina sea capaz de crecer y producir esterastina, pero --
20. una temperatura de incubación particularmente preferida es -- del orden de 25 a 35° C. Se continúa el cultivo durante un -- período de tiempo suficiente para producir y acumular una -- cantidad suficiente de esterastina en el medio o caldo de -- cultivo. Por ejemplo, la producción y acumulación de esterastina alcanzó un valor máximo al final de la incubación por espacio de 2 a 4 días cuando se preparó y esterilizó un medio de cultivo que comprendía 1,5% de glicerina, 1,5% de harina de semilla de algodón, 0,2% de L-asparaguina y 0,3% de cloruro sódico (pH 7,4), seguido de la inoculación con esporas
25. y micelios recogidos de un cultivo en declive de la cepa --
- 30.

MDA-Cl y por cultivo con agitación a 27° C bajo condiciones aerobias.

- Puede realizarse el ensayo de la esterastina determinando la actividad de la esterastina para inhibir la estera
5. rase de acuerdo con una modificación del método de Yasunori Kobayashi descrito en una literatura japonesa titulada "Sei kagaku" Vol. 36, pág. 335 (1964). Así pues, se disuelve un preparado de lipasa cruda, comercialmente disponible, obtenido a partir de páncreas del cerdo, a una concentración
  10. del 0,5% (en peso) en una solución tamponada con fosfato 0,05 M (pH 7,0) conteniendo 0,2% de "Triton X-100" (un nombre comercial de un emulsionante consistente en un alquile
  15. niléster de polietilenglicol, un producto de Rohm & Haas Co. EE.UU.). Se mezcla entre sí 0,03 ml de esta solución de lipasa, 2,92 ml de solución tamponada con fosfato 0,05 M (pH 7,0) y 0,025 ml de una solución que contiene una muestra de esterastina a ensayar, y la mezcla resultante (2,975 ml) es
  20. calentada a 20° C durante 3 minutos y luego se le agregan 0,025 ml de una solución que contiene 10 mg/ml de acetato de p-nitrofenilo en metanol para iniciar la reacción del acetato de p-nitrofenilo con la lipasa. Después de efectuar la reacción a 20° C durante 30 minutos, se mide la absorbancia (a) a 400 nm de la solución de reacción resultante. Por otra parte, se mide del mismo modo que antes la absorbancia
  25. (b) a 400 nm de una solución de reacción de control obtenida a partir de un ensayo testigo usando una solución tamponada con fosfato 0,05 M que no contenía esterastina. Se calcula el grado (%) de inhibición para la esterasa de acuerdo con la siguiente ecuación:

(b-a)

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{\text{---}}{b} \times 100$$

De acuerdo con este método de ensayo, el polvo in-

5. coloro de esterastina (el producto del ejemplo 7 mostrado - más adelante) tenía una actividad tal que su ID<sub>50</sub>, es decir la dosis que da una inhibición del 50 % a la esterasa se elevó a 0,0002 mg/ml.

- La esterastina puede ser producida perfectamente -
10. por un método de cultivo en tanque así como por un método - de cultivo con agitación. Por ejemplo, se dispuso en un tanque de fermentación de 570 l. de capacidad 250-300 l. de un medio de cultivo líquido que comprendía 1,5% de Pharma-media 15% de glicerina, 0,3 % de cloruro sódico y 0,2 % de L-as-
15. parraguina y luego se esterilizaron, y posteriormente se ino- culó el medio con un cultivo en declive de la cepa MD4-C1 a un tamaño de inóculo del 10% mientras se hacía pasar aire - estéril a una cadencia de 250-300 l/minuto dentro del medio que fue agitado por un agitador que giraba a 200 r.p.m. La
20. temperatura de incubación fué de 27° C. En este experimento, la producción de esterastina alcanzó un valor máximo al final de las 48-72 horas de incubación.

- La esterastina producida está presente en el caldo de fermentación y en los micelios de la cepa MD4-C1. Para la
25. recuperación de la esterastina a partir del cultivo de la - cepa MD4-C1, se puede filtrar el caldo de fermentación y la torta de filtro comprendiendo los micelios que contienen es- terastina puede ser extraída con un disolvente orgánico mig- cible con el agua tal como metanol, etanol y acetona. Para
30. recuperar la esterastina de los micelios, la torta de mico-

- lios puede ser extraída dos veces con un volúmen 5-10 veces mayor de metanol de manera que pueda transferirse la esterastina de los micelios a la fase de metanol. El extracto metanólico resultante puede ser concentrado hasta la sequedad bajo presión reducida y el residuo puede ser extraído con un disolvente orgánico que sea altamente capaz de disolver la esterastina, por ejemplo cloroformo, acetona, benceno, acetato de butilo y acetato de etilo. Cuando se trata un gran volúmen de la torta de micelios, es conveniente extraer
5. la torta de micelios con metanol, concentrar el extracto metanólico hasta la sequedad bajo presión reducida, extraer el residuo resultante con cloroformo u otro disolvente orgánico, concentrar el extracto resultante hasta la sequedad bajo presión reducida y tratar el polvo crudo resultante de
10. esterastina con acetato de butilo y agua de acuerdo con un método conocido de distribución del disolvente de manera que pueda extraerse la esterastina en la fase de acetato de butilo con una pureza elevada.
- Para recuperar la esterastina del caldo de fermentación, el caldo de fermentación que contiene los micelios como tales es concentrado hasta la sequedad bajo presión reducida, y luego se extrae el residuo sólido con un disolvente orgánico que es altamente capaz de disolver la esterastina, por ejemplo metanol, etanol, dimetilsulfóxido, acetona,
25. acetato de butilo y cloroformo, de manera que se extraiga la esterastina en este disolvente orgánico. Cuando hay que recuperar la esterastina de un gran volúmen de filtrado del caldo de fermentación, es conveniente extraer el filtrado del caldo con un disolvente orgánico no miscible con el agua que sea altamente capaz de disolver la esterastina, por ejem
- 30.

- plo, acetato de butilo y disolver de este modo la esterastina en la fase del disolvente orgánico (por ejemplo acetato de butilo). Cuando se extrae dos veces el caldo de fermentación con aproximadamente medio volúmen de acetato de butilo,
5. es usual que una cantidad sustancialmente completa de esterastina presente en el filtrado del caldo de fermentación pueda ser transferida y disuelta en la fase de acetato de butilo. Puede realizarse también la extracción y purificación de la esterastina de acuerdo con un método conocido de distribución en contracorriente usando dos disolventes que disuelvan la esterastina pero que no sean miscibles entre sí. Cuando se concentra el extracto de esterastina en acetato de butilo así obtenido hasta la sequedad bajo presión reducida, se obtiene un polvo crudo que comprende esterastina.
10. También es posible recuperar la esterastina con un rendimiento favorable a partir de una solución que contiene esterastina disuelta en la misma, por tratamiento de dicha solución con un absorbente para realizar la adsorción de la esterastina y tratando después el adsorbente de un modo apropiado para desorber la esterastina del mismo. Como adsorbente apropiado para tal fin se puede usar un adsorbente orgánico tal como Amberlite XAD (una resina altamente porosa, no iónica, un producto de Rohm & Haas Co., EE.UU.) y un adsorbente inorgánico tal como carbón activo, alúmina, sílice y silicato de magnesio (Frorigil). Por ejemplo, la esterastina puede ser adsorbida por la gel de sílice y eluida de la misma usando cloroformo-metanol (80 : 1 en volúmen). Cuando se somete un polvo crudo de esterastina, que fué obtenido por la extracción de los micelios de la cepa MD4-GI con metanol,
15. 20. 25. 30. concentración del extracto metanólico hasta la sequedad, ex-

tracción del residuo con acetato de butilo y concentración del extracto de acetato de butilo hasta la sequedad, a la cromatografía sobre gel de sílice, seguida por la elución con cloroformo-metanol (80:1), puede obtenerse esterastina con un rendimiento del 90 % o más.

Para la purificación de la esterastina, resulta eficaz someter un polvo crudo de esterastina a la cromatografía sobre gel de sílice. Por ejemplo, puede obtenerse esterastina sustancialmente pura por tratamiento de un polvo crudo de esterastina de acuerdo con una cromatografía sobre gel de sílice seca aludida con acetato de etilo como disolvente de revelado. La esterastina sustancialmente pura así obtenida puede ser purificada adicionalmente por reprecipitación a partir de un disolvente apropiado o disolventes mezclados tales como cloroformo-éter de petróleo, de tal modo que se pueda aislar la esterastina pura en forma de polvo incoloro. Para la purificación de la esterastina, es también eficaz recurrir a la cromatografía con Sephadex LH-20 (un agente de filtración de gel, un producto de Pharmacia Co., Suecia).

Las propiedades físico-químicas y biológicas de la esterastina de esta invención serán descritas ahora con más detalle en lo que sigue.

La esterastina en forma de polvo incoloro presenta un punto de fusión de 90-95° C y una actividad óptica específica  $[\alpha]_D^{20} + 112$  (c 1, cloroformo). Análisis elemental: C 67,04 %, H 9,21 %, N 5,56 % y O 17,90 %. El espectro de absorción ultravioleta de la esterastina en una solución de 0,1 mg/ml de esterastina en metanol aparece en la figura 1 y muestra un pico de absorción a 230 nm ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} 22,5$ ). El espectro de absorción infrarrojo de la esterastina nodulí

- zada en bromuro potásico está representado en la figura 2 y muestra las bandas de absorción características a los siguientes números de onda  $/\text{cm}^{-1}/$ : 3470, 3350, 2950, 1840, 1730, - 1645, 1610, 1545, 1415, 1375, 1325, 1260, 1225, 1185, 1115, 5. 1040, 1020, 975, 920, 900, 880, 840, 810 y 690.

El espectro de resonancia magnética nuclear de la esterastina en deutero-cloroformo medido a 100 M Hz con referencia al tetrametilsilano como norma interna está representado en la figura 3.

10. La espectrometría de masa de la esterastina muestra un pico iónico molecular a  $m/e$  506. Debido al pico iónico molecular y a los valores del análisis elemental, es probable que la esterastina tenga la fórmula empírica  $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_6$ . Esta fórmula ha sido confirmada por espectrometría de masa de alta resolución (hallados:  $m/e$  506, 3364, peso molecular calculado para  $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_6$  : 506, 3354).

Con referencia a los dibujos que se acompañan:

La figura 1 muestra el espectro de absorción ultravioleta de la esterastina en solución en metanol.

20. La figura 2 muestra el espectro de absorción infrarrojo de la esterastina nodulizada en bromuro potásico.

La figura 3 muestra el espectro de absorción de resonancia magnética nuclear de la esterastina en deutero-cloroformo a 100 M Hz.

25. Se hidrolizó la esterastina en ácido clorhídrico 6N a 100° C durante 18 horas y el hidrolizado obtenido fué sometido a un análisis de amino-ácidos, cuando se detectó ácido aspártico. La esterastina es fácilmente soluble en piridina, dimetilsulfóxido, metanol, etanol, acetona, acetato de etilo, 30. acetato de butilo, cloroformo y benceno pero prácticamente -

insoluble en el agua, éter de petróleo y hexano. La esterastina es positiva a la reacción de Rydon-Smith, a la reacción de Dragendorff y a la reacción de vapor de yodo pero es negativa a la reacción de Ehrlich, a la reacción de ninhidrina y a la

5. reacción de Sakaguchi.

En una cromatografía de gel de sílice en capa delgada sobre "Gel de Sílice G", la esterastina da un valor Rf de 0,6 cuando es revelada con cloroformo-metanol-agua (10:1:0,05); y un valor Rf de 0,2 cuando es revelada con acetato de etilo.

10. La esterastina no se mueve en una electroforesis con papel de alto voltaje (3500 voltios, 15 minutos) usando ácido fórmico-ácido acético-agua (25:75:900).

La esterastina de esta invención presenta una toxicidad muy baja, según lo demuestra el hecho de que no se observó toxicidad alguna cuando se aplicó una dosis de 250 mg/kg -

15. (por inyección intraperitoneal) a los ratones con el fin de determinar la toxicidad aguda. Como se ha descrito anteriormente, la esterastina a una concentración de 0,0002 mcg/ml - muestra una inhibición de 50 % (ID<sub>50</sub>) a la esterasa del pán-

20. creas del cerdo. Como sustancias conocidas que inhiben la esterasa, puede mencionarse el paradoxon y el flu-oro-fosfato de di-isopropilo, etc., que son compuestos altamente tóxicos. - Mientras tanto, la esterastina no es tóxico e inhibe fuertemente la actividad de la esterasa en un grado tal que la esterastina a un bajo nivel de  $4,1 \times 10^{-11}$ M da una inhibición del

25. 50 % a la esterasa cuando es estimada la misma usando acetato de p-nitrofenilo como sustrato. A este respecto, se confirma también que la esterastina es una sustancia nueva.

Mediante ensayos posteriores, se ha descubierto que

30. la esterastina ejerce acción sobre la respuesta inmune en los

animales vivos.

Se investigó el efecto de la esterastina sobre la respuesta inmune como sigue.

(1) Efecto sobre la formación de anticuerpo humoral

5. Se inmunizaron grupos de dd/Y ratones (5 hembras por grupo, 6-8 semanas de edad) con  $10^8$  células de sangre roja de oveja como antígeno (bajo la forma de una suspensión en solución salina fisiológica) por inyección intravenosa para desarrollar la inmunidad. Al mismo tiempo, se inyectaron por vía
10. intraperitoneal 1 mg, 250 mcg, 62,5 mcg o 15,6 mcg de esterastina (bajo la forma de una suspensión en 1% DMSO-salina) por ratón, a los diferentes grupos de ratones respectivamente. A los 4 días de la inmunización, los ratones tratados fueron sacrificados, el bazo fué desgarrado y el número de las células
15. formadoras de anticuerpos presentes en el bazo de cada ratón fué enumerado de acuerdo con el método de Jerne (véase N.K. Jerne, A.A. Nordin y C. Henry: "The agar plaque technique for recognizing antibody-producing cells. Cell-bound Antibodies". ed. B. Amos y H. Koprowski páginas 109-122, Winter Institute Press. Filadelfia, 1963). Los resultados de los ensayos así obtenidos se muestran en la tabla 2 que sigue.

25.

... / ...

30.

T A B L A 2

Efecto de la esterastina sobre la formación de anticuerpos.

5.	<u>Antígeno</u>	<u>Dosis de esterastina por ratón.</u>	<u>Número de células formadoras de anticuerpos por bazo</u> ( $\pm$ S.E. <sup>***</sup> )
	$10^8$ SRBC <sup>**</sup>	0	170,000 $\pm$ 10,400
	" "	1 mg	45,300 $\pm$ 3,300
	" "	250 mcg	52,000 $\pm$ 2,300
	" "	62.5 mcg	55,000 $\pm$ 5,700
10.	" "	15.6 mcg	173,000 $\pm$ 19,600

<sup>\*\*</sup> SRBC significa células de sangre roja de oveja.

<sup>\*\*\*</sup> S.E. significa error típico.

Por los resultados de la tabla anterior, se ve que  
15. la administración de 1 mg a 62,5 mcg de esterastina a los ratones reduce considerablemente el número de las células formadoras de anticuerpos.

(2) Efecto sobre la inmunidad por medio de las células.

20. Se ensayó el efecto de la esterastina sobre la inmunidad celular de acuerdo con una técnica de hipersensibilidad de tipo retardado (D.T.H.) conocida (véase P.H. Lagrange, G.B. Mackaness y T.E. Miller "J. Exp. Med.", 139, 1529-1539 (1974), usando ratones inmunizados con células de sangre roja de oveja como antígeno.

25. Así pues, se aplicaron  $10^8$  células de sangre roja de oveja suspendidas en 0,05 ml de solución salina fisiológica por inyección subcutánea a un lado de la almohadilla de la pata trasera de los  $\delta/\gamma$  ratones (5 ratones por grupo, 30. hembras, 6 semanas de edad) para establecer la hipersensibi-

- lidad de tipo retardado. Al mismo tiempo que se efectuó esta inmunización, se inyectaron por vía intraperitoneal 1 mg/ratón, 250 mcg/ratón, 62,5 mcg/ratón ó 15,6 mcg/ratón de esterastina. Cuatro días después, se inyectaron por vía subcutánea  $10^8$  células de sangre roja de oveja en el otro lado de cada almohadilla de la pata trasera de los ratones de ensayo para educir la respuesta a la D.T.H. 24 horas después de la inyección de educación, se midió el espesor (en mm) de la almohadilla de la pata para evaluar el grado de hinchamiento observado en la almohadilla de la pata que recibió la inyección de educación de células de sangre roja de oveja. El grado de hinchamiento de la almohadilla de la pata sirve de medida para estimar la inmunidad celular conseguida. Los resultados de ensayo obtenidos se muestran en la tabla 3 que sigue.

T A B L A 3

Efecto de la esterastina sobre el establecimiento de la D.T.H. a las SRBC en los ratones.

20.	<u>Inmunización.</u>	<u>Dosis de este rastina.</u>	<u>Inmunización por la inyección de educación.</u>	<u>Incremento de espesor de la almohadilla de la pata - (x 0,1 mm)</u>
	$10^8$ SRBC	0 (control)	$10^8$ SRBC	8.0
	" "	1 mg	" "	3.8
25.	" "	250 mcg	" "	3.0
	" "	62,5 mcg	" "	6.2

Nota: SRBC significa células de sangre roja de oveja.

- Por los resultados de la tabla que precede, se ve que la administración de 1 mg a 250 mcg de esterastina a los ratones suprime notablemente el desarrollo de la D.T.H. y por

consiguiente que la esterastina muestra también el efecto supresivo sobre la inmunidad celular.

- Mediante ensayos adicionales, se ha descubierto también que la esterastina a una concentración de 10 mcg/ml no presenta toxicidad celular para las células cultivadas. Según se ha descrito anteriormente, una dosis de 250 mg/kg de esterastina no da síntoma alguno de toxicidad en el ensayo de estimación de la toxicidad aguda en los ratones. Estos y los resultados antes mencionados muestran que la esterastina es útil como droga inmunosupresiva que puede ser utilizada con elevada seguridad, por la razón de que la esterastina funciona de un modo completamente diferente de las drogas inmunosupresivas conocidas anteriormente, por ejemplo, la 6-mercaptopurina, azatiopurina, ciclofosfamida y corticoesteroides cuya toxicidad celular es elevada y contribuye a su efecto de supresión de la inmunidad en los animales. Por estas razones, la esterastina puede ser usada como droga para tratar muchas enfermedades mortales, tales como la dermatitis alérgica de contacto, lupus sistémico eritematoso, anemia hemolítica autoinmune, periarteritis nodosa, miastenia gravis, artritis, reumatismo y esclerosis múltiple y puede usarse como agente para suprimir el síntoma de rechazo en las operaciones quirúrgicas de trasplante de órganos internos tales como el corazón y el riñón.

- De acuerdo con esta invención, se proporciona por consiguiente una droga inmunosupresiva para reducir la respuesta inmune en los animales, incluido el hombre, que comprende una cantidad eficaz de esterastina como ingrediente activo, en asociación con un transportador farmacéuticamente aceptable para el ingrediente activo.

- La droga inmunosupresiva de esta invención puede -

- ser formulada bajo formas convencionales administrables - - oralmente tales como tabletas, cápsulas, polvos, soluciones y suspensiones, ya sea mezclando una cantidad de esterastina con un transportador sólido farmacéuticamente aceptable de tipo convencional tal como el almidón, sucrosa, talco y carbonato cálcico o bien disolviendo o suspendiendo una cantidad de esterastina en un transportador líquido farmacéuticamente - - aceptable tal como etanol y agua. La proporción de esterastina con relación al transportador sólido o líquido puede ser -
5. elegida de forma apropiada dependiendo de la forma de la formulación oralmente administrable preparada y puede estar comprendida usualmente en una relación de 1:1 a 1:100 en peso.

- La droga inmunosupresiva de esta invención puede ser formulada también en soluciones o suspensiones inyectables por di
15. solución o suspensión de la esterastina en una proporción apropiada del 0,1 al 10% en peso en una solución salina fisiológica u otro vehículo líquido convencional farmacéuticamente aceptable tal como la solución de Ringer, con o sin ayuda de un agente de dispersión apropiado. La solución o suspensión inyectable así
20. preparada puede ser aplicada, por ejemplo por inyección intravenosa, inyección intramuscular o inyección intraperitoneal.

- Se apreciará que la dosificación real preferida de - esterastina usada variará de acuerdo con la composición particular formulada para su administración, el modo de administra
25. ción y la enfermedad particular a tratar. Muchos factores que modifican la acción de la droga de esta invención serán tenidos en cuenta por el especialista en la materia, por ejemplo la edad, el peso corporal, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la vía de administración, la cadencia de excre-
30. ción, las combinaciones de drogas, las sensibilidades de reag

- ción y la gravedad de la enfermedad. En general, puede administrarse aproximadamente de 0,5 mg/kg a 100 mg/kg de esterastina por día a una persona adulta. Las dosificaciones óptimas para un conjunto determinado de condiciones de un paciente pueden ser determinadas por el especialista en la materia usando ensayos de determinación de dosificación de tipo convencional a la vista de las pautas antes indicadas y a la vista de las experiencias pasadas obtenidas en la determinación de dosificaciones apropiadas de las drogas inmunosupresivas anteriormente conocidas tales como Immuran (6-mercaptopurina).

- Se cree que usando la descripción precedente y sin más elaboración, el experto en la materia podrá utilizar el concepto de esta invención en su sentido más amplio. Las realizaciones específicas preferidas que siguen han de ser consideradas, por consiguiente, como meramente ilustrativas de esta invención.

#### EJEMPLO 1

- Se inoculó una cantidad determinada de un cultivo en declive de la cepa de *Streptomyces* MD4-C1 (identificada como FERM-F 3723 o ATCC, nº 31336) como cepa productora de esterastina en 15 litros de un medio de cultivo que comprendía 1,5 % de glicerina, 1,5 % de harina de semilla de algodón, 0,2 % de L-asparaguina y 0,3 % de cloruro sódico que se había colocado en porciones de 100 cc. en matraces giratorios de 500 cc. de capacidad y que habían sido esterilizados por calentamiento a 120° C durante 20 minutos. Se condujo la incubación durante 10 días consecutivos a 27° C y a una velocidad de rotación de 180 r.p.m. mientras que eran extraídas muestras del medio incubado a un intervalo de tiempo y cada

muestra fué ensayada para determinar la actividad de esterastina para observar cómo avanzaba la producción de esterastina durante el período de incubación. En el segundo día de incubación, la producción de esterastina alcanzó un nivel máximo, y el nivel de la sustancia inhibidora de la esterasa en el medio de incubación fué mantenida invariable hasta el 5º día de incubación. Posteriormente, el nivel de esterastina descendió lentamente. El valor pH del medio incubado varió de 6,8 en el primer día, a 7,2 en el segundo día, a 7,3 en el tercer día, a 7,5 en el cuarto día y a 6,4 en el quinto día de incubación y posteriormente fluctuó en la gama de 8,0-9,0 después del sexto día de incubación.

En el tercer día de incubación, se filtró la mayor parte del medio incubado con ayuda de un producto de filtración (tierra de infusorios, comercialmente disponible bajo el nombre comercial "Hyflo-Supercel") y se obtuvo un filtrado de caldo transparente (12600 ml). Este filtrado de caldo fué ensayado y se descubrió que contenía la sustancia inhibidora de la esterasa en tal grado que 0,0017 ml de dicho filtrado de caldo por ml mostraron un 50 % de inhibición (ID<sub>50</sub>) de la esterasa. Este filtrado de caldo fué mezclado con 500 ml de acetato de butilo para extraer la sustancia inhibidora de esterasa del mismo. La fase acuosa restante fué extraída nuevamente con 250 ml de acetato de butilo. Los extractos combinados en acetato de butilo fueron concentrados hasta la sequedad bajo presión reducida para dar 200 mg de un polvo color marrón. La ID<sub>50</sub> de este polvo fué de 0,03 mcg/ml una vez determinada por el método de ensayo indicado anteriormente. La eficacia de extracción de la sustancia activa del filtrado del caldo por medio de ace

tato de butilo fué aproximadamente del 80 %.

#### EJEMPLO 2

Se incubó la cepa de Streptomyces MD4-C1 durante 3 días usando el medio de cultivo y las mismas condiciones de cultivo que en el ejemplo 1. El caldo de fermentación resultante fué filtrado para retirar la torta de micelios. La torta de micelios (280 gr) fué extraída dos veces con metanol, es decir con 1500 ml de metanol y luego con 500 ml de metanol. Los extractos metanólicos combinados fueron concentrados hasta la sequedad bajo presión reducida. El residuo sólido obtenido fué disuelto en 500 ml de agua y la solución acuosa fué extraída con 500 ml y 200 ml de acetato de butilo sucesivamente por este orden, de tal modo que aproximadamente 90% o más de la esterastina originalmente presente en el residuo sólido fué transferida en solución en la fase de acetato de butilo. Los extractos de acetato de butilo fueron combinados entre sí y concentrados hasta la sequedad bajo presión reducida para dar 3 gr de un polvo marrón. Este polvo tenía una actividad tal que su  $ID_{50}$  para la esterasa fue de 0,07 mcg/ml.

#### EJEMPLO 3

Se cultivó la cepa de Streptomyces MD4-C1 durante 3 días usando el medio de cultivo y las mismas condiciones de incubación que en el ejemplo 1, y el filtrado del caldo de fermentación (10 l) así obtenido fué pasado a través de una columna de 1 l. de Amberlite XAD-4 (una resina adsorbente, un producto de Rohm & Haas Co., EE.UU.) para adsorber la esterastina por la resina. El efluente que salía de la columna de resina no tenía actividad para inhibir la esterasa. La esterastina adsorbida fué recuperada de la resina por elución

con 2 l. de metanol. El eluado metanólico fué recogido en fracciones de 20 gr., y las fracciones activas fueron combinadas entre sí y concentradas hasta la sequedad bajo presión reducida para dar 160 mg de un polvo crudo de esterastina -

5. ( $ID_{50} = 0,03$  mcg/ml.). Rendimiento: más del 90 %.

#### EJEMPLO 4

- Un cultivo de siembra que fue obtenido incubando la cepa de Streptomyces MD4-Cl durante 3 días en el mismo medio de cultivo y bajo las mismas condiciones de incubación que -
10. en el ejemplo 1 fué inoculado en porciones de 400 ml en dos fermentadores de agitación de 30 l. de capacidad cada uno de los cuales contenía 15 l. de un medio de cultivo que comprendía 1,5 % de glicerina, 1,5 % de harina de semilla de algodón, 0,2 % de L-asparaguina y 0,3 % de cloruro sódico que -
15. había sido esterilizado. Se condujo entonces el cultivo con agitación durante 3 días a 27° C a una cadencia de aireación de 15 l/minuto y a una velocidad del agitador de 250 r.p.m.. De este modo, se obtuvo el caldo de cultivo de una actividad tal que su  $ID_{50}$  para la esterasa fué de 0,0017 ml/ml. Los -
20. dos fermentadores de agitación dieron en total 30 l. de caldo de cultivo. La filtración de este caldo de cultivo dió 780 gr de la torta de micelio que fue entonces extraída dos veces con una porción de 4 l. de metanol cada una. Los extractos metanólicos combinados (8 l. en total) fueron concentrados hasta la sequedad bajo presión reducida para dar 17,5 gr
25. de un polvo crudo de esterastina. Este polvo crudo fué sometido a dos operaciones del método de distribución de líquido usando un litro de agua y un litro de acetato de butilo para cada operación. Los extractos de acetato de butilo resultantes fueron combinados entre sí (2 l. en total) y concentra-
- 30.

dos hasta la sequedad bajo presión reducida para dar 6,5 gr -  
de un polvo crudo de esterastina ( $ID_{50} = 0,1$  mcg/ml).

#### EJEMPLO 5

El polvo crudo (6,5 gr,  $ID_{50} = 0,1$  mcg/ml) obtenido  
5. en el ejemplo 4 fué extraído con 200 ml y luego con 100 ml de  
cloroformo. Los extractos en cloroformo fueron combinados en-  
tre sí y concentrados a un volúmen de 100 ml bajo presión re-  
ducida. La solución concentrada fué mezclada con 10 gr de gel  
de sílice (disponible comercialmente bajo el nombre comercial  
10. de "wako-gel G-100", un producto de Wako Chemicals Co., Japón)  
y la mezcla fué concentrada hasta la sequedad bajo presión re-  
ducida, de tal modo que la esterastina fue adsorbida por la -  
gel de sílice. La gel de sílice que contenía la esterastina -  
adsorbida fué colocada en la parte superior de una columna -  
15. cromatográfica de 300 ml de gel de sílice que había sido lava-  
da con cloroformo. Después de lavar toda la columna con 3 li-  
tros de cloroformo, se realizó la elución usando un disolven-  
te mezclado consistente en cloroformo-metanol (80 : 1 en volú-  
men). El eluado fué recogido en fracciones de 20 gr, y los pi-  
20. cos de la actividad inhibidora de la esterasa aparecieron en  
la proximidad de las fracciones núms. 60 a 160. Estas fraccio-  
nes activas fueron concentradas hasta la sequedad bajo presión  
reducida para dar 150 mg de un polvo de color ligeramente ro-  
jo. Este polvo mostró una actividad tal que su  $ID_{50}$  para la -  
25. esterasa fué de 0,0024 mcg/ml.

#### EJEMPLO 6

El polvo de color ligeramente rojo de esterastina -  
(150 mg) obtenido en el ejemplo 5 fué disuelto en 2 ml de me-  
tanol y posteriormente cromatografiado en una columna de 400  
30. ml de Sephadex LH-20 que había sido hinchada con metanol. Se

efectuó la elución usando metanol como eluyente, y el eluado fué recogido en fracciones de 5 gr. Los picos de la actividad inhibidora de la esterasa aparecieron en la proximidad de las fracciones núms. 54 a 66. Estas fracciones activas fueron con-  
 5. centradas hasta la sequedad bajo presión reducida para dar 30 mg de un polvo de color amarillo. Este polvo mostró una actividad tal que su  $ID_{50}$  para la esterasa fué de 0,0007 mg/ml.

#### EJEMPLO 7

El polvo amarillo (30 mg) obtenido en el ejemplo 6 -  
 10. fué disuelto en 1 ml de acetato de etilo, y la solución resul-  
 tante fué mezclada con 500 mg de gel de sílice (Wako-gel -  
 C-200). La mezcla fué concentrada hasta la sequedad bajo pre-  
 sión reducida, con el fin de adsorber la esterastina por la -  
 masa de gel de sílice. Esta masa de gel de sílice fué coloca-  
 15. da en la parte superior de una columna cromatográfica (1,2 cm  
 de diámetro y 20 cm de altura) de gel de sílice seca, y se -  
 realizó la elución con acetato de etilo como eluyente. El elua-  
 do fué recogido en fracciones de 10 gr, y la esterastina ape-  
 reció solamente en la proximidad de las fracciones núms. 10 a  
 20. 17. Estas fracciones activas núms. 10-17 fueron concentradas  
 hasta la sequedad bajo presión reducida para dar 7 mg de un -  
 polvo incoloro de esterastina, punto de fusión 90-95°. Este -  
 polvo mostró una actividad tal que su  $ID_{50}$  para la esterasa -  
 fué de 0,0002 mg/mg.

25.

#### EJEMPLO 8

Se cargó un medio de cultivo (300 ml), comprendiendo  
 1,5 % de glicerina, 1,5 % de harina de semilla de algodón, -  
 0,3 % de cloruro sódico, 0,2 % de L-asparraguina y 0,005 % de  
 agente antiespumante (polioxialquileno comercialmente disponi-  
 30. ble bajo el nombre comercial de "Adecanol", un producto de -

- Asahi Denka Co., Japón), en un tanque de acero inoxidable de 570 l. de capacidad y luego se esterilizó por calentamiento a 120° C durante 20 minutos. Con este medio de cultivo esterilizado se inocularon 30 l. de un cultivo de siembra que fué -
5. obtenido por incubación de la cepa *Streptomyces* MDA-Cl (FERM-P 3723) durante 2 días a 27° C bajo aireación y agitación. El medio de cultivo inoculado fué incubado a 27° C durante 48 horas a una cadencia de aireación de 300 l/minuto y a una velocidad del agitador de 200 r.p.m. El caldo de fermentación así
10. obtenido fué filtrado para dar 34,2 kg de la torta de filtro que contenía los micelios. Esta torta de filtro fué extraída dos veces con 100 l. de etanol cada una, y los extractos etanólicos combinados fueron concentrados a un volumen de 6 l. - bajo presión reducida. La solución concentrada fué extraída -
15. dos veces con 6 l. de acetato de butilo cada una. Los extractos en acetato de butilo fueron combinados entre sí y concentrados bajo presión reducida para dar 128,2 gr de un polvo - crudo de esterastina que tenía una actividad correspondiente a un valor ID<sub>50</sub> de 0,08 mcg/ml.

20.

EJEMPLO 9.

- El polvo crudo de esterastina obtenido en el ejemplo 8 fué purificado en el procedimiento siguiente. Este polvo -
- crudo (128,2 gr) fué disuelto en 500 ml de cloroformo y la solución resultante fué pasada a través de una columna de 1,5
25. kg de gel de sílice (Wako-gel C-100) para la adsorción de la esterastina. La columna de gel de sílice fué lavada con 10 l. de cloroformo y luego con 10 l. de cloroformo-metanol (100 : 1 en volumen), seguida por la elución con cloroformo-metanol - (80 : 1 en volumen). Las fracciones activas (2500 ml) del elu-
30. do fueron combinadas entre sí y concentradas hasta la seque-

- dad bajo presión reducida para dar 4,83 gr de un polvo crudo de color marrón que tenía una actividad correspondiente a un valor  $ID_{50}$  de 0,002 mcg/ml. Este polvo crudo fué recogido en 20 ml de metanol y la solución obtenida fué pasada a través
5. de una columna de 2 l. de Sephadex LH-20 que había sido hinchada con metanol. Esta columna fué eluida entonces con 4 l. de metanol. Las fracciones activas del eluado fueron combinadas entre sí y concentradas hasta la sequedad bajo presión reducida para dar 656 mg de un polvo de color ligeramente -
10. amarillo ( $ID_{50} = 0,0004$  mcg/ml). Este polvo fué recogido en 5 ml de acetato de etilo y la solución obtenida fué pasada a través de una columna de 250 gr de gel de sílice (Wako-gel G-300) para la adsorción de la esterastina. Esta columna de gel de sílice fué revelada entonces con acetato de etilo, y
15. las fracciones activas del eluado fueron combinadas entre sí (1000 ml) y concentradas hasta la sequedad bajo presión reducida, dando 351 mg de un polvo incoloro de esterastina que tenía una actividad correspondiente a un valor  $ID_{50}$  (a la esterasa) de 0,0002 mcg/ml).

20.

NOTA

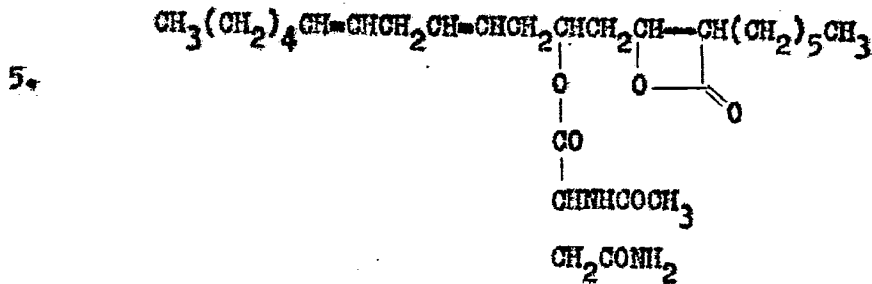
La Patente de Invención que se solicita por veinte años, para España, de acuerdo con la vigente Legislación, de berá recaer sobre:

25. "PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ESTERASTINA", con Prioridad de la solicitud de Patente en Japón nº 12119/77 de fecha 8 de Febrero de 1977, según las características esenciales de las siguientes:
- 

30.

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para la producción de esterastina que responde a la fórmula general:



10. cuyo procedimiento comprende el cultivo de una cepa productora de esterastina del género Streptomyces bajo condiciones aerobias en un medio de cultivo apropiado para la misma que contiene fuentes de carbono y nitrógeno asimilables durante un período de tiempo suficiente para producir y acumular la esterastina en el medio de cultivo, y recuperar la esterastina del cultivo.
- 15.

2.- Procedimiento para la producción de esterastina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cepa productora de esterastina es la cepa Streptomyces MD4-C1 identificada como FERM-P 3723 ó ATCC. 31336.

20. 3.- Procedimiento para la producción de esterastina de acuerdo con la reivindicación 2, en el que se cultiva la cepa de Streptomyces MD4-C1 a una temperatura de 27 a - 37° C y preferiblemente de 25 a 35° C bajo condiciones aerobias.

25. 4.- Procedimiento para la producción de esterastina, de acuerdo con la reivindicación 2, en el que se cultiva la cepa de Streptomyces MD4-C1 a una temperatura de 25 a 35° C durante un período de 2 a 4 días bajo condiciones aerobias.

30. 5.- "PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ESTERAS-

TINA\*.

Según queda sustancialmente descrito en la presente Memoria que consta de treinta y seis hojas escritas a máquina por una sola cara y acompañada de dibujos

5.

Madrid,

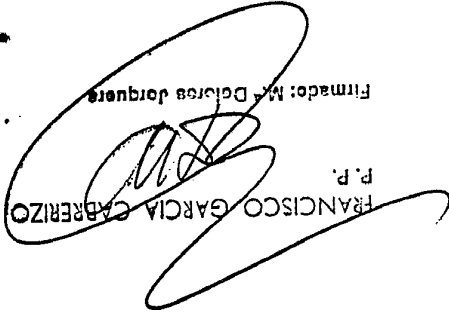
8 FEB. 1978

ZAIDAN HOJIN BISEIBUTSU

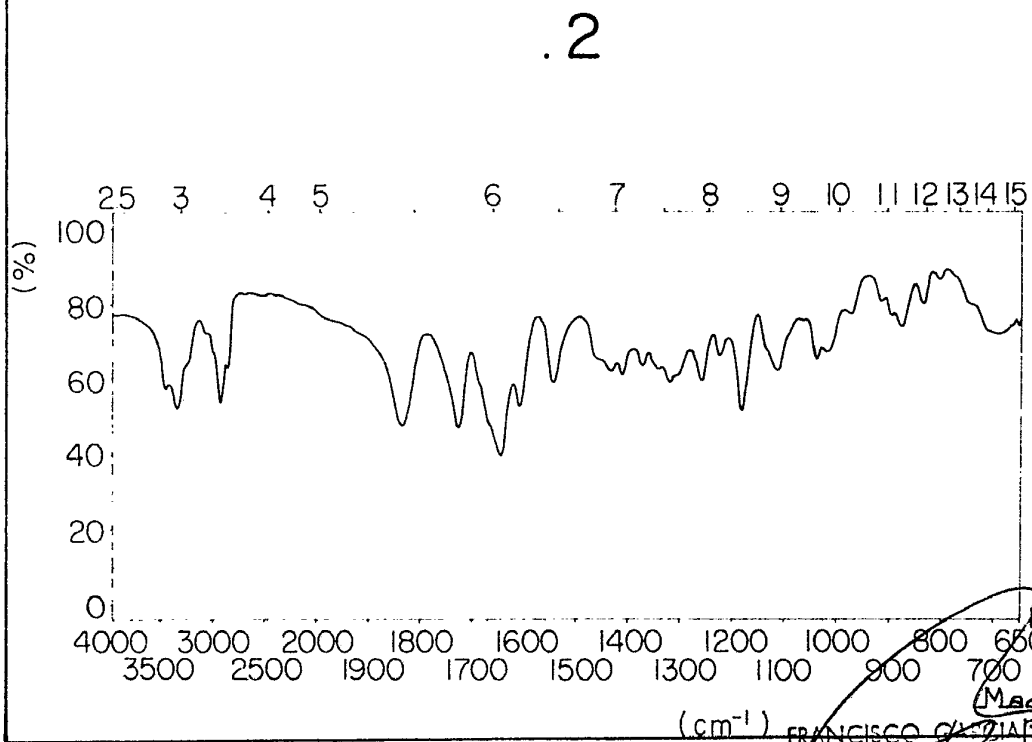
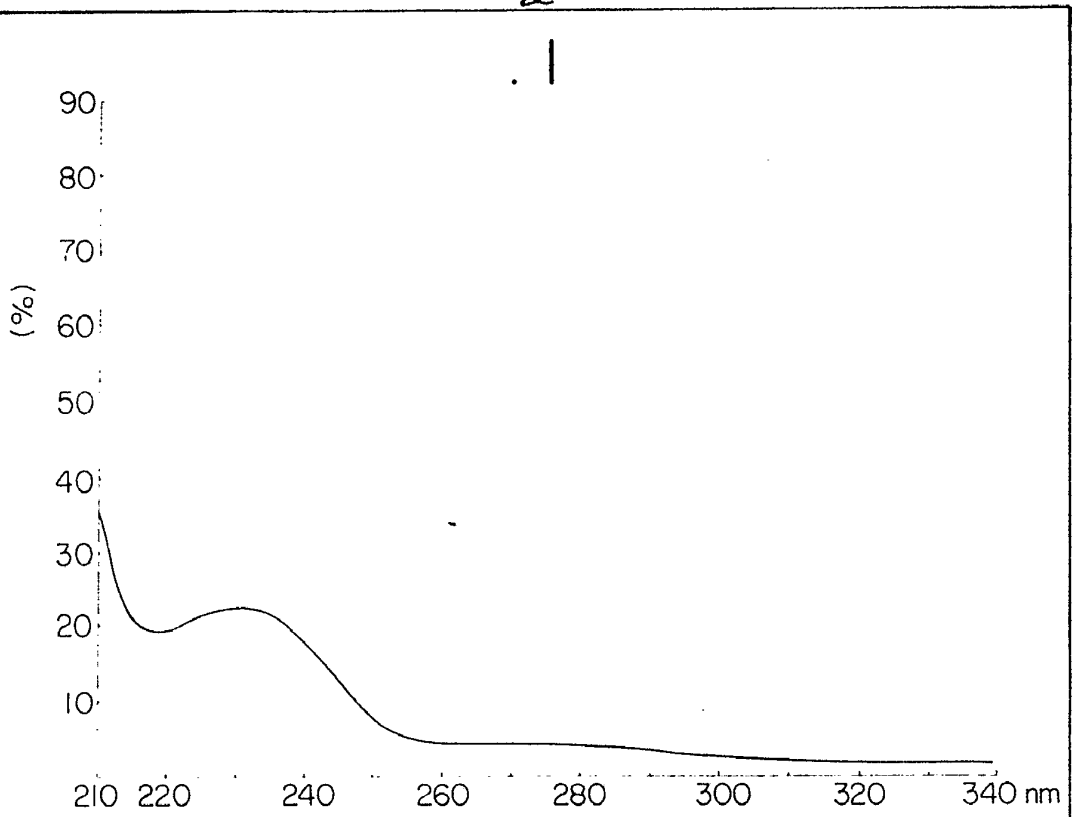
KAGAKU KENKYU KAI

P.P.

Firmado: M. Dolores Jorquera



FRANCISCO GARCIA CABRERIZO  
P. P.



FEB. 1978  
Machida  
FRANCISCO CALZADILLA BARRERA  
P.P.  
Nippon: M. E. Editora Japonesa

