

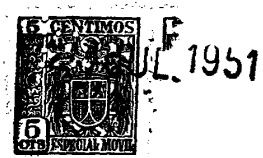
198990

P. 9090.-

A - 1051.54.

MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

198990



28 JUL. 1951

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de SCHENLEY INDUSTRIES, INC., entidad norteamericana, establecida en 350 Fifth Avenue, Nueva York, N.Y., Estados Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UN PRODUCTO ENZIMATICO BACTERIANO".

- 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 -

Este invento se refiere en general a productos enzimáticos bacterianos y, más particularmente, a un material enzimático, que tiene la propiedad de destruir las propiedades antibióticas características de la penicilina, y que es afín al enzima conocido como penicilinasas. El invento incluye,

198990



1951

adicionalmente, un nuevo procedimiento para preparar productos de este tipo.

Es bien sabido que las propiedades bacteriostáticas de la penicilina pueden ser destruidas por un enzima, designado como penicilinasasa, que es elaborado como metabolito extracelular por cierto número de especies comunes de bacterias gram-negativas y por ciertas especies gram-positivas, tales como el paracolon bacillus y otros bacilos coliformes, bastoncillos aeróbicos formadores de esporas, y ciertas especies de Shigella. Aunque el cultivo de los organismos Escherichia coli, Bacillus subtilis y Bacillus cereus, produce el enzima en proporción satisfactoria para la mayoría de los fines, el organismo últimamente mencionado se prefiere particularmente para la producción comercial a causa del elevado rendimiento del enzima obtenido cuando este organismo se cultiva sobre cualquiera de los medios de cultivo ordinarios. El enzima, aunque tiene su génesis dentro de las celdas del organismo que se está cultivando, se produce allí en un exceso tan grande que sale de las celdas al medio nutricio ambiente, desde el cual puede ser precipitado, con preferencia dentro de su gama isoelectrica (pH de aprox. 5 a aprox. 5,4) por tratamiento con acetona, alcohol, dioxano, tungstato sódico, o solución saturada acuosa de sulfato amónico.

Las preparaciones de penicilinasasa tienen una función importante en la fabricación comercial de penicilina, donde se usan para ensayar la esterilidad de la droga y para el análisis químico de la actividad antibiótica. Se usan

1 98990



954

también en el ensayo de la presencia de organismos viables o sustancias antibióticas distintas de la penicilina en los fluidos corporales de los pacientes que están sometidos a terapia penicilínica. Es evidente también que cada uno de estos usos de la penicilinasa, salvo el empleo en análisis químicos, requiere un producto estéril, no importa que tal producto sea impuro o de baja actividad, mientras que el uso del producto en análisis químicos, que se basan en la conversión de penicilina en ácido penicilótico, requiere un producto sumamente activo exento de agentes tampón que perturbarían las mediciones del pH. La producción comercial de preparados de penicilinasa que satisfagan estos requisitos ha sido difícil porque las técnicas de esterilización ordinarias pueden causar la destrucción parcial o, incluso, total, de la actividad del enzima extremadamente inestable (por ejemplo, como un 95% de la potencia se pierde en una hora si el producto se calienta a 45°C) y el procedimiento ordinario para eliminar los agentes tampón, a saber, la diálisis, aumenta mucho la posibilidad de contaminación de la droga. Como resultado de estas dificultades, las características de los preparados de penicilinasa comercialmente disponibles reflejan una transacción entre lo práctico y lo deseable, porque, aunque estériles y sustancialmente libres de contaminantes tóxicos, la mayoría de estos preparados son de baja potencia y contienen agentes tampón como impurezas que perturban su uso en análisis químicos de penicilina.

Uno de los objetos más importantes del pre-



198990

5 sente invento es el de crear un producto puro estéril que tiene la actividad característica de la penicilinasasa, que posee una potencia mucho mayor que los preparados anteriormente disponibles, que contiene a lo sumo cantidades meramente despreciables de agentes tampón y que tiene un grado mayor de estabilidad química que los productos de este tipo anteriormente disponibles.

10 Otro objeto de este invento es el de crear un procedimiento para fabricar un preparado de penicilinasasa estable, de gran potencia, que rinde uniformemente un producto que tiene virtualmente las mismas propiedades en cada caso, en contraste con la técnica anterior cuyos procedimientos dan productos que poseen propiedades ampliamente diferentes en distintas tandas.

15 De acuerdo con el procedimiento de este invento, un caldo de fermentación clarificado que contiene penicilinasasa y que puede prepararse en cualquier forma conocida, se trata aproximadamente con 10% a 30% en peso de sulfato amónico para determinar la precipitación fraccionada de material inerte indeseado que se separa de este modo, luego se añade una cantidad ulterior de sulfato amónico hasta que la solución contiene aproximadamente 80% de la cantidad de esta sal precisa para saturarla, después de lo cual la solución se deja reposar mientras se enfría para permitir la formación de un precipitado que contiene penicilinasasa. Este precipitado se elimina y se extrae con solución diluída acuosa de sulfato amónico, que disuelve

20

25



1951

198990

la penicilinasas contenida en el precipitado y da una solución que contiene, por volumen unidad, aproximadamente diez veces el contenido en penicilinasas del caldo original. Si se desea, en este momento, el tratamiento con sulfato amónico para la precipitación de la penicilinasas y las operaciones subsiguientes arriba descritas pueden repetirse para efectuar una purificación ulterior del producto. La solución de penicilinasas resultante, relativamente concentrada, se dializa luego con agua fría, usando una membrana semipermeable tal como celofana, para separar el contenido en sulfato amónico, luego se trata con un ácido, con preferencia, un ácido mineral diluido, para ajustar su concentración en ión hidrógeno a un pH dentro de la gama de aproximadamente pH 3 a pH 5, y con preferencia a un pH aproximado de 4,5.

Esta solución acidificada se trata luego con un agente capaz de formar un compuesto complejo con la penicilinasas que sea escasamente soluble en la mezcla de reacción, con lo cual, virtualmente toda la penicilinasas presente en la solución, reacciona para formar este compuesto, que luego precipita y puede separarse fácilmente del líquido que sobrenada. Los agentes precipitantes que se prefieren actualmente para su uso de este modo son ciertos compuestos orgánicos complejos de origen vegetal, tipificados por los taninos y las ligninas. El agente precipitante se pone en relación reactiva con la solución que contiene penicilinasas mientras los dos están en solución acuosa, y con preferencia la solución del agente precipitante tiene una concentra-

198990



1951

ción de hidrogeniones que es aproximadamente la misma que la de la solución de penicilinas.

5 Cuando se usa tanino como agente precipitante, es con preferencia el complejo del ácido tánico derivado de la nuez de agallas o de palo mora, y debe estar en un estado tan altamente purificado como sea convenientemente practicable obtenerlo. Los taninos de otros orígenes pueden usarse también, por ejemplo, los derivados de la corteza de varias especies de roble, abeto, mimosa, mirabolam, 10 hematina y zumaque. El tipo de lignina preferido para su empleo como agente de precipitación en el procedimiento de este invento es el conocido en la industria de la pulpa de la madera como lignina alcalina a la sosa, tal como la que se obtiene por precipitación ácida desde el líquido negro producido en la formación de pulpa de abeto a la sosa, 15 seguido por neutralización. Es deseable, aunque no esencial, que la lignina usada sea tan pura como pueda ser convenientemente practicable obtenerla.

20 De acuerdo con la realización actualmente preferida del procedimiento del invento, la solución de penicilinas y la solución del agente precipitante usado son de concentraciones tales que el volumen de la última preciso para una precipitación completa de la penicilinas sea aproximadamente de 20% del volumen de la primera, aunque éste no es un valor crítico y puede ser, en lugar del 25 20%, tan pequeño como 5% o tan alto como 50%. Se prefiere que las soluciones, durante toda la operación de precipi-

MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

198990



tación, sean mantenidas a una baja temperatura, por ejemplo, a una temperatura desde unos 5°C a unos 10°C, y que las soluciones sean agitadas para asegurar la homogeneidad completa de la mezcla resultante y la completa reacción de los componentes.

5

El complejo de la penicilinasas-ácido tánico o de penicilinasas-lignina producido de este modo se obtiene como precipitado floculento desde las soluciones mezcladas a un pH de aprox. 4,5 y, después de dejar que las soluciones mezcladas enfriadas reposen durante un período hasta que todo el precipitado se haya sedimentado, el material insoluble se separa por filtración, y luego se suspende en agua. El pH de esta suspensión se ajusta a aprox. 7,5 por adición de una solución de hidróxido de metal alcalino, por ejemplo, solución de hidróxido sódico, lo cual hace que el material activo suspendido se disuelva, formando una verdadera solución, que luego se dializa contra agua fría para separar los materiales difusibles que pudieran actuar como tampones en el producto terminado. La solución se trata así con una solución acuosa de una goma hidrofílica, por ejemplo acacia (goma arábiga), y las soluciones mezcladas pueden usarse entonces directamente en el análisis químico de penicilina, o la solución mixta puede deshidratarse desde el estado congelado para dar un producto liofílico seco que puede emplearse al hacer soluciones para tales procedimientos de ensayo.

10

15

20

25

Los productos complejos de tanino-penicilinasas

198990



y lignina-penicilinasas de acuerdo con este invento son considerablemente superiores a los tipos anteriormente conocidos de preparados de penicilinasas en función de la potencia, estabilidad térmica, tanto en solución como en estado sólido seco, carácter específico de acción, resistencia a las influencias inactivadoras, y ausencia de sustancias tóxicas que perturbarían el uso de los productos en el análisis químico de la penicilina. Por ejemplo, el complejo de tanino-penicilinasas estabilizado con acacia, designado en lo que sigue complejo de penicilinasas, es superior a la penicilinasas preparada por precipitación desde una solución acuosa dentro de su zona isoelectrica de acuerdo con el procedimiento de la técnica anterior antes mencionado, designada en lo que sigue penicilinasas precipitada. El complejo de penicilinasas puede tratarse en autoclave a unos 1.05 Kgs/cm² (unos 120°C) durante 20 minutos con pérdida solamente de 50% de su actividad inicial, al paso que la penicilinasas precipitada es totalmente inactivada por este tratamiento. Una solución acuosa del complejo (20:1) no pierde en grado apreciable su actividad cuando se guarda con refrigeración durante un periodo de 4 meses, al paso que, en las mismas condiciones, una solución de penicilinasas precipitada pierde como la mitad de su actividad con un periodo de dos a tres meses. Un miligramo del complejo de penicilinasas, en condiciones óptimas de temperatura, concentración de hidrogeniones y relación enzima-substrato, es capaz de inactivar 600 a 700 miligramos de penicilina, al paso que la misma

198990



1957

cantidad de penicilinas precipitada, en iguales condiciones, es capaz de inactivar 75 mgrs. de penicilina, a lo sumo. El contraste entre los productos nuevo y antiguo es especialmente chocante en función de sus titulaciones respectivas con álcali; el complejo de penicilinas requiere, para cambiar pH desde 6 a pH 8, meramente 0.02 mls. a lo sumo de hidróxido potásico 0,02N, al paso que se requieren 0,2 mls. o más para producir el mismo cambio con penicilinas precipitada. Además, el complejo de penicilinas no es inactivado por incubación durante 4 horas a 37°C con benzoato sódico, sulfamato amónico, ácido sulfanílico o sulfanilato sódico a concentraciones de aprox. 2%, al paso que ciertos tipos de preparados de penicilinas de la técnica anterior se decía que quedaban inactivados en estas condiciones.

Los ejemplos siguientes ilustran aplicaciones prácticas de los principios de este invento.

EJEMPLO I

Un caldo de fermentación que contiene penicilinas, obtenido por cultivo del organismo denominado *Bacillus cereus*, Cepa NRRL B-569, se filtra a través de varias capas de tela, luego el filtrado se pasa una o más veces por una centrífuga de gran velocidad para eliminar las celdas suspendidas y otras materias. Esta solución tiene una potencia de unas 8.000 unidades de penicilinas por ml. Se añade sulfato amónico a unos 60 litros de este caldo clarificado para producir una solución de aprox. 20%

198990



de concentración de la sal y esta solución después de re-
posar durante la noche en la nevera, se filtra para dar un
filtrado pardo claro que tiene una potencia de unas 8.400
unidades de penicilinas por ml. Esta solución se satura
5 luego por adición ulterior de sulfato amónico suficiente
para hacer que la cantidad total de sulfato amónico sea de
unos 706 grs. por litro de caldo, y esta solución se deja
reposar durante la noche con refrigeración con lo cual un
precipitado pardo que lleva el material activo se separa
10 del líquido que sobrenada. El precipitado se elimina por
filtración y se disuelve en unos 2,5 a 3 ls. de solución
de sulfato amónico (aprox. 2% en peso). El volumen de esta
solución es aprox. de 1/20 del del caldo clarificado y su
potencia es de unas 110.000 unidades de penicilinas por
15 ml. Después de saturar la solución con sulfato amónico por
adición de cantidades ulteriores de la sal, la solución se
deja reposar durante la noche en la nevera, luego se filtra
y el residuo se disuelve en aproximadamente un litro de
solución de sulfato amónico (2% en peso). Esta solución
20 después de combinarse con medio litro de solución de sulfa-
to amónico usada al lavar la materia insoluble que queda
como residuo, tiene un volumen de aprox. 1,5 litros y una
potencia de unas 307.000 unidades de penicilinas por ml.
Se coloca en una bolsa de dialización de membrana semiper-
25 meable, tal como celofana, y se dializa contra agua de grifo
fluyente enfriada hasta que la solución dé ensayo negativo
para el ión de amonio.



198990

La concentración de hidrogeniones de esta solución dializada se ajusta luego a un pH dentro de la gama de pH 3 a pH 5,5, con preferencia a un pH de aprox. 4,5, y la solución se trata con una solución acuosa de ácido tánico (de aprox.5%) usando un tanino derivado de nuez de agallas o palo de mora. Con preferencia el volumen de la solución de tanino usada para ello es aproximadamente 1/5 del volumen de la solución dializada de penicilinas, y debido al aumento en volumen de la solución durante la diali-
sis, el volumen total de la solución después de la adición de la solución de tanino es de aproximadamente 2.230 mls. La concentración de hidrogeniones de la solución se ajusta de nuevo después de la adición de la solución de tanino, a aprox. 4,5 pH por adición de ácido mineral diluido o hidró-
xido de metal alcalino, luego la mezcla se deja reposar en baño de hielo durante una media hora con agitación ocasional, durante la cual el complejo de penicilinas-tanino se forma y precipita de la solución. El precipitado se separa por filtración, se suspende en medio litro de agua, y se añade solución de hidróxido sódico (10% en peso) para ajustar la concentración de hidrogeniones a aprox. pH 7,5, después de lo cual la solución se dializa contra agua de grifo flu-
yente fría durante 36 a 48 horas para eliminar las impurezas difusibles que pudieran contribuir a formar sustancias también en el producto final. Después de esta dialisis final, la solución tiene un volumen de unos 625 mls. y una potencia de unas 800.000 a 1.200.000 unidades de penicilinas

198990



1951

por ml.

Una solución acuosa de acacia (aprox. 2% en peso) se añade para diluir la solución del complejo de penicilinasa al deseado nivel de potencia, luego la solución puede usarse directamente en el análisis químico de penicilina o puede deshidratarse mientras está en estado congelado para dar un producto liofilo seco para hacer soluciones a usar para ese fin.

El procedimiento anterior puede modificarse si se desea, en los particulares siguientes: la clarificación inicial del caldo puede efectuarse usando una solución de sulfato amónico en concentraciones dentro de la gama de 10% a 40% en peso de la sal en la solución; la precipitación del material activo por adición de sulfato amónico al caldo clarificado puede efectuarse añadiendo sulfato amónico en cantidades menores de las que se requerirían para saturar plenamente la solución, siendo como 80% de saturación el límite inferior para una operación eficaz; y el enzima precipitado puede disolverse en una solución de sulfato amónico con una concentración dentro de la gama de 1% a 10% de sulfato amónico referida al peso. Los taninos derivados de nuez de agallas o de palo de mora, aunque preferidos, pueden sustituirse, si se desea, por taninos procedentes de abeto, mincea, mirabolam y hematina, y el volumen de la solución de tanino añadida para determinar la formación y precipitación del complejo de penicilinasa-tanino puede estar dentro de la gama de 5% a 50% del volumen

198990



1951

de la solución de penicilinas. El complejo precipitado puede disolverse en soluciones acuosas a pH por encima de pH 6 pero la gama preferida es aprox. pH 7 a pH 8.

EJEMPLO II

5 El caldo que contiene penicilinas se recoge, clarifica, precipita fraccionadamente con sulfato amónico, se dializa, se enfría y su pH se ajusta a aprox. pH 4,5 como se ha descrito en el Ejemplo I. Esta solución enfriada se mezcla con aprox. 1/5 de su volumen de un extracto acuoso
10 enfriado de lignina alcalina a la sosa, preparada a un pH de 6 aprox., y la concentración de hidrogeniones de la mezcla se ajusta a aprox. pH 4,5. La mezcla de soluciones se enfría en un baño de hielo durante aprox. media a una hora, durante cuyo tiempo un complejo de penicilinas-lignina
15 se forma y se separa de la solución como precipitado y se separa por filtración. Este residuo se disuelve en solución diluida de hidróxido sódico, como se describió en el ejemplo I, luego, después de ajustar la concentración de hidrogeniones de la solución a aprox. pH 7,5, la solución se dializa
20 durante unas 36 a 48 horas contra agua del grifo fluyente enfriada. La solución dializada se diluye luego a la potencia deseada por adición de una solución acuosa de amoníaco, dando un producto que tiene la misma utilidad que el obtenido como se describió en el ejemplo I.

25 El procedimiento descrito en este ejemplo, puede someterse también a modificaciones en la misma forma que el procedimiento descrito en el Ejemplo I.

28



198990

Esta solicitud, que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, el 9 de Enero de 1951, bajo el número 205.439, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

- O - N O T A - O -

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

10

15

20

1º. - Un procedimiento para la fabricación de sustancias que tienen la actividad del enzima bacteriano penicilinasas, que comprende ajustar la concentración en hidrogeniones de una solución acuosa concentrada de penicilinasas, esencialmente libre de sustancias tampón, a un pH dentro de la gama de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 5 y, mientras se mantiene el pH de la solución sustancialmente dentro de esta gama, añadir a la misma una solución acuosa de una sustancia del grupo consistente en taninos y ligninas, con lo cual se forma un complejo insoluble de penicilinasas y dicha sustancia y se separa de las soluciones mezcladas, y re-

198990



cuperar dicha sustancia compleja de las soluciones mezcladas.

2ª. - El procedimiento según se reivindica en el punto 1, en el cual la concentración en hidrogeniones de las soluciones se mantiene a aproximadamente pH 4,5 durante la formación y separación de la sustancia compleja.

3ª. - El procedimiento según se reivindica en el punto 1, caracterizado además porque la sustancia que forma el complejo es un tanino derivado de un producto vegetal del grupo consistente en nuez de agallas, palo mora, corteza de roble, corteza de abeto, corteza de mimosa, corteza de mirabolán, corteza de hematina, y corteza de zumaque.

4ª. - El procedimiento según se reivindica en el punto 1, caracterizado además porque la sustancia formadora del complejo es una lignina del tipo designado como lignina alcalina a la sosa.

5ª. - Un procedimiento para la fabricación de sustancias que tienen la actividad de la penicilinasas enzimática bacteriana, que comprende ajustar la concentración en hidrogeniones de una solución acuosa concentrada de penicilinasas, esencialmente exenta de sustancias tampón, a un pH dentro de la gama de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 5, y, mientras se mantiene el pH de la solución sustancialmente dentro de esta gama, añadir a la misma una solución acuosa de una sustancia del grupo consistente en taninos y ligninas, con lo cual un comple-

198990

28



jo insoluble de penicilinas y dicha sustancia se forma y se separa de las soluciones mezcladas, recuperar dicha sustancia compleja de las soluciones mezcladas, suspender la sustancia recuperada en un medio acuoso, ajustar la
5 concentración de hidrogeniones de dicho medio a aproximadamente pH 7,5 con lo cual el material suspendido se disuelve para formar una verdadera solución, e introducir una goma hidrófila en dicha solución.

6^a. - El procedimiento según se reivindica
10 ca en el punto 5, en el cual la concentración de hidrogeniones de las soluciones se mantiene a aproximadamente pH 4,5 durante la formación y separación de la sustancia compleja.

7^a. - El procedimiento según se reivindica
15 en el punto 5, caracterizado además porque la sustancia formadora del complejo es un tanino derivado de un producto vegetal del grupo consistente en muez de agallas, palo mora, corteza de roble, corteza de abeto, corteza de mimosa, corteza de mirabolán, corteza de hematina, y corteza de zumaque.
20

8^a. - El procedimiento según se reivindica
en el punto 5, caracterizado además porque la sustancia formadora del complejo es una lignina del tipo denominado lignina alcalina a la sosa.

9^a. - Un procedimiento para fabricar sustancias que tienen la actividad de la penicilinas, que
25 incluye las operaciones de formar una solución acuosa que

MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

198990



5 contiene penicilinasas, añadir a esta solución, mientras
está enfriada y mientras se mantiene la concentración de
hidrogeniones de la mezcla por debajo de pH 6, una solu-
ción acuosa enfriada de una sustancia elegida del grupo
consistente en taninos y lignina con lo cual dicha sustan-
cia forma un producto complejo escasamente soluble con la
penicilinasas, que se separa de las soluciones mezcladas
como precipitado, recuperar el precipitado del líquido
que sobrenada y disolverlo en un medio acuoso a pH de
10 aproximadamente 7,5.

15 10º. - Un procedimiento de fabricar sus-
tancias que tienen la actividad de la penicilinasas, que
incluye las operaciones de formar una solución acuosa que
contiene penicilinasas, añadir a esta solución, mientras
está enfriada y mientras se mantiene la concentración de
hidrogeniones de la mezcla por debajo de pH 6, una solu-
ción acuosa enfriada de una sustancia elegida del grupo
consistente en taninos y ligninas, con lo cual dicha sus-
tancia forma un producto complejo escasamente soluble con
20 la penicilinasas, que se separa de las soluciones mixtas
como precipitado, recuperar el precipitado del líquido
que sobrenada, disolverlo en un medio acuoso a un pH de
aproximadamente 7,5 y añadir al mismo una solución acuosa
de una goma hidrófila.

25 11º. - Un procedimiento para preparar un
procedimiento enzimático bacteriano.

Tal y como se ha descrito en la Memoria

198990



que antecede, y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de diecisiete hojas y la presente, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 6 DIC 1951

P. A.

Alberto de Ezaburu

Por Poder