

AÑO 1959

Expediente núm.

249489

249489'



REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

PATENTE DE INVENCIÓN

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de

una **PATENTE DE INVENCIÓN** por **VEINTE** años, en España

a favor de

PHILIPPE CZACZKES y THADEE STARON, de nacionalidad

francesa y polaca domiciliado en París, Francia

respec.

calle de 22 rue Lalo y núm.

17 rue Descombes respectivamente.

por:

«PROCEDIMIENTO DE FABRICACION DE UN ANTIBIOTICO».

Nº 14791

Agente Sr. UNGRIA



20 MAY.

249489

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a

la solicitud de

una PATENTE de INVENCION por VEINTE AÑOS en ESPAÑA

a favor de

PHILIPPE CZACZKES, de nacionalidad francesa, con domicilio en 22 rue Lalo, París, (16e), y THADEE STARON, de nacionalidad polaca, con domicilio en 17 rue Descombes, París, (17e), Francia,

p o r

"PROCEDIMIENTO DE FABRICACION DE UN ANTIBIOTICO".

Inventores: Los solicitantes.

Prioridad: De la solicitud de Patente francesa nº 766.307, del 23 de mayo de 1958.



249489

La presente invención tiene esencialmente por objeto un procedimiento de fabricación de un nuevo antibiótico.

5 Los caracteres culturales, históricos y morfológicos del hongo productor utilizado para la fabricación de este antibiótico permiten clasificar a este germen en el grupo de los "as
pergilli flavus-cryzal".

10 La reproducción de la cepa puede hacerse, como en los hongos de la misma familia, en el medio conocido con el nombre de "medio de Czapeck". En este medio las colonias aparecen al cabo de 24 horas de cultivo a 28°C. Son planas, radiadas y de color verde-amarillento, con predominio, sin embargo, del verde.

Con una ligera ampliación al microscopio, se observan los siguientes hechos:

15 La longitud de las conidiósporas varía entre 600 y 900 μ y su diámetro es de 15 μ .

Los conidios son redondos, globulares y lisos, de un diámetro que varía de 3 a 4,5 μ .

20 Estos caracteres acercan a este hongo al conocido con el nombre de "aspergillus micro-virido-citrinus", descrito por Constantin y Lucet en una obra aparecida en 1905. Sin embargo, difiere de este último precisamente por la producción del antibiótico a partir de la cepa que ha sido aislada.

25 En lo que respecta a la conservación misma de la cepa, puede hacerse bajo aceite de vaselina o incluso por liofilización de las esporas.

30 Según la invención, la fabricación del antibiótico se hace en primer lugar utilizando como medio de cultivo para este hongo un medio lechoso, por ejemplo a base de suero lechoso y de leche en polvo. Los mejores rendimientos se obtienen

249489



utilizando solamente suero lechoso.

La temperatura a que debe efectuarse el cultivo puede variar entre 24 y 30°C.

5 Los procedimientos de cultivo pueden ser varios. Se citará, a modo de ejemplo entre los procedimientos clásicos, el cultivo denominado "de fermentador" y el cultivo en recipientes del tipo Erlenmeyer. En este último caso, y a título de ejemplo no limitativo, se introducen aproximadamente 200 litros del medio de cultivo en un recipiente del tipo Erlenmeyer de un contenido aproximado de 6 litros. Después de la siembra del medio con esporas del hongo citado, se somete el recipiente a una agitación, continua por ejemplo, a un ritmo de 40 movimientos aproximadamente por minuto.

15 Se continúa esta fase durante 48 horas o por lo menos hasta la obtención de una concentración del orden de 1,5 a 3 g. aproximadamente por litro del medio de cultivo.

20 Se puede seguir la evolución de la concentración en antibiótico del medio, en el curso del cultivo, utilizando como germen-prueba el "Bacillus subtilis", que combate eficazmente, como se verá, el antibiótico perseguido. Los métodos de titración utilizados en el curso del cultivo pueden ser variados, pudiéndose efectuar esa titración por la técnica conocida de los discos sobre placas de gelosa y la de las diluciones en agua peptonada glucosificada.

25 La sensibilidad del Bacillus subtilis se halla en las proximidades de 1 mg. La extracción y la purificación del antibiótico a partir del caldo de cultivo obtenido se hace de la siguiente manera:

30 Se procede en primer lugar a la separación del micelio por ejemplo con filtros giratorios para obtener el jugo de



249489

cultivo propiamente dicho en el que se encuentra la totalidad del antibiótico.

5 Se procede seguidamente a la clarificación del jugo separado, por ejemplo por filtración en un filtro Seitz. Este filtrado puede efectuarse eventualmente después de la precipitación previa de las proteínas por medio de Ca(OH)_2 al 5% aproximadamente o de Ba(OH)_2 , igualmente al 5%. De forma general, esta precipitación puede realizarse alcalinizando el jugo hasta la obtención de un pH del orden del 8,5.

10 Eventualmente, aunque no necesariamente, se puede tratar el jugo después de la clarificación con una permutita, por ejemplo la "permutita 50" u otra resina similar a fin de eliminar las impurezas absorbibles por esta resina, sin ser absorbido el antibiótico.

15 El jugo de cultivo así clarificado es ligeramente acidulado para llevar el valor de su pH a 7 aproximadamente. Se procede entonces a su adsorción, por ejemplo, con carbón vegetal, como el conocido por el nombre de Carbón Norit u otro, utilizando aproximadamente 12 a 15 g. de carbón por litro de jugo clarificado. Se puede agitar la mezcla de carbón y jugo para facilitar la adsorción, que dura aproximadamente 20 minutos. Se recoge seguidamente el carbón en un filtro o mediante centrifugación y se procede a su lavado, por ejemplo con agua destilada.

25 La elución del antibiótico a partir del carbón así separado y lavado puede hacerse por medio de una solución de acetona acuosa que contenga aproximadamente una proporción en volumen del 80% de acetona para un 20% de agua. De hecho, la proporción de agua puede estar comprendida, sin inconveniente, entre un 8 y un 25% aproximadamente. Se pone en suspen-

30



20 MAY 1953

249489

5

si6n el carb6n en esta acetona acuosa en la proporci6n, por ejemplo, de 1 kg. de carb6n h6medo por 35 litros aproximadamente de acetona acuosa; se agita el conjunto durante 20 minutos aproximadamente y luego se recoge en un filtro. Esta operaci6n puede repetirse varias veces seguidas, por ejemplo tres.

10

Seguidamente se procede, mediante cualquier procedimiento conocido, a la concentraci6n del licor de acetona acuosa obtenido hasta la reducci6n de 6 a 10 veces aproximadamente respecto al volumen inicial.

15

El filtrado de este licor reducido puede hacerse seguidamente en filtros Seitz clarificantes y esterilizantes, lo que elimina, adem6s de los g6rmenes, las sustancias pir6genas.

20

Las operaciones siguientes que conducen a la obtenci6n del antibi6tico en su forma definitiva, en cuya forma es utilizado, se hacen en medio rigurosamente est6ril, siendo sometido eventualmente el propio licor reducido anteriormente obtenido a una operaci6n de esterilizaci6n previa.

25

La evaporaci6n total de este licor esterilizado permite obtener el antibi6tico en forma cristalizada. Esta evaporaci6n puede hacerse en caliente, preferentemente con temperatura que no rebase los 45 a 50°C. aproximadamente o por liofilizaci6n. En el caso en que la evaporaci6n se haga en caliente, se puede desecar en seguida el antibi6tico obtenido sobre $CaCl_2$.

30

Se procede seguidamente a las operaciones habituales de acondicionamiento, envasado, embalaje, etc., para la utilizaci6n comercial del antibi6tico.

Este antibi6tico se presenta en forma de cristales pla-

249489



nos o con aristas, ligeramente amarillentos, muy higroscópicos y muy solubles en agua. Es poco soluble en alcohol de 90°, el metanol y la acetona. Es insoluble en todos los demás disolventes orgánicos.

5 Posee una fluorescencia verde a la luz ultravioleta, pero sin espectro de absorción en ésta. Su poder rotatorio, medido en el sacarímetro, es de $+54^{\circ}133$. Su punto de fusión es de $+156^{\circ}\text{C}$.

10 Además, reduce el licor de Fehling, da una reacción de Molish y, con nitrato de plata amoniacal positivo, da una ozazona cuyos cristales son microscópicos y funden a 203°C .

 Este antibiótico es muy lábil. Su actividad queda destruida por una permanencia de media hora a 90°C . Los pH ácidos favorecen su inactivación.

15 Este antibiótico es notable especialmente en el sentido de hallarse desprovisto de toda toxicidad y permite en terapéutica la utilización de dosis importantes. Su acción sobre el Bacillus subtilis (actividad del orden de 500 γ) le hace particularmente eficaz, entre otras enfermedades, contra la

20 tuberculosis.

 Naturalmente, la invención no queda solamente limitada a los modos de realización descritos, que sólo se han ofrecido a título de ejemplos.

NOTA

25 En resumen: La Patente de Invención que se solicita, recaerá sobre las reivindicaciones que siguen:

 1) Procedimiento de fabricación de un antibiótico, caracterizado por consistir en la siembra de un medio de cultivo a base de suero lechoso con esporas de un hongo perteneciente al grupo de los "aspergilli flavus-crysal", en la agita-

30

249489



5 ción del medio sembrado en un recipiente del tipo Erlenmeyer o análogo hasta que el medio de cultivo tenga un titre suficiente del antibiótico citado, en la separación seguida, mediante filtración, del micelio, en la adsorción del antibiótico contenido en el citado jugo por carbón o material análogo, en la separación inmediata del carbón por filtración o centrifugación y subsiguiente lavado con agua destilada, en la elución del antibiótico a partir del citado carbón mediante acetona acuosa, en la separación, mediante filtrado por ejemplo, del carbón del licor de acetona acuosa que contiene el antibiótico, en la ulterior concentración y filtrado de dicho licor y, finalmente, en la eventual evaporación de éste, ya sea en caliente, ya sea por liofilización, para recoger el antibiótico en forma cristalizada.

10
15 2) Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por utilizarse como medio de cultivo solamente suero lechoso o una mezcla de suero lechoso y de leche en polvo.

20 3) Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por efectuarse el cultivo en fermentador.

25 4) Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por efectuarse el cultivo en recipiente del tipo Erlenmeyer, que se somete a una agitación, preferentemente continua, al ritmo de 40 movimientos aproximadamente por minuto.

30 5) Procedimiento, según la reivindicación 4, caracterizado por proseguirse el cultivo durante unas 48 horas o por lo menos hasta la obtención de una concentración del orden de 1,5 a 3 g. aproximadamente por litro.

6) Procedimiento según una de las reivindicaciones pre-



cedentes, caracterizado por utilizarse como germen-prueba el Bacillus subtilis.

5

7) Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por utilizarse como método de titración del medio de cultivo la técnica de los discos sobre placas de gelosa o la de las diluciones en agua peptonada glucosificada.

10

8) Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por efectuarse la separación del micelio a partir del medio de cultivo por filtración en filtro rotativo.

15

9) Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por efectuarse la clarificación del jugo en filtro Seitz.

10) Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por alcalinizarse el jugo citado hasta un pH aproximado de 8,5 antes de su clarificación, a fin de hacer precipitar las proteínas que contiene.

20

11) Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por alcalinizarse el jugo citado por un hidróxido alcalino, por ejemplo $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ó $\text{Ba}(\text{OH})_2$ aproximadamente al 5%.

25

12) Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque después de la clarificación se trata el jugo con una permutita, por ejemplo la permutita 50, a fin de eliminar las impurezas absorbibles por esta resina.

30

13) Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por utilizarse para la adsorción del antibiótico, que se encuentra en el jugo clarificado carbón vegetal Norit, a razón, por ejemplo, de 12 a 15 g. aproximada-

249489



20 MAY 1953

mente de carbón por litro de jugo.

5

14) Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la elución del antibiótico adsorbido por el citado carbón se hace por medio de acetona con un 80% aproximadamente de acetona.

10

15) Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la elución del antibiótico se hace utilizando 35 litros aproximadamente de acetona acuosa para 1 kg. de carbón húmedo, agitando la mezcla durante 20 minutos aproximadamente y renovando eventualmente la operación varias veces.

15

16) Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por efectuarse la concentración del licor de acetona acuosa hasta la reducción del volumen inicial de 6 a 10 veces aproximadamente.

20

17) Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por filtrarse el licor de acetona acuosa reducido en filtro Seitz clarificante y esterilizante.

25

18) Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la evaporación del licor de acetona acuosa para la obtención del antibiótico cristalizado se hace a una temperatura que no sobrepasa los 45 a 50°C. aproximadamente.

30

19) Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque, en el caso en que la evaporación del licor de acetona acuosa se hace en caliente, se deseca seguidamente el antibiótico, por ejemplo mediante Cl_2Ca .

20) Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por utilizarse para la reproducción

249489



de la cepa un medio de Czapeck.

21) Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por conservarse la cepa bajo aceite de vaselina o mediante liofilización de las esporas.

5

22) Se reivindica, por último, como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "PROCEDIMIENTO DE FABRICACION DE UN ANTIBIOTICO".

Todo conforme queda descrito en la presente memoria, que consta de diez páginas escritas a máquina.

10

Madrid, 20 de mayo de 1959

ALFONSO UNGRIA

PR.