

053487



MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña

a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION por VEINTE AÑOS en ESPAÑA a FAVOR

de

BRISTOL LABORATORIES INC., residente en Thompson Road, EAST
SYRACUSE, New York, ESTADOS UNIDOS,

por

"PROCESO PERFECCIONADO PARA LA RECUPERACION DE MITOMICINA
DE UN CALDO COMPLETO QUE CONTIENE MITOMICINA".

Inventores: Don Alexander Gourevitch

Don Bernard Chertow

Don Joseph Lein, de nacionalidades norteameri-
cana.

Prioridad: Solicitud Patente Norteamericana Ser.779520 del

11 de Diciembre de 1958.

-o-o-o-o-o-o-o-o-o-o-

253487



Esta invención se relaciona con un procedimiento en el método de recuperar el antibiótico mitomicina y particularmente con un método de mejoramiento de la producción de dicho antibiótico.

5.- La mitomicina es un conocido antibiótico cuyas propiedades físicas, químicas y biológicas, así como su preparación y diversos usos conocidos, se describen en la literatura correspondiente.

10.- La mitomicina se prepara comercialmente cultivando un organismo productor de la misma, v.gr., el Streptomyces caespitosus, en un medio adecuado y durante un período de tiempo que ordinariamente oscila entre unos pocos y varios días. Cuando se ha completado un ciclo de fermentación, la práctica corriente consiste en separar los sólidos del licor sobrenadante que contiene prácticamente toda la actividad antibiótica. El tiempo requerido para la fase de separación por centrifugación, filtración u otro medio, puede variar entre varios minutos y varias horas, dependiendo de una serie de factores, por ejemplo el tiempo requerido para la separación física, así como el tiempo empleado en esperar en que el equipo se halle dispuesto para su uso. Hasta ahora ha existido un serio problema debido al hecho de que la totalidad del caldo de mitomicina disminuye rápidamente de potencia durante el tiempo que transcurre entre el final de la fermentación y la retirada del micelio (sólidos). Por ejemplo, se ha observado que se pierde prácticamente toda la actividad de la mitomicina en un caldo al cabo de seis horas a la temperatura ambiente y a las veinticuatro horas a 10°C. Sin embargo, un licor sobrenadante clarificado, obtenido por centrifugación del mismo caldo completo, no muestra ninguna pérdida de actividad bajo las mismas condiciones.

25.- Se ha descubierto que el micelio producido por el desarrollo de los organismos productores de mitomicina durante el ciclo de fermentación contiene una sustancia que inactiva o destruye a la mitomicina. Esta sustancia, que no se ha aislado ni caracterizado, ha recibido la denominación de "mitasa", término que será utilizado a

30.-

253487



lo largo de la presente descripción y reivindicaciones para referirse al agente destructor del antibiótico.

5.-

Como por las razones antes mencionadas no es posible separar el micelio del licor sobrenadante inmediatamente después de la terminación del ciclo de fermentación, el objeto de la presente invención es proporcionar un método de inhibición de los efectos perjudiciales de la mitasa. Hemos descubierto que este efecto puede reducirse o eliminarse añadiendo un inhibidor de la mitasa tal como clo

10.-

roformo, cloruro mercuríco, tolueno y sulfatos alcalino-metálicos de alquilo a la totalidad del caldo de fermentación. La adición se realiza al final del ciclo de fermentación, es decir, poco antes o al cesar la aireación del caldo de fermentación. Se ha comprobado que

15.-

estos materiales son unos eficaces inhibidores de la mitasa a través de experimentos, que se describirán ampliamente más adelante, debiéndose entender que mediante análoga experimentación pueden identificarse también otros eficaces inhibidores de la mitasa.

20.-

Entre los específicos inhibidores de la mitasa descritos en la presente solicitud, nosotros preferimos usar sulfato alquilo sódico o potásico o mezclas de los mismos, en las que el grupo alquilo tenga de 8 a 18 átomos de carbono. El preferido inhibidor de la mitasa de este grupo es el sulfato lauril sódico.

25.-

En el proceso de la presente invención el inhibidor de la mitasa se añade a la totalidad del caldo hacia el final del ciclo de fermentación, por ejemplo poco antes o en el momento de cesar la aireación del caldo. La cantidad del preferido inhibidor de la mitasa es de ordinario del 0,1 al 0,5% aproximadamente por peso del caldo. Cantidades superiores al 0'5 % aproximadamente por peso del caldo.

30.-

Cantidades superiores al 0'5% por peso son poco o nada más eficaces que las cantidades inferiores. El efecto del inhibidor de la mitasa puede incrementarse enfriando todo el caldo inmediatamente después del ciclo de fermentación y manteniendo el caldo en el pH final o pró

253487



U.S.A.

ximo a él.

Los siguientes experimentos ilustran la eficaz destrucción de la mitomicina en un caldo completo sin tratar. Por comparación, la siguiente tabla incluye datos para el licor sobrenadante clarificado, cuyos datos prueban que la influencia destructiva está en el micelio o sólidos de la totalidad del caldo.

5.-

Muestra	Tratamiento	Potencia (mcg./ml.)	
		0 Horas	24 Horas
I	Control del caldo completo, centrifugado en el momento del ensayo.	17'6	11'5
10.- II	Sobrenadante y mitomicina sólida.	37'8	52'2
III	Micelios suspendidos y lavados, más mitomicina sólida.	24'3	0'0
IV	Control del caldo completo, centrifugado en el momento del ensayo.	22'6	12'6
15.- V	Sobrenadante más mitomicina sólida.	50'8	51'3
VI	Micelios suspendidos y lavados más mitomicina sólida..	28'8	15'3

15.-

20.-

La muestra I era un caldo completo recogido al séptimo día de fermentación; la muestra II era una porción del mismo caldo que había sido centrifugado para obtener el sobrenadante claro, al que se añadió una pequeña cantidad de mitomicina sólida; la muestra III se preparó con parte del mismo caldo que había sido centrifugado para obtener los sólidos (el micelio fué lavado con solución salina acuosa), cuyos sólidos fueron luego nuevamente suspendidos en una solución amortiguadora de fosfato 0'1 gramomolecular con un pH 7, añadiéndose una pequeña cantidad de mitomicina sólida. Las muestras IV, V y VI se prepararon en la misma forma que las muestras I, II y III, con la excepción de emplearse otro caldo, que se recogió en el octavo día de fermentación.

25.-

30.-

Se efectuó otro experimento para demostrar que la sustancia que inactiva la mitomicina está contenida en el micelio o sólidos;

253487



los resultados experimentales indican también que la sustancia se destruye por cocción.

	Tiempo en baño de agua a 37°. Horas	Potencia en mcg./ml.	
		Suspensión de micelios hervidos con mitomicina	Suspensión de micelios sin hervir con mitom.
5.-	0.0	4.95	5.4
	0.25	5.7	3.7
	0.50	5.1	1.2
	1.0	5.4	0.5
	2.0	6.0	0.
10.-	3.0	6.6	0.
	4.0	4.65	0.
	5.0	4.95	0.

15.- Esta tabla indica que la mitomicina es totalmente inactivada después de una hora a 37°C, en tanto que el experimento anterior indicaba que la mitomicina no es siempre completamente inactivada en un período de veinticuatro horas a la temperatura ambiente.

20.- A lo largo de la presente descripción la potencia de los caldos que contienen mitomicina se mide en microgramos de mitomicina por mililitro de caldo, determinado por el método del ensayo de la placa de difusión, utilizando Klebsiella pneumoniae como organismo de ensayo.

Ejemplo I

25.- Se obtuvieron varias muestras idénticas de caldos completos conteniendo mitomicina; la muestra I, que representaba toda la potencia del caldo, fué centrifugada, ensayándose inmediatamente el sobrenadante para determinar la actividad de la mitomicina, determinándose así la actividad inicial de aquélla. Luego se determinó la potencia residual del caldo después de la destrucción de parte de la mitomicina por la mitasa del micelio, en la muestra II del caldo completo; esta muestra fué calentada durante una hora a 37°C, centrifugándose luego y ensayándose el sobrenadante. El efecto del cloruro mercúrico sobre la

30.-

253487



5.- mitasa fué determinado por la adición de un 0,025 % por peso de cloruro mercúrico a la muestra III del caldo completo. Después de la adición del reactivo se calentó la muestra durante una hora a 37°C extractándose luego con butanol para eliminar la actividad de la mitomicina. El extracto fué luego desposeído del disolvente orgánico, reconstituido con agua y ensayado. Se observó que el efecto destructivo de la mitasa sobre la mitomicina había sido inhibido por el cloruro mercúrico y se había retenido toda la potencia de la mitomicina del caldo, a pesar del suave calentamiento en presencia del micelio.

10.- En la Tabla I se muestran los resultados del ensayo.

TABLA I

<u>Muestra</u>	<u>Tratamiento</u>	<u>Potencia(mcg./ml.)</u>
I	Caldo completo, menos micelios, ensayado inmediatamente.	35,0
II	Caldo completo mantenido a 37°C durante una hora y ensayado luego.	1,5
15.- III	Caldo completo más 0,025% por peso de Cl ₂ Hg mantenido a 37°C, extractada seguidamente la mitomicina y ensayada.	35,0

EJEMPLO II

20.- Se midió la efectividad de varios inhibidores de mitasa en un experimento en el que se trataron varias muestras idénticas de caldo completo conteniendo mitomicina, separando los sólidos y ensayando inmediatamente el sobrenadante. Luego se determinó la potencia residual del caldo después de la destrucción de parte de la mitomicina por la mitasa, en otra muestra (identificada por muestra V) del caldo completo, que fué calentada durante una hora a 37°C, luego se centrifugó y finalmente se ensayó el sobrenadante. Las muestras restantes fueron tratadas exactamente como la V, con la excepción de que se añadieron varios inhibidores de mitasa al caldo antes de calentar en las cantidades especificadas en la Tabla II. Los resultados del ensayo

25.-

30.- se indican en la Tabla II.

253487

- 7 -



TABLA II

<u>Muestra N°</u>	<u>Tratamiento</u>	<u>Potencia (mcg./ml).</u>
IV	Caldo completo menos micelios, ensayado inmediatamente.	35,0
5.- V	Caldo completo mantenido a 37°C durante una hora, y ensayado luego.	2,8
VI	Caldo completo más 0,1% de fenol, mantenido a 37°C durante una hora y luego ensayado.	12,5
VII	Caldo completo más 1% de cloroformo mantenido a 37°C durante una hora, y luego ensayado.	35,0
10.- VIII	Caldo completo más 1% de cloroformo mantenido a 37°C durante una hora y luego ensayado.	27,0

EJEMPLO III

Se demostró la efectividad de cantidades variables de sulfato lauril sódico en la inhibición de la mitasa en caldos de fermentación completos, ensayando la potencia de varias muestras de caldos conteniendo mitomicina, obtenidos de la siguiente manera: las muestras IX y X eran porciones del caldo completo tomadas en el momento de la recogida. La muestra XI era caldo completo idéntico al de la muestra X, pero añadiéndosele un 0,1% de sulfato lauril sódico (por peso del caldo). Las muestras XII y XIII contenían 0,01 y 0,001% respectivamente de sulfato lauril sódico en caldo completo, pero eran por lo demás idénticas a la muestra X. Las muestras X a XIII fueron incubadas a 37°C durante una hora. Todas las muestras fueron sometidas a ensayo diferencial usando Klebsiella pneumoniae y Bacillus subtilis como organismos de ensayo, determinándose así el contenido de mitomicina A y mitomicina C. Los resultados se hallan resumidos en la siguiente Tabla:

253487



TABLA III

<u>Muestra</u>	<u>Descripción</u>	<u>Potencia (mcg./ml.)</u>		
		<u>Mitomi- cina A</u>	<u>Mitomi- cina C</u>	<u>A ± C</u>
5.- IX	Caldo completo, menos micelios, refrigerado hasta el ensayo.	5	39	44
X	Control de caldo completo.	0,8	5,7	6,5
XI	Caldo completo con 0,1% de SLS.	3	41	44
XII	Caldo completo con 0,01% de SLS.	4	11	15
XIII	Caldo completo con 0,001% de SLS.	5	10	15

10.- Por los resultados indicados en la Tabla III es evidente que, aunque se consigue alguna estabilización con un porcentaje inferior, es conveniente añadir aproximadamente un 0,1% de sulfato lauril sódico a fin de conservar la porción principal de la potencia del caldo.

REIVINDICACIONES

15.- En resumen: La Patente de Invención que se solicita recaerá sobre las reivindicaciones siguientes:

20.- 1ª.- Proceso perfeccionado para la recuperación de mitomicina de un caldo completo que contiene mitomicina, caracterizado por la fase de añadir un inhibidor de mitasa al caldo completo al completarse el ciclo de fermentación, con lo que queda sustancialmente eliminado el efecto destructor de la mitasa sobre la mitomicina.

25.- 2ª.- Proceso perfeccionado para la recuperación de mitomicina según la reivindicación 1ª, caracterizado por la fase de añadir al caldo completo por lo menos un 0,001% aproximadamente, por peso, del caldo completo, de un sulfato metálico alcalino de alquilo, en el que el radical alquilo tenga de 8 a 18 átomos de carbono.

30.- 3ª.- Proceso perfeccionado para la recuperación de mitomicina de un caldo completo que contiene mitomicina, según la reivindicación 2ª, caracterizado por la fase de añadir aproximadamente un 0,1% por

253487



peso del caldo completo, de sulfato lauril sódico al caldo completo al completarse el ciclo de fermentación, con lo que queda sustancialmente eliminada la destrucción de la mitomicina por la mitasa.

5.-

4ª.- Proceso perfeccionado para la recuperación de mitomicina de un caldo completo que la contenga, de acuerdo con la reivindicación 1ª, caracterizado por la fase de añadir por lo menos un 1% aproximadamente, por peso, del caldo completo, de cloroformo a dicho caldo al completarse el ciclo de fermentación, con lo que queda sustancialmente eliminado el efecto destructor de la mitasa sobre la mitomicina.

10.-

5ª.- Proceso perfeccionado para la recuperación de mitomicina de un caldo completo que la contenga, de acuerdo con la reivindicación 1ª, caracterizado por la fase de añadir por lo menos un 1% - aproximadamente, por peso, del caldo completo, de tolueno a dicho caldo al completarse el ciclo de fermentación, con lo que queda sustancialmente eliminado el efecto destructor de la mitasa sobre la mitomicina.

15.-

6ª.- Proceso perfeccionado para la recuperación de mitomicina de un caldo completo que la contenga, de acuerdo con la reivindicación 1ª, caracterizado por la fase de añadir por lo menos un 0,025 por ciento aproximadamente, por peso del caldo completo, de cloruro mercúrico a dicho caldo al finalizar el ciclo de fermentación, con lo que queda sustancialmente eliminado el efecto destructor de la mitasa sobre la mitomicina.

20.-

7ª.- Proceso perfeccionado para la recuperación de mitomicina C de un caldo completo que la contenga, de acuerdo con la reivindicación 1ª, caracterizado por la fase de añadir aproximadamente un 0,1% por peso del caldo completo, de sulfato lauril sódico a dicho caldo al completarse el ciclo de fermentación, con lo que queda sustancialmente eliminada la destrucción de la mitomicina C por la mi-

25.-

30.-

253487



tasa.

5.- 8ª.- Proceso perfeccionado para la recuperación de mitomicina C de un caldo completo que la contenga, de acuerdo con la reivindicación 1ª, caracterizado por la fase de añadir un inhibidor de la mi tasa al caldo completo al terminarse el ciclo de fermentación, con lo que queda sustancialmente eliminado el efecto destructor de la mi tasa sobre la mitomicina C.

10.- 9ª.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "PROCESO PERFECCIONADO PARA LA RECUPERACION DE MITOMICINA DE UN CALDO COMPLETO QUE CONTIENE MITOMICINA".

Todo conforme se reivindica en la presente memoria que consta de diez páginas mecanografiadas.

Madrid, 16 Noviembre 1959

ALFONSO UNGRIA