

275328

P - 22.450

ES/A 196



275328

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

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

formulada el 9 de Marzo de 1962, con el Núm. 275.328

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED, entidad británica, establecida en 183-193, Euston Road, Londres, Inglaterra, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACION DE UNA POLIMIXINA"

Este invento se refiere a antibióticos, particularmente a polimixinas, y a su purificación.

Las polimixinas constituyen una familia de antibióticos polipéptidos que tienen actividad anti-bacterial y son muy eficaces contra las bacterias Gram-negativas. Pueden obtenerse a partir de los productos de fermentación de varios medios especiales mediante cepas de Bacillus polymyxa. Se conocen las polimixinas A, B, C, D, y E, de las cuales las polimixinas B y E se prefieren para uso medicinal a causa de su

5

275328



baja toxicidad. En esta Memoria descriptiva, el antibiótico descrito como colistina o colimicina, del que se dice que es producido por Bacillus colistinus, se considera para todos los fines como una polimixina; se cree que es una forma de polimixina E.

Los polipéptidos de polimixina son sustancias básicas y se aíslan y usan convenientemente en forma de sales de adición con ácidos. Sus derivados N- metanosulfonato, formados por tratamiento con formaldehído y un bisulfito, pueden también usarse, y tienen la ventaja de una toxicidad local reducida por inyección, particularmente por vía intramuscular.

Una polimixina bruta obtenida a partir del medio de fermentación, generalmente de color inadecuado debido a la materia orgánica del medio, se ha purificado hasta ahora por un cierto número de operaciones de precipitación o cristalización con ácidos orgánicos. Estas operaciones son inconvenientes y pueden ir acompañadas de una pérdida considerable de material activo. Se ha encontrado que puede disminuirse el número de tales operaciones de purificación introduciendo en la operación de purificación el tratamiento de la polimixina impura en solución acuosa con un permanganato, preferiblemente dentro de los límites de pH entre, aproximadamente, 3,0 y, aproximadamente, 7,5. Esta nueva operación es especialmente efectiva en el mejoramiento del aspecto de una polimixina coloreada. La polimixina se usa preferiblemente en solución concentrada, convenientemente de alrededor de 10% (peso/volumen). El permanganato, convenientemente permanganato potásico o permanganato sódico, puede usarse en solución neutra, pero preferiblemente se usa en presencia de un ácido mineral tal como ácido sulfúrico. Es con-

275328



veniente evitar el empleo de una cantidad excesiva de ácido con respecto a la que se necesita por la ecuación:



- 5 ta hidrógeno oxidable en las impurezas de la polimixina, de manera que, al completar la oxidación, la solución de polimixina no está lejos de su pH inicial. La solución de permanganato se agrega preferiblemente de modo gradual sobre la solución de polimixina, y la presencia de un ligero exceso se aprecia evidentemente por un color rosa persistente.
- 10 Cualquier exceso de permanganato puede destruirse por los procedimientos conocidos, preferiblemente por adición de peróxido de hidrógeno. En todas las operaciones, es conveniente evitar que la solución de polimixina llegue a hacerse sustancialmente alcalina, y que en ningún caso sea mayor
- 15 de pH 8,0.

La polimixina se obtiene de esta operación de purificación en forma de una solución acuosa que contiene cationes manganeso y los cationes del permanganato usado, y puede contener también otros cationes inorgánicos presentes en

20 la polimixina impura usada como material de partida. La polimixina puede separarse de estos cationes del modo conocido, por ejemplo por precipitación. Convenientemente, la separación se realiza haciendo pasar la solución a través de un material de cambio catiónico que posea grupos fuertemen-

25 te ácidos presentes en la forma ácido libre y que presente un grado sustancial de enlaces cruzados en la totalidad del material. Un material conveniente es una resina de polistireno sulfonado con una proporción relativamente elevada (tal como aproximadamente 20%) de divinilbenceno. Un material de

30 este tipo absorbe los cationes de pequeño peso molecular,



275328

pero no absorbe la polimixina, si el grado de enlace cruzado es suficientemente alto. La polimixina, libre de cationes manganeso y otros, de peso molecular bajo, se obtiene, pues, en solución ácida del efluente. Partiendo de esta solución,
5 puede prepararse la base libre o una sal o derivado conveniente.

Por su utilidad medicinal, el nuevo procedimiento es especialmente importante para la purificación de las polimixinas B y E. El producto obtenido directamente puede convertirse, si es necesario después de nueva purificación, en
10 una forma terapéuticamente aceptable, tal como sulfato de polimixina B o N-metanosulfonato sódico de polimixina B, o sulfato de polimixina E o N-metanosulfonato sódico de polimixina E.

15 Por consiguiente, en un aspecto este invento proporciona un procedimiento para incrementar la pureza de una polimixina impura que comprende la operación de tratar la polimixina en solución acuosa bajo condiciones ácidas o aproximadamente neutras, con un permanganato. Preferiblemente,
20 te, la polimixina se separa después de los cationes manganeso.

Este invento proporciona un procedimiento particularmente para aumentar la pureza de una polimixina impura que comprende las operaciones sucesivas de tratar la polimixina
25 en solución acuosa bajo condiciones ácidas o aproximadamente neutras, con un permanganato, y hacer pasar la solución de polimixina, así obtenida a través de un material de cambio catiónico que posea grupos fuertemente ácidos en la forma de ácido libre y que muestre un grado sustancial de enlace
30 cruzado en la totalidad del material, con lo que son absor-

275328



bidos por el material los cationes de bajo peso molecular, incluyendo cationes manganeso, y la polimixina permanece sustancialmente no absorbida.

5 En otro aspecto, este invento proporciona una polimixina, ya sea en forma de base libre, ya como sal de adición con un ácido o ya como un derivado N-metanosulfonato, cuya molécula polipéptida ha experimentado purificación en alguna operación por tratamiento con un permanganato según se ha descrito en cualquiera de los dos párrafos precedentes.

10 Los siguientes ejemplos ilustran el invento:

EJEMPLO 1

15 Se disolvieron 0,5 gr. de hidrocloruro de polimixina B bruto en 10 ml. de agua para dar una solución pardo intenso. Se añadió gota a gota solución de permanganato potásico neutra acuosa al 1%(peso/volumen) hasta que persistía durante un minuto el color rosa. Después se decoloró la solución con dióxido de azufre hasta obtener color paja, y se eliminó el óxido de manganeso precipitado.

20 Se trataron 0,5 gr. de sulfato de polimixina B bruto, obtenido de modo análogo, con permanganato potásico de la manera descrita arriba. No hubo pérdida de actividad biológica.

25 Se trataron 1,6 gr. de sulfato de polimixina A bruta con permanganato potásico. El producto se purificó por precipitación con una mezcla de sales sódicas de alcoholes grasos sulfatados y luego se convirtió en sulfato. La actividad biológica se conservó por completo.

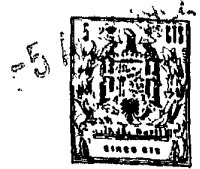


275328

EJEMPLO 2

Se extrajo con 10 litros de agua 1,0 kg. de sulfato de polimixina B bruto que contenía aproximadamente 60% de material inorgánico, obtenido del caldo de fermentación, y se separó por filtración el material insoluble. La solución clara se trató gradualmente con una solución que contenía 25 gr. de permanganato potásico por litro y 0,475 N con respecto al ácido sulfúrico. Se continuó el tratamiento hasta que persistía durante cinco minutos por reposo un color rosa; se necesitó aproximadamente un litro de solución de permanganato acidificada. Se añadió solución de peróxido de hidrógeno al 30% (peso/volumen) hasta que desapareció el color; se necesitaron unos 20 ml. La mezcla se dejó en reposo durante 30 minutos. En esta fase puede ser conveniente la filtración; de este modo se elimina algo de oxígeno disuelto, así como material insoluble.

La polimixina B se extrajo por el siguiente procedimiento. La mezcla de reacción se dejó fluir por gravedad a una velocidad de 50 ml/min. a través de un tubo de vidrio vertical de 10 cm. de diámetro y 46 cm. de alto que contenía 4,5 kg. de una resina de cambio catiónico de polistireno sulfonado que se vende por la Permutit Company Limited con el nombre de "Zeocarb 225". El efluente ácido se llevó a pH 7 por la adición lenta de amoníaco al 34,5% o pasando a través de una resina de cambio aniónico. La solución neutra se concentró en un destilador cíclico a un volumen de 5 litros. Se precipitó base Polimixina B añadiendo 2,5 litros de amoníaco al 34,5% y dejando en reposo durante 4 horas. El producto se recogió, se lavó con agua hasta liberarle de amoníaco, y se secó en vacío a una temperatura baja para dar 150 gr.



275328

de base polimixina B, adecuada para posterior purificación por cristalización fraccionada en forma de naftaleno-2-sulfonato.

5 El sulfato de polimixina E bruto puede tratarse de modo análogo.

Esta solicitud, que corresponde a la presentada en Gran Bretaña el 10 de Marzo de 1961, bajo el Núm. 8957/61, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

10

N O T A

15 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:

1º. - Un procedimiento para la purificación de una polimixina que comprende tratar una solución acuosa de la polimixina con un permanganato.

20 2º. - Un procedimiento para la purificación de una polimixina que comprende tratar una solución acuosa de la polimixina con un permanganato dentro del margen de pH de desde aproximadamente pH 3,0 hasta aproximadamente pH 7,5.

25 3º. - Un procedimiento para la purificación de una polimixina que comprende tratar una solución acuosa de la polimixina con un permanganato dentro del margen de pH de desde aproximadamente 3,0 hasta aproximadamente 7,5 y hacer pasar la solución de la polimixina así obtenida a través de un material permutador de catión que posee grupos fuertemente
30 te ácidos en la forma de ácido libre para obtener la poli-

275328-5



mixina en solución ácida en el efluente.

42. - Un procedimiento para la purificación de una polimixina.

5 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

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

Madrid,

13. 1962
P. A.
Alberto de Ezaburu
Por Poder.

DG/10