

296533



296533

MEMORIA DESCRIPTIVA

DE

PATENTE DE INVENCION

EN

ESPAÑA

por veinte años

a favor de Société Anonyme BIOFARMA

con domicilio en NEUILLY-SUR-SEINE (Seine) Francia, 4, Rue De-

leau.
de nacionalidad Francesa

por PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE LA FUSAFUNGINA.

de la que es inventor, Sr. Jacques SERVIER.

Reivindic ndose la prioridad de la Patente deposi-
tada en Gran Bretaña el 25 de Febrero de 1.963 bo-
jo el n  7516/63.

296533

El presente invento se refiere a un procedimiento de preparación de la Fusafungina, caracterizado por perfeccionamiento de las técnicas de fermentación, de extracción y de purificación de este producto.

La Fusafungina se ha descrito en la Patente de Invención francesa nº 1.164.181, y sus aplicaciones terapéuticas como antibiótico antiinflamatorio en la patente especial de medicamento francesa nº 1084 M.

El empleo de este producto - aparte de las demás vías de aplicación posibles - es particularmente interesante en aplicaciones locales, en las afecciones de las vías respiratorias, de la piel y de las mucosas, como por ejemplo, rinitis, rinofaringitis, sinusitis, bronquitis, llagas, úlceras infectadas, etc. bajo forma de soluciones nasales, aerosoles, pomadas, etc.

El producto obtenido y purificado según el procedimiento objeto del invento posee un espectro de acción particularmente amplio y es activo en concentración débil contra la mayor parte de los microorganismos patógenos, teniendo al mismo tiempo una acción antiinflamatoria superior a la del ácido acetil salicílico.

El invento se refiere a un procedimiento de cultivo en condiciones de aireación sumergida y de agitación en medios consistentes en agua estéril conteniendo una fuente de nitrógeno, una fuente de carbono, una fuente de sustancia de crecimiento, sales minerales y uno o varios agentes tamponadores.

La fuente de nitrógeno puede asegurarse por una



296533

o varias de las siguientes sustancias incorporadas al medio: extracto de levadura, aminoácido, peptona, harina de garbanzos, harina de pescado, harina de soya, extractos solubles de maiz, extractos solubles de trigo, extractos de carne, urea, nitrato de amonio.

Estos ingredientes, fáciles de obtener en el comercio en forma bruta, presentan la ventaja de llevar además factores de crecimiento, así como cantidades importantes de minerales nutritivos.

La aportación de carbono puede asegurarse por medio de hidratos de carbono en forma purificada y bajo forma de concentrado: sacarosa, melaza, almidón soluble, glucosa, glucosa masé, gerezosa, maltosa, galactosa, fructosa, lactosa.

La cantidad adecuada de estas fuentes de carbono para dar la mejor producción de fusafungina varía del 3 al 7% del peso del medio de fermentación.

Las sales minerales se eligen de manera que se introduzcan en el medio dos o más de los iones siguientes: cloruro, fosfato, nitrato, sulfato, carbonato, citrato, tartrato, sodio, potasio, amonio, calcio, magnesio, zinc, hierro, cobre.

El pH del medio de fermentación puede variar en grandes límites entre 4,5 y 7, pero con preferencia de 5,5 a 6 al principio de la fermentación. Este pH se mantiene en los límites convenientes por adición de las sustancias tamponadoras tales como: soluciones de fosfatos, citratos o tartratos.

La temperatura de fermentación puede variar de

206533

25° a 33° C, pero es preferible operar a 29-30° C para obtener un contenido elevado de antibiótico en el micelio por la fermentación.

5 La duración de la fermentación puede reducirse de manera notable asegurando una aireación del cultivo del orden de 0,8 l/mm, de aire por litro de solución nutritiva y asegurando igualmente una agitación conveniente de la solución. Generalmente de buenos resultados una duración de 60 a 100 horas.

10 El desarrollo del cultivo se hace efectuando cada 5 horas una toma de aproximadamente 1 litro de caldo de fermentación y efectuando sobre esta toma una dosificación del antibiótico. Esta dosificación se efectúa por medio del método de cromatografía sobre papel. La fermentación se interrumpe cuando el porcentaje de fusafungina no aumenta ya de manera sensible.

15 Para mejor ilustrar este invento, damos a continuación, a título no restrictivo, varios ejemplos de su aplicación.

20 Ejemplo 1.

En un matraz de 5 lts. de doble tubuladura - prevista una de ellas para un enlace posterior a una fuente de aire estéril - se preparan 2 lts. de medio con la fórmula siguiente:

25	- Peptona	1%
	- Glucosa masé	3%
	- Nitrate de sodio	0,1%
	- Fosfato dipotásico	0,1%
	- Sulfato de magnesio	0,05%
30	- Cloruro de potasio	0,05%

296533



- Agua

q. s. p. 100

Se tapa cada abertura del matraz con algodón y se esteriliza el medio pasándolo por la autoclave durante 30 minutos a 120° C.- Se deja enfriar a 29-
5 30° C. y se efectúa una toma de poco volumen para los controles de esterilidad y de pH, siendo este último cercano a 5.

Se extraen las esporas de la cepa de un cultivo inclinado sobre medio de gelosa con agua destilada previamente esterilizada para obtener una suspensión
10 conteniendo unas 600.000 esporas por cm³.

Esta suspensión se utiliza para sembrar el medio citado.

Se hace incubar el contenido del matraz a 27° C.

15 La insuflación de aire estéril en el seno de líquido permite una agitación eficaz por braceo y una aportación constante de oxígeno.

Después de 55 horas de fermentación se transfiere el matraz, en condiciones asépticas, en un reactor
20 metálico de una capacidad de 100 lts., en el que se han preparado 60 lts. de medio estéril de la fórmula siguiente:

	- Peptonas	0,5%
	- Sacarosa	4%
25	- Nitrato de amonio	0,5%
	- Fosfato monopotásico	0,1%
	- Cloruro de potasio	0,05%
	- Sulfato de magnesio	0,05%
	- Sulfato férrico	0,002%
30	- Agua	q. s. p. 100

296533

Se hace incubar el cultivo a una temperatura de 28° C, en el reactor, durante 60 horas bajo agitación mecánica y aireación constante. Se utiliza el caldo obtenido para sembrar 600 lts. de medio estéril preparado en un fermentador metálico de 1.800 lts. con la siguiente composición:

	- Sacarosa	5%
	- Cerelesa	0,5%
	† Nitrato de amonio	1%
10	- Cloruro de sodio	0,3%
	- Sulfato de magnesio	0,25%
	- Cloruro de potasio	0,03%
	- Aceite de manteca	0,1%
	- Agua	q.s.p. 100%

15 Se hace incubar el cultivo durante 55 horas a 28° C en constante aireación forzada y agitación y se usa el caldo de cultivo para sembrar el medio de producción.

20 En un fermentador de 12 m³ dotado de agitador conveniente, de doble pared para la regulación de la temperatura, de un dispositivo apropiado para la dispersión del aire estéril, y, si es necesario, de un dispositivo de inyección automática de antiespumoso estéril, se preparan 6 m³ de medio nutriente, mezclando los siguientes ingredientes:

	- Sacarosa	5,5%
	- Cerelesa	0,5%
	- Nitrato de amonio	1%
	- Cloruro de sodio	0,3%
30	- Fosfato monopotásico	0,5%



296533

- Sulfato de magnesio 0,25%
- Agua q.s.p. 100%

Se esteriliza el medio calentándolo a 120° C durante 30 minutos y después se enfría a 30° C.

5 Se siembra y después se hace incubar durante unas 60 horas, manteniendo la temperatura a 30° C.

Durante todo el tiempo de la fermentación se mantiene una velocidad de 90 revoluciones por minuto y se introduce aire estéril por la parte inferior a razón de 4,8 m³ de aire por minuto, por medio del dispositivo de dispersión.

Se interrumpe la fermentación cuando el consumo de hidratos de carbono alcanza el 90%.

15 El contenido de fusafungina del mosto de fermentación es entonces una media de 0,5 a 0,8 g. por litro.

Se filtra el mosto fermentado por medio de filtro prensa y se lava el contenido de los bastidores con 2m³ de agua, después se seca parcialmente la torta por insuflación de aire comprimido. A continuación se seca el micelio en estufa ventilada durante 20 30 horas a 70° C después se seca y tritura.

Se obtienen 88 Kgs. de producto seco con un contenido de 5,71% de fusafungina.

25 Se extrae a continuación el producto bruto de la manera siguiente:

Se pone el polvo en suspensión en 836 lts. de metanol, después se añaden 44 lts. de tampón acético de pH 4,25 (0,05 M), se agita durante una hora a temperatura ambiente, después seorea para separar el 30

296533

polvo agotado de la solución metanólica. Esta solución se transfiere a un evaporador donde se reduce su volumen a 200 lts.

5 Se añaden 100 lts. de hexano, después se vierten bajo agitación 200 lts. de agua. Después de 15 minutos de agitación, se deja reposar durante 30 minutos y se elimina la base inferior.

10 El extracto hexánico se agota por tres veces con 25 lts. de una mezcla de metanol y agua (en volumen de 3 a 1). La mezcla metanólica se concentra enseguida bajo presión reducida a 12,5 lts. Después de la concentración se evapora el metanol, aunque el contenido de agua del residuo se incrementa regularmente y así precipita la fusarungina.

15 A continuación, se concentra la suspensión obtenida en un matraz equipado con agitador resante, después se asegura la agitación durante 48 horas al baño de hielo.

20 El antibiótico se aísla en el licor medio por filtración con "buchner".

Se lava la torta con 5 lts. de mezcla previamente enfriada a $+4^{\circ}$ C de alcohol metílico, en la proporción de 1 volumen para 2,5 de agua.

25 Después del secado en una estufa al vacío, se obtienen 2,805 Kgs. de producto bruto de color gris amarillo.

30 Se solubiliza el producto bruto en 140 lts. de alcohol metílico anhidro no desnaturalizado, se añaden después 100 g. de negro decolorante y un peso, igual al peso del negro, de un coadyuvante a la fil-

7 / FEB.



296533

tración.

Se agita durante 30 minutos.

5 Por filtración, se elimina el negro, el coadyuvante a la filtración y las impurezas insolubles. Se lava la torta con 14 lts. de alcohol metílico.

10 Se coloca el filtrado en un recipiente, después, bajo agitación, se vierten lentamente 280 lts. de agua destilada previamente calentada a 70° C. Se deja enfriar poco a poco hasta unos 35° C. manteniendo una agitación lenta.

Se favorece la cristalización por la adición de algunos cristales de fusofungina pura, y después se agita todavía durante 12 horas.

Se deja reposar durante 48 horas a +4° C.

15 Se recogen los cristales de fusofungina pura por filtración.

20 Se lava la torta con 10 lts. de mezcla de metanol-agua (en volumen de 1 a 2) refrigerada previamente a +4° C, y después con 20 lts. de agua destilada.

Los cristales se secan en una estufa, al vacío, a 40° C. Se obtienen 2,110 Kgs. de antibiótico puro.

25 El ejemplo precedente es, naturalmente, susceptible de numerosas variaciones, tanto en las condiciones de fermentación como en las de extracción y las de purificación. En efecto, la solubilidad de la fusofungina en agua es prácticamente nula, el antibiótico se encuentra concentrado en el micelio, pero la separación de éste último por filtración o por cen-

30 trifugación no es obligatoria para extraer el princi-

pio activo.

296533

Ejemplo 2.

A un litro de mosto de fermentación, preparado según el ejemplo 1, se añaden, bajo agitación, 0,25
5 lts. de alcohol butílico normal, después se ajusta el pH de la mezcla a 4 (\pm 0,3) con la ayuda de un ácido, se mantiene la agitación durante 30 minutos a pH constante. Después de haber dejado reposar durante 2 horas, se elimina la fase inferior.

10 Se aísla a continuación el micelio agotado del extracto butanólico, por filtración, en presencia de un coadyuvante tal como supercel.

Se concentra enseguida el extracto butanólico bajo presión reducida hasta la obtención de un jarabe viscoso de color amarillo marrón, que encierra
15 el antibiótico.

Se solubiliza el jarabe en el hexano, se somete a continuación la solución obtenida a tres extracciones sucesivas, con la ayuda de un pequeño volumen de una mezcla hidroalcohólica no miscible en el hexano.
20

Reunidos los extractos alcohólicos, se reduce a pequeño volumen por empleo de vacío.

El antibiótico precipita bajo forma de un sólido amarillento a medida que la solución se empobrece en alcohol.
25

La precipitación de la fusafungina es máxima después de la reducción a 1/5 del volumen inicial y, prácticamente total después del paso de 48 horas a
30 $+42^{\circ}$ C.



296533

Se recoge el antibiótico en estado "bruto" por filtración y después se seca al vacío.

Ejemplo 3.

5 Se regula a 6,5 el pH de un mosto de fermentación preparado según el ejemplo 1 y se le agota con la ayuda de metilisobutilcetona o metiletilcetona.

Se separa el extracto cetónico y se le concentra hasta la obtención de un "jarabe" que se purifica como se ha descrito en el ejemplo 1.

10 Ejemplo 4.

Se agota el mosto obtenido según el ejemplo 1, a pH 9 en un medio de acetato de etilo o de acetato de amilo.

15 Se separa el disolvente orgánico, se lava por medio de una solución tampón de pH 4,25 (tampón acetato), y se concentra hasta la obtención de un "jarabe" que se purifica como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 5.

20 Se puede retener el antibiótico, por filtración del mosto de fermentación, sin modificación previa del pH, con el micelio en la torta del filtro, lo que permite eliminar la mayor parte de las impurezas solubles en el filtrado.

25 No es indispensable la adición de un cuerpo que facilite la filtración.

Se lava la torta, después se seca en estufa ventilada y después se tritura muy finamente.

30 Se extrae la materia activa utilizando uno o varios de los siguientes disolventes : acetato de etilo, acetato de butilo, alcohol metílico, alcohol

296533

5 etílico, alcohol isopropílico, alcohol n-butílico, acetona, metiletacetona, metilisobutilcetona, óxido de etilo, óxido de isopropilo, óxido de butilo, benceno, metileno, dicloroetano, tricloroetileno, piridina, etc.

Todos estos disolventes disuelven la fusafungina aunque algunos más selectivamente, y dejan en la torta residual una parte más o menos grande de los impurezas.

10 La torta agotada se elimina por filtración, y se concentra el filtrado en poco volumen.

Se solubiliza el concentrado siruposo obtenido en el hexano o en éter de petróleo, después se procede a la extracción del principio activo por medio de una mezcla hidrometanólica, como se ha descrito en el ejemplo 1.

N O T A

20 Se reivindican como propios y nuevos para que sean objeto de una Patente de Invención en España, por veinte años, reivindicándose la prioridad de la Patente depositada en Gran Bretaña el 25 de Febrero de 1.963, bajo el nº 7516/63, los puntos siguientes:

25 1.- Procedimiento de preparación de la fusafungina, de propiedades antibióticas y antiinflamatorias, caracterizado porque

30 a) la duración de la fermentación en cultivo profundo se reduce una quinta parte en virtud del empleo de un sistema de aireación del orden de 0,8 lts./min. de aire por litro de solución nutriente y de un sistema de agitación apropiado.



296533

b) se emplean medios de cultivo con pH variable de 4,5 a 7 asegurado por sustancias tamponadoras tales como soluciones de fosfatos, citratos o tartratos.

5 2.- Procedimiento de preparación de la fusa-
fungina, caracterizado porque se emplean en él di-
solventes orgánicos, tales como: metanol, metiletil
cetona, acetato de etilo o hexano, que permiten efec-
tuar la extracción a la temperatura ambiente.

10 3.- Procedimiento de preparación de la fusa-
fungina, caracterizado porque se concentra el ex-
tracto en poco volumen bajo presión reducida, se
disuelve el concentrado en un hidrocarburo infe-
rior líquido, se somete la solución obtenida a la
15 extracción por una mezcla hidroalcohólica y se eli-
mina el alcohol por destilación en vacío ocasionan-
do la precipitación del producto bruto.

20 4.- Procedimiento de preparación de la fusa-
fungina, caracterizado porque se purifica el produc-
to bruto por contraextracción de una solución en un
hidrocarburo por una mezcla de metanol y agua, seguida
de una cristalización por adición de agua.

5.- PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE LA FUSA-
FUNGINA.

25 Todo conforme se describe en la memoria que an-
tecede, y se reivindica en su Nota.

 Este memoria consta de trece hojas foliadas y
escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 17 de Febrero de 1.964.
P. A. de Sociéte Anonyme BIOFARMA

ERNESTO TORRES A. TORRES
B. P.