

350779



PATENTE DE INVENCION

=====

SG. 3062.

Memoria Descriptiva

sobre:

"PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DEL
ANTIBIOTICO 19.402 R.P."

Solicitante: RHONE-POULENC S.A., entidad francesa,
residente en : 22, Avenue Montaigne,
PARIS 8e, Francia.

La presente invención se refiere a un
nuevo antibiótico, designado a continuación por
el número 19.402 R.P., y a su procedimiento de
preparación, así como a las composiciones medici-
nales que lo contienen.

5.



Este nuevo producto presenta un interés muy particular como consecuencia de su actividad antibacteriana elevada sobre los gérmenes gram-positivos.

5. El antibiótico 19.402 R.P., puede obtenerse a partir de los medios de cultivo artificial de un microorganismo perteneciente al género *Streptomyces*, denominado "*Streptomyces 6227*" o "*Streptomyces peruviansis*" (NRRL 2757) y que se ha descrito ya en la patente francesa número 1.259.983.

El antibiótico 19.402 R.P. es un ácido cuya sal de sodio posee las características físico-químicas siguientes:

Aspecto: polvo amorfo blanco.

15. Solubilidad: es muy soluble en el agua, soluble en el metanol anhidro, el etanol, el propanol y el isopropanol hidratados, muy poco soluble en el etanol, el propanol, el isopropanol y el butanol anhidros e insoluble en la acetona, el hexano, el benceno, el éter, el cloroformo y el acetato de etilo.

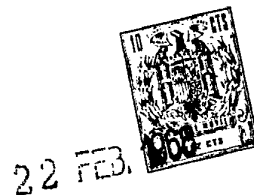
20. Espectro ultravioleta (determinación a partir de una solución de 0,040 mg/l en el agua):

$$\text{máximo de absorción a 256 nm : } E_{1\text{cm}}^{1\%} = 102,5$$

25. mínimo de absorción a 227 nm : $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 18,7$

Espectro infrarrojo (determinación a partir de comprimidos en mezcla con KBr).

Este espectro se ha representado por la figura adjunta, en la cual se han señalado en abscisas,



por una parte, las longitudes de ondas expresadas en micras (escala superior), y por otra parte los números de ondas en cm^{-1} (escala inferior) y en ordenadas las transmisiones en %.

5. En la tabla I, se indican las principales bandas de absorción infrarroja para este producto:

T A B L A I.

	3420 mf	1620 m	1070 mf	710 ang.
10.	3300 ang.	1530 f	1045 f	665 m
	3100 ang.	1420 m	972 m	595 d
	2930 f	1380 m	955 d	575 f
	2870 m	1330 m	883 m	495 m
	1720 m	1240 m	855 m	475 ang.
15.	1675 f	1155 ang.	800 d	425 d
	1645 m	1100 f	775 d	385 ang.

mf = muy fuerte

f = fuerte

m = media

20. d = débil

ang = angular

Poder rotativo

25. $[\alpha]_D^{20} = + 1,9 \pm 1^2$ (c = 0,4, agua)

$[\alpha]_{436}^{20} = + 7,5 \pm 1^2$ (c = 0,4, agua)

$[\alpha]_{365}^{20} = + 9,0 \pm 1^2$ (c = 0,4, agua)



22

Composición elemental

C % = 46,25 H % = 6,9 O % = 36,70 N % = 4,1
P % = 2,4 S % = 0,6 Na % = 3,05.

5. No dializa a través de una membrana de celulosa regenerada (tipo Cellophane).
- La sal sódica del antibiótico 19,402 R.P. puede identificarse por migración electroforética sobre gel de agarosa tamponado a pH 8 por un tampón glicocola (la agarosa es un polímero neutro lineal de la galactosa): hay migración de $13,10^{-3}$ cm/voltio/hora hacia el ánodo.
- 10.
- La sal sódica del antibiótico 19.402 R.P. puede igualmente identificarse por cromatografía sobre diversos soportes. Las Rf obtenidas con diferentes disolventes de desarrollo se han indicado en la tabla II (desarrollo a 20°C, revelado microbiológico por aplicación de los cromatogramas durante 5 minutos sobre una placa de gelosa sembrada de Staphylococcus aureus 209 P y después incubación
- 15.
20. durante una noche a 37°C).



T A B L A III

Soporte	Disolvente de desarrollo	Rf
Kieselgel G	Isopropanol-amoníaco 2N (70 : 30 en volumen)	0,37
Kieselgel G + Alúmina G (70 : 30 en peso)	Isopropanol-n butanol- - agua (50 : 40 : 30 en volumen)	0,35
Kieselgel G + Alúmina G (50:50 en peso)	Isopropanol - n butanol- agua (50 : 40: 30 en volumen)	0,30
Kieselgel H	Dioxano - agua (80 : 20 en volumen)	0,20
Papel Arches 302 no tamponado	n-butanol - ácido acético (60 : 40 en volumen)	0,62
	n-butanol-ácido acético-agua (60 : 40 : 10 en volumen)	0,48
	Acetato de etilo - piridina- agua (50 : 40 : 30 en volumen)	0,30

5. La actividad bacteriostática del 19.402 R.P. respecto a cierto número de gérmenes se ha determinado por uno de los métodos de dilución corrientemente empleado a este efecto. Por cada germen se ha determinado la más pequeña concentración de sustancia que, en condiciones definidas, impide todo desarrollo visible en un caldo nutritivo apropiado. Los resultados de las diversas determinaciones se han agrupado en la tabla III, donde las concentraciones bacteriostáticas mínimas se expresan en microgramos de sustancia por

10.

22 FEB



cm³ de medio de ensayo.

T A B L A III.

Organismos bacterianos ensayados.	Concentraciones mínimas bacteriostáticas (en $\mu\text{g}/\text{cm}^3$)
Staphylococcus aureus -cultivo 209 P - ATCC 6538 P	0,10
Staphylococcus aureus -cultivo 133 (Instituto Pasteur)	0,10
Staphylococcus aureus - cultivo Smith	0,25
Sarcina lutea ATCC 9341	40
Streptococcus faecalis - ATCC 9790	150
Streptococcus viridans (Instituto Pasteur)	0,8
Streptococcus pyogenes hemolyticus (cultivo Dig 7, Instituto Pasteur)	0,01
Neisseria gonorrhoeae (A 150 - Instituto Pasteur)	2,5
Diplococcus pneumoniae (cultivo Til, Instituto Pasteur)	0,07
Bacillus subtilis - ATCC 6633	20
Bacillus cereus - ATCC 6630	0,01
Mycobacterium species - ATCC 607	30
Mycobacterium para smegmatis (A 75 - Lausanne)	40
Escherichia coli - ATCC 9637	30
Shigella dysenteriae - Shiga L (Instituto Pasteur)	70
Salmonella paratyphi A (Lacasse, Instituto Pasteur)	90
Salmonella schottmuelleri (paratyphi B) Fougere (Instituto Pasteur)	60
Proteus vulgaris	125
Klebsiella pneumoniae - ATCC 10.031	75
Pseudomonas aeruginosa (cultivo Bass-Instituto Pasteur)	50
Brucella bronchiseptica (GN 387 - Wellcome Instituto)	15
Brucella abortus bovis B 19	1
Pasteurella multocida (A 125, Instituto Pasteur)	0,8
Treponema de Reiter	10



biótico 19.402 R.P. consiste esencialmente en cultivar *Streptomyces peruviansis* o sus mutantes en un medio y en condiciones apropiadas y en separar a continuación el antibiótico formado en el curso del cultivo.

5.

El cultivo de *Streptomyces peruviansis* se efectúa, según los métodos descritos en la patente francesa nº 1.259.983 para la producción del antibiótico 6.798 R.P. (que es una sustancia anfótera).

10.

El antibiótico 19.402 R.P. puede aislarse de los mostos de fermentación por los diferentes métodos conocidos para la extracción y la purificación de los antibióticos ácidos no dializables, por ejemplo, según se indica en la patente francesa nº 1.468.671.

15.

El mosto de fermentación puede filtrarse a un pH superior o igual a 5, de preferencia comprendido entre 7 y 9, pero en estas condiciones una parte importante del 19.402 R.P. queda en la torta de filtro, que hay que tratar igualmente para extraer el producto activo. Además, es necesario entonces separar el antibiótico 19.402 R.P. del antibiótico 6.798 R.P. que ha pasado igualmente en el filtrado.

20.

25.

Es, pues, preferible realizar la filtración a un pH inferior a 5, y de preferencia próximo a 4; en tales condiciones todo el 19.402 R.P. queda en la torta de filtración, de donde puede extraerse a un pH comprendido entre 3 y 7 por agua

30.



22

que contiene un alcohol de bajo peso molecular, tal como el metanol.

5. Se puede igualmente hacer pasar el mosto de fermentación a una columna que contenga una resina intercambiadora de iones de carácter aniónico fuerte y gran porosidad, y eluir después por un disolvente hidroalcohólico, tal como el metanol acuoso contentivo de un electrólito. Este método tiene también el inconveniente de necesitar una separación ulterior de los antibióticos 19.402 R.P. y 6.798 R.P.

15. El antibiótico 19.402 R.P. bruto puede aislarse a partir de las soluciones hidroalcohólicas indicadas más arriba por concentración de la solución bajo un pequeño volumen; esta concentración se hace cómodamente a una temperatura inferior a los 40°C bajo presión reducida. Por enfriamiento y/o por adición de un mal disolvente del 19.402 R.P., tal como el etanol anhidro o la acetona, precipita el antibiótico bruto.

20. Puede entonces purificarse el 19.402 R.P. por fijación sobre una resina intercambiadora de iones de carácter aniónico fuerte y de gran porosidad y posterior elución por una solución hidroalcohólica contentiva de un electrolito, tal como los cloruros de sodio, de amonio, de potasio, de calcio o de magnesio, a razón de 5 a 50 g por litro de eluente. Se concentra entonces el eluado a un pequeño volumen, a una temperatura inferior a 40°C bajo presión reducida y se somete el concen-
- 25.
- 30.

22 FEB.



trado a una diálisis contra una corriente de agua destilada por medio de una membrana de celulosa regenerada. Las sales minerales y diversas impurezas son arrastradas por el agua y el 19.402 R.P.

5. queda íntegramente en la solución dializada. Por liofilización de esta solución, se obtiene el antibiótico 19.402 R.P. purificado.

10. Para obtener el 19.402 R.P. más puro, se pueden utilizar los métodos clásicos en uso, tales como la cromatografía sobre diversos agentes adsorbentes, la distribución a contracorriente o la repartición entre diversos disolventes. Se ha revelado particularmente ventajoso efectuar una cromatografía sobre gel de sílice del antibiótico en solución acuosa eluyendo con una mezcla de propanol y de amoníaco.
- 15.

20. Es comprensible que los diferentes métodos indicados para la extracción, el aislamiento y la purificación del antibiótico 19.402 R.P. pueden repetirse varias veces, según los imperativos de la fabricación, para obtener este antibiótico bajo una forma adecuada a las aplicaciones deseadas.

25. Tras estos diversos tratamientos, el antibiótico 19.402 R.P. se obtiene de preferencia bajo la forma de sal alcalina. Puede a continuación transformarse, si es necesario en ácido libre mediante puesta en solución concentrada en el agua de una sal alcalina y paso sobre una resina intercambiadora de iones con carácter catiónico fuerte.

30. Los ejemplos siguientes, dados a título

22 FEB



no limitativo, muestran cómo puede ponerse en práctica la invención. En cuanto sigue, se determina la actividad por dosificación biológica por el método de difusión utilizando bacillus subtilis como germen sensible y con respecto a una muestra de 19.402

- 5. R.P. puro, tomado como contraste. Esta actividad, se expresa en unidades (u) por mg para los productos sólidos y en unidades por cm³ para las soluciones (la unidad se define como la más pequeña cantidad de producto que, disuelta en 1 cm³ de un medio de cultivo apropiado, inhibe el crecimiento de Staphylococcus aureus 209 P en condiciones determinadas).
- 10.

EJEMPLO 1 -

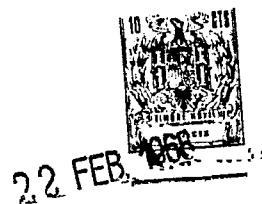
Se carga en un fermentador de 170 litros:

- 15. - Corn steep 4,800 kg
- Cerelesa 2,400 kg
- Cloruro sódico 0,600 kg
- Sulfato de magnesio 0,120 kg
- Agua, complemento para 110 litros.

- 20. Después de haber ajustado el pH de la mezcla a 7,40 con 660 cm³ de lejía de sosa concentrada (d = 1,33), se añade además:

- Carbonato de calcio 0,600 kg

- 25. Se esteriliza entonces el medio de cultivo por borboteo de vapor a 122°C durante 40 minutos. Tras enfriamiento, el volumen del caldo es de 120 litros, y el pH de 6,95. Se siembra el medio con 200 cm³ de un cultivo en erlenmeyer agitado de "Streptomyces 6227". Se desarrolla el cultivo a 30°C durante
- 30. 26 horas agitando y aireando con aire estéril; resulta



entonces adecuada para la siembra del cultivo productor.

Se efectúa el cultivo productor en un fermentador de 800 litros cargado con las sustancias

5. siguientes:

- Corn steep	22	kg
- Almidón	8,250	kg
- Aceite de soja	8,250	l.
- Carbonato de calcio	5,500	kg
10. - Fosfato monopotásico	1,100	kg
- Sulfato de magnesio	1,100	kg
- Cloruro de cobalto hidratado	11	g.
- Agua, complemento para 510 litros.		

15. Se esteriliza el medio por borboteo de vapor a 122°C durante 40 minutos. Después de enfriar, el volumen del caldo es de 550 litros y el pH de 6,60, tras adición de 250 cm³ de lejía de sosa concentrada (d = 1,33). Se siembra entonces con 55 litros del cultivo inoculum en el fermentador de 170
20. litros descrito anteriormente. Se efectúa el cultivo a 30°C durante 123 horas agitando con ayuda de una turbina que gira a razón de 285 vueltas/minuto y aireando con un volumen de aire estéril de 25 m³/h. El valor pH del medio es entonces de 8,10 y el volumen del mosto de 520 litros. La cantidad de antibiótico presente en el mosto de fermentación es de
25. 2420 u/cm³.

EJEMPLO 2 -

30. Se toman 520 litros del mosto de fermentación precedente de titulación 2420 u/cm³ y a pH 8,1



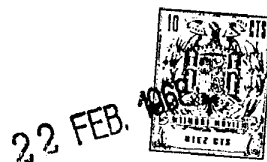
- y se ajustan a un valor pH 4 por adición de una solución de ácido fosfórico al 37 %, en una cuba provista de un agitador. Se añaden entonces 15 kg de adyuvante de filtración. Se filtra la mezcla sobre
5. filtro prensa y se lava la torta de filtración con 250 litros de agua de grifo. El filtrado y el producto del lavado prácticamente inactivos, se desechan. Se pone en suspensión la torta de filtración, agitando, en 350 litros de una mezcla constituida
10. por 270 litros de metanol y su complemento en agua. Se ajusta el pH aparente de la mezcla en 7, por adición de una solución de sosa 10 N. Se mantiene la agitación durante 1 hora y se filtra después la pasta en un filtro prensa. Se recoge el filtrado y se
15. lava la torta de filtración con 100 litros de una mezcla hidrometanólica al 70 % de metanol. El conjunto del filtrado y del lavado (o sean 440 litros) da 2320 u/cm³. Se desecha la torta.
- Se concentra el filtrado alcohólico bajo
20. presión reducida (35 mm de mercurio) a 37°C hasta un volumen de 6 litros. A este concentrado se le añaden 3 litros de etanol. La solución obtenida se precipita a continuación con una mezcla de 30 litros de etanol y 40 litros de acetona. El antibiótico se
25. aísla por filtración, se lava mediante acetona y se seca en estufa al vacío (5 mm de mercurio). Se obtienen así 1009 g de un producto pardo, de un título de 950 u/mg, que es la sal sódica del 19.402 R.P. bruto.



22 FEB. 1968

EJEMPLO 3 -

- Se disuelven 900 g del producto bruto preparado anteriormente (titulación 950 u/mg) en 10 litros de agua destilada. Se filtra la solución y se pasa después por una columna (diámetro interior = 9 cm) que contiene 8 litros de resina DOWEX 1X2 en ciclo cloro (caudal 2 litros hora aproximadamente). Se lava sucesivamente la columna con:
5. - agua destilada - hasta que el
10. efluente sea incoloro 8 l. a 2 l/h
- mezcla ácido fórmico - agua (10 : 90 en volumen) 24 l. a 12 l/h
- mezcla ácido fórmico - agua - metanol (10 : 10 : 80 en
15. volumen) 24 l. a 12 l/h
- mezcla metanol - agua (80 : 20 en volumen) 24 l. a 12 l/h.
- Se eluye entonces el antibiótico por medio de la mezcla metanol-agua (80 : 20 en volumen) a la
20. que se añaden 10 g/l de cloruro potásico con un caudal de aproximadamente 10 l/h. Se fracciona el eluado en cada 10 litros; las fracciones más activas (4,5 y 6) se reagrupan y concentran bajo presión reducida a temperatura inferior a 40°C, hasta 3 litros.
25. Se dializa el concentrado durante 48 horas contra tres veces 40 litros de agua destilada, por intermedio de una membrana de celulosa regenerada, para eliminar las sales y diversas impurezas, y después se liofiliza.
30. Se obtienen así 35 g de sal potásica del



19.402 R.P. bajo la forma de un polvo amorfo de color crudo de titulación 13800 u/mg y que presenta un máximo de absorción en el ultravioleta a 257 mμ (E_{1cm}^{1%} = 84).

5. EJEMPLO 4 -

5 g de antibiótico purificado antedicho se disuelven en 20 cm³ de agua destilada y se forma una pasta con ello y 25 g de Kieselgel activado; la pasta obtenida se seca durante una noche bajo 2 mm de mercurio a la temperatura ambiente y se coloca después en la parte superior de una columna (diámetro interior = 4 cm) previamente guarnecida con 500 g de Kieselgel activado seco.

10. Se desarrolla la columna sucesivamente por medio de las mezclas:

- propanol normal - amoníaco 2 N
(100 : 20 en volumen) 2,4 litros
- propanol normal - amoníaco 2 N
(80 : 20 en volumen) 2 litros

15. y se eluye después por medio de la mezcla:

- propanol normal - amoníaco 2 N
(80 : 30 en volumen) fraccionado
cada 50 cm³.

20. Se reúnen las fracciones 1 a 50 por una parte, y 51 a 75 por otra, se concentran bajo presión reducida a temperatura inferior a 40°C para expulsar el propanol, y después se liofilizan.

25. Las fracciones 1 a 50 proporcionan así:

Chorro A : 1300 mg de titulación 15.700 u/mg

30. Las fracciones 51 a 75 proporcionan así:



22 FEB

Chorro B: 1355 mg de titulación 15.800 u/mg.

5. Se disuelven 1200 mg del chorro A antedicho en 20 cm³ de agua destilada, y se les añade, agitando y en pequeñas fracciones, resina AMBERLITE IR 120 en ciclo ácido hasta obtenerse un pH constante. Se filtra y enjuaga la resina por medio de 10 cm³ de agua destilada. Se reúnen el filtrado y los lavados, se ajustan a un valor pH de 8,0 mediante sosa, y se dializan una noche contra 2 veces 1 litro
10. de agua destilada, por intermedio de una membrana de celulosa regenerada. La sal sódica del 19.402 R.P. se obtiene bajo forma sólida por liofilización de la solución que queda encima de la membrana.

15. Se recogen así 945 mg de sal sódica del 19.402 R.P. puro de titulación 17.800 u/mg que tiene la composición elemental siguiente:

C % = 46,25 H % = 6,9 O % = 36,70 N % = 4,1
P % = 2,4 S % = 0,6 Na % = 3,05.

- N O T A -

20. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.
25. También se hace constar que el invento corresponde a una solicitud de patente presentada en Francia, con fecha 22 de febrero de 1967, bajo el N^o PV.96.051, acogiéndose por lo tanto, a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en
30. vigor, siendo lo que constituye la esencia del refe-

22 FEB 1958



rido invento y por lo que se solicita Patente de Invención, por 20 años en España sobre: "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DEL ANTIBIOTICO 19.402 R.P.", caracterizándose por lo siguiente:

5. 1ª.- Procedimiento de preparación del antibiótico 19.402 R.P., cuya sal de sodio es un polvo amorfo blanco, muy soluble en el agua, soluble en el metanol anhidro, el etanol, el propanol y el isopropanol hidratados, muy poco soluble en el etanol, el propanol, el isopropanol y el butanol anhidros e insoluble en la acetona, el hexano, el benceno, el éter, el cloroformo y el acetato de etilo, posee una composición elemental de C % = 46,25, H % = 6,9, O % = 36,70, N % = 4,1, P % = 2,4, S % = 0,6, Na % = 3,05 y su espectro ultravioleta presenta un máximo de absorción a 256 mμ de $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 102,5$, caracterizado porque se cultiva de modo aerobio un microorganismo elegido del grupo consistente en Streptomyces 6227 o Streptomyces peruviansis NRLL 2757 y sus mutantes, sobre un medio clásico adecuado, y en las condiciones habituales para este género de cultivo, se separa después el antibiótico formado en el curso del cultivo, se purifica y se transforma eventualmente en sal de metal alcalino.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.

2ª.- Procedimiento de preparación del antibiótico 19.402 R.P.; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria e ilustrado en el dibujo adjunto.



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

Madrid,

RHONE-POULENC, S.A.,

22 FEB. 1968

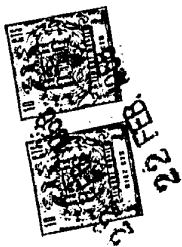
J. GOMEZ ACEBO Y MODEI
D. P. Firmado F. Hernández Ruiz

354779

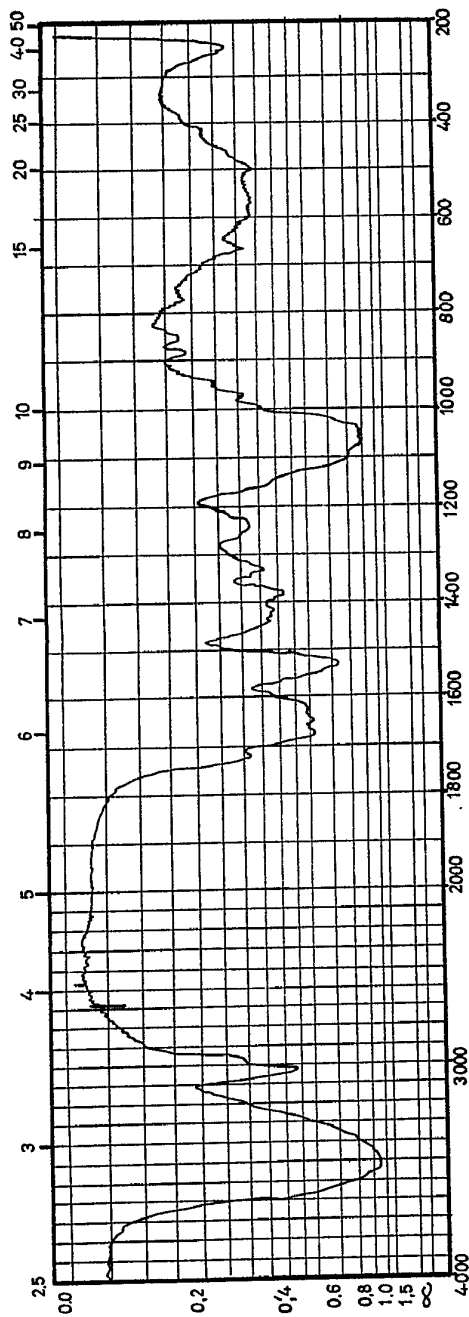
HOJA UNICA

350779

RHÔNE-POULENC



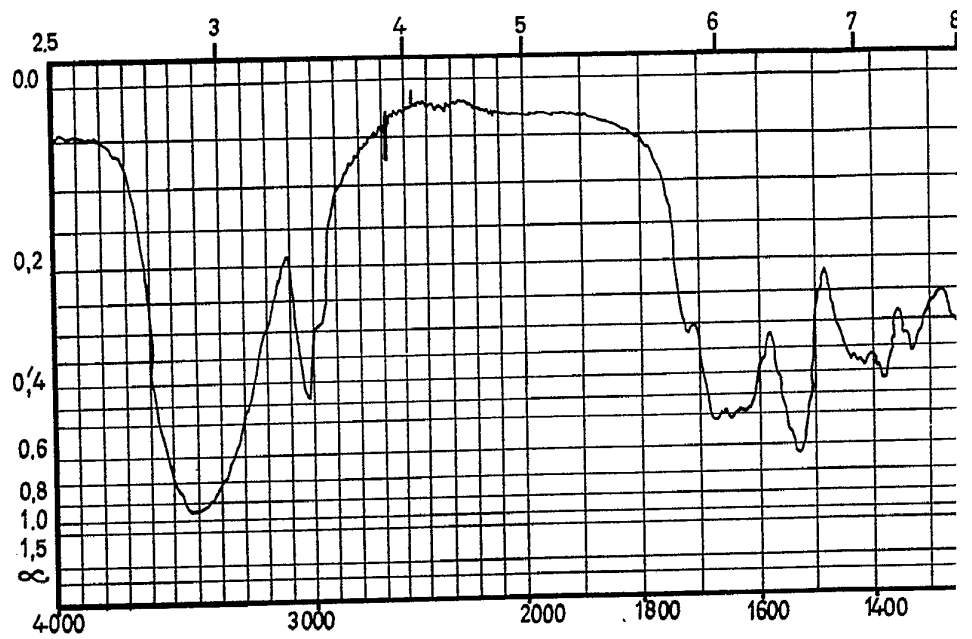
FOCAL

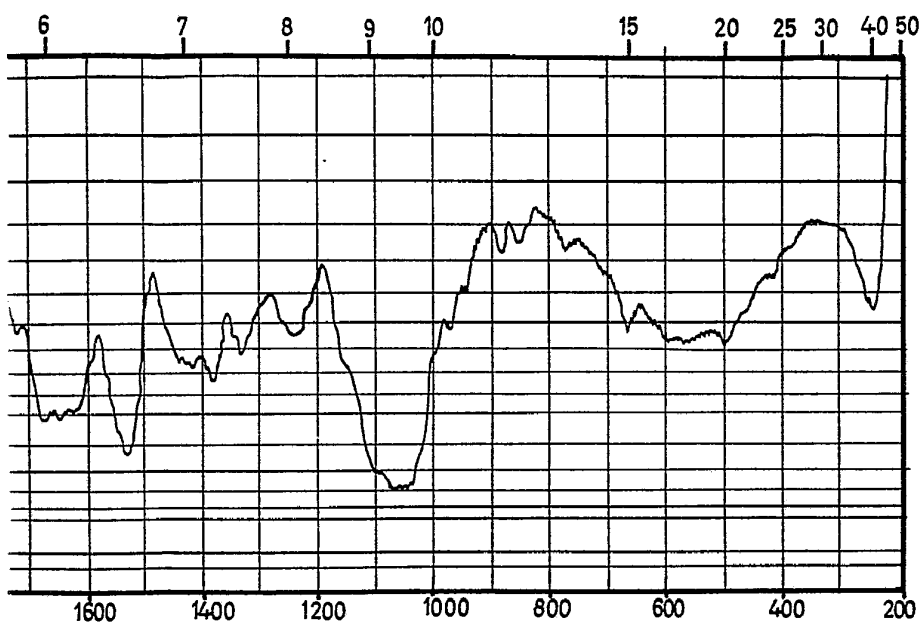
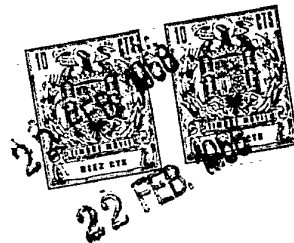


22 FEB 1968
 MADRID GOMEZ PUECO MODESTO
 P. R. FERNANDEZ RUIZ

RHÔNE-POULENC

350779





BOGALIA

22 FEB 1968

Madrid
A. GOMEZ ACEDO Y MODEI
p. p. Firmado: F. Hernández Ruiz