

PATENTE DE INVENCION

Ref: Ip. 334.



Memoria Descriptiva

sobre:

"Procedimiento para la preparación de
rifamicina SV".

=====
Solicitante: LEPETIT S.p.A. Gruppo per la Ricerca Scientifica e la
Produzione Chimica Farmacéutica, residente en Via Du-
rando, 38, 20158 MILAN, Italia.

=====
Este invento se refiere a un nuevo procedimien-
to para la preparación de rifamicina SV, por fermenta-
ción de nuevos mutantes de cepas de Streptomyces medi-
terranei que tienen la propiedad de producir directa-
5. mente el antibiótico citado.



- En una publicación anterior (Antibiotics Annual 1959-60, 262) Sensi y otros describen la producción de la rifamicina antibiótica consistente en una mezcla de muchas sustancias de estructura análoga, fermentando una cepa de Streptomyces mediterranei. La rifamicina B ha demostrado ser la más interesante entre estas sustancias, por cuya razón se ha tratado de mejorar el rendimiento. Los resultados de una de estas investigaciones se describen por Margalith y otros en Appl. Microbiol, 9, 325 (1961), donde se indica que la adición de dietilbarbiturato sódico al caldo de fermentación, permite mejorar el rendimiento y la pureza de la rifamicina B. Una publicación posterior (Sensi y otros, II Farmaco, Ed. Sci. 16, 165) describe la preparación de la rifamicina SV que a su vez demostró ser uno de los componentes de la familia de las rifamicinas, dotada de una actividad antibacteriana superior y que constituye un intermediario importante para la síntesis de otros derivados rifamicínicos. Descrito en general, el procedimiento consiste en someter la rifamicina B a una serie de operaciones químicas, durante la cual se oxida primero a rifamicina O, luego se hidroliza a rifamicina S y finalmente, por la acción de un agente reductor suave, se convierte en rifamicina SV. Esta síntesis, como es evidente, es muy laboriosa e implica en las distintas etapas, la solución de problemas de orden práctico bastante difíciles de resolver, con pérdidas posibles y frecuentes del mismo antibiótico. Consideraciones obvias de carácter económico, han inducido a buscar métodos más sencillos para la preparación de rifamicina SV.
- Estos problemas, se han resuelto por el procedimien



- to que constituye el objeto de este invento. Se ha comprobado, en efecto, que sometiendo la Streptomyces mediterranei a la acción de agentes de formas de mutación, físicos (rayos ultravioleta, por ejemplo), o químicos
5. iperita (sulfuro de dicloretilo), N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, etc., o biológicos (por ejemplo actinófgos), se obtienen formas de mutación de dicho microorganismo, que produce rifamicina SV junto con cantidades variables de otras rifamicinas.
10. Las formas de mutación productoras de rifamicina SV, mantienen la toxomía original del Streptomyces mediterranei, y sus características de cultivo son prácticamente las mismas. Solo se observa algunas diferencias en la formación del micelio aéreo, y en el color del pigmento soluble cuando las formas de mutación se desarrollan
15. en algunos medios de cultivo representativos. A continuación figura una Tabla en la que se indica una comparación entre las características de la Streptomyces mediterranei ATCC 13.685 y una de las nuevas formas de mutación, que se
20. ha comprobado ser especialmente eficaz en la obtención de elevados rendimientos de rifamicina SV. La forma de mutación, que recibió el número RS20 de código interno, se ha depositado en ATCC con el número 21.271 y ha recibido el número de serie.



Características de cultivo comparativas de Streptomyces mediterranei ATCC 13685 y la cepa RS20 en varios medios.

Medio	ATCC 13685			RS20 (ATCC 21271)		
	Micelio vegetativo	Micelio aéreo	Pigmento soluble	Micelio vegetativo	Micelio aéreo	Pigmento soluble
Agar almidón	diáfano a marrón claro	blanco rosado	amarillo verdoso para marrón claro	diáfano para naranja oscuro a marrón oscuro	Ausente	verde amarillento claro a verde amarillento oscuro
Agar glucosa malato de calcio	diáfano a marrón claro	blanco rosado	amarillo claro	diáfano a naranja amarillo	ausente	verde amarillento claro a marrón verde-amarillento
Agar glicerol malato de calcio	diáfano a naranja claro	blanco naranja claro	poco, naranja pálido	diáfano para amarillo naranja oscuro	ausente	verde amarillento muy ligero a amarillo verdoso oscuro
Agar Bennett	diáfano para naranja amarillo	blanco rosado	muy ligero amarillo marrón	diáfano para amarillo naranja oscuro	ausente	amarillo-marrón a rojo-marrón



Los medios nombrados en la Tabla anterior tenían la composición siguiente:

5. Agar almidón - Almidón soluble, 10 g; K_2HPO_4 , 1 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g; NaCl 1 g; $(NH_4)_2SO_4$, 2 g; $CaCO_3$, 2 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, cada uno 0,001 g; agar Difco, 20 g; agua destilada hasta 1000 cc. Después de esterilización a $120^\circ C$ durante 20 minutos, el pH era de 6,7 a 6,8.
10. Agar glucosa malato cálcico - Glucosa 20 g; malato cálcico, 10 g; NH_4Cl , 0,5 g; K_2HPO_4 , 0,5 g; agar Difco, 15 g; agua destilada, hasta 1000 cc. Después de la esterilización a $115^\circ C$ durante 15 minutos, el pH era de 6,5.
15. Agar glicerol malato cálcico - Glicerol, 10 g; malato cálcico, 10 g; NH_4Cl , 0,5 g; K_2HPO_4 , 0,5 g; agar Difco 15 g; agua destilada, hasta 1000 cc. Después de la esterilización a 115° durante 15 minutos, el pH era de 6,5 a 6,6.
20. Agar Bennett - Glucosa, 10 g; extracto de levadura, 1 g; extracto de buey, 1 g; N-Z-amina A, 2 g; agar, 15 g; agua destilada hasta 1000 cc. Después de la esterilización, el pH era de 6,7 a 6,8.
25. El procedimiento tanto en cuanto a la fermentación como a la extracción, es prácticamente el mismo que se ha descrito para la producción de la rifamicina B y consiste en cultivar una de dichas formas de mutación de Streptomyces mediterranei en un medio nutritivo que contenga orígenes de carbono asimilable y nitrógeno y sales minerales esenciales, hasta comunicar una actividad antibiótica substancial a dicho medio, y en extraer de éste rifamicina SV.
30. Más especialmente, esta forma de mutación se cultiva en condiciones de agitación y de inmersión aireada, a una tempera



tura variable desde 25 a 37°C y, con preferencia a 28°C.

Como orígenes de carbono pueden utilizarse los hidratos de carbono y los derivados de carbono siguientes: glucosa, galactosa, lactosa sucrosa, maltosa, glicerol, manitol,

5. etc. Los orígenes de nitrógeno útiles, son por ejemplo los aminoácidos y sus mezclas, péptidos, proteínas y sus hidrolizados, como peptona extracto de levaduras, harina de soja, licor corn steep, fish soluble, extracto de carne y fracciones acuosas de semillas de cereales. La fermentación puede llevarse a cabo durante 96-180 horas. El pH de partida, en general se ajusta a 6,2-6,4 aproximadamente y disminuye durante el curso de la fermentación a 5,5-6. En general, se observan los mejores resultados de una fermentación a la hora 180. Después de este momento, se obtiene un excelente rendimiento de antibiótico.
- 10.
- 15.

- Al final de la fermentación, la rifamicina SV puede aislarse por el procedimiento siguiente. El medio de fermentación se filtra al pH final de 6,4-6,6. El filtrado se acidifica rápidamente con preferencia a 1 pH inferior a 5 aproximadamente, para conseguir la mejor estabilidad de la substancia antibiótica. La actividad se extrae con disolventes inmiscibles en agua tales como cloroformo, butanol, o acetato de etilo, propilo, butilo o amilo. La relación entre el volumen del medio y el del disolvente, cambia de acuerdo con el disolvente elegido; generalmente se utiliza una relación variable de 2:1 a 10:1.
- 20.
 - 25.

- El micelio conserva todavía una actividad microbológica notablemente más elevada que la observada en el caso de la fermentación de rifamicina B. Esta actividad se extrae del micelio por medio de un disolvente inmiscible
- 30.



en agua, y luego combinado con la fase orgánica que contiene ya la mayor parte de la rifamicina. Como variante, la extracción de la actividad del micelio, puede llevarse a cabo por medio de un disolvente miscible en agua tal como acetona. En este caso, el líquido se filtra, la acetona se evapora en vacío, la rifamicina se extrae con un disolvente inmiscible en agua, y el procedimiento se aplica como antes se ha indicado.

En cuanto la mayor parte de la actividad antibiótica se ha transferido al disolvente, éste se destila en vacío, a sequedad, con preferencia a una temperatura inferior a 30°C.

La purificación de la rifamicina SV, puede realizarse cromatográficamente en una columna preparada con un material adsorbente adecuado, tal como gel de sílice. Las rifamicinas se disuelven en un disolvente orgánico adecuado tal como acetona, se transfieren a la columna y se someten a elución con una mezcla conveniente de disolventes tal como acetona y benceno. La separación de la rifamicina SV de las demás rifamicinas, es en general bastante pronunciada dado que posee una movilidad notablemente superior y puede continuar fácilmente debido al calor anaranjado amarillo característico del anillo en el interior de la columna. El producto de la elución que contiene rifamicina SV, se concentra luego en vacío, a sequedad. Se obtiene un residuo cristalino, amarillo anaranjado.

Con el fin de aclarar más aún el objeto de este invento, se facilitan los ejemplos siguientes:

EJEMPLO 1 - Una suspensión de micelio de Streptomyces mediterranei ATCC 13.685, se trata con N-metil-



N'-nitro-N-nitrosoguanidina y se inocula en agar Bennett. Las colonias que sobrevivan al tratamiento mutagénico, se aíslan y se examinan para su capacidad con objeto de inhibir el desarrollo de *Pseudomonas reptilivora* NRRL-B6 cultivada en agar semilla de Penassay a un pH de 7,2. En estas condiciones la rifamicina B es microbiológicamente inactiva, y la rifamicina SV produce cepas que pueden seleccionarse.

10. Una de estas cepas que denominamos con la abreviatura RS20, se propaga durante 6-8 días en agar Bennett y se incuba a 28°C. Con el cultivo obtenido en el agar "inclinado", se inoculan, en condiciones estériles, dos matraces Erlenmeyer de 500 cc. Los matraces contienen 100 cc del medio vegetativo de la composición siguiente:

Extracto de buey	5 g
Extracto de levadura	5 g
Peptona	5 g
Hidrolizado de caseína	3 g
Glucosa	20 g
NaCl	1,5g
H ₂ O hasta	1 litro

15. el pH se ajusta a 7,3, con NaOH.

Los matraces así inoculados se colocan en un agitador alternativo a 28°C durante 72 horas. El contenido de los matraces Erlenmeyer se utiliza como inóculo para verter en un pre-fermentador de 10 l. que contiene 4 litros del medio vegetativo antes citado. La incubación se realiza a 28°C con una agitación de 750 rpm. y una aireación de 1 v/v/m. Al cabo de 30 horas de crecimiento, se obtuvo un volumen de 7 a 10 % de células apretadas. En la etapa

20.



siguiente, se utilizó un fermentador de vidrio de 10 l que contenía 4 l del medio de fermentación siguiente:

Harina de cacahuet	25 g
Harina de soja	5 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	9,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,85g
Glucosa	95 g
Glicerol	40 g
KH_2PO_4	1 g
Propilenglicol	5 g
CaCO_3	8,5 g
Dietil barbituratosódico	1,7 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,8 mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,5 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	42,5 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3,4 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,7 mg
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,85mg
H_2O	hasta 1 litro

5. el pH se ajusta a 7,8 con NaOH. Esterilización durante 60 minutos, a 120°C. Después de la esterilización, el pH es de 6,4. Se utiliza como inóculo, una cantidad del contenido del pre-fermentador, igual al 5 % del contenido del fermentador.

10. La fermentación se realiza a 28°C con una agitación de 750 rpm, y una aireación a razón de 1 v/v/m. Se utiliza silicona A como antiespumante. El caldo de cultivo vira a un color característico rojo oscuro, durante la fermentación. Al cabo de 120 horas de crecimiento, se obtiene un volumen de 20-25 % de células apretadas. El pH del caldo



es de 6. La actividad antibiótica más elevada se obtiene al cabo de 180 horas (2000 μ /ml de rifamicina SV). En este momento se cosecha el caldo.

EJEMPLO 2 - Se prepara en un frasco, un cultivo de Strept-

5. tomyces mediterranei RS20, obtenido como se describe en el ejemplo 1, con agitación como se ha descrito en el caso anterior. Para el cultivo previo se vierte en un aparato de fermentación de vidrio de 10 litros, que contenga 4 l del medio siguiente:

Glucosa	5	g
Harina de cacahuet	7,5	g
CaCO ₃	1,65	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,33	g
KH ₂ PO ₄	0,33	g
FeSO ₄ .7H ₂ O	3,3	mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	16,5	mg
MnSO ₄ .4H ₂ O	1,3	mg
H ₂ O	hasta	1 litro

10. El pH se ajusta a 7,5. Esterilización, 50 minutos a 120°C. Después de la esterilización, el valor del pH es de 6,4. Al cabo de 38 horas de desarrollo, el volumen de las células apretadas es de 6-8 % del volumen total. Se utiliza un inóculo igual a 10 % para un fermentador de vidrio de 20 l. que contenga 10 l. del medio de fermentación siguiente:

Líquido de "Cornsteep"	20	g
Harina de soja	15	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	6	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,85	g
Glucosa	100	g
KH ₂ PO ₄	1	g



13 JUL 1968

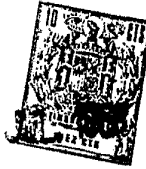
CaCO ₃		6	g
FeSO ₄ ·7H ₂ O		8,5	mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O		42,5	mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O		3,4	mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O		2,8	mg
COCl ₂ ·6H ₂ O		1,7	mg
H ₂ O	hasta	1	litro

El pH se ajusta a 7,8 con NaOH. Esterilización, durante 50 minutos a 120°C. Después de la esterilización, el pH es de 6,4. La fermentación se realiza a 28°C durante 150 horas. El pH del caldo de fermentación al cosechar es de 6,5. La actividad antibiótica final es de 1600 γ /ml de rifamicina SV.

El producto se extrae, se purifica por via cromatográfica y luego se cristaliza como se ha descrito en la introducción. Más especialmente, la cromatografía se realiza utilizando gel de sílice Merck, 0,05-0,20 mm, la rifamicina bruta se disuelve en acetona, luego se somete a elución con una mezcla benceno-acetona 1:1. El producto así purificado muestra las características químico-físicas de la rifamicina SV. Punto de fusión, empieza a descomponerse a 140°C. $[\alpha]_D^{20} = -3,9^\circ$ (c = 1 % en metanol).

El espectro infrarrojo acusa las siguientes bandas de absorción: 3440, 2920 (Nujol), 2850 (Nujol), 1700, 1658, 1605, 1545, 1464 (Nujol), 1415, 1375 (Nujol), 1325, 1290, 1260, 1218, 1197, 1164, 1125, 1115, 1102, 1083, 1050, 1020, 976, 962, 950, 930, 915, 898, 871, 845, 830, 801, 785, 772, 760, 750, 717, 703 cm⁻¹

El espectro visible y ultra-violeta realizado en amortiguador fosfato, pH = 7,3, acusa máximos de absorción



a 223 μ , 314 μ , y 445 μ .

- N O T A -

5. 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. También se hace constar que el invento corresponde a una Solicitud de Patente, presentada en Italia, con fecha 13 de julio

10. de 1967, bajo el número 18343 A/67; acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Inven

15. ción por 20 años en España, sobre: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE RIFAMICINA SV"; caracterizándose por lo siguiente:

1ª.- "Procedimiento para la preparación de rifamicina SV", caracterizado porque comprende cultivar un mutante de Streptomyces mediterranei, susceptible de producir rifamicina SV, en un medio acuoso de nutrición que con

20. tenga una fuente de carbono asimilable, una fuente de nitrógeno asimilable, y sales minerales esenciales, en condiciones aerobias de inmersión, hasta comunicar una actividad antibiótica apreciable a dicho medio, y recuperar la

25. rifamicina SV del medio.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende cultivar un mutante de Streptomyces mediterranei, del número de código ATCC 21271.

3ª.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el cultivo se realiza a

30.

