

C12D

419160

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

por "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE RAPAMICINA" a favor de la firma canadiense AYERST, MCKENNA & HARRISON LTD. residente en 1025 Laurentien Boulevard, Saint-Laurent, Provincia de Quebec, Canadá.

- 0 -

MEMORIA DESCRIPTIVA

Extracto de la exposición

El antibiótico rapamicina es producible cultivando Streptomyces hygroscopicus NRRL 5491 en un medio nutritivo acuoso. La rapamicina tiene propiedades antifungosas.

5. Se exponen métodos para su preparación y empleo.

Fundamento del invento

a) Ambito del invento

- Este invento se refiere a un antibiótico, a una nueva composición de materia llamada rapamicina y a un procedimiento para su preparación.
- 10.

419160

b) Descripción de la práctica anterior

El antibiótico de este invento se distingue fácilmente de los compuestos de la práctica anterior pertenecientes a su clase por su profunda actividad antifúngosa y por su índice relativamente bajo de toxicidad.

5.

Más explícitamente, el espectro ultravioleta de la rapamicina, aquí representado, indica que este compuesto pertenece a la clase de los antibióticos conocidos como antibióticos triénicos. En esta clase particular existen únicamente cinco compuestos de los que se haya informado an

10.

tes. La trienina (A. Aszalos y col., J. Antibiotics, 21, 611 -1968-) es un antibiótico triénico de actividad anti-tumoral, que también muestra actividad marcada contra los organismos grampositivos y actividad sólo marginal contra

15.

las razas de Candida. El trieno antifúngoso comunicado por J.J. Armstrong y col., Nature, 206, 399 (1965) y la micotrienina comunicada por C. Coronelli y col., J. Antibiotics, 20, 329 (1967) son probablemente idénticos. Ambos tienen es

20.

casa actividad antifúngosa (CIM contra C. Albicans: 5 microgramos/cc) y gran toxicidad (DL₅₀ en los ratones: 15 mg/kg). Los dos antibióticos restantes [la resistafilina, S. Aezaiwa y col., J. Antibiotics, 24, 393 (1971), y la proticina, G. Neseemann y col., Naturwissenschaften, 59, 81 (1972)] se

25.

distinguen fácilmente del compuesto de este invento por manifestar actividad antibacteriana sin ninguna actividad antifúngosa.

Breve resumen del invento

La rapamicina es un compuesto químico que puede producirse cultivando en un medio nutritivo acuoso un orga-

nismo productor de rapamicina. El compuesto tiene la propiedad de afectar adversamente el crecimiento de los hongos; por ejemplo, de Candida albicans y Microsporium gypseum.

5. En consecuencia, la rapamicina puede usarse para impedir el crecimiento o reducir el número de ciertos hongos en diversos ambientes.

El organismo productor de rapamicina utilizado para este invento, Streptomyces hygroscopicus NRRL 5491, se obtuvo de terrenos de Easter Island y muestras de él han sido depositadas sin restricciones en la Northern Utilization and Research Division, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, Estados Unidos.

10. Debe entenderse que este invento no se limita al uso del organismo particular aquí descrito, sino que incluye variantes y mutantes obtenidos por selección natural o por tratamiento del microorganismo (por ejemplo, con rayos ultravioletas, rayos X, N-metil-N'-nitro-N-nitroso-guanidina, cloruro de manganeso, alcanfor, mostazas nitrogenadas, etc.), lo mismo que los poliploides de los diversos mutantes.

15. El Streptomyces hygroscopicus NRRL 5491 se desarrolla abundantemente en los medios de cultivo empleados de ordinario para cultivar otros organismos del mismo género. Es capaz de crecer a temperaturas entre 20 y 35°C, pero preferentemente alrededor de 28°C, en agar de Czapek, glucosa-asparagina-agar, glicerol-asparagina-agar, almidón-agar y peptona-buey-agar. Además, el organismo se desarrolla muy bien en extracto de levadura-agar, extracto de malta-agar, almidón-sales inorgánicas-agar, harina de avena-agar, harina de avena-tomate-agar y agar de Bennet. Sobre las tajadas
- 20.
- 25.

419160

- de patata no existe micelio aéreo, pero el crecimiento del substrato está bien desarrollado y es de color de ante. En todos los medios, el crecimiento aéreo es al principio blanco y luego grisáceo con manchas negras. Los esporóforos suelen ser compactos, formando una espiral de más de 10 esporas. El crecimiento del substrato es de color amarillo claro hasta casi incoloro y en algunos medios pardo pálido. En ocasiones se produce un pigmento amarillento. El organismo es negativo al H_2S y a la melamina.
- 5.
10. La utilización de los hidratos de carbono por el Streptomyces hygroscopicus NRRL 5491 se estudió en agar para la utilización de carbono (medio 9 del ISP) según el procedimiento estandarizado por el International Streptomyces Project (ISP).
15. Los hidratos de carbono mejor utilizados fueron la D-glucosa, el inositol, la D-fructosa y el D-manitol; hidratos de carbono menos bien utilizados fueron la ramnosa, la rafinosa, la xilosa, el almidón y la arabinosa. Hidratos de carbono no utilizados fueron la sacarosa y la celulosa.
20. Los requisitos ambientales y nutricios para la fermentación del Streptomyces hygroscopicus NRRL 5491 son semejantes a los que se precisan para la producción de antibióticos por medio de otros microorganismos aerobios. Así, la aerobiosis puede ser sostenida en un medio nutricio líquido inoculado con un cultivo estéril que se haya incubado en matraces depositados en máquinas sacudidoras. Para la producción industrial, pueden utilizarse en su lugar depósitos metálicos con aireación interna y agitación mediante paletas. La rapamicina se produce también por cultivo su-
- 25.

419160

- perfficial. El microorganismo necesita como elementos nutritivos carbono asimilable y sustancias orgánicas nitrogenadas. La presencia de sales minerales es deseable. El cultivo se efectúa de la mejor manera cuando el pH inicial del terreno de cultivo se halla entre 6,5 y 7,5, y el pH óptimo gira alrededor de 6,8-7,3.
- 5.

- Las fuentes utilizables de carbono asimilable para la producción del antibiótico son muy diversas, y entre ellas se incluye los azúcares (por ejemplo, glucosa, D-fructosa, D-manitol, maltosa, arabinosa, ramnosa, rafinosa, xilosa, etc.), la dextrina, almidones de diversos tipos de origen, el glicerol (y otros polialcoholes), el quinositol y las grasas animales y vegetales, lo mismo que los ésteres respectivos. Las fuentes de nitrógeno orgánico asimilable que estimulan activamente el crecimiento y favorecen la producción de la rapamicina son sustancias tales como la harina de soja, la harina de algodón y otras harinas vegetales (integrales o parcial o totalmente desgrasadas), harinas de carne o vísceras animales, diversas peptonas, hidrolizados de caseína, hidrolizados de soja, hidrolizados de levadura, lactoalbúmina, glutinas de trigo, residuos solubles de los destiladores, maceraciones de maíz, melazas, urea y aminoácidos.
- 10.
- 15.
- 20.

- Deben incluirse, en concentraciones apropiadas, sales minerales, como los cloruros, los nitratos, los sulfatos, los carbonatos y los fosfatos de sodio, de potasio, de amonio y de calcio. El terreno nutritivo debería contener una serie de oligoelementos como magnesio, hierro, manganeso y zinc.
- 25.

419160

El inóculo del terreno citado para la fermentación se proporciona con un cultivo inclinado, fresco, de Streptomyces higroscopicus.

5. En las condiciones que se han descrito y con la temperatura de cultivo de unos 20 a 35°C (de preferencia, alrededor de 25°C), se obtiene en los depósitos la producción máxima de rapamicina en unos 2 a unos 8 días.

10. Luego puede emplearse una diversidad de métodos para el aislamiento y la purificación de la rapamicina; por ejemplo, extracción con disolventes, cromatografía de partición, cromatografía de gel de sílice, distribución de líquido-líquido en un aparato Craig y cristalización a partir de disolventes. Para la recuperación comercial se prefieren los métodos de extracción con disolvente, porque consumen
15. menos tiempo y resultan menos caros.

En términos generales, puede decirse que la rapamicina es cosechable por uno de los métodos siguientes:

- a) La mezcla de fermentación se extrae con un disolvente prácticamente inmisible con el agua; de preferencia,
20. un alcohol inferior, como el n-butanol, el n-pentanol o la mezcla comercial de pentanoles conocida como "Pentanol" o el n-hexanol; o bien con un alcanoato inferior de alquilo inferior prácticamente inmisible con el agua, como el acetato de etilo, el acetato de butilo, el acetato de amilo o
25. la mezcla asequible en el comercio de acetatos de amilo; o bien con un hidrocarburo alifático halogenado prácticamente inmisible con el agua, como el cloroformo, el dicloruro de metileno o el dicloroetano. Los extractos se secan y se concentran bajo presión reducida, para obtener un residuo oleo

419160

so que a su vez se extrae con un disolvente miscible con el agua, de preferencia un alcohol inferior, como el metanol o el etanol. Los extractos últimamente citados se filtran por tierra de diatomáceas ("Celite") y el filtrado se concentra bajo presión reducida, para obtener un residuo oleoso que contiene rapamicina bruta.

5.

b) La mezcla de fermentación se filtra por una capa de tierra de diatomáceas ("Celite") y la torta de filtro que contiene el micelio se extrae de la manera que se describe en c). El filtrado, o sea la mezcla de fermentación

10.

desprovista del micelio, se extrae varias veces con un disolvente prácticamente inmisible con el agua (por ejemplo, un alcohol inferior, un alcanato inferior de alquilo inferior o un hidrocarburo alifático halogenado como los que se han dado por ejemplos en la sección a). Los extractos

15.

se secan y se concentran bajo presión reducida, para obtener un residuo oleoso que se extrae con un disolvente miscible con el agua (de preferencia, un alcohol inferior, como el metanol o el etanol). Los extractos últimamente citados se tratan de la misma manera que se ha descrito en a), para obtener un residuo oleoso que contiene rapamicina bruta.

20.

c) Se separa de la mezcla de fermentación el micelio y se extrae éste con un disolvente apropiado miscible con el agua (de preferencia, un alcohol inferior, como el metanol o el etanol). Se concentra el extracto por evaporación hasta la fase acuosa, que a su vez se extrae con un disolvente prácticamente inmisible con el agua (como un alcanato inferior de alquilo inferior, un hidrocarburo ali

25.

419160

fático halogenado o un alcohol inferior prácticamente inmiscible con el agua, tal como se ha descrito antes, o bien un hidrocarburo aromático, como el benceno o el tolueno). El último extracto se evapora bajo presión reducida para

5. obtener un residuo oleoso que contiene rapamicina bruta.

La rapamicina bruta obtenida por cualquiera de los procesos descritos en las secciones a), b) ó c) se purifica luego por una diversidad de métodos, tales como, por ejemplo, los que se han descrito antes. Los métodos preferidos incluyen la absorción de la rapamicina bruta sobre un absorbente (por ejemplo, carbón o gel de sílice) a partir de una solución en un primer disolvente prácticamente apolar, seguida por elución con un segundo disolvente más polar que el primero.

- 10.

- 15.

Detalles del invento

La rapamicina es útil como agente antifungoso contra una serie de hongos patógenos; por ejemplo, Candida albicans y otras especies de Candida, Microsporium gypseum, Trichophyton mentagrophytes, Aspergillus sp. y Sporotrichum sp.

- 20.

La actividad inhibidora de la rapamicina es especialmente marcada contra Candida albicans, y este último organismo puede usarse con ventaja para fines de ensayo.

- 25.

La actividad antifungosa de este compuesto es demostrable en las pruebas estandarizadas que se utilizan para esta finalidad; por ejemplo, en las pruebas descritas en "Antiseptics, Disinfectants, Fungicides and Sterilization", G.F. Reddish, editor, 2ª edición, Lea and Febiger, Filadelfia, 1957, o por D.C. Grove y W.A. Randall en "Assay

419160

Methods of Antibiotics", Med. Encycl. Inc., Nueva York
1955.

- Cuando el antibiótico de este invento se emplea como agente antifungoso en los animales de sangre caliente
5. (por ejemplo, las ratas), se le puede utilizar solo o en combinación con vehículos aceptables farmacéuticamente, cuya proporción se determina de acuerdo con la solubilidad y la naturaleza química del compuesto, la vía elegida para la administración y la práctica biológica normal. Por ejemplo,
10. puede administrarse por vía oral una cantidad antifungosamente eficaz del antibiótico en forma sólida que contenga excipientes tales como el almidón, el azúcar, ciertos tipos de arcilla, etc. Del mismo modo, puede administrarse también por vía oral dicha cantidad en forma de soluciones o suspensiones o bien puede inyectarse el antibiótico por vía parenteral. Para la administración parenteral,
15. el antibiótico puede utilizarse en forma de una solución o suspensión estériles que contengan otros solutos o agentes suspensores; por ejemplo, suficiente solución salina o suficiente glucosa para hacer la solución isotónica, sales biliares, acacia, gelatina, monooleato de sorbitán, polisorbato 80 (oleato-ésteres de sorbitol y sus anhídridos, copolimerizados con óxido de etileno), etc.
- 20.

25. La dosis de este antibiótico variará según la forma de administración y el compuesto particular que se elija. Además, variará según el sujeto particular en tratamiento. Por lo general, el tratamiento se inicia con dosis pequeñas, mucho menores que la dosis óptima del compuesto. Luego se aumenta la dosis por pequeños incrementos hasta

419160

- llegar al efecto óptimo en las circunstancias dadas. Por lo general, el compuesto de este invento se administra lo más deseablemente en un nivel de concentración que proporcione generalmente resultados antifungosamente eficaces sin causar ningún efecto secundario nocivo o deletéreo y de preferencia en un nivel que se halle en un intervalo de 1,0 mg aproximadamente a 250 mg aproximadamente por Kg y por día, aunque, como se ha indicado antes, son posibles variaciones. No obstante, para lograr resultados eficaces se emplea lo más deseablemente un nivel de dosificación en la escala de 10 mg aproximadamente a 100 mg aproximadamente por kg y por día.

- Este agente puede emplearse además tópicamente. Para la aplicación tópica, se le puede formular en forma de soluciones, cremas o lociones en vehículos farmacéuticamente aceptables que contengan de 0,1 a 5%, y preferentemente 2%, del agente, y la aplicación tópica puede realizarse en la zona infectada de la piel.

- La rapamicina puede usarse también para limpiar y desinfectar equipo de laboratorio, instrumentos quirúrgicos, locales cerrados o salas de duchas, protegiéndolos de los organismos fungosos sensibles. Para tales fines se prefiere usar soluciones de 0,1 a 10% de rapamicina en un alcohol inferior (de preferencia, metanol), diluidas con 10 a 100 volúmenes de agua que contengan de 0,001 a 0,1% de agente tensioactivo no iónico (por ejemplo, polisorbato 80 de la Farmacopea Norteamericana) inmediatamente antes de aplicarlas a los objetos que hayan de limpiarse y desinfectarse.

419160

Preparación

En una modalidad preferida de este invento, la rapamicina se prepara de la manera siguiente:

5. Se carga un fermentador apropiado con terreno de producción 8KM (véase el Ejemplo 1). Después de la esterilización y el enfriamiento, se inocula el terreno con una primera fase de preparación de inóculo de Streptomyces hygrosopicus.

10. En la mezcla de fermentación se alcanza un título máximo de 20 a 100 microgramos/cc del antibiótico al cabo de 2 a 8 días, y de ordinario al cabo de unos 5 días, según determinación por el método "cup-plate" y con Candida albicans como organismo de ensayo. El micelio se cosecha por filtración con tierra de diatomáceas. Luego se extrae del micelio la rapamicina con un disolvente miscible con el agua (por ejemplo, un alcohol inferior, de preferencia metanol o etanol). A continuación se concentra este último extracto, de preferencia bajo presión reducida, y la fase acuosa resultante se extrae con un disolvente inmiscible con el agua.
15. Un disolvente inmiscible en el agua que se prefiere para este fin es el dicloruro de metileno, aunque pueden usarse también el cloroformo, el tetracloruro de carbono, el benceno, el n-butanol y similares. Concentrando, de preferencia bajo presión reducida, el último extracto, se obtiene el producto bruto en forma de un aceite. El producto puede purificarse todavía más por una diversidad de métodos. Entre los métodos de purificación preferidos existe el de disolver el producto bruto en un primer disolvente prácticamente apolar (por ejemplo, éter de petróleo o hexano) y tratar la solu-
- 20.
- 25.

419160

- ción resultante con un absorbente apropiado (por ejemplo, carbón o gel de sílice) para que el antibiótico quede absorbido en el absorbente. Luego se separa el absorbente y se lava o eluye con un segundo disolvente más polar que el primero (por ejemplo, acetato de etilo, dicloruro de metileno o una mezcla, preferida, de dicloruro de metileno y éter).
5. La concentración consecutiva de las lavazas o el eluato proporciona rapamicina esencialmente pura. Se obtiene ulterior purificación mediante precipitación parcial con un disolvente apolar (por ejemplo, éter de petróleo, hexano, pentano, etc.) a partir de una solución de la rapamicina en un disolvente más polar (por ejemplo, éter, acetato de etilo, benceno, etc.). Todavía se obtiene ulterior purificación mediante cromatografía en columna, de preferencia empleando
10. gel de sílice, y mediante cristalización de la rapamicina en éter.
- 15.

Caracterización

- a) La rapamicina purificada es un compuesto cristalino incoloro, de punto de fusión 183-185°C después de recristalización a partir de éter;
- 20.
- b) La rapamicina es soluble en éter, cloroformo, acetona, metanol y dimetilformamida; muy escasamente soluble en hexano y éter de petróleo; y fundamentalmente bien soluble en agua;
- 25.
- c) la rapamicina muestra una mancha uniforme en las placas de capa delgada de gel de sílice G (E. Merck A.G., de Darmstadt) reveladas con una diversidad de sistemas de disolventes para cromatografía de capa delgada; por ejemplo, éter-hexano 40:60 ($R_f = 0,42$), alcohol isopropílico-benceno

419160

15:85 (Rf = 0,5) y etanol-benceno 20:80 (Rf = 0,43);

d) la rapamicina obtenida de cuatro tandas sucesivas de fermentación dió los valores siguientes en análisis elementales repetidos:

	PROMEDIO				
5. C%	67,24,	66,14,	67,26,	66,72.	66,84
H%	8,93,	8,72,	8,92,	8,9.	8,84
N%	1,39,	1,37,	1,28,	1,38.	1,37

e) La rapamicina muestra los máximos de absorción característicos siguientes en su espectro de absorción ultravioleta (etanol al 95%):

267 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 417), 277 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 541) y 288 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 416);

f) el espectro de absorción de infrarrojo de la rapamicina en cloroformo, reproducido en la figura 1, muestra bandas de absorción características en 3560, 3430, 1730, 15. 1705 y 1630-1610 cm^{-1} .

Otras bandas de absorción de infrarrojo están caracterizadas por los datos siguientes, expresados en centímetros recíprocos, con (s) denotando una banda de intensidad fuerte, (m) denotando una banda de intensidad media y (w) denotando una banda de intensidad débil. Esta clasificación se ha establecido arbitrariamente de manera que una banda se designa como fuerte, (s), si su absorción de pico es mayor de 2/3 del fondo en la misma región; como mediana, (m), si su pico se halla entre 1/3 y 2/3 del fondo en la misma región; y como débil (w), si su pico es menor de 1/3 del fondo en la misma región.

419160

	2990 cm ⁻¹ (m)	1158 cm ⁻¹ (m)
	2955 cm ⁻¹ (s)	1129 cm ⁻¹ (s)
	2919 cm ⁻¹ (s)	1080 cm ⁻¹ (s)
	2858 cm ⁻¹ (s)	1060 cm ⁻¹ (s)
5.	2815 cm ⁻¹ (m)	1040 cm ⁻¹ (m)
	1440 cm ⁻¹ (s)	1020 cm ⁻¹ (m)
	1365 cm ⁻¹ (m)	978 cm ⁻¹ (s)
	1316 cm ⁻¹ (m)	905 cm ⁻¹ (m)
	1272 cm ⁻¹ (m)	888 cm ⁻¹ (w)
10.	1178 cm ⁻¹ (s)	866 cm ⁻¹ (w)

g) el espectro de resonancia magnética nuclear de la rapamicina en deuterocloroformo es el que se reproduce en la figura 2;

h) la concentración inhibidora mínima de la rapamicina para diversos microorganismos es la siguiente:

	Organismos	Rapamicina: (microgramos/cc)
	<u>Candida albicans</u> (5 razas)	0.02 a 0.1
	<u>C. catenulata</u>	< 0.1
20.	<u>C. lipolytica</u>	2.5
	<u>C. stellatoidea</u>	< 0.1
	<u>C. tropicalis</u>	0.1
	<u>C. pseudtropicalis</u>	> 5.0
	<u>C. parapsilosis</u>	< 0.1
25.	<u>C. morrera</u>	< 0.1
	<u>C. intermedia</u>	< 0.1
	<u>M. gypseum</u>	12.5
	<u>T. mentagrophytes</u>	> 1000

419160

i) la rapamicina muestra una DL_{50} (intraperitonealmente en el ratón) de $597.3 \pm 28,1$ mg/kg y una DL_{50} (per os en el ratón) de > 2500 mg/kg.

5. En estudios de protección, se infectaron ratones por inyección endovenosa de G. albicans ATCC 11651. Al cabo de 1, 4 y 24 horas de la infección, se administraron a los ratones 10 mg/kg (por vía subcutánea) de rapamicina. A esta dosis, el 50% de los ratones resultaron protegidos. El tratamiento con 25 mg/kg (por vía subcutánea) proporcionó protección completa. Cuando la rapamicina se administró por vía oral, a 10 mg/kg 4 de cada 10 ratones sobrevivieron y a 25 mg/kg se observó protección completa.

15. Una suspensión (0,2 cc) al 1% de rapamicina en agua que contenía 1,5% de polisorbato 80 (Tween 80) no causó irritación al ser inyectada intradérmicamente en la oreja de un conejo. Del mismo modo, dos gotas de una suspensión al 0,5%, aplicadas al ojo de un conejo, no causaron irritación ninguna.

20. El ejemplo que sigue contribuye a ilustrar este invento.

EJEMPLO 1

Microorganismo

25. El Streptomyces hygroscopicus NRRL 5491 se hizo crecer y se mantuvo en cultivos inclinados de harina de avena-pasta de tomate-agar (T.G. Fridham y col., Antibiotic Annual 1956-1957, Medical Encyclopedia Inc., Nueva York, pág. 947) y en frascos de Roux que contenían el mismo terreno. Se obtuvo buen crecimiento después de 7 días de incubación a 18°C. Se barrieron las esporas de un frasco de Roux

419160

y se las suspendió en 50 cc de agua destilada estéril. Esta suspensión se utilizó para inocular el inóculo de primera fase.

5. El terreno para el inóculo de primera fase consistió en caldo de Emerson (R.L. Emerson y col., J. Bacteriol, 52, 357 -1946-), 0,4%; peptona, 0,4%; cloruro sódico, 0,25%; extracto de levadura, 0,1%; y glucosa, 1%; pH, 7,0; los frascos que contenían el terreno anterior se inocularon con 1% de la suspensión de esporas descrito antes. Los frascos
10. inoculados se incubaron a 28°C durante 30 horas en una sacudidora recíprocativa ajustada a 65 rpm. (carrera de 4 pulgadas).

Fase de producción

15. La fase de producción se realizó en fermentadores de 250 litros New Brunswick modelo F-250, equipados con sistema automático de adición de antiespumante y dispositivo regulador-registrador del pH. Se cargaron los fermentadores con 160 litros de un terreno de producción acuoso (8 KM) constituido por los ingredientes siguientes:

20.	almidón soluble	1,0	%
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5	%
	K_2HPO_4	0,5	%
	glucosa (Cerelese)	1,5	%
	MgSO_4	0,025	%
25.	ZnSO_4	0,005	%
	MnSO_4	0,001	%
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,002	%
	CaCO_3	0,2	%
	melaza "Blackstrap"	0,5	%

419160

- caseína hidrolizada (NZ-Case,
de la Sheffield Chemical, de
Norwich, Nueva York) 0,5 %
5. aceite de lardo (Larex nº 1,
de la Swift Canadian Co.,
de Toronto) 0,2 %
- pH 7,1 a 7,3

- Se esterilizaron los fermentadores a 121°C duran-
te 45 minutos, se enfriaron y se inocularon con un frasco
10. (2% de inóculo) de inóculo de la primera fase. Temperatura
de incubación: 28°C; ventilación: 0,5 volumen/volumen/minu-
to; agitación: 250 r.p.m.

- Se alcanzó en cinco días un título de unos 20 mi-
crogramos/cc, determinado por ensayo microbiológico en pla-
15. cas de agar sembradas con Candida albicans. En este momento
se detuvo la fermentación.

La extracción y el aislamiento del antibiótico se
realizaron por uno de los métodos siguientes:

Extracción

20. a) Se extrajo la mezcla de fermentación por dos ve-
ces con 1 v/v de n-butanol y los extractos butanólicos, com-
binados, se lavaron con 1 v/v de agua, se secaron con sul-
fato sódico anhidro y se evaporaron hasta sequedad bajo pre-
sión reducida, lo que dió un residuo. Se extrajo el residuo
25. oleoso tres veces con dos litros de metanol y los extractos
metanólicos, combinados, se pasaron por tierra de diatomá-
ceas ("Celite") y se evaporaron hasta sequedad, lo que dió
un residuo oleoso que contenía rapamicina bruta.
- b) Se filtró la mezcla de fermentación en tierra de

419160

diatomáceas ("Celite") y el filtrado se extrajo dos veces con 1 v/v de acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo se lavaron con 1 volumen de agua, se secaron con sulfato sódico anhidro y se evaporaron bajo presión reducida, hasta sequedad. El residuo se extrajo dos veces con 1 litro de metanol, y los extractos metanólicos se evaporaron bajo presión reducida, lo que proporcionó un residuo oleoso que contenía rapamicina bruta.

5.

c) Se lavó con 1 a 2 volúmenes de agua el micelio obtenido tal como se ha descrito en la sección b). El micelio lavado se extrajo tres veces con 5 volúmenes de metanol por peso de micelio húmedo cada vez y los extractos metanólicos se centrifugaron y concentraron bajo presión reducida hasta pequeño volumen de una fase acuosa que contenía alrededor de 10% v/v de metanol. Esta fase acuosa se extrajo tres veces con 1 volumen de cloruro de metileno y los extractos de cloruro de metileno se combinaron, se secaron con sulfato sódico anhidro y se evaporaron, lo que dió un residuo oleoso.

15.

El residuo oleoso se diluyó con 1 volumen de éter de petróleo y se añadió 30% peso/volumen de carbón (Darco G60). Se agitó la mezcla por media hora y se la filtró. El carbón, que retenía fundamentalmente todo el producto, fué lavado dos veces con un volumen de éter de petróleo y eluído tres veces con 5 volúmenes (respecto al peso del carbón) de una mezcla de cloruro de metileno y éter (50:50). Los extractos de cloruro de metileno y éter se evaporaron hasta sequedad, y el residuo se disolvió en un poco de éter. El producto bruto se obtuvo por precipitación a partir de la

20.

25.



solución etérea con éter de petróleo frío.

- Alternativamente, el residuo oleoso obtenido por cualquiera de los procesos de extracción que se han descrito antes se diluyó con 1 volumen de hexano y se hizo pasar por una columna preparatoria de gel de sílice G. El producto se adsorbió en la columna. El gel de sílice G que contenía el producto adsorbido se lavó con varios volúmenes de hexano y mezclas 50:50 de hexano-éter. De la columna, el producto se eluyó con éter. El eluyente etéreo se evaporó hasta pequeño volumen y, precipitando de la solución etérea con éter de petróleo frío, se obtuvo producto bruto.
- 5.
- 10.

Purificación

- El producto bruto mencionado antes se purificó todavía por cromatografía en columna de gel de sílice G Merck (50:1 peso/volumen) en hexano-éter (50:50). De la columna, el producto se eluyó con éter, y el eluato etéreo se evaporó hasta pequeño volumen. Con éter de petróleo se precipitó rapamicina purificada. Las muestras analíticas se prepararon por cristalización a partir de éter; punto de fusión, 183-185°C.
- 15.
- 20.

REIVINDICACIONES

- Descrito el objeto del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención, las siguientes reivindicaciones con prioridad de la solicitud de patente estadounidense serial nº 293.699 del 29 de septiembre de 1972.
- 25.

1.- Un procedimiento para la preparación de rapamicina, caracterizado por cultivarse Streptomyces hygrocopicus NRRL 5491 en un terreno nutritivo acuoso que contiene una fuente de carbono y nitrógeno asimilables y sales

419160



419160

28 JUN 1973

minerales, en condiciones aerobias, hasta que en la mezcla de fermentación exista actividad antifungosa substancial por la producción de rapamicina, y aislarse la rapamicina de dicha mezcla de fermentación.

5. 2.- Un procedimiento como se define en la reivindicación 1, caracterizado por efectuarse el cultivo a temperatura en la escala de 20 a 35°C y con un pH inicial entre 6,5 y 7,5.

10. 3.- Un procedimiento como se define en la reivindicación 1, caracterizado por efectuarse el aislamiento de la rapamicina por extracción de la mezcla de fermentación con un disolvente prácticamente inmisible con el agua, concentración del extracto así obtenido, para obtener un residuo, extracción del residuo con un disolvente miscible con el agua, filtración de este último extracto, concentración del filtrado y purificación de la rapamicina bruta así obtenida.

15. 4.- Un procedimiento como se define en la reivindicación 3, caracterizado por efectuarse la purificación de la rapamicina bruta por disolución de dicha rapamicina bruta en un primer disolvente esencialmente apolar y tratamiento de la solución resultante con un absorbente, separación del absorbente, elución de la rapamicina del absorbente con un segundo disolvente, más polar que el primero, y concentración del eluato.

20. 5.- Un procedimiento como se define en la reivindicación 1, caracterizado en que el aislamiento de la rapamicina se efectúa separando el micelio de la mezcla de fermentación, extrayendo la mezcla de fermentación exenta

- 25.





- de micelio con un disolvente inmiscible con el agua, concentrando el extracto así obtenido, para obtener un residuo, extrayendo el residuo con un disolvente miscible con el agua, filtrando este último extracto, concentrando el filtrado y purificando la rapamicina así obtenida.
5. 6.- Un procedimiento como se define en la reivindicación 5, caracterizado en que la purificación de la rapamicina bruta se efectúa disolviendo dicha rapamicina bruta en un primer disolvente esencialmente apolar y tratando la solución resultante con un absorbente, separando el absorbente, eluyendo la rapamicina del absorbente con un segundo disolvente, más polar que el primero, y concentrando el eluato.
10. 7.- Un procedimiento como se define en la reivindicación 1, caracterizado en que el aislamiento de la rapamicina se efectúa separando el micelio de la mezcla de fermentación, extrayendo el micelio con un disolvente miscible con el agua, concentrando el extracto así obtenido hasta la fase acuosa, extrayendo la fase acuosa con un disolvente inmiscible con el agua, concentrando este último extracto y purificando la rapamicina bruta así obtenida.
15. 20. 8.- Un procedimiento como se define en la reivindicación 7, caracterizado en que la purificación de la rapamicina bruta se efectúa disolviendo dicha rapamicina bruta en un primer disolvente esencialmente apolar y tratando la solución resultante con un absorbente, separando el absorbente, eluyendo la rapamicina del absorbente con un segundo disolvente, más polar que el primero, y concentrando el eluato.
- 25.





419160

419160

9.- Un procedimiento para la preparación de rapamicina.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva, que consta de 23 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a 28 de Septiembre de 1973

p. a.

JAIME ISERN

p. p.

Firmado: JOSE F. NIETO

MLA



419160

419160

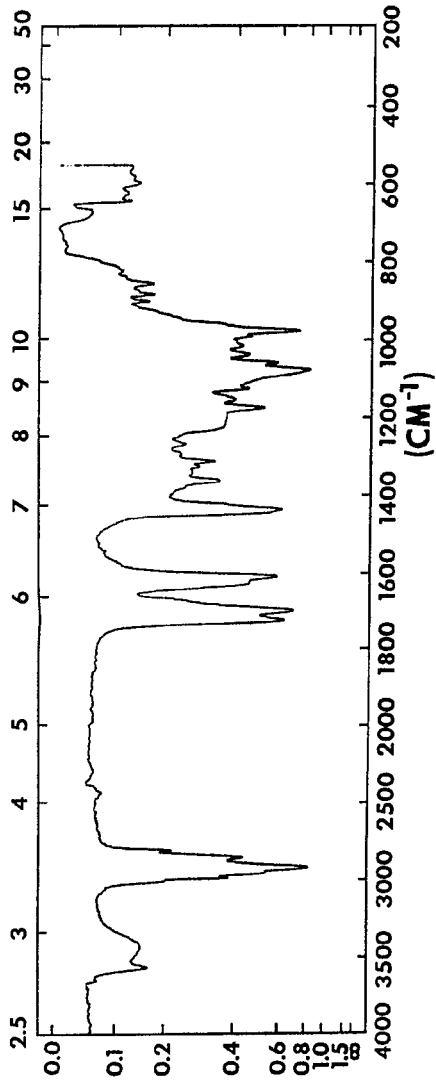


FIG. 1

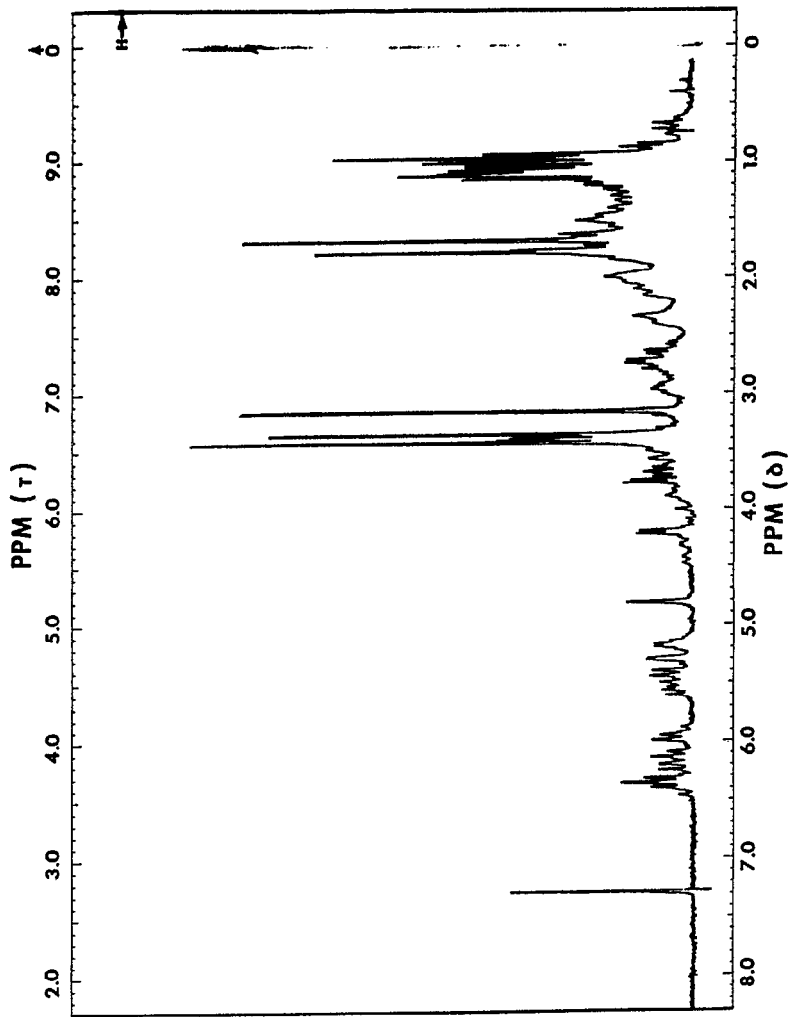


FIG. 2

MADRID, a 28 SET. 1973

J. d. JAIME ISERN
P. P.

[Handwritten signature]

Firmado: estude copia

419160

FIG.1

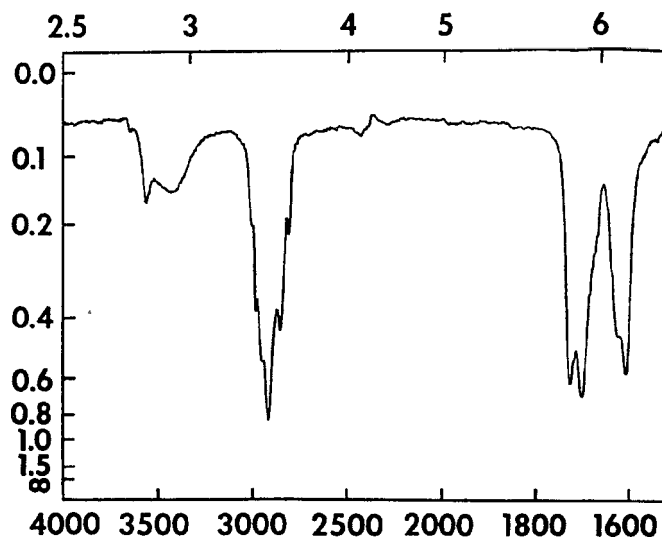
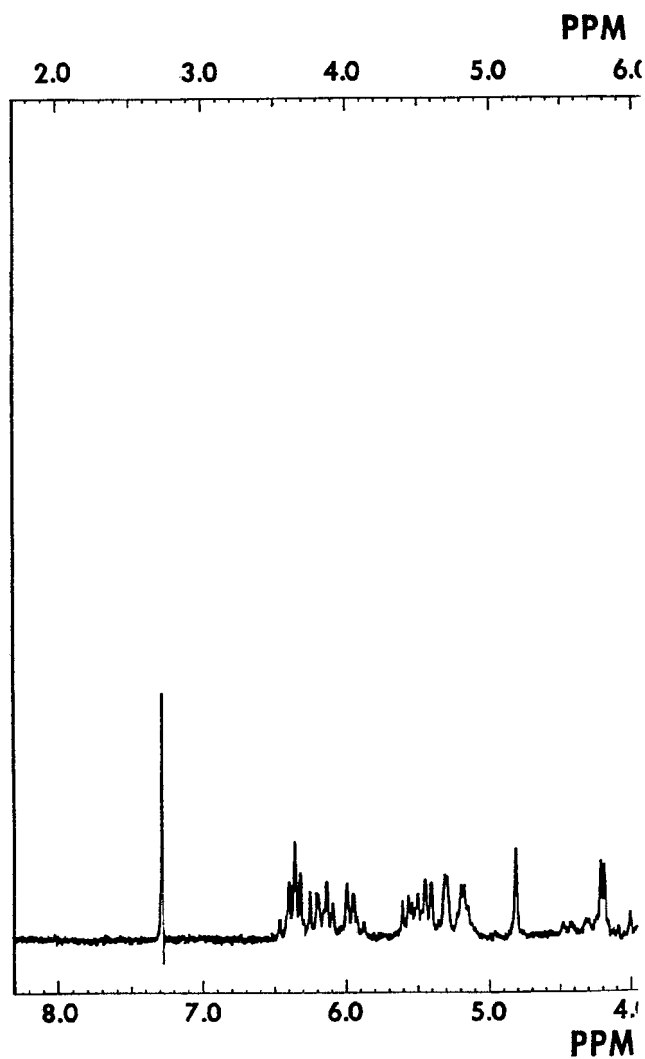


FIG.2



MADRID, a 28 SET. 1973

p. a. JAIME ISERN
P. P.

Firmado: FELIPE PRIET

419 160

