



- 2 ABR. 1949

187692

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

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

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de MERCK & CO., INC., entidad norteamericana, establecida en 126 East Lincoln Avenue, Rahway, Nueva Jersey, Estados Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO DE PREPARAR UN CONCENTRADO GRISELINICO".

- 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 -

Este invento se refiere a sustancias terapéuticamente valiosas, y especialmente a sustancias obtenidas por el cultivo de una raza del micro-organismo Streptomyces griseus en un medio adecuado.

5

El invento tiene por objeto un procedimiento



187692

para recuperar un producto de elaboración del Streptomyces  
griseus a partir de un caldo de cultivo que lo contiene, tra-  
tando dicho caldo de cultivo con material adsorbente, y elu-  
yendo el adsorbato del mismo con una solución de piridina  
5 acuosa o una piridina acuosa sustituida con un alcohol in-  
ferior.

De acuerdo con un procedimiento descrito en  
la publicación de Reynolds, Schatz y Waksman, Proceedings  
of the Society of Experimental Biology and Medicine, 64,  
10 pags. 50 a 54, (1947), pueden adsorberse sustancias activas  
desde un caldo de cultivo de este tipo por medio de carbón  
activado y eludirse luego del carbón con una solución de  
alcohol etílico al 9%. Se ha comprobado que la elución con  
alcohol etílico da como resultado la recuperación aproximada  
15 de sólo una mitad de la actividad total.

Se ha descubierto ahora, de acuerdo con el  
presente invento, que las sustancias activas, después de ser  
adsorbidas del caldo de cultivo mediante carbón activado,  
pueden ser eluidas del carbón con una solución acuosa de  
20 piridina o de  $\alpha$ -picolina. El eluato así obtenido contiene  
aproximadamente 75% del material activo adsorbido.

De acuerdo con una realización preferida de  
nuestro invento, el micro-organismo Streptomyces griseus es  
cultivado en un medio que contiene extracto de carne, una  
25 peptona (una digestión enzimática de caseína), cloruro de  
sodio y agua. El caldo de cultivo puede tratarse con un  
auxiliar filtrante de diatomeas para eliminar el micelio  
y otra materia extraña, y la sustancia activa adsorberse



187692

de la mezcla de reacción por adición de carbón activado. Hemos obtenido los mejores resultados, sin embargo, acidificando primero el caldo de cultivo, tratando el medio acidificado con un auxiliar filtrante de diatomáceas y ajustando luego el pH del filtrado a entre 7.5 y 8 antes de la adición de carbón activado. El carbón activado que contiene la sustancia activa es separado por filtración y eluido con una solución acuosa de piridina o  $\alpha$ -picolina. Se obtiene un concentrado griseínico sólido concentrando el eluato a sequedad a presión reducida.

Alternativamente, el concentrado sólido puede recuperarse y seguirse purificando por concentración del eluato a pequeño volumen y adición de unos diez volúmenes de alcohol. El precipitado que se forma se separa luego y el filtrado se añade a éter seco determinando la precipitación de la griseína que se recupera y seca.

El concentrado griseínico sólido es una sustancia parda amorfa que es soluble en agua y que tiene una actividad de al menos 200 unidades por mgr. determinada de acuerdo con el método de dilución con Escherichia coli descrito en la publicación de Reynolds y otros antes citada. Este producto es útil como agente terapéutico y puede usarse también como producto intermedio para preparar otras sustancias de valor terapéutico.

Considerado en algunos de sus aspectos más amplios, el nuevo procedimiento de acuerdo con el presente invento comprende adsorber del caldo de cultivo la griseína obtenida cultivando una raza del micro-organismo Streptomyces



1 8 7 6 9 2

griseus en un medio nutritivo, eludir el adsorbato con una solución acuosa de piridina o una solución acuosa de una piridina sustituida con alcohol inferior, tal como  $\alpha$ -picolina, y recuperar la sustancia activa del eluato.

5 Los siguientes ejemplos ilustran métodos de realizar el presente invento, pero ha de entenderse que estos ejemplos se dan primordialmente a modo de ilustración y no de limitación.

Ejemplo 1

10 Una solución de 2925 litros de caldo de cultivo que posee una potencia microbiológica de unas 200 unidades /ml. se forma por cultivo de una raza del micro-organismo Streptomyces griseus en un medio nutritivo adecuado. Este  
caldo de cultivo se acidifica a un pH de aprox. 2.5 a 3.0  
15 con ácido fosfórico. Como unos 22.5 Kgs. de auxiliar filtrante diatomáceo se añaden a la mezcla y ésta se agita y se filtra. La torta de filtro se lava con unos 450 litros de agua. El filtrado y el lavado se combinan, se neutralizan  
a aprox. un pH de 7.5 a 8.0 con hidróxido sódico 30% y se  
20 filtran. Al filtrado se le añaden aproximadamente 11.4 Kgs. de carbón activado. La mezcla se agita durante 1/2 hora y luego se filtra. La torta del filtro se lava haciendo una papilla con unos 450 litros de agua, seguida por filtración. La torta de filtro que comprende carbón y material activo  
25 adsorbido se añade a la mezcla de aproximadamente 545 litros de agua y 180 litros de piridina o  $\alpha$ -picolina. La mezcla se agita durante una 1/2 hora. El carbón agotado se separa por filtración y se lava por devolución al ciclo a través



187632

del filtro-prensa de unos 180 litros de piridina 25% o  $\alpha$ -picolina durante 15 minutos. El eluato y las lavaduras combinados se evaporan a presión inferior a la atmosférica y a una temperatura inferior a 40°C hasta unos 27 a 31 litros y se diluyen con aproximadamente 295 litros (lo volúmenes) de alcohol metílico. La solución metílico-acuosa se clarifica por filtración y la sustancia activa, junto con material inerte, es precipitada por adición en porciones de unos 45 litros a tandas sucesivas de unos 136 litros de éter seco. El material insoluble se elimina por filtración y se seca en un secador de vacío. El rendimiento de toda la tanda es de unos 1937 grs. de un sólido pardo, con una potencia microbiológica de unas 320 unidades griseínicas/mgr.

Ejemplo 2

Aproximadamente 15 litros de un caldo de cultivo que contienen 1.1 millones de unidades de griseína de actividad total se forman por cultivo de una raza del microorganismo Streptomyces griseus en un medio que contiene extracto de carne, una peptona (una digestión enzimática de caseína), cloruro de sodio y agua. Este caldo se acidifica a un pH 3 con ácido fosfórico 85%. La mezcla se filtra y el filtrado se ajusta a pH 8 con solución al 30% de hidróxido sódico. A esta solución se le añaden 50 grs. de carbón activado. La mezcla se agita, se filtra y la torta de filtro se lava con un litro de agua. La torta de filtro, que comprende carbón y material activo adsorbido, se pone en suspensión en unos 1260 cc. de una solución de  $\alpha$ -picolina (25 ml. de  $\alpha$ -picolina diluida a 100 ml. con agua). La mez-



187692

5  
10  
15  
20  
25

cla se agita y luego se filtra. El filtrado que tiene una potencia total de 610.000 unidades (55% de la actividad del caldo) se evapora a una presión inferior a la atmosférica y a una temperatura por debajo de 40°C. 3 ml. del concentrado así obtenido se diluyen con 10 volúmenes de alcohol metílico y el precipitado que se forma se separa por centrifugación. El filtrado se añade a 60 ml. de éter anhidro, el precipitado resultante se separa por filtración y se seca a una presión inferior a la atmosférica. El producto recuperado pesó 0.03 grs. y tenía una actividad antibiótica de aproximadamente 194 unidades/ml.

### Ejemplo 3

15  
20

Unos 1290 ml. de caldo de cultivo con una actividad de 479 unidades griseínicas/ml. se forma por cultivo de una raza del micro-organismo Streptomyces griseus en un medio nutritivo. Este cultivo se filtra a través de un auxiliar de filtro de diatomáceas para separar el micelio. El filtrado resultante se agita durante 1/2 hora con 13 grs. de carbón activado que luego se separa por filtración y se lava con 130 ml. de agua.

25

La mitad del adsorbato así obtenido se agita con 65 ml. de piridina acuosa 5% durante 15 minutos y luego se separa por filtración. El adsorbato en carbón se eluye luego análogamente con una solución de piridina al 10%, primero, y luego con una al 50%, respectivamente. Los filtrados individuales se concentraron a presión reducida hasta un residuo cuyos pesos y actividades se indican a continuación. La cantidad total de griseína recuperada fué de 74%.



187632

<u>Eluato</u>	<u>Peso del residuo</u>	<u>Actividad</u>
Piridina 5%	455 mgrs.	300 u/mgr.
Piridina 10%	260 mgrs.	400 u/mgr.
Piridina 50%	176 mgrs.	129 u/mgr.

5 Al llevar a la práctica el presente invento pueden introducirse modificaciones sin apartarse por ello del espíritu y del alcance del mismo, y el invento ha de considerarse limitado solamente por las reivindicaciones anejas.

10 Esta solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América el 3 de abril de 1948, bajo el número 18,848, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

- O - N O T A - O -

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:

20 1ª. - El procedimiento de recuperar un producto de elaboración de Streptomyces griseus a partir de un caldo de cultivo que lo contiene, que comprende tratar dicho caldo de cultivo con material adsorbente, y eluir el adsorbato del mismo con una solución de piridina acuosa o una piridina acuosa sustituida con alcohol inferior.

2ª. - El procedimiento según se reivindica



187692

en el punto 1º, en el cual la piridina alcohólica inferior es  $\alpha$ -picolina.

5 3º. - El procedimiento según se reivindica en los puntos 1 y 2, que incluye concentrar dicho eluato a sequedad.

4º. - El procedimiento según se reivindica en los puntos 1 a 3, en el cual el material adsorbente es carbón activado.

10 5º. - El procedimiento según se reivindica en los puntos 1 a 4, en el cual el caldo de cultivo se obtiene cultivando una raza del micro-organismo Streptomyces griseus en un medio nutritivo.

15 6º. - El procedimiento según se reivindica en los puntos 1 a 5, que incluye acidificar el caldo de cultivo antes del tratamiento con el material adsorbente, filtrar luego el caldo de cultivo acidificado, y neutralizar después y filtrar el caldo de cultivo.

20 7º. - El procedimiento según se reivindica en los puntos 1, 2 y 4 a 6, que incluye concentrar el eluato a un pequeño volumen, diluir el concentrado con un alcohol alifático inferior, filtrar la mezcla, añadir un disolvente miscible al filtrado en el cual es insoluble el material activo, y recuperar el precipitado así formado.

25 8º. - El procedimiento según se reivindica en el punto 7º, en el cual el alcohol alifático inferior es alcohol metílico.

9º. - El procedimiento según se reivindica en los puntos 7 y 8, en el cual el disolvente miscible es éter.



187632

10º. - El procedimiento en esencia como se ha descrito en esta Memoria.

11º. - Un procedimiento de preparar un concentrado griseínico.

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

Esta Memoria consta de nueve hojas escritas por una sola cara.

Madrid,

12 JUL. 1949

P. A.

Alberto de Elzaburu  
Por Poder