

189725

P. 7580.-



189725

14 SEP. 1949

MEMORIA DESCRIPTIVA

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

1^{er} CERTIFICADO DE ADICION en España, por "MEJORAS INTRODUCIDAS EN EL OBJETO DE LA PATENTE PRINCIPAL" Nº. 187.274, presentada el 2 de Marzo de 1949, que recae sobre:

"Un procedimiento de recuperar estreptomocina de soluciones de la misma".

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

El presente invento se refiere a la recuperación de estreptomocina desde sus soluciones obtenidas por la propagación de micro-organismos productores de estreptomocina en medios nutricios adecuados.

5

Con más particularidad, este invento es un perfeccionamiento o modificación del invento expuesto en la



189725

Memoria de la Patente N^o.187.274. Esta Patente describe un procedimiento para la recuperación de estreptomina desde sus soluciones acuosas poniendo en contacto una solución .
acuosa de estreptomina con una resina de permutación iónica
5 ca que deriva su capacidad permutadora de grupos carboxílicos, con lo cual dicha estreptomina es adsorbida sobre dicha resina, y eluyendo luego dicha resina para separar la estreptomina adsorbida.

La mejora o modificación de acuerdo con el
10 presente invento consiste en un procedimiento de recuperar estreptomina desde sus soluciones, que comprende poner en contacto una solución acuosa de estreptomina con una resina de permutación iónica del tipo carboxílico formada por co-polimerización de un compuesto divinílico y un ácido
15 polimerizable, con lo cual dicha estreptomina es adsorbida sobre dicha resina, y eluir luego dicha resina para separar la estreptomina adsorbida.

Las resinas obtenidas por co-polimerización de compuestos divinílicos con ácidos polimerizables se caracterizan por la cualidad común de tener su capacidad de
20 permutación iónica dependiente de grupos carboxílicos en la molécula de resina. En la práctica del presente invento, preferimos usar un co-polímero de ácido acrílico o metacrílico y benceno divinílico, ya que tales resinas poseen un
25 mayor número de grupos carboxílicos por unidad de peso y, como resultado de ello, una mayor capacidad para adsorber iones. Hemos comprobado, sin embargo, que la capacidad de las resinas de permutación iónica para adsorber estreptomi-



189725

dina no depende sólo del número de grupos polares en un peso o volumen dados de resina. Depende también de la porosidad de la resina porque en una resina densa solamente los grupos polares sobre la superficie exterior de la partícula de resina son capaces de reaccionar con el antibiótico, al paso que en el caso de una resina de estructura porosa, la molécula de estreptomina penetrará, al menos parcialmente, en los poros de la resina y reaccionará con grupos polares en el interior de la partícula de resina.

En co-polímeros de ácidos polimerizables y compuestos divinílicos, la porosidad depende en gran medida del grado de enlace transversal comunicado por el componente divinílico. En estos copolímeros, el componente divinílico contribuye a la insolubilidad en agua y, en cierto grado, a la dureza de la resina, pero, al mismo tiempo, disminuye la porosidad de la resina. Por tanto, al practicar el presente invento con este tipo de resina de permutación iónica, es deseable usar una resina que contenga la mínima cantidad de compuesto divinílico que produzca las propiedades físicas requeridas de un material de permutación iónica.

Las resinas de permutación iónica que hemos comprobado son las más eficaces en la práctica de nuestro invento, son co-polímeros de ácido acrílico y metacrílico y benceno divinílico, en los cuales el componente de benceno divinílico constituye desde 2 1/2 a 5% de la composición de la resina. Tales resinas tienen una capacidad en extremo grande para la estreptomina y en algunos casos



189725

adsorberán su propio peso de estreptomocina desde el caldo. Su capacidad excede en treinta veces la capacidad de un peso igual de los adsorbentes de carbón y desde diez a treinta veces la capacidad adsorbente de las resinas permutadoras del tipo de ácido sulfónico. Al hacer la resina pueden usarse cantidades mayores de benceno divinílico, pero sacrificando su capacidad, no lográndose ventajas al ir más allá de un contenido de 10% de benceno divinílico.

Para la adsorción de estreptomocina preferimos tener la resina en la forma de su sal sódica ya que la sal sódica es de uso económico, es sustituida fácilmente por la estreptomocina y no es tóxica. Otros metales monovalentes son el equivalente sustancial del sodio en la operación, pero no son de uso tan económico. La forma de sal amónica de la resina es nuestra segunda elección. Puede usarse también la resina en forma de su sal con metales divalentes, aunque estos metales no son sustituidos con tanta facilidad por la estreptomocina como lo son los iones monovalentes. La forma de la sal cálcica de la resina es de capacidad particularmente baja para la estreptomocina y debe ser evitada, a menos que se añada al caldo un agente secuestrador para ayudar a la sustitución. Las formas de sal de magnesio y de sal de cobre tienen capacidades ligeramente inferiores a la de la forma de sal de metal monovalente. Las resinas pueden usarse también en la forma hidrógeno o en una forma mixta en la cual algunos de los grupos carboxílicos están en forma de sal y algunos en la forma hidrógeno.



189725

El pH del caldo en contacto con la resina debe estar por encima de 4,5 y, con preferencia, aproximadamente en el punto neutro. Cuando la resina se usa en forma de una sal de una base más fuerte, tiene lugar dentro de la columna un aumento del pH, particularmente si se emplea un caldo ácido. Por consiguiente, incluso si el caldo tiene un pH inferior a 4,5, su pH será llevado rápidamente a la gama operativa mediante una neutralización de la acidez en exceso por la resina de permutación. Sin embargo, en la medida en que la resina se usa para neutralizar la acidez, no queda disponible para la adsorción de estreptomina y, por consiguiente, es preferible neutralizar cualquier acidez en exceso por otros medios. Las resinas carboxílicas adsorberán estreptomina desde caldos que son muy alcalinos, y parece que el límite superior operable de pH es determinado solamente por la estabilidad de la estreptomina. Aunque no es probable que se encuentre en la práctica un caldo de pH tan elevado como 11.5, la estreptomina puede ser separada incluso desde un caldo de este elevado pH. En tal caso, sería preferible usar la resina en la forma hidrógeno.

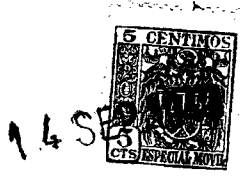
Se ha observado también que, aun cuando la presencia de iones de sodio en los caldos de fermentación no afecta de modo material a la capacidad de los permutadores carboxílicos para la estreptomina, la presencia de algunos otros iones, especialmente los iones de calcio, tiene un efecto señalado. Por consiguiente, en aquellos casos en que una elección de condiciones de fermentación



1 8 9 7 2 5

5 pudiera llevar a una elevada concentración de cationes interferentes, es deseable eliminar el efecto interferente de tales iones por dilución, por mezcla con un agente sequestrador, o eliminando los iones mismos por precipitación o sustitución con iones de sodio.

10 Al llevar a cabo el procedimiento según el presente invento, el caldo de fermentación que contiene la estreptomycin, después de operaciones tales como filtración y regulación del pH que puedan ser necesarias o deseables, es puesto en contacto con una resina de permutación iónica del tipo carboxílico formada por la co-polimerización de un compuesto divinílico con un ácido polimerizable. Esto se realiza, con preferencia, haciendo pasar el caldo a través de una o más columnas de la resina. Cuando se usa 15 una sola columna de resina, la operación de adsorción puede ser interrumpida cuando aparece estreptomycin en el líquido que abandona la columna. En este momento, la capacidad de la columna para adsorber estreptomycin no se utiliza en su plenitud. Cuando la operación de adsorción se 20 continúa más allá de este punto, ocurre escape de estreptomycin, pero son adsorbidas cantidades mayores por la resina. El caldo que abandona la columna parcialmente agotada puede hacerse pasar a través de una segunda columna de resina nueva y la primera columna puede continuar operando hasta 25 que no se adsorba más estreptomycin. Haciendo funcionar dos o más columnas de este modo y alternando el flujo a través de las columnas de modo que el escape de una columna parcialmente agotada pase a través de una capa de resina



189725

nueva, la plena capacidad de la resina para la estreptomina puede utilizarse sin pérdidas por escapes.

Una vez que se ha hecho pasar agua a través de la columna agotada para eliminar el caldo residual, la estreptomina adsorbida es recuperada haciendo pasar a través de la columna una solución acuosa de un electrolito. Preferimos una solución acuosa de un ácido, particularmente de un ácido inorgánico energético, tal como el ácido clorhídrico. En lugar de una solución acuosa de un ácido, puede utilizarse una solución de metanol, o una solución que contenga tanta agua como metanol. Las resinas de permutación iónica del tipo carboxílico de acuerdo con el presente invento, tienen una afinidad tan fuerte para el hidrógeno, que la estreptomina puede separarse fácilmente de la resina por medio solamente de un ligero exceso de ácido fuerte. El ácido separará también de la resina cualesquiera iones metálicos que no fueron sustituidos por la estreptomina durante la operación de adsorción y por consiguiente, al eluir se obtiene una solución acuosa ligeramente ácida de estreptomina que también contiene algunas sales metálicas. Cuando la operación de adsorción se realiza como antes se ha descrito, de modo que se utilice la mayor parte de la capacidad de permutación de la resina, la cantidad de sales metálicas es tan pequeña como para no presentar dificultades de tratamiento. La estreptomina puede recuperarse de esta solución por neutralización, concentrando luego por evaporación, con preferencia, a presión reducida hasta un pequeño volumen o hasta sequedad, recogiendo el

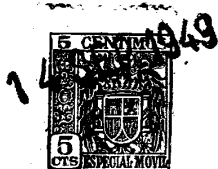


189725

residuo en metanol u otro disolvente que disuelva la estreptomina pero no cantidades apreciables de las sales presentes, separando las sales por filtración, precipitando la estreptomina desde su solución en metanol por la adición de acetona u otro precipitante adecuado y, finalmente, filtrando y secando. La estreptomina precipitada así obtenida se convierte fácilmente en la sal compleja cristalizada de cloruro de calcio disolviendo dicho producto en metanol y añadiendo la cantidad requerida de cloruro de calcio, como se ha descrito en esta técnica.

Quando se usa ácido para eluir, la resina se deja en la forma hidrógeno y, para convertirla a la forma sódica, se hace pasar una solución acuosa de hidróxido sódico a través de la columna o se deja que quede estacionaria en la columna. Después de lavada para separar la solución de regeneración, la columna está lista para su nuevo uso en la adsorción de estreptomina.

Nuestra práctica preferida es, como antes se ha descrito, un ciclo de tres operaciones de adsorción, elución y regeneración realizadas en columnas de resina a través de las cuales pasan en sucesión el caldo de fermentación, la solución eluyente, y la solución regenerante. La operación en columnas, sin embargo, no es esencial del procedimiento y las mismas tres operaciones pueden realizarse en cualquier tipo de aparato en el cual las soluciones y la resina puedan ser puestas en contacto. Es evidente también que, cuando la resina se usa en su forma hidrógeno para adsorber estreptomina, la opera-



189725

ción de elución con ácido sirve también para regenerar la resina. Debe mencionarse asimismo que la solución de cloruro de calcio es un material eluyente completamente eficaz y permite la fácil recuperación de estreptomina relativamente pura directamente desde el eluato por operaciones corrientes de cristalización. En este caso, la resina está en la forma de calcio después de la elución y la regeneración a la forma sodio puede realizarse haciendo pasar una solución de cloruro de sodio a través de la columna.

10 Los siguientes ejemplos se dan para ilustrar el invento:

Ejemplo 1.

15 Se hizo con agua una papilla de un copolímero granular de ácido metacrílico y benceno divinílico que contenía 5% de benceno, y luego se colocó en una columna de adsorción adecuada. Esto proporcionó una capa de resina adsorbente de aproximadamente 7.5 cm. de altura.

20 La resina se lavó con ácido clorhídrico 2.5 N y luego con agua. Luego se convirtió en el ciclo amónico por la adición de una solución de hidróxido amónico 2.5 N, seguida por lavado de nuevo con agua. Se produjo hinchazón cuando la resina se convirtió al ciclo amónico, dando una columna con una capa resultante de aproximadamente 12.5 cm. de altura. La columna se lavó luego a reflujo con agua hasta que el pH del líquido efluente era aproximadamente 25 de 10.5. La columna quedó entonces lista para su uso en la adsorción de estreptomina desde soluciones acuosas del agente antibiótico.



189725

El caldo filtrado resultante de la propagación de Streptomyces griseus en un medio líquido que contiene nutrientes para el micro-organismo recibió un tratamiento preliminar de clarificación y luego fué suministrado a la columna de adsorción fluyendo por gravedad. Se creó sobre la columna una carga de líquido de aproximadamente 90 cm., y la velocidad de flujo se ajustó para proporcionar un período de contacto de un minuto entre la resina y el caldo.

Al final del ciclo de adsorción, la columna recibió un lavado de desplazamiento con agua, y el nivel del líquido se dejó descender hasta la parte superior de la capa de resina. La solución eluyente, ácido clorhídrico de concentración de 1 a 1.5 N se aplicó luego a la parte superior de la columna y el efluente se recogió a medida que salía de la columna. Cuando las últimas fracciones de eluato eran muy ácidas (por debajo de un pH de 1.0), se neutralizaron inmediatamente por adición de solución de hidróxido sódico 2.5 N.

El eluato neutralizado se concentró a presión reducida hasta un pequeño volumen, se diluyó por adición de metanol, se filtró y la solución en metanol se precipitó. El producto sólido se separó por filtración, y luego se secó a presión atmosférica reducida a la temperatura ambiente. Era estreptomycinina de calidad terapéutica satisfactoria.

Después de terminada la elución, la columna se lavó con una cantidad adicional de ácido clorhídrico.



189725

co 2.5 N, seguido por lavado con agua. La columna se regeneró luego con solución de hidróxido amónico por tratamiento como arriba se ha descrito, y quedó lista para su nuevo uso.

5 Referido a la cantidad de estreptomina adsorbida por la resina, el rendimiento de estreptomina después de la elución fué de 96%, la potencia del producto era de 500 unidades por miligramo, y las pérdidas en caldo efluente fueron solamente de 1.6%.

10 Ejemplo 2.

15 Dos columnas que contenían 50 grs. de la resina usada en el Ejemplo 1 se convirtieron en el ciclo sódico haciendo pasar a través de cada columna 1000 cc. de hidróxido sódico acuoso 10%. Las columnas se lavaron con 2000 cc. de agua cada una. Las columnas se conectaron con tubo de caucho para funcionar en flujo en serie.

20 64.8 litros de caldo de estreptomina se acidificaron a un pH de 2 con ácido fosfórico, se filtraron, se neutralizaron a un pH 7 con hidróxido sódico acuoso y se volvieron a filtrar. El caldo tratado ensayado dió 360 u/cc.

25 El caldo tratado se dejó luego fluir a una presión aproximada de 0.5 Kgs. a través de las dos columnas de resina en serie en una proporción de 150 cc/min. El caldo agotado al final de la operación dió en el análisis 4.3 u/cc. o 1.2%. Las columnas se lavaron con 1.000 cc. de agua y luego se eluyeron haciendo pasar a través de cada columna 1.000 cc. de ácido clorhídrico acuoso 1.0 N. El eluato rico



189725

5 procedente de la primera columna ascendió a 670 cc. y dió en el análisis 25.000 u/cc. El eluato rico procedente de la segunda columna ascendió a 235 cc. y dió en el análisis 28.000 u/cc. La recuperación de estreptomocina se calculó en 100.5%.

10 El eluato procedente de la primera columna se concentró en el vacío a 30°C casi a sequedad, se trató con 100 cc. de metanol y se filtró. El sólido separado por filtración, pesaba 2.75 grs. La solución en metanol se precipitó en 500 cc. de acetona; el sólido se filtró, se lavó con 50 cc. de acetona y se secó en el vacío. Peso: 26.3 grs., análisis: 650 u/mgr., cenizas (sulfatadas): 15%. La recuperación en este punto se calculó en 101.5%.

15 El sólido precipitado con acetona se disolvió en 81 cc. de metanol y a la solución se le añadieron 23.6 grs. de cloruro de calcio anhidro. La solución se agitó durante 40 horas y luego se filtró. El precipitado se lavó con una solución al 10% de cloruro de calcio en metanol, luego con etanol, y se secó. El producto pesaba 20 17.5 grs. y dió en el análisis 780 u/mgr. (teórico para el complejo puro estreptomocina cloruro de calcio = 779 u/mgr.). La recuperación total desde el caldo (a través de la primera columna) fué de 80%.

25 Ejemplo 3

Una columna que contenía 2 grs. de un condensado de ácido resorcílico-formaldehído, conocido como Nefatite C, se convirtió al ciclo sódico haciendo pasar



1949

189725

a su través 100 cc. de hidróxido sódico 10%. La columna se lavó con 200 cc. de agua.

Un litro de caldo se estreptomocina se acidificó a pH 2 con ácido fosfórico, se filtró, se neutralizó con hidróxido sódico y se volvió a filtrar. El caldo tratado dió en el análisis 537 u/cc.

El caldo tratado se hizo pasar a través de la columna de resina en una proporción de 0.64 cc/min. El caldo agotado, que dió en el análisis 198 u/cc, se devolvería normalmente al ciclo a una segunda columna pero en este caso no se hizo esto. La columna se lavó luego con 100 cc. de agua y se eluyó con 200 cc. de ácido clorhídrico acuoso 1.0 N. El eluato rico ascendió a 172 cc. y dió en el análisis 1.750 u/cc. Esto corresponde a una recuperación de 88% de la estreptomocina adsorbida por paso a través de una columna de resina.

El eluato se concentró en el vacío a 25°C casi a sequedad y el concentrado se diluyó con 5 cc. de metanol. La solución se filtró y se añadió a 25cc. de acetona. El precipitado se filtró y se secó en el vacío. Peso: 580 mgr., potencia: 500 u/mgr. Esto asciende a 86.5% de recuperación de las unidades adsorbidas por la resina.

Ejemplo 4

La Tabla siguiente ilustra los rendimientos comparativos de varios adsorbentes comunmente usados y resinas de tipo carboxílico para la adsorción y recuperación de estreptomocina desde una solución acuosa de la misma. Estos resultados experimentales se obtuvieron ha-



189725

5	Copolímero de ácido metacrílico y benceno divinílico conteniendo 10% de benceno divinílico	300-800	HCl acuoso	100	600 u/mgr.
10	Una resina carbóxilica que se cree es del tipo fenol-formaldehído conocida como Permutite XHIC	500-900	HCl acuoso	100	650 u/mgr.

15 Esta solicitud, que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América el 8 de Enero de 1949 bajo el No. 69.986, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

- O - N O T A - O -

20 Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de este Certificado de Adición en España, son los siguientes:

25 1ª. - La mejora o modificación del invento expuesto en la Memoria de la Patente No. 187.274, que consiste en un procedimiento de recuperar estreptomina desde las soluciones de la misma, en el cual una solución acuosa de estreptomina se pone en contacto con una resina de permutación iónica del tipo carboxílico formada por



la copolimerización de un compuesto divinílico y un ácido polimerizable, con lo cual dicha estreptomina es adsorbida sobre dicha resina, y eluir luego dicha resina para separar la estreptomina adsorbida.

5 2º. - El procedimiento según se reivindica en el punto 1º, en el cual dicho ácido polimerizable es ácido acrílico o metacrílico.

10 3º. - El procedimiento según se reivindica en el punto 1º, en el cual el compuesto divinílico es benceno divinílico.

15 4º. - El procedimiento según se reivindica en los puntos 1 a 3, en el cual dicha resina está formada por la copolimerización de desde 2 1/2 a 5 partes de benceno divinílico y desde 95 a 97 1/2 partes de ácido acrílico o ácido metacrílico.

20 5º. - El procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos 1 a 4, en el cual caldo clarificado se hace pasar a través de una columna de resina de permutación iónica los grupos polares de la cual son grupos carboxilo en forma de sal.

6º. El procedimiento según se reivindica en el punto 5º, en el cual la resina está en la forma de su sal sódica.

25 7º. - El procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos anteriores, en el cual una columna de resina de permutación iónica se hace funcionar en un ciclo de tres fases consistente en hacer pasar un caldo clarificado desde dichos medios de cultivo a



189725

través de la columna, con lo cual es adsorbida estrepto-
micina por la resina, hacer pasar una solución de ácido
a través de dicha resina, con lo cual la estreptomycin
adsorbida es eluída de la resina, y hacer pasar una solu-
5 ción de base a través de dicha columna, con lo cual la
resina es regenerada a la forma usada en la fase de ad-
sorción.

8º. - El procedimiento según se reivindica
en los puntos 6 y 7, en el cual la base usada para regenerar
10 la resina es una solución de hidróxido sódico.

9º. - El procedimiento de recuperar estrept-
tomicina desde sus soluciones acuosas, en esencia como se
ha descrito en esta Memoria.

10º. - Mejoras introducidas en el objeto
15 de la Patente principal No. 187.274 que recae sobre "Un
procedimiento de recuperar estreptomycin de soluciones
de la misma".

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

20 Esta Memoria consta de diecisiete hojas
escritas por una sola cara.

Madrid, 14 SEP. 1949

P. A. 10
Alberto de Elzaburu
Por Poder