

P - 8.232.-

Case 2.939.-

193684

27 JUN. 1950



193684

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

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

e n

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 NEOMICINA A  
Y SUS SALES ACIDAS ".-

-----

Este invento se refiere a sustancias antibióticas nuevas y terapéuticamente útiles y a procedimientos para obtenerlas.- más especialmente, el invento se refiere a neomicina A y a sales ácidas de la misma y a procedimientos para prepararlas en forma virtualmente pura a partir de caldos de cultivo obtenidos cultivando cepas seleccionadas del género



1950

193684

Actinomyces en medios de cultivo adecuados.-

5 En una publicación de Waksman y Lechevalier que aparece en Science, 109, 305-307 (1.949), se ha descrito que ciertas cepas de Actinomyces, particularmente las pertenecien  
tes a la subespecie Streptomyces, cuando se cultivan en me-  
dios adecuados, producen un material que es activo contra  
las bacterias resistentes a la estreptomycinina y especialmente  
activo contra las cepas de M. tuberculosis resistentes a la  
estreptomycinina.- En particular, se ha mostrado que un orga-  
10 nismo identificado como Actinomyces fradil, o identificado  
alternativamente como Streptomyces fradiae, da un producto  
que ha sido denominado neomicina y que se describe en la pu-  
blicación antes mencionada como compuesto básico con su ma-  
yor actividad a reacción alcalina, que es soluble en agua e  
15 insoluble en disolventes orgánicos, termoestable, y activo  
contra numerosas bacterias gram-positivas y gram-negativas,  
especialmente microbacterias, pero no contra hongos.- La pu-  
blicación señala además, por espectro antibiótico comparativo,  
que la neomicina bruta es muy diferente y distinta en su ac-  
20 tividad de la estreptomycinina y la estreptotricina.-

Aunque se indica en la citada publicación que la  
neomicina bruta recuperada de caldos de cultivo de Strepto-  
myces fradiae contiene un solo compuesto activo, se ha com-  
probado ahora que el producto bruto contiene en realidad una  
25 pluralidad de sustancias antibióticas.- La distribución en  
contra-corriente del material bruto con pentasol - ácido es-  
teárico 5% contra borato M/2 pH 7.3, es decir, ácido bórico



N. 1950

193684

5 y tampón de hidróxido sódico (mutuamente saturadas) indica que existen tres fracciones antibióticas distintas.- Se obtienen resultados similares con otros sistemas de contra-corriente de disolvente orgánico y acuoso tales como butanol normal contra ácido p-tolueno sulfónico 5-10% en agua, mutuamente saturados.-

10 Como ejemplo de una distribución típica de contra-corriente, cantidades iguales de n-butanol y ácido p-toluenosulfónico 10% en agua se agitaron juntas y se dejaron separarse como dos capas mutuamente saturadas.- En cada uno de 9 tubos o embudos separadores se colocó una porción de 60 mls., del n-butanol (saturado con ácido p-toluenosulfónico 10% en agua).- Además, se colocó en uno de los tubos una porción de 60 mls., de la solución acuosa (saturada de n-butanol),  
15 y a éste tubo se añadieron 4 grs., de un concentrado bruto de neomicina con una actividad de unas 200-250 unidades/mgr.- Este tubo se agitó entonces a fondo, se dejaron separar las dos fases líquidas, la fase acuosa se transfirió a un segundo tubo y se añadió fase acuosa nueva al primer tubo.- Se agitaron luego ambos tubos, se dejaron separar en dos fases líquidas y la fase acuosa del tubo 2 se transfirió al tubo 3, y la del tubo 1 se transfirió al tubo 2, y se añadió fase acuosa nueva al tubo 1.- Este proceso se continuó hasta que  
20 la fase acuosa originalmente añadida había sido hecha avanzar hasta el tubo 9, y todos los tubos contenían dos fases líquidas.- Luego se añadieron 200 mls., de éter de petróleo a cada tubo para forzar la actividad completamente en la fase

25



JUN. 1950

193684

acuosa que se separó y neutralizó.- Se obtuvieron análisis de la solución de cada tubo sobre una base comparable, y los resultados se tabulan debajo.-

Tubo	Actividad Unidades/ml.	Tipo de Actividad.-
1	234	Más soluble en disolvente (neomicina A)
2	283	
3	397	
4	269	Solubilidad intermedia (neomicina C)
5	251	
6	170	
7	181	Más soluble en agua (neomicina B)
8	143	
9	81	

En esta tabulación, aparecen crestas bien definidas en los tubos 3 y 7, y la distribución de la actividad indica fuertemente la presencia de una cresta sumergida en aproximadamente el tubo 5.- Por este ejemplo parecería que sobre una base de actividad, las cantidades relativas de los tres componentes activos indicados están en el orden neomicina A > neomicina C > neomicina B, y que la cantidad de neomicina A es menor que que las cantidades combinadas de neomicina B y C.-

Debe observarse a este respecto que las porciones de las fracciones antibióticamente activas varían algo de tanda en tanda de neomicina bruta.- El tipo de medio empleado al producir la neomicina bruta parece influir en las cantidades relativas de los tres componentes activos, pero los tres componentes parecen ser producidos en los diversos medios



N. 1950

193684

que se han empleado hasta la fecha.-

La neomicina A se distingue de la neomicina B y C en razón de su mayor solubilidad en disolventes en un sistema de distribución en contra-corriente acuoso disolvente orgánico.- La neomicina B por el contrario, se caracteriza por su baja solubilidad en los disolventes y la neomicina C se caracteriza aproximadamente por una solubilidad en los disolventes que cae entre la de la neomicina A y la de la B.- Así, cada una de las tres moléculas activas de neomicina puede caracterizarse por su coeficiente de partición en un sistema adecuado de disolvente orgánico y acuoso.-

El presente invento se refiere a los procedimientos para la separación de los tres componentes activos de la neomicina y, particularmente, para el aislamiento y purificación de una de estas sustancias antibióticas a la que se hace referencia como neomicina A en esta Memoria y a neomicina A virtualmente pura y a sus sales ácidas que se obtienen de este modo.-

El procedimiento que se ha desarrollado es equiparable en cierta medida a procedimientos que han sido descritos para el aislamiento de estreptotricina y estreptomycinina e incluye las operaciones de preparar primero un picrato, someter el picrato o una sal de ácido mineral regenerada desde el mismo a una adsorción cromatográfica y elución, y tratar el producto muy purificado así obtenido con una sal de ácido arilazosulfónico para formar una sal cristalizada de neomicina A, y convertirla en una sal virtualmente pura de ácido mineral



UN. 3350

193684

tal como hidrocioruro de neomicina A.- En cada fase del proceso, sin embargo, se obtienen resultados que son muy diferentes y distintos de los resultados en el aislamiento de estreptotricina y estreptomycin, y la posibilidad de aislar sales puras de neomicina A depende de controles y precauciones especiales en cada etapa del procedimiento general.-

cuando un concentrado de hidrocioruro de neomicina obtenido de acuerdo con el procedimiento descrito en la publicación de waksman y Lechevalier antes mencionada se hace reaccionar con ácido pícrico, y la sal o complejo de ácido pícrico así obtenido se convierte de nuevo en hidrocioruro de neomicina, se comprueba que la actividad total del hidrocioruro resultante es casi siempre mayor que la actividad total del concentrado de partida, y a menudo tanto como dos o tres veces tan grande como la actividad total del concentrado de partida.- Así, parecería que el ácido pícrico efectúa un cambio químico tal como la división de una forma combinada de neomicina para dar moléculas libres o no combinadas, activas, que tienen una actividad, referida al peso, mayor que la de la forma combinada.- Por otra parte, este aumento en la actividad puede ser debido en parte a separación de los componentes que poseen actividad antibiótica de sustancias inhibidoras presentes en el concentrado del cultivo.-

La preparación de las sales de ácido pícrico se efectúa preferentemente haciendo reaccionar una parte en peso de hidrocioruro de neomicina bruto disuelto en unas seis partes (volumen métrico) de agua y calentado a aproximada-



193684

de 200-250 unidades/mgr., o más.- Aun cuando es posible preparar sales brutas de neomicina de esta actividad por reprecipitación reiterada desde un disolvente orgánico, es muy fácil efectuar este aumento en la actividad pasando por la fase de picrato de neomicina antes mencionada.-

5 En el proceso cromatográfico, la sal de neomicina es disuelta en un disolvente adecuado, tal como metanol o metanol acuoso y puesta en contacto con una cantidad adsorbente, con preferencia dispuesto en una columna del tipo cromatográfico.- La columna se lava luego con disolvente adicional y la solución efluente se ensaya de vez en cuando añadiendo unas pocas gotas a una cantidad de acetona o éter, indicando la aparición de un precipitado en la acetona o en el éter que los materiales antibióticos están comenzando a ser eluidos de la columna.- La columna puede entonces dividirse físicamente en zonas o fracciones separadas para la extracción de material antibiótico desde ellas, pero es preferible efectuar el fraccionamiento continuando lavando la columna con un disolvente tal como metanol, metanol acuoso, o metanol acuoso ácido, y recogiendo varias fracciones diferentes de eluato.- La sal ácida de neomicina es precipitada desde estas fracciones, ya directamente, ya después de evaporación a volumen conveniente, por adición a las mismas de un disolvente miscible tal como acetona o éter, en el cual sea relativamente insoluble la sal ácida.-

25 A este respecto debe observarse que la elección del disolvente a emplear en el desarrollo y la elución de la



27 JUN. 1950

193684

columna varía con los diferentes adsorbentes.- Así, por ejemplo, con alúmina lavada con ácido como adsorbente, el metanol que contiene hasta 15% de agua separa la mayor parte de las impurezas de la neomicina adsorbida, al paso que el metanol con 15-50% de agua sirve para eluir las zonas de material activo.- En contraste con esto, cuando se emplea alúmina alcalina, el metanol que contiene hasta 50% de agua se ha comprobado que separa esencialmente las impurezas solubles, siendo las zonas activas eluidas por el uso de metanol con 50-70% de agua.-

Se ha comprobado al ensayar diversas fracciones de eluato por el proceso de distribución en contra-corriente antes citado, que la composición de fracciones sucesivas de eluato varía considerablemente.- Cuando se emplea alúmina lavada con ácido como adsorbente y se eluye con metanol acuoso, las primeras fracciones parecen contener un predominio esencial de un solo material antibiótico que es la neomicina A que el invento busca recuperar.- Las últimas fracciones, aun cuando contienen todavía cantidades considerables de neomicina A, contienen también cantidades crecientes de otros componentes, neomicina B y C.- Parece existir tendencia a que la alúmina retenga algo de la neomicina B y C pero esto puede vencerse lavando la columna con ácido clorhídrico acuoso aproximadamente 0,1N.-

Como prueba de la elución selectiva de las fracciones que contienen predominantemente neomicina A y para ilustrar más el efecto del procedimiento al ácido pícrico en el



JUN. 1950

193684

mente 70° C., con una solución de aproximadamente 1,5 partes en peso de ácido pícrico en aproximadamente 30 partes de agua.- La solución de hidrocioruro de neomicina se añade rápidamente a la solución casi hirviente de ácido pícrico, y comienza a formarse inmediatamente un precipitado oleoso de picrato de neomicina.- La mezcla se enfría luego y las aguas madres se decantan del precipitado gomoso.- Luego, el precipitado se disuelve en aproximadamente 3 partes de acetona, y la solución resultante se mezcla con aproximadamente 34 partes de acetona que contienen 0,5 partes de ácido clorhídrico, determinando la precipitación del hidrocioruro de neomicina.- Este hidrocioruro regenerado tiene en general una actividad por unidad de peso al menos tres o cuatro veces mayor que la actividad del concentrado de partida.- La neomicina puede precipitarse también en forma de otras sales de ácidos minerales por reacción similar de la sal del ácido pícrico en solución en acetona con ácidos minerales tales como el sulfúrico o el bromhídrico.-

La siguiente operación de la purificación de la neomicina y el aislamiento de la neomicina A supone la adsorción cromatográfica y elución sobre un material adsorbente adecuado, tal como carbón vegetal, carbón vegetal lavado con ácido, alúmina, alúmina lavada con ácido, tierra de diatomáceas y gel de sílice; siendo los adsorbentes preferidos el carbón vegetal y la alúmina lavada con ácido.- La sal de neomicina empleada para la purificación cromatográfica debe estar suficientemente concentrada y purificada para tener una actividad



7 JUN. 1950

193684

aumento de la recuperación de neomicina A se presentan los siguientes datos comparativos.-

Una muestra de 20 grs. de hidrocioruro de neomicina con una actividad de unas 250 unidades/mgr., pero que no había pasado por la etapa del picrato, se cromatografió en una columna que contenía 1.000 grs., de alúmina lavada al acido, dando los resultados siguientes:

Fracción	Tipo de eluato y volumen.		Peso de la fracción sólida recuperada. gramos	Actividad de la fracción.- unidades/mgr.
	Vol. lmls.	% metanol		
1	1400	90	4,53	304
2	2800	85	4,10	427
3	2020	80	2,50	310
4	1950	70	2,37	380

Se cromatografiaron similarmente en dos columnas dos cantidades adicionales de 20 grs. de hidrocioruro de neomicina con una actividad de unas 239 unidades/mgr. y preparadas por regeneración de picrato de neomicina, conteniendo cada columna 1.000 grs. de alumina lavada con acido, y fracciones correspondientes de las dos columnas se combinaron para dar los resultados siguientes:

Fracción	Tipo de eluato y volumen		Peso de la fracción sólida recuperada. gramos	Actividad de la fracción. unidades/mgr.
	vol. lmls.	% metanol		
1	3200	90	18.1	290
2	5820	85	9,6	760
3	6420	80	5,4	683



193684

5 La primera de las anteriores tablas que muestra las fracciones 2 y 4 con una actividad ligeramente mayor a la fracción 3, indica claramente que ha tenido lugar una separación de al menos dos componentes activos.- La comparación de la actividad del material recuperado de la fracción 2 (neomicina A) en la tabla primera con la actividad incrementada de la fracción 2 de la tabla segunda, indica claramente que la fase del picrato ha proporcionado una recuperación incrementada de la neomicina A.-

10 Un solo tratamiento de purificación cromatográfica dará al menos una parte de la actividad en forma de material purificado con dos a cinco veces la potencia del concentrado de partida, dependiendo el grado de aumento en la potencia, desde luego, del cuidado tomado en la elección de las fracciones de eluato.- Los tratamientos cromatográficos sucesivos de las sales ácidas de neomicina recuperadas de las fracciones de eluato dan una purificación ulterior y separación de los diversos componentes de la neomicina, y es posible, empleando el proceso cromatográfico, obtener fácilmente concentrados de neomicina A con una actividad de 500-1000 unidades/mgr.- Las sales de ácidos minerales de este orden de actividad son terapéuticamente útiles pero no son prácticas desde el punto de vista comercial, ya que la presencia de pequeñas cantidades de impurezas, así como la falta de uniformidad en la actividad, hace difícil determinar las cantidades de estos productos que pueden administrarse terapéuticamente con seguridad.-

15

20

25



1. 1950

193684

Se ha comprobado además que las sales esencialmente puras de neomicina A obtenidas en la purificación cromatográfica pueden convertirse en un producto todavía más puro y esencialmente uniforme por reacción con ciertas sales de ácido arilazosulfónico para formar una sal cristalizada de neomicina A que puede purificarse fácilmente por recristalización y convertirse luego de nuevo en una sal de ácido mineral esencialmente pura de neomicina A.- La heliantina y el naranja II que fueron eficaces en la formación de sales cristalizadas de estreptotricina y estreptomina no parecen formar sales con la neomicina A que puedan purificarse fácilmente.- Estas sales de neomicina A son tan difícilmente solubles en los disolventes usuales que la recristalización no puede realizarse convenientemente.- Sin embargo, se comprueba que el p-(p'-hidroxifenilazo)-benceno sulfonato sódico forma una sal cristalizada fácilmente purificada con la neomicina A cuando una sal ácida de neomicina A con una actividad de al menos 400 unidades/mgr., y, con preferencia, con unas 700 unidades/mgr., se hace reaccionar con él en agua, metanol, o mezclas acuosas de alcoholes alifáticos inferiores.- El disolvente preferido a usar en esta reacción es agua o metanol acuoso, y se han obtenido resultados muy satisfactorios en la purificación por recristalización cuando se recristaliza la sal del ácido arilazosulfónico de neomicina A desde metanol acuoso que contiene 5-50% de metanol.- En la formación de esta sal, es preferible emplear la sal de ácido mineral de neomicina A y la sal de ácido arilazosulfónico en una relación de aproximada-



1950

193684

mente dos a una partes en peso.- La reacción es una reac-  
ción metatética y puede realizarse a la temperatura ambiente  
pero, con preferencia, se lleva a cabo a una temperatura de  
unos 60-70º C., aunque pueden usarse temperaturas de hasta  
5 unos 100º C.- A la temperatura ambiente, la terminación de  
la reacción puede necesitar una a tres horas con agitación,  
pero a 60-70º C., se obtiene una reacción casi inmediata.-

La sal cristalizada del ácido p-(p'-hidroxifenilazo)  
-benceno sulfónico de la neomicina A después de purificación  
10 por recristalización tiene una actividad de unas 650 unidades/  
mgr., comienza a descomponerse sin fusión a unos 225º C., y  
cuando se somete a ensayos de adsorción ultravioleta muestra  
una banda pronunciada a 3.700  $\mu$  ( $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 400$ ).- Por análi-  
sis, se comprueba que el producto tiene la siguiente composi-  
15 ción elemental parcial: C, 50,62; H, 5,03; y N, 11,31.-

Al formar la sal cristalizada de acuerdo con el  
procedimiento arriba descrito, es decir, usando menos de una  
cantidad equivalente del p-(p'-hidroxifenilazo)-benceno sul-  
fonato sódico, el precipitado cristalizado inicial formado  
20 es virtualmente puro.- El uso de mayores cantidades efectúa  
una separación de mas de la actividad original, pero da un  
producto menos puro que contiene aparentemente formas crista-  
lizadas de neomicina B y C.- También se ha comprobado que  
la composición de la sal del ácido mineral de neomicina afec-  
25 ta mucho a los resultados obtenidos en la operación de cris-  
talización.- Así, por ejemplo, si la sal de ácido mineral  
de neomicina se obtiene a partir de una fracción última en



193684

el proceso cromatográfico y contiene cantidades sustanciales de neomicina B y C, es muy difícil obtener una sal cristalizada que sea una sal pura de neomicina A.- Si la sal de ácido mineral de partida de neomicina es una sal de neomicina A con una actividad de al menos 700 unidades por mgr., sin embargo, parece que pequeñas cantidades de neomicina B o C que puedan todavía estar presentes permanecerán en solución durante la etapa de cristalización.- De hecho, la adición de más p-(p'-hidroxifenilazo)-benceno sulfonato sódico a las aguas madres después de la cristalización de la neomicina A ha dado un producto cristalizado con una forma acicular y un análisis elemental que le distingue de la neomicina A.-

Como evidencia ulterior de que las aguas madres después de la cristalización de la sal de ácido arilazosulfónico de neomicina contiene cantidades residuales de neomicina A y neomicina B, se exponen los datos siguientes:

Una parte de material que representa eluatos anteriores de las columnas cromatográficas se trató con la mitad de su peso de p-(p'-hidroxifenilazo)-bencenosulfonato sódico para dar la sal de neomicina A sustancialmente pura una vez cristalizada en un rendimiento de aproximadamente 40% del peso de partida.- Las aguas madres de la sal se libertaron del ácido sulfónico por extracción de la solución acidificada con butanol.- La solución acuosa se neutralizó luego y se trató con ácido pícrico para dar un picrato que se convirtió luego en la sal hidrocioruro en la forma usual.- Las aguas madres de la formación del picrato insoluble se liber-



193684

5 taron de ácido pícrico, se evaporaron hasta obtener un jarabe, se diluyeron con metanol y se precipitaron vertiendo la solución en acetona.- El producto se secó.- El hidrocloreto de neomicina A, el hidrocloreto del picrato, y el producto obtenido de las aguas madres del picrato se examinaron por métodos de distribución usando el tampón de borato M/2 pH 7,3 contra ácido estearico 5% en sistema de pentasol.- La cantidad de actividad en cada tubo se muestra a continuación para experimentos comparables.-

10

15

20

Actividad en cada tubo al final de la distribución con			
Tubo	I Hidrocloreto de neomicina "A" (1) unidades/ml.	II Hidrocloreto del picrato (2) unidades/ml.	III Producto de las aguas madres del picrato (3) unidades/ml.
1 (final del soluble en agua)	0	310	2740
2	0	53	970
3	0	50	592
4	54	145	733
5	168	980	739
6	517	1700	692
7 (final del soluble en disolvente)	742	2280	309
8	410	-	-

25

- (1) ensayo de 7.2 mgrs. en ocho tubos.-
- (2) ensayo de 32.2 mgrs. en siete tubos.-
- (3) ensayo de 104 mgrs. en siete tubos.-



1911.1350

193684

5 La columna I de la tabla anterior muestra claramente que el hidrocloreto de neomicina A regenerado de la sal ácido del p-(p'-hidroxifenilazo)-benceno sulfónico es un solo compuesto homogéneo.- La columna II indica que el tratamiento de las aguas madres procedentes de la formación de la sal cristalizada del ácido arilazosulfónico de neomicina A con ácido pícrico y regeneración subsiguiente del picrato al hidrocloreto, efectúa otra separación de neomicina A desde las aguas madres, pero que el material así separado contiene al menos otro componente activo.- La columna III indica además la acción separadora del tratamiento del picrato, ya que las actividades de cresta en los tubos 1 y 5 indican la presencia de dos componentes activos, y el bajo valor en el tubo 7 indica que el contenido de este material en neomicina A es muy bajo.-

15 La siguiente comparación de actividades respecto a diversos micro-organismos muestra las diferencias en el carácter específico que se observan para el hidrocloreto de neomicina A y el hidrocloreto obtenido de las aguas madres del picrato antes descritos.-

(G R A F I C O

a

G O N T I N U A C I O N)

27



193684

(Y/ml. requeridos para inhibición)

	!Hidroclo- !ruro de !neomicina !"A" !1700 uni- !dades/mgr!	!Producto de !las aguas !madres del !picrato 300 !unidades/mgr!
1. <u>Aspergillus niger</u> MF 442	< 59	< 150
2. <u>Trichophyton mentagrophytes</u> MF 1932	< 59	< 150
3. Bacilo de sodenheimer MB 265	15	19
4. <u>B. cereus</u> MB 19	1,5	37
5. <u>M. lysodeikticus</u> MB 79	1,5	3,7
6. <u>B. subtilis</u> MB 249	2	15
7. <u>E. coli</u> W MB 208	7,4	7,5
8. <u>E. coli</u> resist. a la estreptomicina Mb (273)	30	19
9. <u>E. coli</u> C MB 61	7,4	7,5
10. <u>E. coli</u> C resistente a la neomicina	59	75
11. <u>S. aureus</u> Mb 109	0,74	15

De las sales cristalizadas purificadas de ácido arilazosulfónico de neomicina A, pueden prepararse sales esencialmente puras de ácidos minerales de neomicina A haciendo reaccionar la sal compleja con un exceso de ácido mineral tal como el clorhídrico, el sulfúrico o similares, en agua, metanol o una mezcla acuosa de alcoholes alifáticos inferiores.-

El ácido arilazosulfónico libertado en esta reacción es separado por filtración o extracción con butanol, y



1950

193684

5 la sal de ácido mineral y neomicina A que queda en el filtrado o fase acuosa después de la extracción es precipitada vertiendo el filtrado o solución acuosa en un disolvente, tal como acetona o éter o una mezcla de ellos que sea miscible con la solución pero que no sea disolvente para la sal del antibiótico.- El precipitado así obtenido cuando está libertado de disolvente y seco de acuerdo con métodos convencionales es la sal esencialmente pura de ácido mineral y de neomicina A.-

10 El hidrocloreto de neomicina A preparado de este modo muestra una actividad de unas 1700 unidades/mgr., comienza a oscurecerse a unos 220º C., y funde con descomposición a unos 250-260º C.- Después de secado a temperatura ambiente, el hidrocloreto de neomicina A, cuando es calentado sobre el micro-block tiene una rotación en agua de aproximadamente

15  $[\alpha]_{D}^{25} +83.2$ .- Una solución acuosa muestra sustancialmente sólo absorción final en el ultravioleta.- La titulación potenciométrica de-1 hidrocloreto de neomicina A da un peso equivalente de 128 con un pH 1/2 7,70-7,80.- El hidrocloreto de neomicina A da ensayo positivo de ninhidrina, pero el

20 ensayo de Sakaguchi para los guanido-grupos, el de Elson-Morgan para la glucosamina, y los ensayos del maltol son negativos.- Una distribución de contra-corriente de hidrocloreto de neomicina A en fases mutuamente saturadas que comprenden tampón de borato m/2 pH 7,3 y ácido esteárico 5% en pentasol muestra la presencia de un solo componente por ensayos

25 de actividad biológica y por ensayos cuantitativos de ninhidrina.- El coeficiente de partición en este sistema es de



N. 1350

193684

5 aproximadamente.- Los análisis elementales de hidrocioruro de neomicina A muestran la presencia de: C, 32,52; H, 6,86; N, 11,57; Cl, 28,65; la pérdida de peso en el secado de la muestra analítica durante dos horas a 100° C., en vacío en una cubeta pesadora fué de 9,7%. El análisis del amino-nitrógeno dió un valor de 11,25%. El hecho de que el aminonitrógeno sea igual al nitrógeno total en la neomicina A es una propiedad caracterizante significativa.-

Como ulteriores propiedades caracterizantes, el espectro de absorción del infra-rojo de hidrocioruro anhidro de neomicina A mostró bandas de absorción características de grupos -OH y  $>NH^+$  y ausencia de absorción en la región característica de grupos de ester carbonilo y grupos amidicos monosustituidos.- La acetil-neomicina A mostró bandas de absorción características de grupos  $>NH$ , grupos de éster carbonilo y grupos amidicos monosustituidos, junto con una banda de absorción limpia y neta a  $9,3\mu$ .- La última banda está también presente en el espectro del hidrocioruro, pero está algo enmascarada por la absorción del hidroxilo.-

El sulfato de neomicina A preparado a partir de la sal del ácido arilazosulfónico en la forma arriba descrita tiene una actividad de unas 1700 unidades/mgr., una rotación óptica de material seco a la temperatura ambiente fué de  $[\alpha]_D^{25} +72^\circ$  (C, 1.0% en agua).- El sulfato de neomicina A secado a 100° C., en el vacío mostró un análisis de nitrógeno de aproximadamente 11,25%. -

El sulfato de neomicina A puede convertirse a la



N. 1950

193684

base libre de neomicina A por reacción con hidróxido de bario diluido, es decir, aproximadamente 0,2N en solución acuosa, separando el precipitado de sulfato de bario así formado, y añadiendo metanol y acetona en una relación aproximada de 1 : 10 a la solución resultante para precipitar neomicina A libre.- La base libre secada a la temperatura ambiente tiene una actividad de aproximadamente 2345 unidades/mgr., y una rotación óptica de  $[\alpha]_D^{25} +792$  (D., 0,57 en agua) y cuando se calentó sobre un micro-block comenzó a obscurecerse a 210º C., y se descompuso gradualmente hasta unos 270º C., sin fundir.- En solución, la base libre da una reacción fuertemente alcalina.

El hidrocloreuro de neomicina A puro obtenido por el procedimiento anterior, muestra actividad contra diversos micro-organismos con inclusión de organismos resistentes a la estreptomycin, según queda indicado por la tabla siguiente:

Organismos	Hidrocloreuro de neomicina "A".- Concentración mgr./ml. requerida para la inhibición completa.
<u>Staph. aureus</u> MB 109	0,00074
<u>B. subtilis</u> MB 249	0,002
<u>E. coli</u> W (resistente a la estreptomycin)	0,030
<u>B. cereus</u> MB 19	0,0015
<u>E. coli</u> C (resistente a la neomicina)	0,059

Existen también indicaciones de que la neomicina A tiene actividad biológica diferente de la de la neomicina B y C,



JUN. 1950

193684

pero la completa evaluación de estas diferencias sólo puede ser determinada cuando se disponga de muestras puras de neomicina B y C.-

5 Los ejemplos siguientes muestran las diversas operaciones que entran en juego en la preparación de sales puras de ácido mineral y neomicina A de acuerdo con el presente invento, pero ha de entenderse que estos ejemplos se dan a modo de ilustración y no de limitación.-

E J E M P L O I

10 Una porción de 50 grs. de hidrocioruro de neomicina bruto (80 unidades/mgr.) se disolvió en 300 mls. de agua y se calentó a 70° C.- Esta solución se añadió en seguida a una solución casi hirviente de 75 grs. de ácido picrico (conteniendo 10% de humedad) en 1400 mls. de agua.- Comenzó a formarse  
15 inmediatamente un precipitado oleoso pardo de picrato de neomicina.- Al enfriarse algo ( a unos 60° C), el precipitado se volvió viscoso, y la solución que sobrenadaba se separó de él por decantación, y la goma se lavó con 50 mls. de agua.- La solución que sobrenadaba y las levaduras se enfriaron luego a  
20 0-5° C, después de lo cual se separó un nuevo precipitado gomoso espeso contaminado con ácido picrico cristalizado.- Las aguas madres se separaron por decantación, y el residuo se enjuagó con 100 mls. de agua.-

25 El primer precipitado oleoso de picrato de neomicina de dos tandas de 50 grs. preparadas como antes se ha descrito, se disolvió en unos 200 mls. de acetona.- Se produjo facil-



1950

193684

mente, con agitación, la disolución de cada precipitado oleoso en unos 75 mls., de acetona.- Las soluciones combinadas se diluyeron a unos 600 mls., con acetona, y a esta solución se añadió con agitación una solución de 20 mls., de ácido clorhídrico concentrado en 280 mls., de acetona.- La precipitación de hidrocloreuro de neomicina comenzó inmediatamente; el precipitado era gomoso al final de la reacción en este caso.- La adición de 20 mls, de agua efectuó la disolución de la goma.- La solución acuosa se diluyó con 180 mls., de metanol, y la solución se vertió entonces en dos litros de acetona para precipitar el hidrocloreuro de neomicina como polvo sólido de color avellana.- Usualmente se obtiene un precipitado sólido en la primera separación de hidrocloreuro, sin embargo.- El peso del hidrocloreuro de neomicina procedente de la primera fracción de picrato de las dos tandas combinadas fué de 28,6 grs., con actividad de 250 unidades/mgr.-

El segundo precipitado oleoso de picrato de neomicina obtenido por enfriamiento de la solución que sobrenadaba del primer picrato a 0-50 C., se trabajó en la misma manera.- Esta fracción procedente de dos tandas de 50 grs., combinadas, se combinó y convirtió en el hidrocloreuro; rendimiento 22,7 grs., actividad, 290 unidades/mgr.- La tabla siguiente resume los rendimientos

Fracción	Peso, grs.	Actividad, unidades/mgr.	Unidades total
Material de partida	100	80	8.000.000
Primera fracción de picrato regenerada a hidrocloreuro	28,6	250	7.150.000
Segunda fracción de picrato regenerada a hidrocloreuro	22,7	290	6.600.000



1950

193684

La discrepancia en la recuperación de actividad se debe probablemente, no a variaciones en el análisis, ya que los resultados eran valores promediados.- Parecería posible que la división por el ácido picrico de una forma combinada de neomicina pueda haber libertado una forma libre más activa.- También es posible que puedan desarrollarse sustancias inhibidoras, siendo precipitada la neomicina como picrato y quedando el inhibidor en solución.-

EJEMPLO II.

10 100 grs. de hidrocloreto de neomicina (84 unidades/mgr.) se disolvieron en 600 mls. de agua y la solución se calentó a 70°.- A esta solución se añadió una casi hirviente de 150 grs. de ácido picrico entre tres litros de agua.- La mezcla se enfrió a 10° C., y las aguas madres se decantaron de un precipitado gomoso de picrato de neomicina.- El precipitado se disolvió en unos 300 mls. de acetona, y la solución se mezcló con 3400 mls. de acetona que contenían 50 mls. de ácido clorhídrico concentrado.- El hidrocloreto de neomicina precipitado pesó 64,7 grs.- Después de lavado con acetona y secado, 20 el producto mostró una actividad de unas 240 unidades/mgr.-

EJEMPLO III.

Una muestra de 2 gramos de cada uno de dos diferentes concentrados brutos de neomicina se disolvió en 12 mls. de agua y la solución se calentó a 60° C.- A cada solución se añadió



1950 193684

una solución de 3 grs. de ácido picrico en 60 mls. de agua caliente (90°C).- Cada solución se enfrió luego a 5°C, y la solución que sobrenadaba se decantó del precipitado de picrato gomoso.- En cada caso, el picrato gomoso se disolvió en 15 mls. de acetona y la solución acetónica se vertió con vigorosa agitación en 150 mls. de acetona que contenían 1,5 mls. de ácido clorhídrico concentrado.- El hidrocloreuro de neomicina precipitado se recogió sobre un filtro, se lavó con acetona y éter y se secó en el vacío.-

Los resultados de cuidadosos ensayos promediados sobre los materiales originales e hidrocloreuros regenerados sobre bases yuxtapuestas se dan a continuación, junto con valores medios de análisis obtenidos en un período anterior.-

M U E S T R A				P R O D U C T O			
Nº	Peso grs.	Ensayo lado a lado unidades/ mgr.	Ensayo original. Unidades/ mgr.	Peso grs.	Ensayo lado a lado unidades/mgr.	% de recuperación de actividad (base lado a lado).	
1	2	195	84	1,32	310	105	
2	2	157	100	0,88	336	94	

Los ensayos lado a lado promediados muestran aproximadamente recuperación cuantitativa de actividad.- Sobre la base de los ensayos anteriores sobre el material de partida, la recuperación estaría bien por encima de 100 por ciento en las aguas madres en este experimento.- Así, la recuperación de actividad es excepcionalmente elevada.- Es insólito que



JUN. 1950

193684

tal recuperación sea observada rutinariamente, de modo que existe la posibilidad de que esté indicado un fenómeno tal como la división de formas combinadas menos activas de neomicina A, o la eliminación o separación de sustancias inhibitoras por el proceso.-

#### EJEMPLO IV.

Una porción de 22 gramos de hidrocloreto de neomicina (actividad 290 unidades/mgr. preparado a través del picrato, como se describió en el ejemplo I) se disolvió en 18 mls., de agua y la solución se elaboró en una columna cromatográfica de alúmina (1 Kg. de alúmina lavada con ácido sulfúrico a pH 4,5; con metanol absoluto como relleno húmedo) y se desarrolló sucesivamente con 2.500 ml., de metanol 90%, 3000 mls., de metanol 85% y 2000 mls., de metanol 80%. Se tomaron fracciones correspondientes del filtrado comenzando en el momento en que la banda amarilla rápidamente móvil (ácido pícrico o un derivado presente en el material de partida) comenzó a emerger de la columna.- Las tres fracciones así obtenidas fueron concentradas a la forma de jarabes finos en el vacío, trituradas bajo etanol absoluto, filtradas y secadas; los resultados se resumen a continuación

fracción	Vol. mls.	Peso gr. de solución	Actividad Unidad mgr.	Unidades totales	Por ciento de actividad de partida.
1	1700	5,69	300	1.700.000	26
2	3000	4,77	700	3.340.000	52
3	2000	2,12	500	1.060.000	16
Muestra de partida		22	290	6.400.000	100



1950

193684

Una muestra de 2 grs., de hidrocloreuro de neomicina (175 unidades por mgr.) se disolvió en 2 mls., de agua y la solución se diluyó con 18 mls., de metanol.- Esta solución se cromatografió sobre una columna de 100 grs., de alúmina no lavada al ácido (Harshaw) compuesta en metanol.- El desarrollo de la columna se realizó con porciones de 250 ml., de metanol 90%, de metanol 85%, de metanol 80%, de metanol 70%, de metanol 50%, y de metanol 30%, y finalmente con agua.- La actividad comenzó a aparecer solo ligeramente en los eluatos de metanol 70%, de modo que se aislaron sólidos únicamente del metanol 50% y del de 25% y de los eluatos del agua.- Los resultados se resumen como sigue:

Fracción	Peso, grs.	Actividad, Unidades/mgr.
Eluato de metanol 50%	0,267	242
Eluato de metanol 25%	0,278	315
Eluato de agua	0,155	285

La actividad se retiene mas fuertemente sobre alúmina alcalina que sobre alúmina lavada con ácido cuando se usa metanol acuoso como disolvente.- Así, se han obtenido mejores resultados con columnas lavadas con ácido.- Con un preparado de hidrocloreuro de neomicina bruto (100 unidades/mgr.) alcanzó una purificación muy satisfactoria por cromatografía directa sobre alúmina lavada con ácido en metanol acuoso, ob-



1950

193684

teniendose una fracción de cresta, 700 unidades/mgr.- Esta fracción apareció en un eluato de metanol 70%, y se obtuvo material de 400-500 unidades/mgr.por elución ulterior con metanol 50%.-

E J E M P L O V

5

Dos gramos de hidrocioruro de neomicina bruto (100 unidades/mgr.) se disolvieron en 20 mls. de metanol 85% y se cromatografiaron sobre 100 grs. de alumina lavada con acido.- Las soluciones de elución, rendimientos ponderales después de aislamiento de fracciones sólidas, y las actividades de las fracciones sólidas, se muestran a continuación

10

	Fracción	Disolvente de elución	Volumen del eluato.	Peso grs. de la fracción sólida	Actividad de la fracción sólida, unidades/mgr.
15	1	meta-nol 90%	250	0,505	< 10
	2	" 85%	250	0,125	< 20
	3	" 80%	500	0,232	250
	4	" 70%	250	0,125	700
	5	" 50%	250	0,195	400
20	6	agua	250	0,170	125

E J E M P L O VI

Se preparó una columna relleno una cromatografica de 76 mm. de diametro con una mezcla íntima de 200 grs. de carbón vegetal activado y 75 grs. de fibra de poliel.- La mez-



JUN. 1950

193684

cla seca se añadió en porciones y se apisonó fuertemente después de cada adición.- A la columna preparada seca se le añadió una solución de 100 grs. de hidrocloreuro de neomicina bruto en 600 mls. de metanol 75%.- La columna se desarrolló con  
5 2 litros de metanol 75%, seguidos por un litro de metanol 50%.- Se recogieron cuatro fracciones de filtrado de 500 mls. cada una (metanol 75%), y luego una fracción de un litro (metanol 50%).- Las dos primeras fracciones se precipitaron vertiendo en aproximadamente diez volúmenes de acetona para dar sólidos  
10 gomosos que se granulaban cuando se agitaban con alcohol absoluto.- Las dos últimas fracciones de 500 mls. se combinaron después de precipitación y granulación.- El eluato de metanol 50% no se trabajó, ya que contenía sólo un total de 75.000 unidades de actividad.- Los pesos y actividades de las tres  
15 fracciones sólidas obtenidas fueron: (1) 53.97 grs., 94 unidades/mgr.; (2) 27,67 grs., 143 unidades/mgr.; (3 y 4 combinadas), 2 gramos, 97 unidades/mgr.- El color de estos sólidos fué avellana palido.-

E J E M P L O VII

20 500 mgrs. de concentrado de neomicina A (750 unidades/mgr.; obtenido por cromatografía) se recromatografiaron sobre una columna de 25 grs. de alumina lavada con acido.- Las fracciones de eluato recogidas se evaporaron a la forma de jarabes, se granularon bajo etanol y se secarón.-



193684

Fracción	Eluato		Producto sólido del eluato	
	Vol. mls.	% de metanol	Peso, mgrs.	Actividad, unid/mgr.
1	60	90	199	710
2	90	85	118	1220
3	100	80	58	925
4	100	70	75	300

En este fraccionamiento, se obtuvo un concentrado (fracción 2) muy rico en neomicina A.- Se calculó esta fracción que contiene al menos un 60% de neomicina A.-

E J E M P L O VIII.

Un gramo de hidrocloreuro de neomicina A (700 unidades/mgr.), obtenido como se ha descrito en los ejemplos anteriores, se disolvió en 15 mls. de metanol 40% y la solución se calentó a 70°C.- A esto se añadió una solución caliente (90°C) de 0,5 grs. de p-(p'-hidroxifenilazo)-benceno sulfonato en 15 mls. de agua.- La mezcla era clara al principio, pero pronto empezó a depositar rosetas translúcidas amarillas.- Después de reposo durante dos horas a la temperatura ambiente, el producto cristalizado se recogió sobre un filtro, se lavó con agua y se secó en el vacío.- El rendimiento fué aproximadamente 500 mgrs. de p-(p'-hidroxifenilazo)-benceno sulfonato de neomicina A, cristalizado.- El producto, en esencia, era puro.- Cuando se calentó comenzó a descomponerse a unos 225°C



DUN. 1950 193684

0, en el análisis mostró una actividad de unas 650 unidades/mgr. y en el ultravioleta exhibió una banda pronunciada a  $3700 \text{ \AA}$  ( $E_1^{1\%} \text{ cm} = 410$ ).- El p-(p'-hidroxifenilazo)-benceno sulfonato de neomicina A puede recristalizarse para separar los vestigios de impurezas disolviendo en metanol 5-50% caliente, dejando que la solución se enfríe, recuperando p-(p'-hidroxifenilazo)-benceno sulfonato de neomicina A recristalizado sobre un filtro, lavando con agua, y secando en el vacío.- La composición elemental encontrada por análisis fué: C, 50,42; H, 5,01; N, 11,20. Los resultados de la recristalización repetida se resumen a continuación:

Disolvente de recristalización	La descomposición comienza a aproximadamente a	Actividad biológica	Intensidad de absorción al ultravioleta, $E_1^{1\%} \text{ cm.}$
15 metanol 20% (primera cristalización)	22500	645	419
metanol 50% (segunda cristalización)	22500	625	403
20 metanol 5% (tercera cristalización)	22500	660	400
metanol 5% (cuarta cristalización)	22500	645	395

El procedimiento según se ha descrito arriba (uso de menos de la cantidad equivalente de p-(p'-hidroxifenilazo)-benceno sulfonato sódico) da un precipitado cristalizado que es esencialmente puro.- El uso de cantidades mayores efectúa una



JUN. 1950

193684

separación de mas de la actividad original, pero da un producto que contiene cantidades significativas de material biologicamente inerte.- Se prefiere emplear un concentrado de neomicina de al menos 700 unidades/mgr. para este procedimiento.-

5

E J E M P L O IX

14 mgrs. de hidrocioruro de neomicina A en 1,5 mls. de metanol 30% se calentaron a unos 60°C y se mezclaron con una solución caliente de 12,2 mgrs. de naranja de metilo en 1 ml. de agua.- Se formó en seguida un precipitado.- El producto se recogió en un filtro después de enfriar a la temperatura ambiente; rendimiento, 12,6mgrs.- El producto se recristalizó desde 2 mls. de metanol 50% para dar 3 mgrs. de agujas cortas, actividad unas 500 unidades/mgr.- Los cristales se descompusieron en la gama de 235-285°C.-

15

E J E M P L O X

Un gr. de p-(p-hidroxifenilazo)-benceno sulfonato de neomicina A se puso en suspensión en unos 10 mls. de agua y 20 mls. de n-butanol y se mezcló con unos 2,5 mls. de acido sulfúrico 2,5 N.- La mezcla se agitó vigorosamente para conseguir una disolución y la terminación de la reacción.- Se separó el butanol que contenía mucho del acido sulfónico libre puesto en libertad.- Se usaron tres porciones adicionales de n-butanol para extraer el resto del acido sulfónico.- La solución acuosa incolora residual se vertió luego en 20 volúmenes de acetona para dar un precipitado blanco amorfo, de sulfa-

25



1950

193684

to de neomicina A que se recogió por centrifugación, se lavó, con acetona y se secó; rendimiento, 282.,  $[\alpha]_D^{25} + 72^\circ$  (C, 1,0 en agua), actividad aproximadamente 1700 unidades/mgr.

Análisis, encontrado: N, 11,25.-

5

E J E M P L O XI.-

Una solución de 57,3 mgrs., de sulfato de neomicina A en 3 mls., de agua se calentó a unos 70° C., y se mezcló bastante rápidamente con 2,18 mls., de solución de hidróxido de bario 0,193 N.- Se separó en seguida un precipitado granular de sulfato de bario.- Después de enfriamiento, la mezcla se filtró y el filtrado claro e incoloro y las aguas de lavado se diluyeron con metanol a un volumen de 20 mls., y se vertieron en 200 mls., de acetona para dar un precipitado blanco amorfo de neomicina libre A.- El producto se recogió por centrifugación, se lavó con acetona y se secó; rendimiento 15 mgrs.-  $[\alpha]_D^{25} + 79^\circ$  (C, 0,97 en agua), actividad aproximada 2345 unidades/mgr.- Una solución en agua dió una reacción fuertemente alcalina.- Cuando se calentó sobre el micro-block, la neomicina libre A comenzó a oscurecerse a 210° C., y se descompuso gradualmente hasta 270° C., sin fusión.-

10

15

20

E J E M P L O XII.-

Una muestra de 240 mgrs. de p-(p'-hidroxifenilazo)-benceno sulfonato de neomicina A puro, se puso en suspensión en 10 mls., de n-butanol y 10 mls., de agua.- A la mezcla se le añadieron 3 mls., de ácido clorhídrico N/1 con agitación. La sal pasó a solución muy rápidamente.- La capa de butanol que contenía el ácido sulfónico libre se separó y se usaron

25



193684

dos nuevas porciones de butanol sucesivamente para extraer el resto del ácido p-(p'-hidroxifenilazo)-benceno sulfónico.- La solución acuosa residual de hidrocloreto de neomicina A se vertió luego en 20 volúmenes de acetona para dar un polvo blanco de nieve.- El precipitado de hidrocloreto de neomicina A se recogió por centrifugación, se lavó con acetona y se secó; rendimiento, 60 mgrs., actividad aproximada de 1420 unidades/mgr.  $[\alpha]_D^{25} +81^{\circ}$  (C, 0,71 en agua).-

E J E M P L O XIII.-

Dos grs. de p-(p'-hidroxifenilazo)-bencenosulfonato de neomicina A, recristalizado una vez, se pusieron en suspensión en 40 mls., de metanol y se calentaron a 50-60° C.- A la suspensión caliente se le añadieron rápidamente 160 mls., de agua hirviente que efectuaron la disolución.- La solución, al enfriar, depositó un producto voluminoso que se recogió sobre un filtro.- Una porción seca al vacío mostró una actividad aproximada de 600 unidades/mgr., se descompuso a unos 220-240° C., sobre el micro-block; y una solución en tampón M/20 a pH 8 mostró  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 402$  a  $3700 \text{ \AA}$  en el ultravioleta.-

El resto de este material, mientras estaba todavía húmedo, se puso en suspensión en 30 mls. de metanol caliente y se mezcló con 120 mls., de agua hirviente.- La solución clara resultante depositó un producto voluminoso, una pequeña porción del cual se secó; actividad de unas 730 unidades/mgr., gama de descomposición 225-245° C.,  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 393$  a  $3700 \text{ \AA}$  para una solución en tampón M/20 a pH 8 en el ultravioleta.-



1950

193684

El resto de este material se recristalizó dos veces en la misma forma usando 20 mls, de metanol y 80 mls., de agua hirviente.- El producto cristalizado final pesó 600 mgrs., y mostró una actividad de aproximadamente 750 unidades/mgrs., se descompuso a 220-2500  $\mu$ ., y mostró  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 410$  a 3700  $\text{\AA}$  para una solución en tampón M/20 a pH 8 en el ultravioleta.-

Análisis, encontrado: C, 50,62; H, 5,03; N, 11,31; pérdida de peso al secar 2 horas a 1000  $\mu$ ., en cubeta, 5, 8, 4, 8.-

La regeneración de 540 mgrs. de la sal antes descrita para dar el hidrocloreto se realizó como sigue: La muestra seca se puso en suspensión en 3 mls., de ácido clorhídrico 2,5 N, y se añadieron, con agitación vigorosa, 10 mls., de agua y 20 mls., de n-butanol.- Se separaron dos fases, conteniendo la de butanol la mayor parte del color.- El butanol se retiró, y la fase acuosa se extractó con otras tres porciones de n-butanol saturado de agua.- Estos extractos se combinaron con el primero para la recuperación de cualquier hidrocloreto de neomicina A arrastrado.- La fase acuosa incolora se vertió en 250 mls., de acetona para dar un sólido granular; rendimiento, 162 mgrs.  $[\alpha]_D^{25} +830$  (C, 1,0 en agua), actividad promediada 1700 unidades/mgr.-

Análisis, encontrado: C, 32,40; H, 6,42; pérdida de peso al secar 2 horas a 1000  $\mu$ ., en cubeta 9,6, 10,4.-

Esta muestra tendía a ser de secado difícil sin pérdidas, debido a la fragmentación de los gránulos, y por tanto se disolvió en 5 mls., de metanol 90%, se pasó a través de



193684

una almohadilla de 50 mgrs., de carbón vegetal activado y se vertió en 70 mls., de acetona para dar el precipitado floculento más típico.- Esta muestra dió un valor de ensayo medio cuidadoso de 1723 unidades/mgr.- Cuando se calentó sobre el micro-block, esta muestra se oscureció desde los 220º C., y fundió con descomposición a 250-260º C., a un alquitran negro.-

Análisis, encontrado: C, 32,52; H, 6,86; N, 11,57; NH<sub>2</sub>-N, 11,25; Cl, 28,65; pérdida de peso al secar dos horas a 100º C., en cubeta, 5,9, 9,7, 6,9.-

Los siguientes ensayos de este material dieron resultados negativos: Sakaguchi (grupos guanido); Elson-Morgan (glucosamina); maltol.- El ensayo de ninhidrina fué positivo.- En el ultravioleta, solamente se observó absorción extrema.-

Una distribución en contra-corriente de ocho placas sobre 7,2 mgrs., de este material en fases de 5 mls., de pentasol-acido esteárico 5% contra tampón de borato pH 7,3 M/2 (mutuamente saturadas) se realizó.- Se observó una sola cresta antibiótica con coeficiente de partición de aproximadamente 5.- Las determinaciones cuantitativas de ninhidrina dieron la misma cresta que los ensayos biológicos.- Esto indica una distribución de los sólidos de acuerdo con la calculada para una sola sustancia homogénea.- Estos resultados parecerían establecer el hecho de que la neomicina A es una entidad única y que la muestra es pura.-

La titulación potenciométrica de esta muestra con



193684

álcali mostró un peso equivalente de 138 con pH 1/2 7,70.-  
La titulación posterior después de reposo con álcali en exceso  
mostró un peso equivalente de 128.- El peso equivalente del  
intervalo fué de 128 con pH 1/2 7,80.-

5                    en relación con la caracterización ulterior de hidro-  
cloruro de neomicina A se cree que el peso molecular es de  
aproxinadamente 350-400 referido a determinación hecha sobre  
neomicina A acetilada.- Sigue un ejemplo que da detalles de  
la preparación de acetilneomicina A.-

10

E J E M P L O    XIV.-

15

Una mezcla de 105,5 mgrs. de hidrocioruro de neomi-  
cina A puro, 75 mgrs., de acetato sódico fundido y 15 mls., de  
anhídrido acético se mantuvo a temperatura de reflujo durante  
una y media horas.- La solución incolora se filtró para se-  
parar el cloruro sódico insoluble que se había formado.- El  
filtrado se evaporó a sequedad, y el residuo se disolvió en  
cloroformo, se filtró por un tampón de carbón vegetal activa-  
do de 108 grs., y el filtrado y las lavaduras de cloroformo  
se vertieron en 60 mls. de éter de petróleo para dar un pro-  
ducto amorfo blanco, acetilneomicina A,  $[\alpha]_D^{25} +80^{\circ}$  (C, 1,0  
en metanol).- El producto fundió a unos 150-160° C., después  
de comenzar a ablandarse a 145° C.-

20

Análisis, encontrado: N, 7,78; acetilo, 56,43.-

25

Se realizó una determinación del peso molecular por  
el método ebulloscópico y dió un valor de  $570 \pm 10$  para el pe-  
so molecular.-



N. 1950

# 193684

La presente solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, con fecha 28 de Junio de 1.949, bajo el número 101.908, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto-Ley sobre Propiedad Industrial.-

5

- N O T A -

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de la presente solicitud de Patente de invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

10

19.- El procedimiento que comprende hacer reaccionar un concentrado bruto de sal de ácido mineral de neomicina con ácido pícrico en solución acuosa, separar el precipitado gomoso de sal de ácido pícrico y neomicina así formado y hacerlo reaccionar con un ácido mineral para formar una sal de ácido mineral de neomicina con potencia aumentada, someter la sal de ácido mineral así obtenida a adsorción cromatográfica y elución con soluciones de disolventes orgánico-acuosos de contenido progresivamente decreciente en disolvente orgánico, efectuando con ello una separación de una fracción mas soluble en disolventes que comprende predominantemente la sal de ácido mineral de neomicina A de fracciones mas solubles en

15

20



JUN. 1950

193684

5 agua que comprenden predominantemente sales de neomicina B y de neomicina C, recuperar la sal de ácido mineral y neomicina A de dicha fracción nombrada en primer lugar y hacerla reaccionar con una sal de un metal alcalino de un ácido arilazo-sulfónico para formar un precipitado cristalizado de la correspondiente sal del ácido arilazosulfónico y neomicina A, recrystalizar esta última desde metanol acuoso y hacerla reaccionar luego con ácido mineral acuoso y recuperar la sal virtualmente pura de ácido mineral y neomicina A así formada.-

10 29.- El procedimiento según se define en el punto 19, en el cual el ácido mineral citado en último lugar es ácido clorhídrico acuoso y se recupera hidrocloreuro de neomicina A virtualmente puro.-

15 39.- El procedimiento según se define en el punto 19, en el cual el ácido mineral citado en último lugar es ácido sulfúrico acuoso y se recupera sulfato de neomicina A virtualmente puro.-

20 49.- El procedimiento según se define en el punto 19, en el cual el ácido mineral citado en último lugar es ácido sulfúrico acuoso, y el sulfato de neomicina A así obtenido se hace reaccionar con hidróxido de bario acuoso, el precipitado de sulfato de bario resultante se separa y se recupera neomicina A esencialmente pura de la solución residual.-

25 59.- El procedimiento que comprende hacer reaccionar un concentrado bruto de una sal de ácido mineral de neomicina con ácido pícrico en solución acuosa, separar el precipitado gomoso de sal de ácido pícrico y neomicina así



1950

193684

5 formado, y hacerlo reaccionar con un ácido mineral para formar una sal de ácido mineral y neomicina con potencia incrementada, someter la sal de ácido mineral así obtenida a adsorción cromatográfica y elución con soluciones disolventes acuoso-orgánicas de contenido en disolvente orgánico progresivamente decreciente, efectuando con ello una separación de una fracción mas soluble en disolvente que comprende predominantemente la sal de ácido mineral de neomicina A de fracciones mas solubles en agua que comprenden predominantemente sales de neomicina B y neomicina C, recuperar la sal de ácido mineral de neomicina A de dicha fracción citada en primer lugar y hacerla reaccionar con una sal de metal alcalino de un ácido arilazosulfónico para formar un precipitado cristalizado de la correspondiente sal de ácido arilazosulfónico de neomicina A y recuperar neomicina A adicional de la solución residual extrayendo primero el ácido arilazosulfónico de la solución residual con butanol neutralizando luego la solución acuosa y haciendo reaccionar con ácido pícrico para formar un precipitado que comprende predominantemente el picrato de neomicina A y una solución residual que comprende predominantemente los picratos de neomicinas B y C.-

15 69.- En un procedimiento para preparar neomicina A a partir de neomicina bruta, la operación que comprende hacer reaccionar neomicina bruta en solución acuosa con ácido pícrico.-

25 70.- En un procedimiento para preparar sales ácidas de neomicina A a partir de una sal ácida bruta de neomicina,



UN. 1950

193684

la operación que comprende hacer reaccionar una sal ácida  
bruta de neomicina en solución acuosa con ácido pícrico para  
formar un precipitado de picrato de neomicina y hacerlo reac-  
cionar con un ácido mineral para formar una sal de ácido mi-  
5 neral de neomicina que contiene una cantidad total de activi-  
dad en neomicina A mayor que la actividad en neomicina A de  
la sal bruta de partida.-

89.- En un procedimiento para preparar sales áci-  
das de neomicina A, la operación que comprende someter una  
10 sal ácida de neomicina a adsorción cromatográfica y elución  
con soluciones disolvente acuoso-orgánicas que contienen pro-  
porciones progresivamente decrecientes de disolvente orgánico,  
efectuando con ello una separación de una fracción mas solu-  
ble en disolvente que comprende predominantemente la sal áci-  
15 da de neomicina A de fracciones mas solubles en agua que com-  
prenden predominantemente sales de neomicina B y neomicina C.-

90.- El procedimiento que comprende someter neo-  
micina a un sistema que incluye agua y disolvente orgánico  
para efectuar una separación de fracciones mas solubles en di-  
20 solvente que comprenden predominantemente neomicina A de frac-  
ciones mas solubles en agua que comprenden predominantemente  
neomicina B y C.-

100.- El procedimiento según se define en el punto  
90, en el cual el sistema empleado comprende adsorción de neo-  
25 micina y elución con soluciones de disolvente orgánico y acuo-  
sas que contienen cantidades progresivamente decrecientes de  
disolvente orgánico.-



1950

193684

119.- El procedimiento según se define en el punto 9º, en el cual el sistema empleado comprende adsorción de neomicina y elución con metanol acuoso que contiene cantidades de metanol progresivamente decrecientes.-

5 129.- El procedimiento según se define en el punto 9º, en el cual el sistema empleado comprende la distribución en contra-corriente con fases acuosa y de disolvente orgánico inmiscible mutuamente saturadas.-

10 139.- El procedimiento según se define en el punto 9º, en el cual el sistema empleado comprende la distribución en contra-corriente con fases acuosa y de disolvente orgánico, inmiscibles y mutuamente saturadas, consistente respectivamente en tampón de borato pH 7,3 M/2 y pentasol que contiene ácido esteárico 5%.-

15 149.- El procedimiento según se define en el punto 9º, en el cual el sistema empleado comprende la distribución en contra-corriente con fases acuosa y de disolvente orgánico, inmiscibles y mutuamente saturadas, que consisten respectivamente en ácido p-toluenosulfónico 10% en agua y en n-butanol.-

20 159.- En un procedimiento de preparar neomicina A a partir de neomicina bruta, la operación que comprende hacer reaccionar una sal ácida de neomicina que comprende predominantemente neomicina A y que tiene una actividad de aproximadamente 700 unidades/mgr., con una sal de metal alcalino de un ácido arilazosulfónico para formar la sal cristalizada de ácido arilazosulfónico de neomicina A.-

25

169.- En un procedimiento de preparar neomicina A



UN. 1950

193684

a partir de neomicina bruta, las operaciones que comprenden hacer reaccionar una sal ácida de neomicina que comprende predominantemente neomicina A y que tiene una actividad de unas 700 unidades/mgr., con una sal de metal alcalino de un ácido arilazosulfónico para formar la sal cristalizada de ácido arilazosulfónico de neomicina A recrystalizarla desde metanol acuoso y hacer reaccionar la sal recrystalizada con un ácido mineral para formar la sal virtualmente pura de ácido mineral de neomicina A.-

10                   179.- El procedimiento que comprende hacer reaccionar una sal ácida de neomicina que comprende predominantemente neomicina A y que tiene una actividad de al menos 700 unidades/mgr., con una sal metálica alcalina de ácido p-(p'-hidroxifenilazo)-benceno sulfónico para formar la sal cristalizada de ácido sulfónico y neomicina A, y hacer reaccionar dicha sal cristalizada con un ácido mineral para formar la sal virtualmente pura de ácido mineral y neomicina A.-

15                   180.- El procedimiento que comprende hacer reaccionar sulfato de neomicina A con hidróxido de bario en solución acuosa, formando con ello un precipitado de sulfato de bario, y recuperar de la solución residual la base libre neomicina A.-

20                   192.- Un procedimiento de preparar neomicina A y sus sales ácidas.-

25                   Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede-



1950

193684

de y para los fines que se han especificado.-

La anterior memoria consta de cuarenta y dos hojas y la presente, escritas a máquina por una sola de sus caras.-

Madrid,

P. A. 27 JUN 1950

Albarrán de Elzaburo  
Por Poder

*Albarrán*