

199673

P - 9276

Case 3287

20 SEP. 1951

199673

205



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 PARA RECUPERAR VITAMINA
B₁₂ Y/O COMPUESTOS SIMILARES A ELLA DESDE
SOLUCIONES ACUOSAS".**

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

Este invento se refiere, en general, a la
recuperación desde solución de sustancias vitamínicas
capaces de favorecer el crecimiento del micro-organismo

199673



Lactobacillus lactis Dorner (LLD) y que tienen actividad en el "factor proteínico animal" (APF). Más especialmente, se refiere a un método nuevo y perfeccionado para recuperar vitamina B₁₂ y/o compuestos similares a la vitamina B₁₂ (tales como vitamina B_{12a}) desde soluciones acuosas, que incluyen caldos de fermentación que los contienen, por adsorción de la vitamina B₁₂ y/o de compuestos similares a la vitamina B₁₂ desde dichas soluciones utilizando adsorbentes resinosos seleccionados como agentes de adsorción.

10 La vitamina B₁₂ es un nuevo compuesto químico plenamente caracterizado en una solicitud norteamericana No 146404, presentada el 25 de Febrero de 1950, que es capaz de favorecer el crecimiento del micro-organismo L. Lactis Dorner, y que muestra actividad en factor proteínico animal.

15 Posee una acción marcada y eficaz en el tratamiento terapéutico de la anemia perniciosa de Addison y otras anemias macrocíticas. La vitamina B₁₂ se prepara ordinariamente por fermentación de un medio nutritivo acuoso por una cepa de Streptomyces productora de vitamina B₁₂ y sometiendo el
20 caldo de fermentación así obtenido a operaciones de purificación.

25 Por compuestos similares a la vitamina B₁₂ queremos dar a entender los compuestos cristalizados rojos (no la vitamina B₁₂) que se obtienen cuando un caldo de fermentación que los contiene es sometido al tratamiento de purificación utilizado en la purificación de vitamina B₁₂ (como se describe en las páginas 13 a 16 de dicha so-

199673

205



licitud norteamericana No. 145.404) pero omitiendo el pro-
ceso de distribución en contra-corriente empleado como
operación final en esta operación de purificación. Estos
compuestos similares a la vitamina B₁₂ pueden caracteri-
zarse por el hecho de que son fácilmente convertibles a
vitamina B₁₂ pura en sí mismos por tratamiento con ion de
cianuro, como se describe en la solicitud No. 194.833, pre-
sentada el 5 de Octubre de 1950.

La recuperación de vitamina B₁₂ y/o de com-
puestos similares a la vitamina B₁₂ desde soluciones acue-
sas, tales como los caldos de fermentación que los contie-
nen, ha sido realizada hasta ahora por tratamiento de di-
chos caldos con un material adsorbente, tal como carbón
vegetal activo o tierra de batán, lo que produce un adsor-
bato que contiene vitamina B₁₂ y/o compuestos similares
a la vitamina B₁₂ presentes en el caldo, junto con diver-
sos contaminantes. El adsorbato es eluido luego con un
disolvente adecuado, tal como una solución acuosa de pi-
ridina o una piridina alcohilsubstituida, y el eluato se
evapora produciendo de este modo un producto de elabora-
ción que contiene la vitamina B₁₂ y/o compuestos similares
a la vitamina B₁₂. El producto de elaboración así obteni-
do se extrae con un disolvente de elaboración, tal como
agua o un alcohol alifático inferior, miscible con agua,
y el extracto resultante se somete a fraccionamiento cro-
matográfico añadiendo dicho extracto a una columna de ma-
terial adsorbente y lavando la columna con disolvente para

199673

20 SEP



eluir fraccionalmente la vitamina B₁₂ y/o compuestos similares a la vitamina B₁₂ del material adsorbente.

El eluato puede seguirse tratando como se expone en la mencionada solicitud norteamericana No. 146.404 para producir vitamina B₁₂ pura o para producir las sustancias similares a la vitamina B₁₂ sustancialmente libres de materiales contaminantes.

Así, la preparación de un extracto enriquecido en vitamina adecuado para cromatografía, partiendo de un caldo de fermentación que contiene vitamina B₁₂ y/o compuestos similares a la vitamina B₁₂, implicaba anteriormente las siguientes operaciones de purificación: (1) adsorción de la vitamina B₁₂ y/o de compuestos similares a la vitamina B₁₂ desde caldos de fermentación utilizando carbón activo o tierra de batán como agente adsorbente; (2) elución del adsorbato con piridina; (3) evaporación del eluato de piridina; y (4) extracción del producto de elaboración con otro disolvente.

Aunque el procedimiento citado que utiliza carbón como agente de adsorción es satisfactorio porque permite la recuperación de vitamina B₁₂ y/o de sustancias similares a la vitamina B₁₂ desde caldos de fermentación que los contienen, desde el punto de vista industrial es un método costoso y objeccionable. Adicionalmente, se ha comprobado que ocurren en el tratamiento de los eluatos pérdidas indebidamente grandes en materiales activos.

199673



Se han hecho tentativas, usando operación por tandas, para utilizar carbón como adsorbente seguido por elución del adsorbato resultante con una mezcla agua-butanol en dos fases. La tierra de batán ha sido también usada como adsorbente para los componentes activos en LLD de caldos de fermentación, pero el uso de tierra de batán ha necesitado el empleo de procedimientos por tandas para las operaciones de adsorción y de elución. Tales procedimientos por tandas, aunque dan recuperaciones mejoradas de vitamina B₁₂ y compuestos similares, poseen los detalles objeccionables característicos de las operaciones por tandas y estos procedimientos que usan carbón y tierra de batán no han demostrado ser practicables para la operación en columna.

Con anterioridad al presente invento, no se conocía ningún procedimiento de purificación que empleara un adsorbente resinoso para separar vitamina B₁₂ y/o compuestos similares a la vitamina B₁₂. Se ensayaron varios adsorbentes resinosos y demostraron ser ineficaces. Por ejemplo, los siguientes adsorbentes representativos adsorbieron poco o nada de los compuestos deseados: (a) una resina de permutación catiónica que deriva su capacidad de permutación de grupos carboxílicos; (b) una resina de permutación catiónica que deriva su capacidad de permutación de grupos sulfónicos; (c) una resina de permutación aniónica que deriva su capacidad de permutación de grupos amínicos secundarios, y (d) una resina de permutación aniónica que

199673



5 deriva su capacidad de permutación de grupos amínicos secundarios y terciarios. De hecho, los adsorbentes resinosos del tipo (a) resultaron adsorber selectivamente la estreptomina antibiótica, al paso que rechazaban sustancialmente toda la vitamina B₁₂ y/o los compuestos similares a la vitamina B₁₂.

10 Se ha descubierto ahora, sin embargo, que la vitamina B₁₂ y los compuestos similares a la vitamina B₁₂ pueden recuperarse desde caldos de fermentación con eficacia y facilidad sorprendentes utilizando como adsorbente una resina decolorante porosa sustancialmente neutra que contiene sustituyentes polares en forma de grupos hidroxílicos o amínicos, caracterizándose dichas resinas como poseedoras de poco o nada de propiedades básicas o ácidas. Preferimos de ordinario utilizar para esta finalidad una resina de amino-formaldehído tal como la Permutit DR fabricada por la Permutit Co., de Nueva York. Esta resina posee una estructura muy porosa y contiene sustituyentes polares en forma de grupos amino. La resina tiene una constante de disociación básica baja resultante de los grupos amino y posee así solamente propiedades ligeramente básicas. Alternativamente, preferimos emplear un adsorbente resinoso fenólico, tal como Duolite S-30, una resina fabricada por la Chemical Process Co., 25 de Redwood City, California, EE.UU. Esta resina es una

199673

20 SEP



resina decolorante porosa que contiene sustituyentes polares fenólicos. La resina tiene una constante de disociación ácida muy baja, y muestra con ello propiedades solamente ligeramente ácidas.

5 Como se ha señalado antes, otros adsorbentes resinosos (tales como las resinas de permutación iónica) resultaron ser ineficaces para adsorber vitamina B₁₂ y/o compuestos similares a la vitamina B₁₂ desde soluciones acuosas. Además, las resinas decolorantes porosas neutras
10 aquí descritas que contienen sustituyentes polares ofrecen ventajas considerables desde el punto de vista de la pureza del producto, rendimientos de la recuperación y economía de la operación, sobre el carbón o la tierra de batán, los únicos adsorbentes anteriormente utilizados para adsorber
15 vitamina B₁₂ y compuestos similares. Mientras que con los adsorbentes carbón o tierra de batán, la operación de adsorción sirve meramente como una operación de concentración después de la cual se requieren numerosas e intrincadas operaciones de purificación, el producto obtenido directamente
20 de caldos de fermentación utilizando una resina decolorante porosa del tipo antes descrito como adsorbente está relativamente libre de materiales indeseables presentes en el caldo original. Esto es puesto en evidencia por las elevadas recuperaciones finales de vitamina B₁₂ que se obtienen
25 debido a las pérdidas disminuidas al separar impurezas en las operaciones subsiguientes.

La vitamina B₁₂ y los compuestos similares

199673



a la vitamina B₁₂ son eluidos con facilidad en rendimiento
virtualmente cuantitativo desde estos nuevos adsorbates
resinosos utilizando una variedad de soluciones orgánicas
acuosas, particularmente una solución acuosa ácida de ace-
5 tona. No solamente este procedimiento de elución consigue
efectivamente una elución virtualmente cuantitativa de la
vitamina B₁₂ y compuestos similares, sino que logra toda-
vía una purificación ulterior del producto debida a la
acción selectiva del disolvente que deja en la resina las
10 impurezas adsorbidas. Además, los disolventes de elución
que pueden emplearse en el presente procedimiento son fá-
cilmente recuperados, en contraste con los costosos y en-
gorrosos procedimientos de recuperación necesarios para
recuperar la piridina anteriormente utilizada como disol-
15 vente de elución cuando se empleaba carbón como material
adsorbente.

Los disolventes de elución que preferimos
utilizar al eluir la vitamina B₁₂ y/o compuestos simila-
res a la vitamina B₁₂ desde los nuevos adsorbates de resi-
20 na incluyen una pluralidad de soluciones orgánicas acuosas
que pueden emplearse con grados variables de eficacia.
Como se ha señalado antes, los eluyentes preferidos son
soluciones acuosas de acetona acidificadas con un ácido
enérgico, es decir, uno que tenga una constante de diso-
25 ciación para el primer hidrógeno de más de aproximadamen-
te 1×10^{-3} . Preferimos hacer la solución aproximadamente
0,1N con tal ácido. La concentración óptima de acetona

199673



queda entre aproximadamente 30 y 60%. Los ácidos débiles
tales como el ácido acético pueden emplearse, pero la efica-
cacia de la elución disminuye. En lugar de acetona podemos
utilizar una pluralidad de disolventes orgánicos, tales co-
5 mo otras cetonas, alcoholes alifáticos inferiores, ésteres,
alcohol benéfico, y similares, siendo dichos disolventes
orgánicos al menos en parte miscibles con agua. Estos disol-
ventes parcialmente miscibles con agua se emplean en canti-
dades de hasta los límites de sus solubilidades en agua. Los
10 disolventes que, según se ha comprobado, carecen de valor,
incluyen el tolueno, el benceno, el cloroformo, el tetraclo-
ruro de carbono y similares. La elución ácida en ausencia de
un disolvente es generalmente escasa con poca separación de
sustancias activas. Una pluralidad de soluciones acuosas
15 de disolventes orgánicos que no contienen ácido eluirá mode-
radamente bien, incluyendo acetona acuosa, agua saturada
con butanol normal así como éter monoetílico acuoso de eti-
lenglicol. Algo de elución tendrá lugar también con metanol
acuoso, etanol acuoso, acetato de etilo acuoso y con agua
20 saturada de alcohol benéfico, aunque se prefiere de ordi-
nario emplear una solución acuosa ácida de disolvente or-
gánico como eluyente.

Las soluciones acuosas de bases energicas
eluirán también la vitamina B₁₂ y/o compuestos similares
25 a la vitamina B₁₂ desde el adsorbente, pero tales solucio-
nes también separarán considerables cantidades de las im-
purezas adsorbidas. Por consiguiente, se prefiere de ordi-

199673



nario eluir el componente de vitamina B₁₂ utilizando una solución acuosa ácida de disolvente orgánico. Se ha comprobado, sin embargo, que las soluciones acuosas de bases débiles pueden emplearse para separar cantidades sustanciales de impurezas adsorbidas, mientras que separan poco o nada de la vitamina B₁₂ y/o de compuestos similares a la vitamina B₁₂. Hemos comprobado que es útil hacer que la elución de sustancias activas vaya precedida por un lavado del adsorbato empleando una solución tal como una acuosa que contenga aproximadamente 1% de carbonato de metal alcalino y 0,1% de nitrito de metal alcalino. Con este tratamiento adicional, los eluatos obtenidos empleando los eluyentes preferidos contienen todavía menos impurezas.

El nuevo procedimiento de adsorción y elución que utiliza las resinas decolorantes porosas sustancialmente neutras aquí descritas que contienen sustituyentes polares, como adsorbente, puede emplearse en general para recuperar sustancias con actividad en IID y APF desde soluciones acuosas. Es particularmente útil para recuperar vitamina B₁₂ y sustancias similares a la vitamina B₁₂ desde caldos de fermentación producidos por fermentación de medios nutritivos acuosos por la mediación de cepas seleccionadas de micro-organismos de la sub-rama Fungi que sean capaces de producir vitamina B₁₂ y/o sustancias similares a la vitamina B₁₂, y en particular cepas de Streptomyces, Mycobacterium, Pseudomonas, Alternaria, y similares.

Al llevar a la práctica la operación de ad-

199673



sorción, cuando el adsorbato de resina se utiliza por primera vez, se ha comprobado que es mejor acondicionar la resina antes de la operación de adsorción. Por ejemplo, cuando se emplea Duolite S-30, la resina se coloca en una columna y se lava con solución alcalina acuosa. Aproximadamente 8 litros de solución acuosa al 2% de hidróxido sódico por Kg. de resina se emplean usualmente y esta solución se hace pasar por la columna a un tiempo de contacto (volumen de resina en c.c. dividido por el caudal de paso en c.c. por minuto) de aproximadamente 25-30 minutos. El tratamiento de la Duolite S-30 con álcali determina el cambio de color de la resina desde canela hasta púrpura. El lavado alcalino va seguido por un lavado con agua, aproximadamente 8 litros por Kg. de resina al mismo tiempo de contacto. Se ha comprobado que es ventajoso seguir el lavado con agua por un lavado con ácido, empleando aproximadamente 6,4 litros de solución acuosa al 2% de ácido clorhídrico por Kg. de resina, a un tiempo de contacto de unos 14 minutos. El tratamiento de Duolite S-30 con ácido hace que la resina cambie de color desde púrpura a canela. El lavado con ácido va seguido por un segundo lavado con agua, aproximadamente 8 litros por Kg. de resina a un tiempo de contacto de 14 minutos. Se da a la resina un segundo lavado alcalino, como antes se ha descrito, y este va seguido por un lavado con agua a aproximadamente 25-30 minutos de tiempo de contacto hasta que el pH del efluente sea de aproximadamente 7-8. Como se ha mencionado antes, este tratamiento preliminar se denomina "acondi-

199673

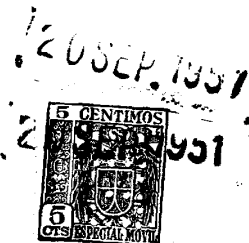


dicionamiento" de la resina. La resina es entonces adecuada para su uso en la adsorción. El pH de la resina no es importante, ya que se ajusta rápidamente al de la solución que se está tratando.

5 La solución a tratar puede ponerse en contacto con la resina por mezcla en tandas, pero es mucho más ventajoso operar haciendo pasar la solución a través de una columna de resina. La dirección del flujo a través de la columna puede ser hacia arriba o hacia abajo. En la operación
10 en columna, parece ser preferible emplear resina de un tamaño de partículas de aproximadamente 20-60 mallas para una eficacia hidráulica óptima. El caldo de fermentación a tratar está con preferencia a un pH de aproximadamente 5-8 para evitar la posibilidad de la descomposición de
15 sustancias activas a mayores y menores valores de pH. El pH, sin embargo, no es crítico en cuanto se refiere a la eficacia de la adsorción.

 Como es usual en la mayoría de las operaciones con resinas, se dispone de una tolerancia considerable en la selección de las condiciones operativas, tales como cantidades y caudales de paso. Estas condiciones son función tanto de las soluciones tratadas como de consideraciones económicas, tales como volúmenes a tratar y requisitos de equipo y espacio. Por consiguiente, en
20 la iniciación de las operaciones y/o cuando se trata una nueva solución, es deseable cierta cantidad de experimentación para establecer las condiciones óptimas.

199673



En general, la cantidad de solución que puede tratarse con una cantidad dada de resina disminuye a medida que el número de sustancias indeseadas presentes en la solución aumenta. Los tipos de sustancias indeseadas presentes son también un factor. En la adsorción, puede decirse que el porcentaje de adsorción aumenta con el tiempo de contacto, hasta cierto límite, y los requisitos de la resina disminuyen con el tiempo de contacto incrementado. En la elución, los requisitos del eluyente disminuyen con el tiempo de contacto incrementado, hasta cierto límite, con aumentos correspondientes en la concentración de sustancias activas en los aluatos.

Como quiera que los caldos producidos por la fermentación de Streptomyces griseus figuran actualmente entre las más importantes de las soluciones que contienen vitamina B₁₂ y/o compuestos similares a la vitamina B₁₂, las condiciones preferidas en el tratamiento de tal caldo con Duolite S-30 se exponen como ilustrativas. Se comprenderá que estas condiciones pueden variarse considerablemente, dando todavía un proceso practicable. El caldo de fermentación de S. griseus según se prepara en la actualidad exhibe de ordinario del orden de 2.000-10.000 unidades por c.c. de actividad den ILD, ensayada empleando L. lactis Dornier como organismo de ensayo y vitamina B₁₂ como patrón. Para una operación de la máxima eficacia, se prefiere emplear en operación en columna un volumen de alimentación de aproximadamente 180-200 litros de caldo por 1/2 Kg. de

199673



resina, a un tiempo de contacto de unos 10 minutos (un caudal de paso de unos 0,2 litros por minuto por Kg. de resina; la Duolite S-30 regenerada tiene una densidad a granel de aproximadamente 0,5 Kgs. por litro). En estas
5 condiciones y empleando caldo de aproximadamente 6.000 unidades por c.c. de actividad LLD, resulta un peso directo acumulativo de aproximadamente 20-25% (actividad LLD remanente en el efluente de la columna). Las sustancias activas en el efluente procedente de la columna son recuperadas haciendo pasar el efluente a través de una segunda
10 columna de resina. Alternativamente, pueden hacerse funcionar dos o más columnas en serie, eluyendo y regenerando alternativamente columnas individuales a medida que se aproximan a la saturación. Después de la adsorción, la columna se lava con aproximadamente 12 litros de agua por Kg.
15 de resina a un tiempo de contacto de unos 10 minutos. El lavado desplaza lo último del caldo y separa las impurezas muy pigmentadas que pueden perturbar las operaciones de purificación subsiguientes. Alternativamente, la adsorción y el desplazamiento de caldo con agua van seguidos
20 por un lavado de la columna con aproximadamente 4 litros por Kg. de resina, de una solución acuosa que contiene 1% de carbonato de metal alcalino y 0,1% de nitrito de metal alcalino, a un tiempo de contacto de unos 60 minutos. Este
25 lavado elimina las impurezas pigmentadas y desadsorbe la mayoría de las restantes impurezas coloreadas, haciéndolas eluibles con agua. La columna se lava luego con aproxima-

199673



damenta 20 litros de agua por Kg. de resina a un tiempo de contacto de unos 10 minutos.

Al eluir el mencionado adsorbato, empleamos en general para la elución aproximadamente 8 litros por Kg. de resina del eluyente preferido, acetona acuosa acidificada, a un tiempo de contacto de unos 20-60 minutos. La cantidad de eluyente necesaria es determinada observando la elución: una vez que el agua es desplazada de la columna, se recoge una fracción de cabeza amarillo clara o parda hasta que el eluato se vuelve negro rojizo oscuro. Este color señala el comienzo del eluato rico que se recoge por separado hasta que el color cambia a amarillo o pardo claro, momento en que la fracción de cola comienza y se recoge por separado. (Un cambio de color similar en el eluato ocurre en la elución de Permutit DR desde amarillo a rojo parduzco a amarillo). Con los eluyentes preferidos, se ha comprobado que sólo cantidades despreciables de sustancias activas están presentes en la fracción de cabeza y en la de cola, de modo que solo precisa utilizarse el eluato rico. La última parte de eluyente es desplazada de la columna con agua.

La resina es regenerada luego lavando con una solución alcalina acuosa. Preferimos lavar la columna con aproximadamente 8 litros por Kg. de resina de solución de hidróxido sódico al 2%, a un tiempo de contacto de unos 25-30 minutos. La columna es lavada luego con agua hasta que el pH del efluente sea de aproximadamente 7-8 en cuyo momento la columna está lista para su nuevo uso en la ad-

199673



adsorción.

Los ejemplos siguientes ilustran métodos de realización del presente invento pero ha de entenderse que estos ejemplos se dan a modo de ilustración y no de limitación.

Ejemplo 1.

En cada una de dos columnas de vidrio de 51 mm. de diámetro interior conectadas en serie se colocaron 2.500 c.c. de resina Duolite S-30 de 20-60 mallas. La resina se estaba usando por primera vez para la adsorción de sustancias activas en ILD y se acondicionó previamente con lavados alternados con álcali y ácido, lavándose finalmente con agua a pH 4-5, después de un lavado con ácido.

400 litros de caldo de fermentación de estreptomocina a pH 6,2, previamente tratado para separar la estreptomocina, se ensayó usando L.lactis Dorner como organismo de ensayo y vitamina B₁₂ como patrón, y resultó tener aproximadamente 5.800 unidades por c.c. de actividad (11.000 unidades \approx 1 microgramo de vitamina B₁₂) o un total de unas $21,9 \times 10^8$ unidades ILD de actividad. El caldo se hizo pasar en flujo ascendente por las dos columnas en serie, a un tiempo total de contacto de unos 20 minutos (unos 250 c.c./min.). Lo último del caldo se desplazó de la columna con agua. El efluente se ensayó y resultó contener un total de aproximadamente $2,8 \times 10^8$ unidades ILD de actividad. Así, como $19,1 \times 10^8$ unidades de actividad (87,2%) fueron adsorbidas en las columnas. Luego las columnas se

199673

20



lavaron en serie con unos 15 litros de agua a un tiempo total de contacto de unos 20 minutos. Las lavaduras se ensayaron y resultaron tener actividad en ILD despreciable.

5 Cada columna se eluyó luego separadamente con 40% de agua - 60% de acetona (en volumen) hecha 1N con ácido clorhídrico, a un tiempo de contacto de unos 20 minutos. Unos 6.100 c.c. de eluate rico se recogieron de la primera columna, y unos 6.900 c.c. de la segunda. La actividad total en las fracciones de eluate rico fué de aproximadamente 18,7 x 10⁶ unidades de actividad ILD, aproximadamente 98% de la adsorbida.

Ejemplo 2

15 En cada una de dos columnas de vidrio de 29 mm. de diámetro interior conectadas en serie se colocaron 100 c.c. de resina Duelite S-30 de 20-60 mallas. La resina se había usado previamente para la adsorción de sustancias ILD activas y se había regenerado posteriormente por lavado con álcali, ácido y agua a pH 4-5.

20 Seis litros de caldo de fermentación de estreptomicina a pH 6,3, previamente tratado para separar la estreptomicina, se ensayó usando L.lactis Dorner y resultó contener unas 8.200 unidades de actividad por c.c. o un total de aproximadamente 49,2 x 10⁶ unidades ILD de actividad. Al caldo se le añadieron 0,75 mgrs. de vitamina radioactiva B_{12a}, dando 18.000 golpes por minuto, medidos con un contador de radiaciones. La actividad total en ILD después de esta adición fué de aproximadamente 55,1 x 10⁶ uni-

199673

20 SEP 1951



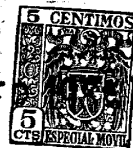
dades.

El caldo se hizo pasar entonces en flujo descendente a través de las dos columnas en serie, a un tiempo de contacto total de unos 35-40 minutos (unos 5-6 cc/min).
5 Lo último del caldo se desplazó de la columna con agua. El efluente se ensayó para su actividad en LLD, y se midió su radioactividad. Los resultados mostraron que 95% de las sustancias activas en LLD y 91% del material radioactivo estaban adsorbidos en las columnas. Las columnas se lavaron luego
10 en serie con aproximadamente 2 1/2 litros de agua a un tiempo de contacto total de unos 20 minutos.

Cada columna se eluyó luego separadamente con 40% de agua - 60% de acetona (en volumen) hecha 0.1N con ácido clorhídrico, a un tiempo de contacto de unos
15 60-75 minutos. El volumen de eluyente para la primera columna fué de unos 600 mls., de los cuales unos 315 mls. se recogieron como fracción rica. El volumen de eluyente para la segunda columna fué de unos 500 mls. de los cuales unos 200 mls. se recogieron como fracción rica. Las fracciones
20 ricas se ensayaron para actividad en LLD, y se midieron sus radioactividades. Los resultados mostraron que virtualmente todas las sustancias activas en LLD y radioactivas adsorbidas fueron separadas en las fracciones ricas. La relación de actividad encontrada en la fracción rica de la primera
25 columna a la actividad encontrada en la fracción rica de la segunda columna fué de aproximadamente 10 : 1 para cada tipo de actividad.

199673

20SF



5 Cuando el citado proceso se repitió empleando caldo de fermentación de estreptomocina el cual se le había añadido vitamina B₁₂ radioactiva se encontró análogamente que las eficacias de la adsorción y de la elución
10 eran altas, tanto cuando se calcularon sobre la base de mediciones de actividad en LLD como sobre la base de mediciones de radioactividad. Así, se comprobó que este procedimiento es muy eficaz para separar sustancias activas en LLD y en particular vitamina B₁₂ y el compuesto similar a la
15 vitamina B₁₂, vitamina B_{12a}, desde caldos de fermentación.

Ejemplo 3

Unos 200 litros de caldo de fermentación de estreptomocina (pH 6,2) del cual había sido retirada la estreptomocina y con una actividad total en LLD de $5,5 \times 10^9$
15 unidades, se hizo pasar a través de 3.900 c.c. de resina Duolite 2-30 (pH8) colocados en una columna de 25 mm. (1.400 c.c.) y una columna de 51 mm. (2.500 c.c.) en serie y en flujo descendente. El tiempo total de contacto fué de unos 28 minutos. Después de lavado con agua, aproximadamente 75%
20 de la actividad se encontró que había sido retenida en las columnas.

Cada columna se eluyó luego por separado con 40% de agua - 60% de acetona a un tiempo de contacto de unos 20 minutos. Unos 2150 c.c. de eluate rico se recogieron de la primera columna y unos 1.340 c.c. de la segunda.
25 La actividad total en las fracciones de eluate rico fué de aproximadamente 96% de la adsorbida.

199673

20 SE



Ejemplo 4.

20 litros aproximadamente de caldo de fermentación de estreptomocina (pH 7,4), del cual había sido separada la estreptomocina y con una actividad LLD total de $1,1 \times 10^6$ unidades, se hizo pasar a través de 154 c.c. de resina Duolite S-30 (pH 8) colocados en una columna de 25 mm., en flujo descendente. El tiempo de contacto fué de unos 5 1/2 minutos. Después de lavado con agua, como 73% de la actividad resultó haber sido retenida en la columna.

10 La columna se eluyó luego con agua saturada de butanol normal a un tiempo de contacto de unos 11 minutos. Unos 950 c.c. de eluato rico se recogieron de la columna. La actividad en la fracción de eluato rico fué de aproximadamente 55% de la adsorbida.

15 Ejemplo 5

Tres columnas de 25 mm. conteniendo cada una 154 c.c. de resina Duolite S-30 (pH 8) se dispusieron en paralelo. Una cantidad separada de unos 20 litros de caldo de fermentación de estreptomocina (pH 6,5), del cual había sido retirada la estreptomocina, y con una actividad LLD total de $5,2 \times 10^7$ unidades, se hizo pasar a través de cada columna en flujo descendente. El tiempo de contacto en cada caso fué de aproximadamente 5 minutos. Después de lavado con agua, aproximadamente 84%, 82% y 82% de la actividad resultó haber sido retenida en las columnas 1, 2 y 3, respectivamente.

25 Cada columna se eluyó luego con una solución diferente, la No. 1 con 40% de agua - 60% de acetona hecha

199673

20 SEP.



0,1N con ácido clorhídrico, la No. 2 con agua saturada de n.-butanol hecha 0,1N con ácido clorhídrico, y la No. 3 con 40% de agua - 60% de acetona hecha 0,1N con ácido fósfórico. El tiempo de contacto en cada caso fué de unos
5 10 minutos. Unos 455 cc, 620 c.c y 365 c.c. de eluato rico se recogieron de las columnas números 1, 2 y 3, respectivamente. La actividad en la fracción de eluato rico fué de aproximadamente 96%, 78% y 98% de la adsorbida, para las columnas 1, 2 y 3, respectivamente.

10 Un ensayo adicional mostró que la elución con 70% agua - 30% acetona hecha 0,1N con ácido fosfórico fué aproximadamente tan eficaz como la elución con ácido fosfórico citada con 40% de agua - 60% de acetona.

Ejemplo 6.

15 Dos columnas de 25 mm., conteniendo cada una 154 c.c. de resina Duolite S-30 (pH 8) se dispusieron en paralelo. Una cantidad separada de unos 20 litros de caldo de fermentación de estreptomocina (pH 6,2) del cual había sido retirada la estreptomocina y con una actividad
20 ELD total de $6,1 \times 10^7$ unidades, se hizo pasar a través de cada columna en flujo descendente. El tiempo de contacto en cada caso fué de unos 5 minutos. Después de lavado con agua, como 84% de la actividad resultó haber sido retenida en cada una de las columnas 1 y 2.

25 La columna número 1 se eluyó con 40% de agua - 60% de acetona hecha 0,1N con ácido sulfúrico, y la columna número 2 se eluyó con 40% de agua - 60% de

199673



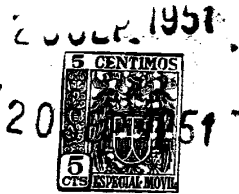
acetona hecha 0,1N con ácido acético. El tiempo de contacto en cada caso fué de unos 10 minutos. Unos 400 c.c. de eluato rico se recogieron de la columna número 1 y unos 300 c.c. de la columna número 2. La actividad en la fracción de eluato rico fué de aproximadamente 100% de la adsorbida para la columna número 1 y de aproximadamente 70% de la adsorbida para la columna número 2.

Ejemplo 7

Se prepararon caldos de fermentación por propagación de 3 miembros representativos adicionales de los Fungi capaces de producir sustancias con actividad en ILD y AFP: (1) Mycobacterium smegmatis. (2) Pseudomonas lumichroma (una nueva especie de Pseudomonas capaz de oxidar riboflavina a lumicroma), y (3) Alternaria. Cada caldo de aproximadamente pH 7 se hizo pasar en flujo descendente a través de una columna de 29 mm que contenía 100 c.c. de resina Duclite S-30 a pH aprox. 5. La resina había sido previamente regenerada por lavado con álcali, ácido y agua. El tiempo de contacto del caldo en cada caso fué de aproximadamente 33 minutos. Los volúmenes de caldo y actividades ILD totales fueron: (1) 3.000 c.c. y 10.8×10^6 unidades, (2) 2.925 c.c. y 19.3×10^6 unidades, y (3) 2.625 c.c. y 12.3×10^6 unidades. Después de lavado con agua, casi toda la actividad resultó haber sido retenida en la columna en cada caso.

Cada columna se eluyó luego con 40% de agua - 60% de acetona hecha 0,1N con ácido clorhídrico, a un

199673



tiempo de contacto de unos 50 minutos. Los volúmenes de eluate rico y los porcentajes aproximados de actividad adsorbida presente en los eluates ricos fueron: (1) 250 c.c. y 50%, (2) 300 c.c. y 65%, (3) 270 c.c. y 50%. (No se establecieron condiciones óptimas para estos caldos).

Ejemplo 8.

En una columna de vidrio de 29 mm. de diámetro interior se colocaron 100 c.c. de resina Permitt DR de 20-60 mallas, a pH 8. 15 litros de caldo de fermentación de estreptomocina a pH 7,2 previamente tratado para separar la estreptomocina se ensayaron y resultaron tener unas 2.800 unidades por c.c. de actividad ILD e un total de unas 42×10^6 unidades de actividad. El caldo se hizo pasar en flujo descendente a través de la columna de resina, a un tiempo de contacto de unos 10 minutos. El caldo fué seguido por un lavado con agua de 500 c.c. El efluente del caldo y el lavado combinados contenían un total de unas $5,2 \times 10^6$ unidades de actividad. Así, se adsorbieron en la columna unas $36,8 \times 10^6$ unidades de actividad (87,5%).

La columna se eluyó luego con 40% de agua - 60% de acetona hecha 0,1N con ácido clorhídrico, a un tiempo de contacto de unos 20 minutos. Se recogieron y ensayaron unos 1.080 c.c. de eluate rico. La actividad total en el eluate rico fué de aproximadamente $36,7 \times 10^6$ unidades de actividad ILD, aproximadamente 100% de la adsorbida.

199673



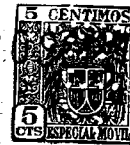
Ejemplo 9.

40 litros de caldo de fermentación de estreptomocina a pH 6,3 previamente tratados para separar la estreptomocina resultaron tener en el ensayo un total de aproximadamente 325×10^6 unidades LLD de actividad, equivalentes a la actividad aproximadamente de 29,6 mgrs. de vitamina B₁₂. Al caldo se le añadieron 4,34 miligramos de vitamina B₁₂ radioactiva.

El caldo se adsorbió luego y se eluyó desde 400 c.c. de resina Duolite 3-30 en la forma descrita en el ejemplo 2. Se combinaron las fracciones de eluato ricas, se ajustaron a pH 7-8, se concentraron y se trataron con cianuro potásico, como se expuso en la mencionada solicitud número 194.833, para convertir en vitamina B₁₂ los compuestos similares a la vitamina B₁₂. Una parte de la solución resultante se purificó luego todavía por los métodos expuestos en la solicitud norteamericana 146.404 para obtener un producto cristalizado que pesaba 14,8 miligramos, que contenía como 15% de humedad y que resultó ser vitamina B₁₂ de 95-100% de pureza sobre base anhidra. La medición de la radioactividad mostró una recuperación de aproximadamente 36,6% (el equivalente de unos 1,59 miligramos) de la vitamina B₁₂ radioactiva añadida. El resto del producto cristalizado, unos 11 miligramos (exento de humedad) fue así derivado de las sustancias con actividad de LLD presentes en el caldo de partida.

Al realizar el presente invento pueden

199673



1951

5 hacerse diversos cambios y modificaciones sin apartarse por ello de su espíritu y alcance. En cuanto tales cambios y modificaciones caigan dentro de los límites de las reivindicaciones anejas, han de considerarse como parte del invento.

10 Esta solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América el 21 de Septiembre de 1950, bajo el número 186.115, 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 que comprende poner en contacto una solución acuosa que contiene sustancias vitamínicas, con actividad LLD y APF, con una resina decolorante porosa sustancialmente neutra que contiene sustituyentes polares adsorbiendo con ello dichas sustancias vitamínicas sobre dicha resina.

2ª. - El procedimiento que comprende poner

199673

203



en contacto una solución acuosa que contiene vitamina B₁₂ con una resina decolorante porosa sustancialmente neutra que contiene sustituyentes polares, adsorbiendo con ello la vitamina B₁₂ sobre dicha resina.

5

3^a. - El procedimiento que comprende poner en contacto una solución acuosa que contiene un compuesto similar a la vitamina B₁₂ con una resina decolorante porosa sustancialmente neutra que contiene sustituyentes polares, adsorbiendo con ello el compuesto similar a la vitamina B₁₂ sobre dicha resina.

10

4^a. - El procedimiento que comprende poner en contacto una solución acuosa que contiene vitamina B₁₂ con un adsorbente resinoso fenólico decolorante poroso sustancialmente neutro, adsorbiendo con ello la vitamina B₁₂ sobre dicho adsorbente.

15

5^a. - El procedimiento que comprende poner en contacto una solución acuosa que contiene un compuesto similar a la vitamina B₁₂ con un adsorbente resinoso fenólico decolorante poroso sustancialmente neutro, adsorbiendo con ello el compuesto similar a la vitamina B₁₂ sobre dicho adsorbente.

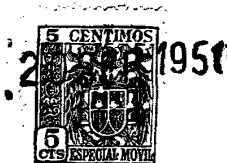
20

6^a. - El procedimiento que comprende poner en contacto una solución acuosa que contiene vitamina B₁₂ con una resina de amina-formaldehído decolorante porosa sustancialmente neutra, adsorbiendo con ello la vitamina B₁₂ sobre dicha resina.

25

7^a. - El procedimiento que comprende poner

199673



5 en contacto una solución acuosa que contiene un compuesto similar a la vitamina B₁₂ con una resina de amina-formaldehído, decolorante, porosa, sustancialmente neutra, adsorbiendo con ello el compuesto similar a la vitamina B₁₂ sobre dicha resina.

10 8º. - El procedimiento que comprende poner en contacto una resina decolorante porosa sustancialmente neutra que contiene sustituyentes polares con un caldo de fermentación que contiene sustancias vitamínicas con actividad IID y APF, adsorbiendo con ello dichas sustancias vitamínicas sobre dicha resina, y tratar el adsorbato así obtenido con una solución ácida de disolvente orgánico, siendo dicho disolvente orgánico al menos parcialmente miscible con agua, eluyendo con ello dichas sustancias vitamínicas desde dicho adsorbato.

20 9º. - El procedimiento que comprende poner en contacto un adsorbente resinoso fenólico decolorante poroso sustancialmente neutro con un caldo de fermentación que contiene vitamina B₁₂, adsorbiendo con ello dicha vitamina B₁₂ sobre dicho adsorbente resinoso, y tratar el adsorbato así obtenido con una solución acuosa ácida de acetona, eluyendo así dicha vitamina B₁₂ desde dicho adsorbato.

25 10º. - El procedimiento que comprende poner en contacto un adsorbente resinoso fenólico decolorante poroso sustancialmente neutro con un caldo de fermentación que contiene un compuesto similar a la vitamina B₁₂, adsor-

20 SEP. 1951

199673



5 biendo con ello dicho compuesto similar a la vitamina B₁₂ sobre dicho adsorbente resinoso, y tratar el adsorbato así obtenido con una solución acuosa ácida de acetona, eluyendo con ello dicho compuesto similar a la vitamina B₁₂ desde dicho adsorbato.

10 11a. - El procedimiento que comprende poner en contacto una resina de amina-formaldehído decolorante porosa sustancialmente neutra con un caldo de fermentación que contiene vitamina B₁₂, adsorbiendo con ello dicha vitamina B₁₂ sobre dicha resina, y tratar el adsorbato así obtenido con solución acuosa ácida de acetona, eluyendo con ello dicha vitamina B₁₂ desde dicho adsorbato.

15 12a. - El procedimiento que comprende poner en contacto una resina de amina-formaldehído decolorante porosa sustancialmente neutra con un caldo de fermentación que contiene un compuesto similar a la vitamina B₁₂, adsorbiendo con ello dicho compuesto similar a la vitamina B₁₂ sobre dicha resina, y tratar el adsorbato así obtenido con solución acuosa ácida de acetona, eluyendo con ello dicho compuesto similar a la vitamina B₁₂ desde dicho adsorbato.

20 13a. - En un procedimiento para recuperar y purificar una sustancia con actividad LLD y APF, el método que comprende separar dicha sustancia desde una solución acuosa de la misma por puesta en contacto de dicha solución con Duelite S-30 (una resina que ha sido descrita en la Memoria) y retirar luego dicha sustancia desde dicha

199673



20 SEP. 1951

Duolite S-30.

14^a. - En un procedimiento para recuperar y purificar un miembro seleccionado del grupo consistente en vitamina B₁₂ y sustancias afines con actividad LLD y APF, el método que comprende retirar dicho miembro de una solución acuosa del mismo por puesta en contacto de dicha solución con Duolite S-30 y retirar luego dicho miembro de dicha Duolite S-30.

15^a. - El procedimiento de adsorber sustancias activas en LLD y APF, vitamina B₁₂ y compuestos similares a la vitamina B₁₂ utilizando una resina decolorante porosa sustancialmente neutra que contiene sustituyentes polares como adsorbente, y eluir los materiales activos desde los adsorbates resultantes empleando soluciones acuosas de disolvente orgánico sustancialmente como se ha descrito y reivindicado.

16^a. - Un procedimiento para recuperar vitamina B₁₂ y/o compuestos similares a ella desde soluciones acuosas.

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

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

Madrid,

20 SEP. 1951

P. A.
Alberto de Elzaburu
Por Poder