

28 FEB



226971

226971

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a
la solicitud de

una PATENTE de INVENCION por VEINTE AÑOS en ESPAÑA, a favor de OLIN MATHIESON CHEMICAL CORPORATION, de nacionalidad norteamericana, residente en 460 Park Avenue, NEW YORK 22 (N.Y. - EE.UU.), por: "UN METODO PARA PURIFICAR Y SEPARAR ANTIBIOTICOS".

Prioridad: Solicitud de Patente norteamericana Serial No 503.815, del 25 de Abril de 1955.

Inventores: Leon Heuser y John Vandeputte, de nacionalidad estadounidense.-

28
226971



5.- La presente invención se refiere a métodos para purificar y separar antibióticos, y más particularmente para recuperar tetraciclina de un caldo de fermentación u otro medio acuoso que contiene el antibiótico y contaminadores genéticos, y para separar tetraciclina de una mezcla de estos con clorotetraciclina.

10.- Con anterioridad a esta invención, se ha demostrado que un potente antibiótico, llamado tetraciclina, se halla presente en los líquidos de cultivo obtenidos cuando especies de ciertos géneros de Streptomyces se desarrollan en o sobre medios nutrientes líquidos (véase, por ejemplo, Minieri et al., Antibiotic Annual 1953-1954, 81-87). Además se sabía que cuando la tetraciclina se produce mediante un proceso de fermentación, la tetraciclina formada está mezclada con varios contaminadores genéticos (sólidos y líquidos) que a menudo incluyen un segundo antibiótico, la clorotetraciclina, formada simultáneamente. Sin embargo, con anterioridad a esta invención no se conocía un método sencillo y eficaz para separar la tetraciclina de los sólidos (V.g., micelios, esporas y otros sólidos sedimentables), otros antibióticos (v.g., clorotetraciclina) simultáneamente formados y materiales inactivos en el medio de cultivo.

15.-
20.- Por consiguiente, un objeto de esta invención es el de proporcionar un método perfeccionado para recuperar tetraciclina de un caldo de fermentación que la contenga y contaminadores genéticos.

25.- Otro objeto de esta invención es el de proporcionar un método ventajoso para separar tetraciclina de impurezas inactivas presentes en el filtrado obtenido de un cultivo de un Streptomyces productor de tetraciclina.

30.- Otro objeto más de la invención es el de proporcionar un método ventajoso para separar tetraciclina de otros antibióticos, como clorotetraciclina, producidos simultáneamente en un proceso de fermentación que utiliza un Streptomyces productor de tetraciclina.

35.- Un cuarto objeto de la invención es el de proporcionar un método ventajoso para separar la tetraciclina de una mezcla de la misma con clorotetraciclina.

Estos objetos se consiguen mediante el método de la in



- 40.- vención, que esencialmente comprende tratar el filtrado de un cultivo de un Streptomyces productor de tetraciclina con un disolvente orgánico substancialmente inmiscible con el agua a un pH alcalino, y recuperar la tetraciclina del disolvente. Los disolventes apropiados que pueden utilizarse
- 45.- en el proceso de la presente invención incluyen alcoholes, cetonas y ésteres. Entre los alcoholes substancialmente inmiscibles con el agua pueden mencionarse los alcanoles inferiores de más de tres átomos de carbono (v.g., butanol, pentanol, o pentasol y hexanol), cicloalcanoles (v.g., ciclohexanol metílico) y aralcanoles (v.g., alcohol bencílico).
- 50.- Ejemplos de cetonas substancialmente inmiscibles en el agua convenientes son los alcanones de más de tres átomos de carbono (v.g., etilcetona metílico) y cicloalcanones (v.g., ciclohexanone metílico). Ejemplos de ésteres substancialmente inmiscibles en el agua operativos son los ácidos grasos inferiores de cellosolve (v.g., acetato de cellosolve). De estos, los alcoholes substancialmente inmiscibles en el agua son preferidos, siendo de particular preferencia los alcanoles inferiores, como el butanol.
- 60.- Previamente a la extracción de la tetraciclina del filtrado de cultivo del disolvente orgánico, un cultivo entero (caldo) de un Streptomyces productor de tetraciclina se acidula a un pH inferior a 5.0 (preferentemente inferior a aproximadamente 2) con un ácido tal como ácido clorhídrico, sulfúrico o nítrico, y el líquido de cultivo se separa de los sólidos de cultivo residuales, como por filtración o centrifugación. El filtrado de cultivo acidulado, que contiene la mayor porción de la tetraciclina en el caldo y asimismo contiene cualquier clorotetraciclina producida, se extrae
- 65.- entonces con los disolventes orgánicos substancialmente inmiscibles con el agua.
- 70.- Bien sea antes de, con o después de la adición del disolvente orgánico substancialmente inmiscible con el agua extractor, el filtrado de cultivo se trata con una base, como hidróxido sódico, para ajustar el pH del filtrado a un
- 75.- valor alcalino como de aproximadamente 7.5 a 10.5 (preferentemente aproximadamente de 9 a 9.5). Con el fin de asegurar la máxima extracción, el disolvente orgánico (v.g., butanol), se agrega al filtrado en cantidades que varían de apro



- 80.- ximadamente el 13% a aproximadamente el 50% por volumen. La capa de disolvente orgánico así formada se separa ahora y trata como sigue para recuperar la tetraciclina en ella disuelta.
- 85.- Sin embargo, antes de recuperar la tetraciclina resulta conveniente que las impurezas de color en la solución de disolvente orgánico se separen, concentrando la solución a aproximadamente una quinta a aproximadamente una décima parte de volumen por destilación al vacío a un pH de un valor de aproximadamente 7.0 a 8.5 (preferentemente aproximadamente 8.0 a 8.5), después de lo cual las impurezas de color se precipitan y separan por filtración. Asimismo, resulta conveniente que cualquier ión de calcio presente en la solución de disolvente orgánico (introducido por el medio de fermentación y afectando favorablemente la extracción de la tetraciclina dentro del solvente orgánico) se separe por el hecho de acidular la solución a un pH de aproximadamente 1.5 a 2.5 (preferentemente a aproximadamente 1.7 a aproximadamente 2.0) con un ácido o mezcla de ácidos, uno de cuyos aniones forma una sal insoluble con el catión de calcio (v.g., con ácido sulfúrico o ácido oxálico), para precipitar el ión cálcico como dicha sal (v.g., sulfato cálcico u oxalato cálcico) y permitir la separación de la misma por filtración.
- 90.-
- 95.✓
- 100.- A continuación la tetraciclina puede ser separada de la solución de disolvente orgánico mediante una variedad de procedimientos. Así pues, la solución, una vez separado el ión cálcico, puede ser sometida a extracción inversa con agua a un pH básico (preferentemente a un pH de aproximadamente 9.5, en el que la constante de distribución para un sistema de agua/butanol es de aproximadamente 6). La capa acuosa ahora se ajusta a un pH de aproximadamente 3.8 a 7.0 (preferentemente a aproximadamente 4.0 a 4.5) con un ácido, como ácido clorhídrico, para cristalizar y precipitar la base de tetraciclina.
- 105.-
- 110.-
- 115.- Un método preferido para separar la tetraciclina de la solución orgánica, no obstante, implica el ajuste de la solución de disolvente orgánico a un pH de aproximadamente 3.8 a aproximadamente 7.0 (preferentemente a aproximadamente 4.0 a aproximadamente 4.5), con o sin concentración



- 120.- de la solución por destilación al vacío. (en el caso de que la solución no haya sido concentrada previamente para la separación de las impurezas de color) y con la adición de una veintava parte a una mitad de volumen de agua (preferentemente a una cuarta parte de volumen), para precipitar
- 125.- la tetraciclina cruda. Este ajuste de pH se efectúa mediante un ácido, como un ácido mineral (vg., ácido clorhídrico o ácido sulfúrico), si la solución se encuentra en su valor pH básico original, o mediante una base, como hidróxido sódico, si la solución ha sido hecha demasiado ácida para precipitar los iones cálcicos.

- 130.- Se ha descubierto que, al precipitar la tetraciclina cruda a un pH de un valor de aproximadamente 3.8 a aproximadamente 7.0 se efectúa una separación inesperada, casi cuantitativa, de tetraciclina de cualquier clorotetraciclina residual. Bajo estas condiciones, la clorotetraciclina resulta relativamente soluble en el disolvente orgánico acuoso y, por lo tanto, permanece en su mayor parte dentro de la solución, mientras que la tetraciclina resulta relativamente insoluble y se precipita como un producto cristalino relativamente libre de clorotetraciclina. Esta diferencia en la solubilidad no fué prevista por la naturaleza química de los respectivos antibióticos o sus constantes de disociación.
- 135.-
- 140.-

- 145.- La tetraciclina precipitada puede ser sometida a purificación posterior y/o convertida en una sal de adición ácida por cualquiera de cierto número de procedimientos alternativos. Según un método, la base de tetraciclina se disuelve en uno de los disolventes orgánicos acuosos anteriormente citados (preferentemente butanol húmedo), tratada en solución con el ácido deseado a un pH de aproximadamente 1.5 a aproximadamente 2.5, (preferentemente aproximadamente 2.0) y filtrado para separar materiales inactivos insolubles. Entre los ácidos utilizables pueden citarse el ácido sulfúrico, el ácido clorhídrico, el ácido fosfórico, el ácido oxálico, el ácido cítrico, el ácido sulfámico y el ácido nítrico. El agua y una porción del disolvente orgánico se separan ahora por destilación azeotrópica bajo vacío, y el concentrado resultante se enfría, si es preciso, a una temperatura de 5°C. a aproximadamente 20°C. (preferentemen-
- 150.-
- 155.-



160.- te a aproximadamente 5°C.), después de la cual la sal de adición ácida de tetraciclina se precipita y se recupera por filtración.

165.- La tetraciclina cruda, asimismo, se puede purificar disolviéndola en una mezcla de agua y uno de los disolventes orgánicos substancialmente inmiscibles en el agua anteriormente citados, o sólo en agua, o bien en una mezcla de agua y un disolvente orgánico miscible con el agua, como metanol, etanol, isopropanol o acetona, a un pH de aproximadamente 1.5 a aproximadamente 2.0 (preferentemente de aproximadamente 1.7 a 2.0); filtrando a continuación para separar las impurezas insolubles. El filtrado ahora se ajusta a un pH de aproximadamente 3.8 a aproximadamente 7.0 (preferentemente de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 4.2), por tratamiento con una base como hidróxido sódico.

170.- En el caso de utilizarse un disolvente orgánico acuoso, según se indicó anteriormente, y el pH sea de aproximadamente 3.8 a aproximadamente 7.0, la tetraciclina se precipita, mientras la clorotetraciclina es relativamente soluble y permanece en la solución. Así pues, este procedimiento alternativo tiene utilidad general en la separación de la clorotetraciclina y tetraciclina, independientemente de la fuente inicial de los antibióticos; por esto, también puede ser utilizado, inter alia, para la separación de clorotetraciclina de tetraciclina cuando esta última se produce a partir de una hidrogenación anterior.

175.- Por lo tanto, por la práctica de esta invención, no solamente se aísla la tetraciclina de las impurezas inactivas normalmente encontradas en un caldo de fermentación, pero asimismo de cualquier clorotetraciclina que haya sido producida durante el periodo de fermentación, siendo posible dicho aislamiento por el hecho de que a un pH de aproximadamente 3.8 a aproximadamente 7.0, la clorotetraciclina resulta mucho más soluble en un disolvente orgánico acuoso (como acetona húmeda o butanol húmedo) que la tetraciclina. En una solución mixta de las dos bajo estas condiciones de pH, la tetraciclina cristaliza, y por esto puede ser separada de la clorotetraciclina que permanece dentro de la solución.

180.- Los siguientes ejemplos ilustran la invención:

185.-

190.-

195.-



226971

200.-

Ejemplo 1

205.-

210.-

215.-

Un caldo de cultivo entero formado por un proceso de fermentación utilizando Streptomyces sp. ATCC 11,834, según se describe más detalladamente en la solicitud Serial N^o 443,952 y que tiene una actividad de tetraciclina de aproximadamente 1200 γ /ml., se trata con ácido sulfúrico al 40% a un pH de 1.5 a 2.0 y se filtra. Al filtrado se agrega una quinta parte del volumen de butanol, y se ajusta el pH a 9.0 mediante un hidróxido sódico al 40%. La fase de butanol rico se separa y se lleva a un pH de 8.0 (mediante ácido clorhídrico concentrado), se concentra a una sexta parte de volumen por destilación in vacuo y se filtra utilizando un 1% (p./v.) de Hyflo (sílice de diatomeas). Al filtrado se agrega una cuarta parte del volumen de agua, la mezcla se calienta a 50°C. y se acidula con ácido clorhídrico concentrado a un pH de 4.0. La base de tetraciclina se cristaliza en aproximadamente el 30-50% de producto de actividad total, basado sobre un caldo que contiene 1 mg./ml. de aproximadamente el 70-75% de tetraciclina.

Ejemplo 2

220.-

225.-

230.-

235.-

Un caldo de cultivo entero formado por un proceso de fermentación utilizando Streptomyces sp. ATCC 11,834, según se describe más detalladamente en la solicitud Serial N^o 443,952, y que tiene una actividad de tetraciclina de aproximadamente 1,500 γ /ml., se trata con ácido nítrico concentrado para ajustar el pH a 1.5 a 2.0. El caldo acidulado se filtra a continuación en presencia del 6% (p./v.) de Hyflo. Al filtrado ácido se agrega butanol acuoso al 19% suficiente para hacer el 25% de una fase de butanol separado. Ahora se agrega hidróxido sódico al 40% para ajustar el pH a 9.5, y la mezcla se agita durante media hora a temperatura ambiente. La fase de butanol se separa, y cualesquiera sólidos formados durante la extracción se separan por centrifugación. El extracto de butanol se concentra ahora a un pH de 8.0 a 8.5 (por tratamiento con ácido clorhídrico a una quinta parte de volumen por destilación al vacío, después de lo cual el pH del concentrado cae a aproximadamente 6.5. El concentrado se filtra para separar impurezas sólidas. Al filtrado se agrega una cuarta parte por volumen de agua y la mezcla se ajusta a un pH de 3.8 a



- 240.- 4.0 por tratamiento con ácido clorhídrico concentrado y se enfría a 5-10°C. Los cristales que se forman se separan por filtración y se secan en un desecador para producir tetraciclina cristalina que contiene aproximadamente el 10% de humedad. El producto es de aproximadamente 35-41% (basado sobre el caldo entero) de 650-700 γ mg. de actividad.
- 245.- El procedimiento del Ejemplo 2 puede ser modificado filtrando el caldo de cultivo entero a un pH de 1.5 ó 1.0 con el empleo de un agente de filtración (v.g., Hyflo). A pH 1.5, se retiene el 96% de la actividad inicial en el filtrado, y a pH 1.0, toda la actividad está dentro del filtrado.
- 250.- Los sólidos formados durante las extracciones (aproximadamente 2-4 gramos/litros de caldo) muestran un máximo del 3% de actividad, siendo por lo general insignificante el promedio de pérdidas.
- 255.- El siguiente ejemplo ilustra un proceso para la recuperación de tetraciclina de un filtrado de caldo y la separación de los iones cálcicos del mismo.
- Ejemplo 3
- 260.- 400 litros de caldo entero cuya actividad es de aproximadamente el 80% de tetraciclina y el 20% de clorotetraciclina se acidula a un pH 1.5 con ácido nítrico concentrado y se agita durante media hora. Después de la filtración utilizando el 6% de Hyflo se agrega una cuarta parte por volumen de butanol y el pH se ajusta a 9.5 mediante hidróxido sódico al 40%. El butanol rico (aproximadamente 75 litros) se separa por centrifugación y se acidula a pH 1.7 a 2.0 con ácido sulfúrico al 40%. Después de una hora de agitación, el sulfato cálcico formado se filtra, cualquier fase acuosa se descarta y el filtrado se ajusta a pH 2.0 a 2.2 con hidróxido sódico al 40%. El disolvente se concentra in vacuo a este pH a aproximadamente una décima parte por volumen y se agrega el 25% por volumen de agua. Por el ajuste a pH 4.0-4.2 y enfriamiento a 5°C. con agitación la tetraciclina cristaliza de la solución. Después del filtrado, lavado con pequeñas cantidades de agua y el secado, la tetraciclina contiene menos del 3% de clorotetraciclina y es pura en aproximadamente el 85%. El agua madre contiene aproximadamente el 35% de clorotetraciclina y el 65% de tetraciclina, sobre una base de actividad.
- 265.-
- 270.-
- 275.-

226971

28 FEB 1956



280.-

Los siguientes ejemplos ilustran métodos modificados para el aislamiento de la tetraciclina del extracto de disolvente orgánico.

Ejemplo 4

285.-

Una fase de butanol rico, después de la extracción, que contiene aproximadamente 5000 γ /ml. de actividad y que represente el 80% de tetraciclina y el 20% de clorotetraciclina se acidula a un pH de 1.7 a 2.0 con ácido sulfúrico al 40% y se trata con Darco G-60 (carbón decolorante) (1 gr./litro de disolvente). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante una hora y se filtra y lava con

290.-

el 5%, por volumen, de butanol saturado de agua. Cualquier capa acuosa se separa y se discarta, y se agrega el 5% por volumen de agua destilada a la fase de butanol. La mezcla se ajusta a un pH de 4.2 a 4.4 con hidróxido sódico al 40%.

295.-

Después de cinco horas de agitación a 5-10°C., se filtran los cristales, se lava con una pequeña cantidad de agua y se seca. Los cristales, que representan aproximadamente el 65% de la actividad en la fase de butanol original, contienen aproximadamente el 97% de tetraciclina y el 3% de clorotetraciclina, y tiene una actividad de aproximadamente 1000 γ mg. El agua madre contiene aproximadamente el 40 al 45% de clorotetraciclina y aproximadamente el 55 al 60% de tetraciclina.

300.-

Ejemplo 5

305.-

(Extracción inversa de butanol rico)

310.-

1,500 ml. de solución de butanol que contiene tetraciclina rica liberada de calcio (obtenida según el método del Ejemplo 3 se mezcla con 250 ml. de agua y se ajusta a un pH de 9.5. Después de 15 minutos de agitación, se separan las capas y se extrae el butanol otra vez a este pH con un 250 ml. adicional. Las capas acuosas se combinan y acidulan con ácido clorhídrico diluido a un pH de 4.2. La tetraciclina cristaliza de la solución y se filtra y seca. Un producto de aproximadamente el 50% de la tetraciclina originalmente presente en la solución de butanol rico se obtiene con una pureza de aproximadamente el 85%.

315.-

El precipitado de tetraciclina formado en los ejemplos 1 a 5 pueden ser tratados posteriormente para formar una

28
226971



320.- base libre purificada, según se ilustra por el siguiente ejemplo.

Ejemplo 6

325.- El precipitado crudo de tetraciclina obtenido por el procedimiento del Ejemplo 2 se disuelve en un disolvente de acetona acuosa al 50%, se ajusta a un pH de 2 mediante ácido clorhídrico, de suerte que la concentración final de la tetraciclina en el disolvente resulte 800 mg. de actividad por 10 ml. de la mezcla de disolvente. Cuando se haya disuelto toda la base cruda, se agrega el 2% (p./v.) de carbón (Darco G-60), y la mezcla se calienta a 50°C. durante 10 minutos bajo agitación. La mezcla a continuación se filtra y se lava la torta con la suficiente acetona acuosa al 50% para desplazar el disolvente rico retenido. El combinado filtrado y lavado se calienta ahora a 45°C., y el pH se eleva a 4.2 mediante hidróxido sódico al 40% durante un periodo de 10 a 15 minutos. La citada mezcla, a continuación, se deja enfriar a la temperatura ambiente (aproximadamente media hora, y se deja reposar durante de tres a cuatro horas hasta la cristalización completa. Seguidamente se filtran los cristales, se rebaja en acetona (1 gramo húmedo/10 ml.), se filtra y se seca bajo vacío a 30-35°C. El producto cristalino puro posee una pureza de aproximadamente el 72/80%. Es de un color amarillo oscuro y contrasta con 950-1000 unidades mg. La pérdida de actividad en el lavado de acetona asciende solamente a 1-2%, encontrándose el resto en el agua madre de pH 4.2.

330.-

335.-

340.-

345.-

Las bases de tetraciclina cristalina formadas en los ejemplos 1 a 6 pueden ser convertidas en una sal de adición ácida, según se ilustra en el siguiente ejemplo.

350.-

Ejemplo 7

355.- 4 gramos de la tetraciclina cristalina formada por el procedimiento del Ejemplo 6 se rebaja en 100 ml. de agua saturada de butanol. Seguidamente se reduce el pH a 2.5, utilizando ácido clorhídrico concentrado. A continuación se filtra la mezcla y se concentra la solución de butanol bajo vacío a 35°C. a una cuarta parte del volumen. El concentrado se enfría a 5°C durante de 4 a 5 horas hasta la cristalización completa. A continuación se filtra el clorhidrato de tetraciclina cristalina, se lava con 50:50 buta-

226.971

- 11 -

226



- 360.- nol:hexano (aproximadamente 5 ml./gramo húmedo), luego con hexano (aproximadamente 10 ml./gramo húmedo) y se seca baja vacío a 30°C.). El producto de clorhidrato de tetraciclina cristalino es aproximadamente el 75% sobre una base de actividad de material satisfactorio, y contrasta alrededor de 1,000 u./mg.
- 365.-

La base libre asimismo puede ser convertida en una sal de adición ácida (v.g., clorhidrato), disolviéndola en cloruro de hidrógeno metanólico, y agregando un alcohol superior, como pentasol.

- 370.- Substituyendo otros ácidos, como ácido nítrico, por ácido clorhídrico en el Ejemplo 7, se forman las correspondientes sales de adición ácida.

Puede realizarse la invención de distintas maneras dentro de la esencia de las reivindicaciones adjuntas.

375.-

N O T A

En resumen: la Patente de Invención cuyo registro se solicita recaerá sobre las reivindicaciones siguientes:

- 380.- 1) Un método para purificar y separar antibióticos, caracterizado porque incluye la separación de tetraciclina de un caldo de fermentación que la contiene, que comprende tratar un filtrado de dicho caldo con un disolvente orgánico substancialmente inmiscible en el agua a un pH alcalino para formar una solución de la tetraciclina en el disolvente, y recuperar la tetraciclina de dicha solución.
- 385.- 2) Un método, según la Reivindicación 1), caracterizado porque el disolvente orgánico se selecciona de la clase que consiste en alcoholes, cetones y ésteres substancialmente inmiscibles con el agua.
- 390.- 3) Un método, según la Reivindicación 1), caracterizado porque el disolvente orgánico es un alcohol inferior de más de tres átomos de carbono.
- 395.- 4) Un método, según la Reivindicación 1), caracterizado porque el disolvente orgánico es butanol.
- 5) Un método, según la Reivindicación 1), caracterizado porque la tetraciclina se recupera de dicho disolvente mediante extracción inversa con agua a pH alcalino, una vez separado cualquier ión cálcico presente en la citada solu-



226971

400.-

ción.

6) Un método, según la Reivindicación 1), caracterizado porque la tetraciclina se recupera de dicho disolvente por ajuste del pH de dicha solución a un valor de aproximadamente 3.8 a aproximadamente 7.0 para precipitar la tetraciclina.

405.-

7) Un método, según las reivindicaciones 1) y 6), caracterizado porque la solución de tetraciclina en el disolvente se concentra y trata con agua antes del ajuste del pH.

410.-

8) Un método, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado por la separación de tetraciclina de una mezcla de la misma con clorotetraciclina que comprende disolver la mezcla en un disolvente y ajustar el pH de la solución resultante a un valor de aproximadamente 3.8 a aproximadamente 7.0 para precipitar la tetraciclina de la misma.

415.-

9) Un método, según las reivindicaciones 1) y 8), caracterizado porque el pH se ajusta a un valor de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 4.5.

420.-

10) Un método, según las reivindicaciones 1) y 8), caracterizado porque el disolvente es una mezcla de disolvente orgánico substancialmente inmisible en el agua y agua.

11) Un método, según las reivindicaciones 1) y 10), caracterizado porque el disolvente es una mezcla de butanol y agua.

425.-

12) Un método, según las reivindicaciones 1) y 8), caracterizado porque el disolvente es una mezcla de un disolvente miscible en el agua y agua.

13) Un método, según las reivindicaciones 1) y 12), caracterizado porque el disolvente es una solución de acetona y agua.

430.-

14) Un método, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado por la separación de tetraciclina de un caldo de fermentación que la contiene, que comprende tratar un filtrado de cultivo separado de dicho caldo con un disolvente orgánico substancialmente inmisible en el agua a un

435.-

pH alcalino para formar una solución de la tetraciclina en el disolvente, separar dicha solución, concentrarla para precipitar impurezas de color, separando dichas impurezas, agregando agua a la solución restante, y ajustar el pH de dicha restante solución a un valor de aproximadamente 3.8



440.-

a aproximadamente 7.0 para precipitar la tetraciclina.

445.-

15) Un método, según las reivindicaciones 1) y 14), caracterizado por la separación de tetraciclina de un caldo de fermentación que la contiene, que comprende tratar un filtrado de dicho caldo, que contiene la citada tetraciclina e iones cálcicos, con un disolvente orgánico substancialmente inmiscible en el agua a un pH alcalino para formar una solución de la tetraciclina en el disolvente, separar dicha solución, acidular la solución con al menos un ácido cuyo anión forma una sal insoluble con cualquier ión cálcico en dicha solución, separar dicha sal, concentrar la solución resultante, agregar agua a dicha solución y ajustar el pH de dicha solución a un valor de aproximadamente 3.8 a aproximadamente 7.0 para precipitar la tetraciclina.

450.-

455.-

16) Un método, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado por la separación de tetraciclina de un extracto de disolvente orgánico substancialmente inmiscible en el agua, alcalino, de un filtrado de cultivo de un caldo de fermentación de Streptomyces productor de tetraciclina, que comprende mezclar dicho extracto con agua, y ajustar el pH de la mezcla resultante a un valor de aproximadamente 3.8 a aproximadamente 7.0 para precipitar la tetraciclina.

460.-

465.-

17) Un método, según las reivindicaciones 1) y 16), caracterizado porque el pH se ajusta a un valor de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 4.5.

470.-

475.-

18) Un método, según las reivindicaciones anteriores, caracterizado por la separación de tetraciclina de un extracto de disolvente orgánico substancialmente inmiscible en el agua, alcalino, de un filtrado de cultivo de un caldo de fermentación de Streptomyces productor de tetraciclina, que comprende acidular el extracto con al menos un ácido cuyo anión forma una sal insoluble con cualquier ión cálcico en dicha solución, separar dicha sal, agregar agua a dicha solución y ajustar el pH de dicha solución a un valor de aproximadamente 3.8 a aproximadamente 7.0 para precipitar la tetraciclina.

19) Un método, según las reivindicaciones 1) y 18), caracterizado porque el pH se ajusta a un valor de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 4.5.

20) Se reivindica por último, como objeto sobre el que

- 14 -

226971

28 FEB



480.-

ha de recaer la Patente de Invención que se solicita: "UN METODO PARA PURIFICAR Y SEPARAR ANTIBIOTICOS".

Todo conforme queda descrito en la presente Memoria, que consta de catorce páginas escritas a máquina.

Madrid, a 28 de febrero de 1956.

ALFONSO UNGRIA