

227164

P.- 14.220.-

A. 16.268  
Case P.C. 1437-1563

27 MAR. 1956

227164



MAR. 1956

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 CHAS. PFIZER & CO., INC. entidad norteamericana, establecida en 11 Bartlett Street, Brooklyn, Nueva York, Estados Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACION  
DE UN ANTIBIOTICO BASICO"

=====

Este invento está relacionado con un método nuevo y extraordinariamente útil de recuperación de ciertos antibióticos básicos. En particular, se relaciona con la recuperación de ciertos antibióticos que poseen



227164

grupos fuertemente básicos, por medio de una serie de pasos que suponen el uso de resinas cambiadoras de ión.

Para la recuperación de compuestos anti-bióticos se han empleado una gran variedad de métodos.

5 Estos comprenden generalmente procesos de muchas fases, para obtener los productos extraordinariamente puros necesarios en la terapéutica de enfermedades infecciosas. La separación del material activo de una variedad de impurezas, tanto orgánicas como inorgánicas, que se encuentran en los caldos de fermentación requiere frecuentemente la preparación de derivados complejos o sales, como las sales de ciertos colorantes ácidos y otros ácidos orgánicos. Muchos de los procesos comprende el uso de disolventes orgánicos para la extracción de antibióticos de la solución acuosa. Frecuentemente los procesos de extracción se llevan a cabo en aparatos sumamente complejos como los extractores de Podbielnak.

10

15

Las resinas cambiadoras de ión se han utilizado extensamente como una fase de los procesos para la recuperación de antibióticos básicos, particularmente compuestos como la estreptomycin. Tales procedimientos se han descrito en las U.S. Patents Nos. 2,541,420, 2,528,188, 2,528,022, y 2,667,441. Algunos de estos métodos han utilizado resinas cambiadoras de ión que poseen grupos carboxilo como principales grupos activos cambiadores. Sin embargo, casi invariablemente, la preparación de antibióticos básicos puros amorfos o cristalinos, o

20

25



227164

5 sus sales, ha requerido el empleo de fases como la precipitación selectiva fraccionada o fraccionamiento por extracción con disolventes y otros métodos, además del uso de resinas cambiadoras de ión, para asegurar la formación de productos de elevada pureza.

10 Se ha descubierta ahora que los antibióticos básicos, incluyéndose compuestos como la estreptomycinina, viomicina, dihidroestreptomycinina, hidroxiestreptomycinina, estreptotricina, mannosodoestreptomycinina y neomicina, que generalmente poseen grupos fuertemente básicos, como grupos guanidino, pueden purificarse muy convenientemente empleando una serie de fases que comprenden el empleo de una purificación con resinas ácidas cambiadoras de ión. Estos antibióticos son los que forman con los ácidos minerales sales sencillas que presentan en solución acuosa un pH próximo a la neutralidad. Este procedimiento tiene muchas ventajas sobre los procesos previamente utilizados para la purificación de antibióticos básicos. En particular, el procedimiento no requiere el empleo de disolventes orgánicos, ni necesita el uso de ácidos orgánicos complejos como determinados colorantes, ácido pícrico, ácido de Reinecke y otros agentes similares para conseguir un alto grado de purificación del antibiótico. En este procedimiento es efectiva una instalación relativamente sencilla, que puede utilizarse para más de uno de estos antibióticos. Además, puesto que se emplea el mismo tipo de aparatos en cada una de las fa-

15

20

25



7164

ses, puede eliminarse la adquisición de diversos tipos de material y la instalación de recuperación de antibióticos estar limitada a su forma más sencilla.

5 Una ventaja totalmente inesperada del procedimiento presente, es que la formación de pirógenos y productos análogos a la histamina, que aparecen a menudo en la recuperación de antibióticos básicos, particularmente cuando estos productos están en contacto con disolventes y se mantienen en pH básicos durante largos  
10 períodos de tiempo, parece ser totalmente evitada en el método presente. Esta es una de las ventajas más útiles del procedimiento, ya que frecuentemente es necesario emplear una fase separada del procedimiento para la separación de pirógenos.

15 Para llevar acabo el procedimiento presente, una solución impura de antibiótico básico, como por ejemplo, un caldo antibiótico filtrado, se hace pasar primeramente, a un pH que oscila de débilmente ácido a débilmente básico (p.ej. 6,0 a 9,0), sobre una resina cambiadora de ión que tenga como grupos cambiadores principales grupos carboxilo y que se haya preparado por polimerización en forma de cuentas del ácido metacrílico o,  
20 preferentemente, de un ester del ácido metacrílico y de un 6 a un 12% aproximadamente de un compuesto aromático divinílico como el divinilbenceno, diviniltolueno, divinilnaftaleno, etc., como material formador de encadenamientos transversales. Si se utiliza un ester para formar  
25



227164

la resina, los grupos ester de la resina deben ser, desde luego, hidrolizados a grupos ácidos. Tales resinas se venden por la Rohm & Haas Company y se conocen comercialmente con el nombre de fábrica como "Amberlite IRC50".

5 La resina está, por lo menos parcialmente, en forma de sal y ajustada a un pH en equilibrio, del neutro al ligeramente básico (de 7 a 8 aprox.), por medio de un álcali (p. ej. hidróxido sódico o hidróxido potásico) antes de entrar en contacto con la solución antibiótica. El anti-  
10 biótico absorbido en la resina, se eluye entonces de la resina cambiadora de ión por medio de un ácido diluido, preferentemente un ácido mineral, como el ácido clorhídrico diluido o el ácido sulfúrico diluido. Esta fase del proceso y las fases siguientes del mismo pueden rea-  
15 lizarse en un proceso de "dos torres" como se describió en la U.S. Patent Nº. 2,528,188. El eluato obtenido de la resina se ajusta, de preferencia rápidamente, a un pH que sea de neutro a ligeramente básico, esto es, de 6,0 a 9,0 aprox., preferentemente de 7,0 a 8,0. Esto  
20 puede hacerse separado el exceso de ácido, como se describe más adelante, o por adición de un agente alcalino, por ejemplo, hidróxido sódico o potásico. La solución obtenida de este modo, si bien es mucho más pura sobre base seca de lo que es una solución tan impura como un caldo de fermentación, tiene ciertos usos, por ejemplo, en  
25 veterinaria o en usos agrícolas. La solución se pone luego en contacto con una segunda resina de permutación ió-



27164

nica.

La segunda resina cambiadora de ión utilizada para llevar a cabo la siguiente fase de purificación del presente procedimiento, es también una resina cambiadora de catión sintética. Se trata de una resina de porosidad considerable, esto es, capaz de absorber una gran proporción de bases orgánicas de peso molecular bastante alto, (por encima de 150 aproximadamente). Estas resinas están caracterizadas por un aumento relativamente grande del volumen al contacto con la resina seca con agua o de conversión de la forma salina de la resina en la forma ácida. Las resinas de porosidad baja, presentan poco cambio en volumen. Estas resinas de elevada porosidad pueden prepararse por copolimerización de un éster del ácido acrílico con una pequeña proporción (de un 1 a un 15%) de un compuesto aromático divinílico, como el divinilbenceno. Alternativamente puede utilizarse un copolímero de un ester metacrílico y una proporción baja (de un 1 a un 4%) de un compuesto divinilaromático. La saponificación de los productos resultantes, que se preparan en forma de cuentas, produce resinas de ácidos carboxílicos, porosas, cambiadoras de catión. La Amberlite XE89, fabricada por Rohm & Haas Company, es una forma especialmente buena de este material. Se ha encontrado que estas resinas absorben, en un tiempo de contacto relativamente corto, un antibiótico básico, como la viomicina, neomicina, o estrep-



227164

5 tomicina, en una exgensi3n del 50% o m3s de la capaci-  
dad te3rica de la resina. Esto no es verdad en el ti-  
po de resina utilizado en la primera fase del procedi-  
miento presente, esto es, la Amberlite tipo IRC50, que  
10 solamente absorbe estos compuestos, durante un per3odo  
pr3ctico de contacto, en una extensi3n de un 10 a un  
20% de su capacidad total. En la pr3ctica de la segun-  
da fase de este proceso, la resina cambiadora de i3n se  
convierte primero parcialmente en una sal de un cati3n  
15 de metal alcalino, como el sodio, por ejemplo, lavando  
con una soluci3n acuosa diluida de hidr3xido s3dico has-  
ta que el pH de equilibrio sea el neutro al ligeramente  
b3sico (es decir, aprox. pH 6 a 9). La soluci3n de an-  
tibiotico, obtenida de la primera columna cambiadora de  
20 i3n por eluci3n con 3cido mineral diluido, se trata pa-  
ra destruir las sales; por ejemplo, puede neutralizarse,  
y, con objeto de disminuir la intr3ducci3n de sal, el  
3cido eluyente puede ser el 3cido sulf3rico diluido y  
el agente de neutralizaci3n hidr3xido b3rico, en cuyo ca-  
25 so se separa sulfato b3rico que se elimina. Alternati-  
vamente, el exceso de 3cido puede separarse con una re-  
sina cambiadora de an3n o el agua puede separarse por  
ejemplo secando a partir del estado congelado, despu3s  
de neutralizar con una amina org3nica que forme una sal  
soluble en disolventes con el 3cido utilizado para la  
eluci3n de la resina. El reemplazamiento del agua con  
un disolvente adecuado permite la separaci3n de la sal



227164

del antibiótico. Un procedimiento como este se describe en la U.S. Patent Nº. 2,560,891. Pueden utilizarse otras combinaciones de un ácido y una base que formen una sal insoluble.

5

La solución antibiótica parcialmente purificada, de la elución de la primera resina, se hace pasar en contacto con la segunda resina cambiadora de ión, preferentemente en una columna, y este proceso se continua hasta que la resina elegida alcance el equilibrio con el antibiótico. Con esto resulta que una gran parte de los cationes presentes en la solución de alimentación pasan a través de la columna sin ser absorbidos. Es relativamente fácil comprobar muestras de la solución de antibiótico que abandona la columna y determinar cuando esta solución tiene aproximadamente la misma concentración de antibiótico que la que entra en la columna. En este momento, se detiene la adición a la columna y se eluye el antibiótico con ácido mineral diluido. Si se emplea ácido sulfúrico, el exceso de ácido puede separarse por precipitación con hidróxido bórico o por otros métodos indicados más adelante. La solución puede usarse luego para varios fines.

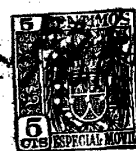
10

15

20

25

Frecuentemente el producto obtenido del contacto con la segunda resina es <sup>de</sup> una pureza tan elevada que el material puede secarse y utilizarse directamente con fines terapéuticos, sin una purificación posterior. La presencia de pequeñas cantidades de materias coloreas-



227164

5 das puede eliminarse por absorción en carbón, si se desea, pero esta no es una fase esencial del procedimiento. Debe hacerse resaltar que si se utiliza una resina del tipo XE89 antes de la resina del tipo IRC50, en la primera fase se absorberán en la resina grandes cantidades de impurezas coloreadas y materiales de alto peso molecular junto con el antibiótico. El empleo de la Amberlite IRC50 como segunda fase no supondría casi ninguna purificación apreciable. Además, el uso de repetidos  
10 tratamientos con un tipo único de estas resinas no alcanzaría el mismo alto grado de purificación de un modo tan sencillo. En general, las impurezas inorgánicas se reducen más fácilmente por el presente procedimiento, que presenta mayor selectividad en la recuperación de  
15 antibióticos.

Ambos polímeros, del tipo utilizado en la primera fase del proceso y en la segunda, se preparan preferentemente en forma de cuentas y la polimerización en esta forma puede llevarse a cabo por tratamiento de  
20 la mezcla de monómeros en suspensión acuosa con un poróxido. Detalles para la preparación del tipo de resinas utilizado en la segunda fase de este procedimiento se dan en la solicitud Serial Nº. 288,951 presentada el 20 de Mayo de 1952, por Edwin N. Lightfoot Jr. Estos polí-  
25 meros que son entrecruzados holgadamente y porosos se encontró que son sumamente efectivos en la absorción de una gran proporción de antibióticos básicos. De aquí



227164

5 resulta la absorción de una cantidad de antibiótico que se aproxima a la capacidad teórica de intercambio de la resina en las condiciones de equilibrio. Esto no es verdad en el tipo de resina cambiadora de ión utilizada en la primera fase del proceso, que, en las condiciones usadas normalmente para la recuperación de antibióticos, no se aproxima en su capacidad de absorción al valor del equilibrio.

10 Cuando se emplea caldo de estreptomici-  
na como material de partida para los dos pasos descri-  
tos anteriormente, la solución obtenida por elución del  
segundo tipo de resina cambiadora de ión puede tener u-  
na potencia tan elevada como 20 a 30 miligramos de anti-  
biótico (base) por centímetro cúbico y puede tener sobre  
15 base seca una pureza del 70% o más en peso. Si se desea,  
puede alcanzarse un grado superior de pureza utilizando  
una fase posterior de purificación que puede efectuarse  
antes o después de la segunda resina tipo ácido carboxí-  
lico. Esta supone el contacto con una resina cambiadora  
20 de ión de ácido sulfónico con porosidad baja y que posee  
una elevada proporción de componentes que forman enlaces  
transversales. Esta fase se lleva a cabo con la resina  
cambiadora de ión en la forma ácida, esto es, como ácido  
sulfónico libre. Pueden utilizarse en particular resi-  
25 nas que sean copolímeros de poliestirenos sulfonados y  
compuestos aromáticos divinílicos, como el divinilbence-  
no. Tales resinas existen en el comercio con el nombre



227184

registrado "Dowex 50". Estas contienen proporciones variables de divinilbenceno como componente que forma enlaces transversales. Una proporción de un 16% aproximadamente de divinilbenceno es muy adecuada. Con este objeto pueden utilizarse proporciones algo más elevadas o inferiores, esto es, entre un 10 y un 25%.

5

10

15

20

25

Cuando se utiliza una resina como esta en su forma ácida, esto es, a un pH bajo, retiene poco o ningún antibiótico básico de la solución que está en contacto con ella. Sin embargo retiene cationes inorgánicos y varias impurezas orgánicas en tal extensión que la solución, después de un contacto relativamente corto con la resina a un pH bajo, esto es, de 1,0 a 2,5 aproximadamente, tiene una pureza elevada. Esta fase del proceso se lleva a cabo preferentemente con la resina en una torre. El ácido libre que queda en la solución efluente se neutraliza a continuación. Es preferible usar ácido sulfúrico en la fase previa y después de llevar a cabo el contacto con la resina se separa el exceso de ácido, que no fué necesario para combinarse con el antibiótico básico, en forma de sal, por precipitación, como un reactivo como el hidróxido bórico. La solución que queda después de separar la sal precipitada, es una forma altamente purificada del antibiótico. Este material puede ser filtrado, obteniendo una solución que puede utilizarse directamente en terapéutica, en la nutrición animal o para otros usos. Puede dese-



227164

carce, por ejemplo, por liofilización, dando un producto que es muy adecuado para incorporarse a productos farmacéuticos. Está prácticamente libre de pirógenos y contiene poco o ningún material histamínico. La solución puede esterilizarse y combinarse con estabilizadores u otras sustancias convenientes.

Cuando se utiliza este proceso (en tres fases) para la purificación de estreptomicina, se ha encontrado que el producto tiene una pureza que se aproxima al 95%. Debe advertirse que el procedimiento no consigue la separación de la estreptomicina B, que no es perjudicial pero que posee una actividad inferior a la de la estreptomicina. Si se desea obtener un producto que contenga una proporción particularmente baja de esta materia, debe elegirse un caldo de fermentación adecuado. Debe hacerse notar también que el procedimiento presente elimina muy eficientemente una impureza ordinaria y perjudicial de la estreptomicina comercial, esto es, el material inactivo estreptidina.

En muchos casos es posible cristalizar el antibiótico básico en una forma de elevada pureza concentrando el eluato acuoso de la segunda resina y añadiendo un disolvente orgánico miscible con agua, como el metanol o el etanol. En algunos casos en los que el antibiótico impuro (esto es, caldo de fermentación antibiótico), utilizado como producto de partida, es de calidad muy pobre o contiene impurezas orgánicas e incor-



227164

gánicas en alto grado, es conveniente efectuar la purificación de tal solución por contacto del material bruto con los tres tipos diferentes de resinas cambiadoras de ión en serie. Cuando se hace esto, el orden que se

5 prefiere es aquel en el que se han descrito anteriormente las fases del proceso de cambio iónico; esto es, se utiliza primero la Amberlite IRC50, resina de baja capacidad, del tipo ácido metacrílico-divinilbenceno, en una forma que está parcialmente neutralizada. Como se-

10 gunda fase se utiliza el producto más poroso de saponificación ester acrílico-divinilbenceno y, finalmente, la solución parcialmente purificada se somete a una purificación posterior poniéndola en contacto con la resina Dowex 50 del tipo ácido sulfónico, con muchas uniones transversales, obteniéndose una solución con un alto

15 grado de pureza. Si las fases 2 y 3 de este proceso en tres fases se invierten de orden, el grado de purificación alcanzado es especialmente alto, pero no tan completo como el que se alcanza mediante el orden antes elegido.

20 Debe señalarse que los antibióticos forman sales definidas con todas las resinas carboxílicas, actuando la resina como un ácido polibáxico macromolecular. Las sales de los antibióticos con las resinas son útiles para fines como el enriquecimiento de los piensos.

25 Se ha encontrado también que, incluso aunque se omita una de las fases antes mencionadas de purificación por ácidos carboxílicos, se alcanza no obs-



227164

5 tante un notable grado de purificación del antibiótico  
bruto si la fase inicial de purificación por ácido car-  
bóxilico va seguida de una fase de purificación por un  
ácido sulfónico. Un notable grado de purificación del  
antibiótico se obtiene por contacto de una solución a-  
cuosa impura de un antibiótico básico con una resina que  
tenga como grupo cambiador activo principal radicales  
carboxilo, elución del antibiótico de la resina con áci-  
do y contacto de la solución del antibiótico con una re-  
10 sina cambiadora de ión del tipo ácido sulfónico en la for-  
ma ácida.

El eluato obtenido separando el antibió-  
tico del primer tipo de resina, esto es, la resina del  
tipo ácido carboxílico, por medio de una solución dilui-  
15 da de ácido mineral, es particularmente adecuado para  
una purificación posterior por contacto con una resina  
cambiadora de ión que tenga como grupos cambiadores prin-  
cipales es radical ácido sulfónico. La primera fase del  
proceso es eficaz para separar el antibiótico de ciertas  
20 impurezas presentes en la solución acuosa impura utiliza-  
da como material de partida, particularmente impurezas  
orgánicas que están presentes ordinariamente en gran ex-  
tensión en los caldos de fermentación filtrados que con-  
tienen antibióticos básicos. Sin embargo, en el antibió-  
tico bruto eluido, obtenido del primer tipo de resina  
25 quedan cantidades apreciables de diversas impurezas, par-  
ticularmente materias inorgánicas, pero también ciertas  
substancias orgánicas. El eluato ácido de la resina cam-



227164

biadora de ión de tipo ácido carboxílico puede purificarse lo más eficazmente por contacto posterior en su estado ácido con la resina de tipo ácido sulfónico.

5 El antibiótico en la solución ácido que entra en contacto con la forma ácida de la resina tipo ácido sulfónico, no se absorbe sobre esta en extensión apreciable. Sin embargo una variedad de impurezas, particularmente sustancias inorgánicas, pero también materias orgánicas, son separadas selectivamente de la solución  
10 solución ácida por la resina tipo ácido sulfónico, obteniéndose una solución de antibiótico básico altamente purificada. En muchos casos, la pureza de la solución es tan elevada que el antibiótico puede cristalizarse directamente de la solución concentrándola cuidadosamente,  
15 por ejemplo en vacío a baja temperatura o por concentración y adición de un disolvente miscible con agua que no disuelva la sal del antibiótico. En algunos casos, es necesario ajustar el pH de la solución antes de concentrar, puesto que puede haber tendencia a descomponerse algo del producto si se efectúa la concentración en  
20 condiciones de acidez elevada. Efectuando el procedimiento presente según se señaló anteriormente, puede utilizarse ácido sulfúrico para la elución del antibiótico absorbido del primer tipo de resina utilizada, esto es,  
25 la resina de tipo ácido carboxílico. Alternativamente, pueden utilizarse otros ácidos como el ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, etc. El exceso de ácido puede



227164

separarse de la solución obtenida después del contacto con la segunda resina cambiadora de ión formando una substancia débilmente soluble. Por ejemplo, si se ha empleado ácido sulfúrico, puede añadirse hidróxido o carbonato bórico a un pH adecuado y el sulfato bórico precipitado puede separarse entonces de la solución antes de concentrarla y aislarla la sal purificada o cristalina del antibiótico. Si se ha empleado ácido clorhídrico para eluir la primera resina, entonces el exceso de ácido puede separarse por adición de un agente como el carbonato de plata. Alternativamente pueden utilizarse ciertas resinas cambiadoras de anion para ajustar el pH de la solución acuosa por separación del exceso de ácido. Después que la resina ha sido separada de la solución acuosa, la solución de antibiótico puede concentrarse para recuperar el antibiótico purificado o cristalino. En general, las sales ácidas de los antibióticos básicos tienen un pH en solución acuosa en el intervalo de 4,0 a 6,5 aproximadamente.

Durante el desarrollo del procedimiento presente es conveniente mantener las soluciones de los antibióticos a pH bajos, esto es pH por debajo de 2,5, durante un tiempo mínimo. Así, después de la elución del antibiótico de la primera resina, el contacto con la segunda resina debe hacerse con una rapidez prudencial y el efluente de la segunda resina debe ajustarse entonces a un pH adecuado, esto es, por lo menos 4,5 aprox.,



227164

5 sin excesiva pérdida de tiempo. Según se señaló anteriormente, las soluciones de antibiótico obtenidas por el procedimiento presente poseen un grado de pureza poco común y, en muchos casos, es posible utilizar el efluente ajustado procedente de la segunda resina directamente sin tratamiento posterior, como la cristalización. Soluciones de esta naturaleza pueden ser utilizadas, por ejemplo, en veterinaria. Puede ser conveniente concentrar tales soluciones y añadir agentes estabilizantes antes de disponer el producto para tales usos. 10 La esterilización puede efectuarse frecuentemente por fultración de la solución por un aparato adecuado. Debe señalarse que los productos del presente invento están considerablemente libres de pirógenos y contienen 15 pocas o ningunas materias histamínicas, que frecuentemente presentan dificultad con antibióticos purificados por otros procedimientos, ya que necesitan fases muy detalladas y definidas para separar estos materiales.

20 Se ha encontrado que el tratamiento de soluciones acuosas impuras de antibióticos básicos con resinas tipo ácido carboxílico como las descritas (esto es, resina tipo Amberlite IRC-50) puede repetirse, obteniendo una solución purificada del antibiótico que tenga una pureza incluso más elevada, y que se presta 25 más fácilmente a la purificación posterior por contacto con las resinas tipo ácido sulfónico descritas anteriormente. Un tratamiento posterior con resinas tipo



7 MAR 1951

227164

5 ácido carboxílico o ácido sulfónico no contribuye a incrementar la pureza del antibiótico en una extensión apreciable y, según se señaló antes, el producto del tratamiento con la resina tipo ácido sulfónico puede a menudo cristalizarse sin una purificación específica posterior. El empleo de la Amberlite tipo XE-89 seguido del uso de la resina tipo ácido sulfónico no consigue un grado tan elevado de purificación.

10 Entre los antibióticos que pueden purificarse por el procedimiento presente están la estreptomycinina, viomicina, dihidroestreptomycinina, hidroxiestreptomycinina, estreptotricina, manosidoestreptomycinina, neomicina y otros de la misma naturaleza. Todos estos contienen grupos fuertemente básicos, como grupos guanidino, y pueden purificarse con facilidad inesperada por el procedimiento del presente invento.

15 Los ejemplos siguientes se dan a modo de aclaración y no deben considerarse como las únicas formas de llevar a cabo este invento. Debe entenderse que la protección está solamente limitada por la redacción de las reivindicaciones anexas.

Ejemplo I

25 Sellenó una columna con una resina cambiadora de catión de tipo ácido carboxílico Amberlite IRC50. Esta resina se llevó al equilibrio con solución de hidróxido sódico diluído hasta alcanzar un pH de 7,5.



227164

El caldo de fermentación de estreptomycin, que había sido filtrado en condiciones ácidas, se ajustó aprox. a neutralidad con hidróxido sódico y la solución del antibiótico se hizo pasar por la columna cambiadora de ión.

5 Muestras del efluente procedente de la columna se analizaron periódicamente hasta que se encontró que la concentración de estreptomycin en el caldo que abandona la columna ora en esencia misma que la del que entra en la columna. Se interrumpió la introducción de solución y la

10 resina se lavó con varios volúmenes de agua. Se eluyó entonces el antibiótico de la resina con solución de ácido clorhídrico 0,35 N. Cuando el eluato deja la columna se neutraliza con hidróxido sódico. Se encontró al

15 analizar la estreptomycin total en el eluato, que se había empleado aprox. el 15% de la capacidad total de la resina para la absorción del antibiótico. Pocas de las impurezas orgánicas presentes en el caldo original habían quedado retenidas en la columna, pero el eluato, que

20 contenía 10 mg de estreptomycin por centímetro cúbico, contenía también unos 20 mg por centímetro cúbico de solución de sales inorgánicas (determinadas por evaporación de una muestra medida e incineración en presencia de ácido sulfúrico). La solución contenía también unos 4

25 miligramos por centímetro cúbico de impurezas orgánicas coloreadas sin identificar.

Se preparó una segunda columna que contenía 115 centímetros cúbicos de resina cambiadora de ca-



227164

5 tión tipo ácido carboxílico Amberlite XE89. La resina  
se llevó al equilibrio con hidróxido sódico a un pH 7,8.  
El eluato neutralizado de la columna precedente se intro-  
dujo en la segunda columna. A intervalos periódicos se  
ensayó la concentración de estreptomina del líquido que  
abandona la columna. Después de haber sido alimentada  
la columna con un total de tres litros de solución de es-  
treptomina parcialmente purificada, se encontró que no  
se separaba más antibiótico, esto es, que la concentra-  
10 ción del antibiótico en el líquido que sale y en la ali-  
mentación eran iguales. Se interrumpió la adición a la  
columna y esta se lavó con agua. Se eluyó entonces el  
antibiótico con solución de ácido sulfúrico 0,36 N. El  
exceso de ácido en el eluato se neutralizó rápidamente  
15 con solución de hidróxido bórico. El sulfato bórico pre-  
cipitado se filtró y se analizó la estreptomina en la  
solución acuosa. Se encontró que se había utilizado  
aproximadamente el 50% de la capacidad de la resina pa-  
ra la absorción de la estreptomina. El eluato conte-  
20 nía unos 30 miligramos de antibiótico como base por cen-  
tímetro cúbico y unos 6 miligramos por centímetro cúbico,  
de sales inorgánicas (si se determinan como sulfato  
calcinado). Solamente quedó retenido en el eluato un  
tercio aprox. de las impurezas coloreadas presentes en  
25 la alimentación de la segunda columna.

Se preparó una tercera columna que con-  
tenía 30 centímetros cúbicos de un copolímero sulfonado



227164

de poliestireno y aprox. 16% en peso de divinilbenceno (disponible como Dowex 50-X16). La resina se trató con ácido sulfúrico diluído para convertirla completamente en la forma ácida y se lavó entonces con agua para separar el exceso de ácido. El eluato de la columna anterior neutralizado se añadió a la columna de Dowex 50-X16, hasta que el pH del líquido que sale de la columna presenta un ascenso definido. En este momento se habían recogido aprox. 660 centímetros cúbicos de efluente. Se neutralizó rápidamente con hidróxido bórico y el sulfato bórico precipitado se filtró. Prácticamente se consiguió la recuperación cuantitativa de la estreptomina de la columna. La solución tenía una concentración de 25 mg por centímetro cúbico de estreptomina base y solamente 0,62 mg de sales inorgánicas por centímetro cúbico (como sulfato calcinado). Por concentración de la solución a vacío, tratamiento con una pequeña cantidad de carbón activo y adición a varios volúmenes de metanol se produce un precipitado de sulfato de estreptomina de elevada pureza. Este producto se filtró y secó en vacío. Se encontró que contenía 1,64% de cenizas y la potencia del producto si se corrige para las materias volátiles se encuentra que es aprox. 790 microgramos por miligramo, comparada con una potencia teórica de 798 microgramos por miligramo para el sulfato de estreptomina.



227:34

### Ejemplo II

5 Caldo de fermentación de viomicina fil-  
trado se ajustó a pH 7,5. El análisis indicó que conte-  
nía 300 microgramos de antibiótico por centímetro cúbico  
de solución. Este material se añadió a una columna  
que contenía resina Amberlite IRC50 ajustada a pH 7,5  
con hidróxido sódico diluído. La solución antibiótico  
se añadió a la columna hasta que la concentración del  
antibiótico en el líquido que sale era muy próxima a la  
10 de la solución de alimentación. La columna se lavó en-  
tonces con agua y el antibiótico se eluyó de la resina  
con solución de ácido sulfúrico 0,35 N. El eluato de  
la columna se neutralizó rápidamente con hidróxido bá-  
rico y el sulfato bórico precipitado se filtró. El e-  
15 luato neutralizado contenía unos 8 miligramos de viomi-  
cina en forma de base por centímetro cúbico y 7 miligra-  
mos de cenizas de sulfato por centímetro cúbico. Se ha-  
bía utilizado aproximadamente un 12% de la capacidad to-  
tal de la resina en la absorción del antibiótico.

20 Una porción del eluato de la columna  
anterior (200 litros) se añadió a un pH 7,5 a una co-  
lumna que contenía 3.750 centímetros cúbicos de resina  
Amberlite tipo XE89, que había sido ajustada previamen-  
te a un pH 7,5 con hidróxido sódico diluído. La resina  
25 absorbió el antibiótico viomicina en una extensión de  
un 80% de su capacidad total de cambio. La adición de  
la solución de viomicina parcialmente purificada se con-



227164

7

5 tinuó hasta que el líquido que sale de la columna tenía aproximadamente el mismo contenido en antibiótico que la solución que se introduce. Se interrumpió entonces la adición y la columna se lavó con agua. El antibiótico se eluyó con solución de ácido sulfúrico 0,35N y el eluato se neutralizó rápidamente con hidróxido bórico. El sulfato bórico precipitado se filtró y el eluato se concentró a vacío a temperatura moderadamente elevada hasta un volumen de 11 litros. El análisis de una muestra demostró que el concentrado contenía 102 miligramos de viomicina (como base) por centímetro cúbico y solamente 5 miligramos de cenizas (sulfato) por centímetro cúbico. El tratamiento del eluato con carbón activo separó una pequeña cantidad de color residual. La adición de 2 volúmenes de alcohol metílico a la solución acuosa produjo la cristalización del sulfato de viomicina. Este producto pesó 1275 g después de desecado en vacío. Contenía uno por ciento de cenizas y 9,3 por ciento de materia volátiles. La potencia se encontró ser, una vez corregida para la materia volátil presente, aprox. 805 microgramos por miligramo. La potencia teórica del sulfato de viomicina puro es 820 microgramos por miligramo. Así, se alcanza una pureza extraordinariamente elevada, mediante el sencillo procedimiento descrito.

10

15

20

25

#### Ejemplo III

Se aciduló caldo de fermentación de neo-



227164

micina y, después de filtrado, se neutralizó. Este material contenía aprox. 730 microgramos de neomicina por centímetro cúbico. Ciento cuarenta litros (140) de la solución se suministraron a una columna que contenía  
5 un litro de resina cambiadora de ión tipo ácido carboxílico Amberlite IRC50, que se había ajustado aproximadamente a neutralidad con hidróxido sódico diluido. Se alcanzó una absorción casi cuantitativa del antibiótico en la resina. La resina se lavó con agua y se eluyó entonces con solución de ácido sulfúrico al uno por ciento.  
10 El eluato se neutralizó enseguida con hidróxido bórico y el sulfato bórico precipitado se filtró. La solución filtrada se analizó encontrándose que contenía 10 miligramos de neomicina (como base) por centímetro cúbico y aproximadamente 8 miligramos de cenizas de sulfato por centímetro cúbico.  
15

Una porción de la solución de neomicina parcialmente purificada, neutralizada, obtenida de la columna de Amberlite IRC50 se suministró a una columna  
20 de Amberlite XE89, que se había ajustado a un pH de 7,0 aprox. con hidróxido sódico diluido. La solución se añadió a la columna hasta que se detectaron cantidades apreciables del antibiótico en el líquido que sale. La columna se lavó con agua y se eluyó entonces con solución de ácido sulfúrico al uno por ciento. El exceso  
25 del ácido en el eluato se neutralizó con hidróxido bórico y el sulfato bórico precipitado se filtró. El elua-



227164

3

5

10

15

contenía aprox. 20 miligramos de neomicina por centímetro cúbico y 5 miligramos de cenizas de sulfato por centímetro cúbico. Se hizo pasar a través de una columna que contenía resina Dowex 50-X16 en la forma ácida. Prácticamente se separaron todas las cenizas del material con poca o ninguna pérdida de neomicina. El líquido que sale de la columna se neutralizó con hidróxido bórico. El precipitado se filtró y el color residual se separó con una pequeña cantidad de carbón activo. La solución purificada se añadió sobre varios volúmenes de metanol y la neomicina precipitada se filtró. El producto contenía uno por ciento de cenizas de sulfato y 3,2 por ciento de volátiles. La corrección para el material volátil dió análisis de aprox. 650 microgramos por miligramo, en comparación con 670 microgramos por miligramo de sulfato de neomicina puro. El producto obtenido por este procedimiento relativamente sencillo se ha encontrado que es muy adecuado para usos terapéuticos.

Ejemplo IV

20

25

Caldo de fermentación de estreptomina filtrado, conteniendo una potencia antibiótica de 800 mcg./cm<sup>3</sup>, se hizo pasar a través de una columna que contenía resina Amberlite IRC50 a un pH de 7,5. El antibiótico se eluyó de la resina con ácido clorhídrico 0,35N y el eluato se neutralizó con hidróxido sódico. En la absorción del antibiótico se utilizó aprox. el 15% de la capacidad de la resina. El eluato contenía aproxima-



5 damente 7 miligramos de antibiótico por centímetro cúbico. Una porción de este material se hizo pasar a través de una columna que contenía 100 cm<sup>3</sup> de resina tipo Amberlite XE89 a un pH de 7,5. El antibiótico se eluyó de la resina con ácido sulfúrico diluido. El eluato contenía unos 18 gramos de estreptomina y unos dos gramos de cenizas. Aproximadamente el 50% de la capacidad total de la resina tipo XE89 se había utilizado en la absorción del antibiótico. El eluato se neutralizó con hidróxido sódico y se hizo pasar a través de una columna que contenía 30 cm<sup>3</sup> de resina Dowex tipo 50-X16 en la forma ácida. El líquido que sale de la columna se neutralizó en seguida con solución de hidróxido bórico. El precipitado de sulfato bórico se filtró. El filtrado se concentró en vacío y se decoloró con carbón activo. La solución obtenida de este modo se añadió a varios volúmenes de metanol para precipitar el sulfato de estreptomina. El producto se filtró y secó. Su ensayo dió 775 mcg/cm<sup>3</sup> y contenía solamente 0,7% de cenizas. Una elevada proporción del antibiótico en el caldo original se recuperó de este modo.

10

15

20

#### Ejemplo V

Una columna que contenía 33 litros de Amberlite IRC50, que había sido ajustada previamente a pH 7,5 con solución de hidróxido sódico, se alimentó con caldo filtrado de fermentación de neomicina a un pH de 7,5. Cuando la resina no absorbió más neomicina, se de-

25



227164

tuvo la alimentación y la columna se lavó con agua elu-  
yéndola entonces con solución de ácido sulfúrico al 1%.  
Se recogió un "heart cut" (aquella porción que contiene  
la máxima concentración de antibiótico) de unos 170 li-  
5 tros de eluato de pH 2,1. Contenía una concentración de  
neomicina de  $12,0 \text{ mg/cm}^3$ , de sólidos totales de  $31 \text{ mg/cm}^3$   
y de cenizas de sulfato de  $7 \text{ mg/cm}^3$ . Esto representa u-  
na purificación considerable comparada con el caldo de  
fermentación. La solución antibiótica se neutralizó con  
10 hidróxido bórico y el sulfato bórico se filtró. El fil-  
trado se añadió a una columna que contenía resina Amber-  
lite XE89 que había sido ajustada previamente con hidró-  
xido sódico a pH 7,5. Una vez que la columna se hubo sa-  
turado de neomicina, se eluyó con ácido sulfúrico al 1%  
15 y el exceso de ácido se neutralizó con hidróxido bórico.  
El eluato contenía  $19,5 \text{ mg/cm}^3$  de neomicina,  $40 \text{ mg/cm}^3$   
de sólidos totales y  $7 \text{ mg/cm}^3$  de cenizas de sulfato.  
Esta solución se hizo pasar a través de una resina Dowex  
50-X16 a un pH ácido. El líquido que sale de la colum-  
20 na se neutralizó con hidróxido sódico. Se encontró que  
contenía  $15 \text{ mg/cm}^3$  de neomicina,  $23 \text{ mg/cm}^3$  de sólidos to-  
tales y  $0,1 \text{ mg/cm}^3$  de cenizas de sulfato. La solución  
acuosa se concentró cuidadosamente a vacío a baja tempe-  
25 ratura y el sulfato de neomicina se aisló por precipita-  
ción con etanol. El producto desecado se encontró que  
tenía una potencia de  $660 \text{ mcg/mg}$  y unas cenizas de 1,0%.  
Esto representa un producto de elevada pureza muy adecua-



227164

do para usos farmacéuticos.

Ejemplo VI

5 Un caldo de fermentación de estreptomi-  
cina que tenía una potencia de aproximadamente 750 uni-  
dades por centímetro cúbico se filtró después de ajustar  
el pH a 2,5 aproximadamente. La solución filtrada se  
hizo pasar por una columna de resina Amberlite IRC-50  
a un pH de aproximadamente 7,5, esto es, el caldo de  
fermentación se ajustó a 7,5 con hidróxido sódico y la  
10 resina se puso en equilibrio a este pH por contacto con  
una solución diluída de hidróxido sódico. Después de  
absorber el antibiótico en la resina, la columna se la-  
vó con un pequeño volumen de agua y los lavados se dese-  
charon. El antibiótico se eluyó entonces, utilizando u-  
15 na solución de ácido clorhídrico 0,35 N. Una vez que to-  
do el antibiótico se hubo desplazado de la columna de re-  
sina el eluato se neutralizó con solución de hidróxido  
sódico. El eluato contenía unos 7 mg de antibiótico por  
centímetro cúbico de solución. Esta solución se hizo pa-  
20 sar por una segunda columna que contenía Amberlite IRC-50  
equilibrada a pH 7,5. Cuando la resina no absorbió más  
estreptomina, se interrumpió la alimentación y la resi-  
na se eluyó con ácido sulfúrico 0,35 N. El exceso de á-  
cido sulfúrico se separó de la solución ácida con hidró-  
25 xido bórico. La solución impura contenía aproximadamen-  
te 6% en peso de impurezas sobre el peso total de produc-  
to bruto en solución. Esta solución se hizo pasar por



227164

una columna que contenía resina tipo Dowex-50-X16 en la forma ácida. El líquido que sale se neutralizó con hidróxido bórico y el sulfato bórico resultante se filtró. Después de concentrar cuidadosamente la solución acuosa a vacío, se trató con una pequeña cantidad de carbón decolorante se filtró y se vertió en metanol. El sulfato de estreptomina precipitado se filtró y secó. El producto seco dió un ensayo de 745 microgramos de estreptomina por miligramo y contenía 0,6% de cenizas.

Ejemplo VII

Un caldo de fermentación de neomicina filtrado que contenía 500 microgramos de neomicina por centímetro cúbico, se ajustó a pH 7,5 y se alimentó con él una columna que contenía 33 litros de Amberlite IRC50, que había sido ajustada previamente a pH 7,5 con solución de hidróxido sódico. Se continuó la alimentación hasta que la resina no absorbió más neomicina. Las columnas se lavaron con agua para separar el caldo residual y el antibiótico se eluyó entonces con solución de ácido sulfúrico al 1%. El primero de los eluatos que contenía poco antibiótico se separó. La solución siguiente, que contenía elevada proporción de antibiótico, se recogió. Esta tenía un volumen de 170 litros y un pH de 2,1. La solución contenía 12,5 mg de neomicina por centímetro cúbico, 33 mg de sólido total por centímetro cúbico y 5 mg de cenizas por centímetro cúbico (en la forma de ceniza



227164

de sulfato). La solución parcialmente purificada se añadió a una columna que contenía 35 litros de resina Dowex-50-X16 en la forma ácida. El líquido que sale de la columna, que contenía el antibiótico, se neutralizó con solución de hidróxido bórico y el sulfato bórico se filtró. La solución purificada se trató con una pequeña cantidad de carbón decolorante y se filtró. Esta solución contenía solamente 0,04 mg de cenizas por centímetro cúbico (cenizas de sulfato). Por concentración de la solución en vacío a baja temperatura y adición de la solución concentrada sobre metanol se aisló un producto sólido. El precipitado sólido se filtró, se lavó con un pequeño volumen de metanol y se secó. El sulfato de neomicina así obtenido dió un ensayo de 670 microgramos por miligramo y contenía solamente 0,55% de cenizas.

#### Ejemplo VIII

Un caldo de fermentación de viomicina filtrado se ajustó a pH 7,5. Esta solución contenía aproximadamente 300 microgramos de viomicina por centímetro cúbico. Se añadió a una columna que contenía resina Amberlite IRC-50, que había sido previamente ajustada a pH 7,5 con solución de hidróxido sódico. La solución se añadió a la columna hasta que empezó a aparecer una cantidad apreciable de antibiótico en el líquido que sale de la columna. La columna de resina, con el antibiótico absorbido, se lavó con un pequeño volumen de



227164

5 agua y el antibiótico se eluyó entonces con solución  
de ácido sulfúrico 0,35 N. El exceso de ácido en el  
eluató se neutralizó con hidróxido bórico, 15,6 litros  
de esta solución se hicieron pasar por una columna, que  
5 contenía 1350 centímetros cúbicos de resina Dowex-50-X16.  
El líquido ácido que sale de la columna se neutralizó  
con hidróxido bórico y el sulfato bórico se filtró. La  
solución acuosa se concentró entonces cuidadosamente a  
vacío y la solución acuosa concentrada se decoloró con  
10 carbón activo. El sulfato de viomicina cristalizó de  
la solución por adición de 2-1/2 volúmenes de metanol.  
Se obtuvieron 147 gramos de sulfato de viomicina cris-  
talino, que dió un ensayo de 790 microgramos por mili-  
gramo. Este producto contenía 0,2% de cenizas y 4% de  
15 materias volátiles. Cuando se corrige para estas impu-  
rezas, el producto tiene una potencia de 824 microgra-  
mos por miligramo, que está muy próxima de la potencia  
teórica del sulfato de viomicina puro.

- N O T A -

20 Los puntos de invención propia y nueva  
que se presentan para que sean objeto de la presente

- 31 -



227164

227164

solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

5 1º.- Un procedimiento para la purificación de un antibiótico básico, caracterizado por poner en contacto una solución acuosa impura del antibiótico con una resina cambiadora de ión de ácido carboxílico de porosidad limitada y por lo menos parcialmente neutralizada, eluir el antibiótico de la resina con un ácido diluído y poner luego en contacto el eluato de la  
10 citada resina, bien con una resina cambiadora de ión de ácido carboxílico por lo menos parcialmente neutralizada y de elevada porosidad, o bien con una resina, cambiadora de ión, de ácido sulfónico.

15 2º.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el eluato de la primera resina citada, se pone en contacto con la mencionada resina cambiadora de ión de ácido carboxílico de elevada porosidad, se eluye de ella con un ácido diluído y se pone en contacto después con la cita-  
20 da resina cambiadora de ión de ácido sulfónico.

25 3º.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por el hecho de que la citada resina cambiadora de ión de ácido carboxílico de porosidad limitada, es un copolímero de ácido metacrílico y de un 6 a un 12% en peso de un compuesto aromático divinílico, que está por lo menos parcialmente neutralizada, la citada resina cambiadora de ión de ácido car-



227164

5 boxílico de porosidad elevada es un copolímero de ácido acrílico y de un 1 a un 15% en peso de un compuesto aromático divinílico o un copolímero de ácido metacrílico y de un 1 a un 4% de un compuesto aromático divinílico, la cual está por lo menos parcialmente neutralizada, y la citada resina cambiadora de ión de ácido sulfónico es un poliestireno sulfonado copolimerizado con un 10 a un 25% de un compuesto divinil-aromático.

10 4<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por el hecho de que la solución acuosa impura es un caldo de fermentación filtrado.

15 5<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 ó 3, caracterizado por el hecho de que el antibiótico es estreptomina, neomicina, viomicina, estreptotricina, dihidroestreptomina, hidroxiestreptomina o manosidoestreptomina.

20 6<sup>a</sup>.- Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por la filtración de un caldo de fermentación de un antibiótico básico, el contacto del citado caldo a un pH de 6 a 9 aproximadamente con la mencionada resina cambiadora de ión tipo ácido carboxílico de porosidad limitada y que está equilibrada a un pH de 6 a 9 aproximadamente, 25 la elución del antibiótico de la citada resina con ácido mineral diluido, el ajuste del pH del eluato de 6 a 9 aproximadamente, el contacto del eluato con la citada re-



227164

5           sina cambiadora de ión tipo ácido carboxílico de porosi-  
dad elevada, que está en equilibrio a un pH de 7 a 8 a-  
proximadamente, hasta que la citada resina se aproxime  
a la saturación con el antibiótico, la elución del anti-  
biótico de la citada resina con ácido mineral diluido,  
10           el contacto del eluato con la citada resina cambiadora  
de ión tipo ácido sulfónico que está en la forma ácida,  
la separación del antibiótico de la resina, la separación  
del exceso de ácido mineral de la solución de antibióti-  
co y la recuperación del antibiótico a partir del filtra-  
do.

7º.- Un procedimiento para la purifica-  
ción de un antibiótico básico.

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

La presente Memoria consta de treintai-  
cuatro hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 7 MAR. 1956

P. A.

Alberto de Elzabur  
Por Poder