

AÑO 1958

Expediente núm.



242247

# REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

242247

**PATENTE DE** INVENCIÓN

## MEMORIA DESCRIPTIVA

*que se acompaña a la solicitud de*

una **PATENTE DE** invención por 20 años, en España

*a favor de*

MERCK & CO. Inc., de nacionalidad

norteamericana domiciliado en New Jersey, E. U.)

calle de East Lincoln Avenue núm. 126

*por:*

Procedimiento para recuperar compuestos con actividad de novobiocina a partir de mezclas que los contengan",

Nº 7613

Agente Sr. BOLIBAR,

JE.

24 2247



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



a favor de

MERCK & CO., Inc. de nacionalidad norteamericana, domiciliada en RAHWAY (New Jersey, E.U.) 126 East Lincoln Avenue,

por:

"Procedimiento para recuperar compuestos con actividad de novobiocina, a partir de mezclas que los contengan".



M e m o r i a   d e s c r i p t i v a .

Este invento se refiere en general a procedimientos y métodos para obtener antibióticos a partir de soluciones crudas o sin purificar, de los mismos. Más concretamente, concierne a un procedimiento nuevo y perfeccionado para recuperar y concentrar novobiocina y pro-



ductos análogos de caldos de fermentación que contengan novobiocina elaborada o sus análogos, micelios de microorganismos y medios nutritivos adecuados. En uno de sus aspectos más peculiares, este invento se refiere al aislamiento de novobiocina, dihidronovobiocina y otros productos análogos a la novobiocina.

La novobiocina, para la cual se ha propuesto la fórmula de estructura o constitución, que se representa en la hoja de fórmulas anexa a esta memoria, se obtiene cultivando, en condiciones reguladas, una especie de microorganismos denominada Streptomyces spheroides, depositada en la colección permanente de cultivos de la Sección de Fermentación, Centro de Investigación Utilitaria del Norte, Departamento de agricultura de EUA., Peoria, Illinois con la designación de NRRL 2449. De manera similar pueden obtenerse productos análogos a la novobiocina.

La novobiocina es un compuesto orgánico ácido con dos grupos de fijación de bases, y puede precipitarse de su solución en álcalis por acidificación. Es soluble en alcoholes ligeros, cetonas alifáticas, bajas, ácido acético, acetato de etilo y dioxano, y es insoluble o escasamente soluble en éter, benceno, cloroformo, tetracloruro de carbono, dicloruro de etileno, agua y ácido clorhídrico.

La novobiocina detiene el crecimiento de microorganismos grampositivos principalmente, aunque también presenta cierta actividad contra microorganismos gramnegativos. Las sales de novobiocina y sus análogos tienen asimismo actividad antibiótica. La actividad de las preparaciones de novobiocina se define en unidades novobio-



cina; la novobiocina substancialmente pura tiene una actividad, arbitrariamente asignada, de 5000 unidades novobiocina por miligramo.

5 Hasta ahora, la novobiocina se aislaba y separaba de los caldos de fermentación en donde habia vegetado empleando procedimientos bastante complicados y entretenidos, que comprendían repetidas extracciones con disolventes y recristalizaciones.

10 El presente invento se propone en general una nueva técnica para aislar novobiocina y sus análogos obtenidos por procedimientos de fermentación.

15 Un objeto de este invento es proporcionar un nuevo procedimiento perfeccionado para separar y purificar novobiocina y sus análogos a partir de los caldos de fermentación en que se cultivan.

Otro objeto de este invento es proporcionar un procedimiento para aislar estos compuestos en proporciones elevadas.

20 Otro objeto del invento es proporcionar un método comercialmente útil para recuperar novobiocina y sus análogos de caldos de fermentación en los que se elaboren.

Otros objetos y ventajas de este invento se apreciarán en el curso de la siguiente descripción y explicación.

25 Se ha comprobado ahora que la novobiocina y sus análogos, denominados en adelante compuestos con actividad de novobiocina, se pueden recuperar de soluciones, suspensiones u otros materiales líquidos crudos o en bruto, que los contengan, incluyendo caldos de fermentación, 30 concentrados crudos, soluciones diluídas, extractos y si-



milares, por tratamiento con una resina de intercambio iónico de la cual se pueden recuperar después por elución los compuestos con actividad de novobiocina.

5 El procedimiento conforme al invento tiene sobre los procedimientos ya conocidos de recuperar actividad de novobiocina por extracciones o separaciones con disolventes, la ventaja de que los volúmenes de soluciones que han de manejarse en el mismo son relativamente pequeños, lo cual reduce al mínimo el instrumental y el trabajo de laboratorio.

10 Otra ventaja del procedimiento de este invento reside en que se consigue una recuperación substancialmente completa de la actividad de novobiocina mediante el empleo de resinas de intercambio aniónico en condiciones óptimas, comparada con la recuperación meramente parcial de actividad de novobiocina asequible por otros métodos, como la extracción con disolventes.

15 Contemplado en algunos de sus aspectos más amplios, el nuevo procedimiento conforme al invento, para recuperar compuestos con actividad novobiocinica a partir de soluciones que los contenga, comprende tratar tales soluciones con una resina de intercambio aniónico orgánica nitrogenada, polimérica y fuertemente básica, que esencialmente deriva su capacidad de intercambio iónico de la presencia de grupos amonio cuaternario o amino, con lo que la resina adsorbe la actividad de novobiocina, y ésta se recupera separando la resina de la solución y eluyendo los compuestos con actividad de novobiocina.

20 El procedimiento de este invento se puede practicar, si se quiere, empleando una columna adecuada, o mani-



pulando cargas de material con actividad novobiocínica en pilas o depósitos. En el primer caso, la resina se introduce en una columna vertical, y la solución que contiene la actividad novobiocínica se hace pasar a través del lecho de resina. El líquido que sale de la columna se examina de continuo, a fin de dar por terminada la alimentación de la columna cuando la descarga contenga más de una actividad mínima de novobiocina arbitrariamente fijada como aceptable. Cuando se alcanza este nivel, se deja de suministrar solución, y el compuesto con actividad novobiocínica adsorbido se separa por elución de la columna de resina de intercambio ionico, haciendo pasar por ésta una solución capaz de eluir de ella el compuesto con actividad de novobiocina.

La resina eluída se puede regenerar luego por tratamiento con una solución regenerativa adecuada, y sirve de nuevo para el proceso de adsorción, o bien se agrega resina nueva a la columna, con la regenerada, si se quiere.

Cuando se trabaja por cargas o tandas, la resina de intercambio anionico, elegida se agita en un recipiente adecuado con la solución que contiene el compuesto con actividad novobiocínica. Las proporciones empleadas de resina y de solución se determinan empíricamente a base de la experiencia anterior, y cuando la concentración de actividad novobiocínica en la solución se ha reducido al factor deseado, la solución se decanta o separa de otro modo de la resina. Ésta se trata luego para eluir de ella el compuesto con actividad de novobiocina; la elución, si se quiere, puede hacerse en una columna.



En una de las formas preferidas de realización del presente invento, se adsorben compuestos con actividad novobiocínica en la resina de intercambio iónico a partir de caldos enteros o integrales que los contengan.

5 Estos caldos enteros contienen además micelios de microorganismos, así como medios nutritivos adecuados y diversos subproductos de fermentación.

La adsorción a partir de estos caldos integrales, se consigue agregando al caldo la resina de intercambio iónico después de la recolección, permitiendo a la resina adsorber el compuesto con actividad de novobiocina contenido en el caldo, y separando luego del caldo la resina con la actividad de novobiocina adsorbida. Esta separación se puede hacer mediante filtración o tamizado, o por cualquier otro método que se quiera, como los que utilizan ciclones de líquido, mesas estriadas, clasificadores, etc. Las cribas con mallas de tamaños apropiados para retener la resina y dejar pasar los micelios, normalmente de unas 10 a 200 mallas, han resultado especialmente ventajosas para este objeto, y no se ha observado obstrucción de las cribas con micelios o caldo gastado. A fin de facilitar más la separación, puede utilizarse una criba vibratoria.

Las resinas de intercambio iónico apropiadas para uso en la práctica del procedimiento del invento son, en particular, las resinas nitrogenadas poliméricas fuertemente básicas, que suelen tener grupos amonio cuaternario unidos a una matriz de estireno-divinilbenceno. Ejemplos de este tipo de resinas son las resinas "Dowex", de la Dow Chemical Co., Midland, Mich., como "Dowex 1-X2",



"Dowex 1-X4" y "Dowex 2-X4"; las resinas "Amberlite" de la Rohm & Haas Co., Filadelfia, Pa., como "Amberlite IRA-400", "Amberlite IRA-401", "Amberlite IRA-411" y "Amberlite XE-98"; y las resinas "Duolite", de la Chemical Process Co., Redwood City, Calif., por ejemplo, "Duolite A-40", "Duolite A-101" y "Duolite A-102". Aunque se mencionan estas resinas como ejemplo de resinas de intercambio ionico que pueden emplearse para la adsorción de novobiocina, son asimismo aplicables otras resinas fuertemente básicas.

Aunque no se fija rigurosamente el tamaño de las partículas de resina, resultan especialmente útiles para la adsorción las comprendidas entre 10 y 200 mallas, y con preferencia entre unas 35 a 100.

Para eluir de la resina de intercambio ionico la actividad de novobiocina adsorbida en ella, se emplea una solución eluente acuosa que contiene un electrolito, con preferencia en un disolvente orgánico para el antibiótico. Han resultado eficaces para este objeto soluciones ácidas acuosas con un disolvente orgánico para el compuesto con actividad novobiocínica. Por ejemplo, son satisfactorias para eluir de la resina el compuesto con actividad biocínica, soluciones acuosas de ácido clorhídrico o acético mezcladas con un disolvente orgánico hidromiscible adecuado, como alcohol o cetona. La concentración del compuesto ácido en la solución eluente es, con preferencia, de 1% a 10% en peso/volumen. La fase orgánica puede estar constituida por 70 a 98% del disolvente orgánico, con un 30% a 2% de agua.

El método de elución puede ser en columna o por



5 cargas, aunque se prefiere el primero, por necesitarse volúmenes menores, y por la relativa facilidad de análisis periódicos del eluato y su división en fracciones, que se efectúa sin dificultad empleando para la elución una columna.

10 El eluato se puede someter a tratamiento ulterior, a fin de purificarlo más, por ejemplo, pasándolo por una columna cromatográfica, como una columna de alúmina lavada con ácido sulfúrico diluido y agua, y tratando el eluato purificado y decolorado con una solución ácida, por ejemplo, de metanol y ácido acético, a fin de recristalizar el ácido novobiocínico. Los cristales separados se pueden filtrar y lavar por ejemplo con una solución de agua y metanol filtrar y secar. Si se quiere, 15 es posible preparar diversas sales de novobiocina de este ácido novobiocínico, mediante técnicas de neutralización adecuadas. Los eluatos que contengan sustancias análogas a la novobiocina, como dihidronovobiocina, pueden tratarse de manera similar para recuperar aquéllas de los mismos.

20 El procedimiento del presente invento se comprenderá mejor con referencia a los ejemplos siguientes, que se ofrecen como ilustración simplemente, y no deben entenderse en modo alguno como limitativos del alcance del invento.

25 EJEMPLO 12.

30 Una porción de 25 litros de un caldo de fermentación filtrado, obtenido del cultivo de una cepa de Streptomyces spheroides productora de novobiocina en un medio nutritivo adecuado, y que contiene unos 7.200.000 unidades de actividad de novobiocina, se pasa por una columna



que contiene 50 c.c. de la resina de intercambio ionico "Amberlite IRA-411", empleada en su ciclo de cloruro. El tiempo de contacto de la solución con la resina de la columna es de unos diez minutos. El líquido que sale no muestra actividad de novobiocina mensurable. La resina, después del contacto con la solución, se lava con metanol al 95% para eliminar las impurezas. La novobiocina se eluye luego de la resina, empleando una solución que contiene 16% de ácido clorhídrico concentrado y 85% de metanol. En el eluato se encuentran 4.500.000 unidades de actividad novobiocínica; su volumen total es de menos de 3 litros, y contiene aproximadamente 62% de la actividad de novobiocina del caldo de cultivo tratado.

EJEMPLO 2º.

Se repite el procedimiento descrito en el ejemplo 1º, empleando 33 litros de caldo de fermentación filtrado con actividad de novobiocina, a razón de 270 unidades por mililitro, y 300 c.c. de la resina, en el ciclo de cloruro, con un tiempo aproximado de contacto de 25 minutos. El eluato mide algo más de 3 litros, y arroja un contenido de 82% de la actividad total de novobiocina existente en la solución primitiva.

EJEMPLO 3º.

Dos porciones de 30 ml. de resina "Dowex 1-X2", de tamaño entre 50 y 100 mallas, en el ciclo de cloruro, se añaden a 300 ml. de caldo de fermentación de novobiocina sin filtrar, con una actividad de 510.000 unidades. Cada porción de la resina se separa del caldo gastado pasándola por una criba de 70 mallas, después de 10 minutos de contacto; se pone en una columna de 1 pulg., y se eluye



en columna con una solución que contiene 16% de ácido clorhídrico concentrado y 84% de metanol. En el eluato se encuentra una actividad de 202.000 unidades.

EJEMPLO 4º.

5                    Se disuelven 5 g. de dihidronovobiocina sódica en 500 ml. de agua, y se añaden 50 ml. de resina "Dowx 1-X2", en el ciclo de cloruro, dejando todo en reposo durante tres horas. La resina se separa por filtración y se lava con agua. Una porción de 17 ml. de resina se  
10                    eluye luego en columna con una solución que contiene 16 ml. de ácido clorhídrico concentrado y 84 ml. de metanol. El eluato da 95% de la dihidronovobiocina presente en la carga inicial

N       O       T       A  
-----

- 15                    Se reivindica como objeto de esta patente:
- 1) Procedimiento para recuperar compuestos con actividad de novobiocina, a partir de mezclas que los contengan; el cual comprende adsorber tal compuesto en una determinada resina de intercambio ionico, y eluir  
20                    de esta resina el material con actividad de novobiocina adsorbido en ella.
  - 2) Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto con actividad novobiocínica es novobiocina.
  - 25                    3) Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto con actividad novobiocínica es un análogo de la novobiocina.
  - 4) Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto con actividad novobiocínica es dihi-



dronovobiocina.

5) Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la resina de intercambio iónico es una resina de intercambio aniónico, fuertemente básica.

5 6) Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la mezcla que contiene el compuesto con actividad novobiocínica se retira de un caldo de fermentación para obtener el citado compuesto con actividad novobiocínica.

10 7) Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la mezcla que contiene el compuesto con actividad novobiocínica es un caldo de fermentación filtrado en el que existe el citado compuesto.

15 8) Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la mezcla que contiene el compuesto con actividad novobiocínica, es un caldo de fermentación no filtrado en el que existe el citado compuesto.

20 9) Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el compuesto con actividad de novobiocina se eluye de la resina de intercambio iónico por medio de una solución eluyente ácida.

10) Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la solución eluyente es de ácido clorhídrico.

25 11) Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la solución eluyente comprende ácido clorhídrico y un disolvente orgánico, y constituye un disolvente del compuesto con actividad de novobiocina.

12) Procedimiento según la reivindicación 11, en el que el disolvente orgánico es metanol.

13) Procedimiento para recuperar compuestos con



actividad de novobiocina, a partir de mezclas que los contengan.

Esta memoria consta de doce páginas escritas por una sola cara.

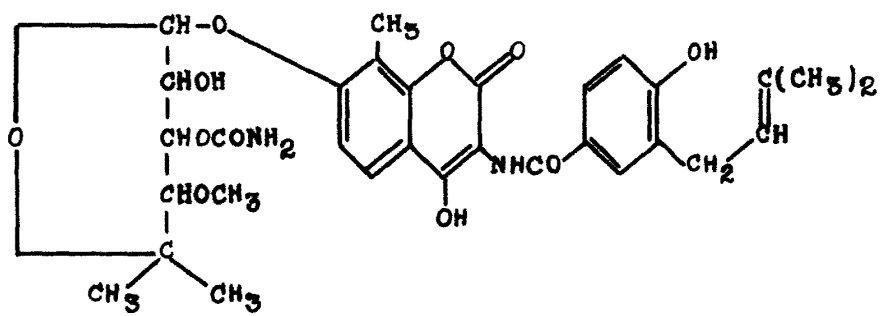
BARCELONA, 9 DE MAYO DE 1951

P. A.

JOSE, M. BOLIBAR  
F.P.



242247



P.H.

JOSE M. BOLIBAR  
P.P.