



2642 9

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

por "UN PROCEDIMIENTO PARA LA RECUPERACION DE CEFALOSPORI-
NA C", a favor de la firma inglesa NATIONAL RESEARCH DEVE-
LOPMENT CORPORATION, domiciliada en 1. Tilney Street, LONDRES,
W.1, (Inglaterra).

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

5. Es conocido que el antibiótico cefalosporina C puede
aislarse en forma pura de concentrados brutos del antibió-
tico por una variedad de métodos de fraccionamiento en
disolventes y a la vez de técnicas cromatográficas de
cambio de iones, y el invento que aquí se expone atañe a
mejoras relativas a la recuperación de la cefalosporina C,
y tiene por objeto proporcionar un procedimiento que supere
las desventajas de los procedimientos conocidos, que impli-
caban el empleo de carbón activado para la adsorción del
material activo contenido en el medio de fermentación.

10.



264299

5. En los procedimientos anteriores, el medio fermentado (que en lo que sigue se designará como "cerveza") se clarificaba por filtración o por centrifugación y se ponía en contacto con carbón, del cual luego se eluía y reabsorbía el material activo en una columna de alúmina o en una columna de una resina cambiadora de iones, de la cual volvía a eluirse y a continuación se le sometía a un proceso de extracción con disolvente, con lo que la cefalosporina C se separaba diferencialmente de la cefalosporina N, también presente. En otra alternativa, la cefalosporina N contenida en los eluatos procedentes de la columna de carbón o en los eluatos procedentes de una columna cambiadora de iones o una columna de alúmina se convertía en su ácido penílico sometiendo la solución a condiciones de temperatura y acidez en las que la cefalosporina N se convertía en su ácido penílico pero en las que la cefalosporina C quedaba substancialmente inafectada; o bien se destruía la cefalosporina N por obra de la penicilinasas enzimática, en condiciones que dejaban inafectada la cefalosporina C. Luego se separaba la cefalosporina C del ácido penílico de la cefalosporina N o bien los productos de la descomposición de la cefalosporina N por acción de la penicilinasas, empleando el fraccionamiento en disolvente o las técnicas cromatográficas con resina cambiadora de iones ya conocidos en anteriores métodos.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.

El proceso de recuperación era algo complicado y se han efectuado intentos para adsorber la cefalosporina C directamente de la cerveza tratada con ácido empleando un material cambiador de aniones, pero esta adsorción directa

264299²⁴



- de la cerveza tenía la desventaja de que se necesitaban cantidades muy grandes de la resina cambiadora de aniones, a causa de la presencia en la cerveza de aniones distintos a la cefalosporina C, mientras que, por otra parte, el ión cloruro se eluía corrientemente y ocasionaba dificultades en las ulteriores etapas de recuperación de la cefalosporina C, ya que, en las ulteriores etapas de recuperación, existía una fase de elución por acetato de piridina que ocasionaba la presencia de clorhidrato piridínico en el eluato, el cual, durante la concentración de la solución, producía un pH capaz de destruir la cefalosporina C y, además, impedía su precipitación en solución acuosa al añadir acetona; la eliminación del ión cloruro de la solución podría haberse efectuado por precipitación mediante compuestos argénticos, pero esta operación resultaba ineconómica.

- Ahora se ha descubierto que puede llevarse a cabo un procedimiento conveniente y eminentemente satisfactorio empleando una resina fuertemente cambiadora de cationes para disminuir el pH en la fase de descomposición de la cefalosporina N, seguido por tratamiento de la solución con una resina fuertemente cambiadora de aniones para eliminar el ión cloruro, después de la cual la cefalosporina C puede adsorberse sobre una resina cambiadora de aniones, de la que puede eluirse y concentrarse sin las desventajas derivadas de la presencia antes mencionada de clorhidrato piridínico.

- Según el invento que aquí se expone, se establece un procedimiento para la recuperación de cefalosporina C contenida en una cerveza en la que se halla junto con



24 E
404299

5. cefalosporina N, el cual comprende la disminución del pH de la cerveza clarificada -de preferencia ajustada a un pH de 5 a 6 aproximadamente por adición de ácido acético o hidróxido sódico a la cerveza enfriada antes de la clarificación- por tratamiento con un material cambiador de cationes que contenga grupos fuertemente ácido en forma hidrogenada (para mayor conveniencia, resina Amberlite IR-120) con el pH de 2,8 a 4,0, y de preferencia de 3,0
10. aproximadamente, la separación del material cambiador de cationes extrayéndolo del medio acidificado, el paso del medio acidificado por un material fuertemente cambiador de aniones (para mayor conveniencia, resina Amberlite IRA-400) en forma de una sal de un ácido orgánico monobásico débil y volátil, de preferencia ácido acético, para eliminar
15. en esencia todo el cloruro y otros aniones inorgánicos contenidos en él y luego la separación de la cefalosporina C del percolado. De preferencia, la cefalosporina C se separa del percolado ácido poniendo éste en contacto con un material cambiador de aniones (para mayor conveniencia, resinas
20. Amberlite IR-4B o IRA-400) en forma de una sal de un ácido orgánico monobásico, débil y volátil, de preferencia ácido acético, para adsorber la cefalosporina C que contiene, de preferencia lavando el material cambiador de aniones
25. con agua y eluyendo luego del material cambiador de aniones la cefalosporina C adsorbida, con ácido acético o fórmico, que en el caso de ciertos materiales débilmente cambiadores de aniones puede necesitar amortiguación por adición de una base débil, de preferencia piridina o amoníaco.

30. Una característica de este invento es que la



264299

24

5. solución de cefalosporina C eluída del material cambiador de aniones se concentra de preferencia por destilación en vacío en los casos en que se han empleado amortiguadores piridínicos. En los casos en que se han usado amortiguadores amónicos, el material puede concentrarse por destilación en vacío seguida por eliminación mediante sublimación en al to vacío de cualquier sal amónica volátil que quede; o, como alternativa, puede substituirse el amoniaco por piridina pasando el concentrado por un material fuertemente cambiador de cationes en forma piridínica y eliminando luego los amortiguadores piridínicos por simple destilación. En ambos casos, el material activo se precipita por la adición de acetona, se disuelve luego el sólido precipitado y si no está exento de cefalospirina N, se incuba la solución a un pH de 3 aproximadamente para convertir la cefalosporina N residual en su ácido penicílico, después de lo cual la cefalosporina C se carga, menos pesadamente que en la primera columna, a un material cambiador de aniones finamente dividido (para mayor conveniencia, resinas Amberlite IRA-400, IR-4B o XE-58), del que se cromatografía por desarrollo de elución con ácido acético o fórmico, que puede amortiguarse tal como antes se ha descrito.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



64299

5. sal amónica volátil remanente por sublimación en alto vacío o por substitución de las sales amónicas por piridina tal como se ha descrito antes, y los materiales activos se vuelven a precipitar por adición de acetona; la primera columna cambiadora de aniones antes mencionada, en que se obtiene un efecto de concentración, puede omitirse, en cuyo caso la cefalosporina C aquí obtenida se halla en solución más diluída. El procedimiento incluye además el volver a disolver la cefalosporina C y convertirla en gran escala a su sal sódica por la adición de hidróxido sódico, para ajustar la solución a un pH de 6 aproximadamente, y el procedimiento se completa pasando la solución por un material fuertemente cambiador de cationes (para mayor conveniencia, resina Dowex 50 x 8) en forma sódica, después de lo cual se concentra y cristaliza de la solución la sal sódica de la cefalosporina C. sales distintas a la sal sódica pueden hacerse mediante una modificación obvia del procedimiento precedente.
- 10.
- 15.
20. Se observará que el procedimiento antes expuesto, que puede llevarse a cabo solamente con el uso de materiales cambiadores de iones, hace así posible la producción de la solución final substancialmente exenta de iones distintos a los de la solución eluyente final, por ejemplo ácido acético o una sal de éste tal como el acetato de piridina y, desde luego, la cefalosporina C.
- 25.
30. Se ha comprobado que, cuando se percuela la solución a través del material fuertemente cambiador de aniones para eliminar los iones de cloruro, se produce con frecuencia un paso del ión cloruro antes de que toda la cefalosporina C haya sido percolada, y es una caracterís-



264299

5. tica de este invento que el material fuertemente cambiador de aniones (resina Amberlite IRA-400) se emplee en una serie de secciones que se utilizan sucesivamente, desviando la solución de una sección a otra sección siguiente en seguida que se detecta el ión cloro en el percolado; procediendo de esta manera, puede asegurarse que el material cambiador de aniones esté saturado de ión cloruro, haciendo así posible asegurarse de que toda la cefalosporina C de la solución aplicada al material cambiador de aniones pasa
10. efectivamente, evitándose así toda pérdida de materiales activos en esta fase. Procediendo de esta manera, la solución percolada de cefalosporina C que se recoge de las secciones sucesivas del cambiador de aniones no contiene cantidades perceptibles de iones de cloruro, sulfato
15. o fosfato y contiene también toda la cefalosporina C que se hallaba en la cerveza acidificada original aplicada al cambiador de aniones.

20. Lo que sigue es una descripción de las varias clases de materiales cambiadores de iones a que se ha hecho antes referencia.

25. 1) Los materiales fuertemente cambiadores de cationes empleados para el ajuste del pH son materiales cambiadores de iones que contienen grupos fuertemente ácidos, tales como radicales de sulfonato o fosfato que no adsorben cefalosporina C de modo notable a pH superior a 2,5, y materiales cambiadores de cationes típicos y convenientes son las resinas que se expenden con los nombres comerciales "Amberlite IR-120" o "Dowex 50 x 8".

30. 2) Los materiales fuertemente cambiadores de aniones que se emplean para la eliminación de los aniones de cloru-

264299



5. ro y otros contenidos en la solución, son materiales de los que la cefalosporina C puede desplazarse muy fácilmente mediante iones de cloruro, y materiales cambiadores de aniones típicos y convenientes son las resinas que se expenden con los nombres comerciales "Amberlite IRA-400", "Dowex 1" o "Deacidite-FF".
10. 3) Los materiales cambiadores de aniones empleados para la adsorción de cefalosporina C pueden ser materiales débilmente cambiadores de aniones que tengan gran capacidad para la cefalosporina C cuando están en forma de acetato y cuando la solución tiene un pH de 3 aproximadamente, tienen la propiedad de descargarse de cefalosporina C a pH de 6,0 a 1,0 en acetato de piridina, y materiales débilmente cambiadores de aniones típicos y convenientes son
15. las resinas que se expenden con los nombres comerciales "Amberlite IR-4B" y "Deacidite E"; como alternativa pueden emplearse materiales fuertemente cambiadores de aniones, tales como las resinas que se expenden con los nombres comerciales de "Amberlite IRA-400", "Dowex 1", "Dowex 2" y
20. "Deacidite FF", de las que la cefalosporina C se eluye mediante ácido N acético.
25. 4) Los materiales fuertemente cambiadores de cationes empleados en la fase de conversión de la cefalosporina C purificada a su sal sódica puede ser cualquier material fuertemente cambiador de cationes en forma sódica, y un material cambiador de cationes típicamente útil es la resina "Dowex 50 x 8".

30. El ejemplo que se da a continuación sirve para ilustrar la manera como puede llevarse a la práctica el invento.



264299

5. Se ajusta a pH 5,5 todo el cultivo por adición de ácido acético glacial, mientras se agita. La suspensión se pasa por un aparato filtrador adecuado a fin de lograr un filtrado brillante. La adición de una preparación de kieselgur, como la Celite Hy-flo Super-Cel, puede ser ventajosa con algunos tipos de aparato filtrador y no es deletérea.
10. El filtrado brillante se ajusta a pH de 2,8 a 3,0 por adición de resina Amberlite IR-120 en forma hidrogenada, con agitación. Cuando se ha logrado el pH deseado, se filtra la suspensión, se la calienta a 37°C y se la mantiene así durante 3 horas. Luego se la enfría hasta la temperatura más baja posible, de preferencia a 0°C.
15. Los aniones inorgánicos, tales como el cloruro, pueden dificultar el proceso de purificación, por ejemplo compiten con la cefalosporina C para la absorción en la resina. Es preferible, por lo tanto, eliminarlos en esta fase. Se ha comprobado que la resina cambiadora de iones Amberlite IRA-400 en forma de acetato adsorbe, si se usa en
20. una columna, tanto la cefalosporina C como los aniones fuertes, pero que si se prosigue la carga hasta producirse la irrupción de cloruro, la cefalosporina C se eluye totalmente. Se establece una serie de columnas de IRA-400 (tamaño de malla 30 aproximadamente, en forma de acetato) y se hace
25. pasar por una de éstas el filtrado frío (a pH 3,0) hasta que ocurre la irrupción de cloruro. Al suceder esto, se transfiere inmediatamente el flujo de filtrado a una segunda columna, y así sucesivamente hasta haber tratado toda la partida. Los efluentes se analizan, tomando muestras, respecto al cloruro, empleando nitrato argéntico/ácido
- 30.

264299



5. nítrico de la manera ordinaria. Es conveniente establecer una gran columna que, según la escala de trabajo que se proyecta, sea suficientemente voluminosa para saturarse de cloruro con la mayor parte de la partida, dejando una pequeña cantidad para tratar con una serie de columnas pequeñas. De esta manera se reducen al mínimo las pérdidas de cefalosporina C, que se puede dejar adsorbida en la última columna.

10. Hemos comprobado que el volumen total de resina (depositado en las columnas) que es necesario se remonta al 0,75% aproximadamente del volumen de filtrado que ha de tratarse. El coeficiente de circulación empleado es de 0,3 aproximadamente volúmenes del lecho de resina por minuto, y la profundidad de las columnas es de alrededor de 50 cm.

15. El filtrado se halla ahora substancialmente libre de aniones inorgánicos.

20. El antibiótico puede adsorberse fácilmente a resina Amberlite IR4B en forma de acetato y se eluye de ella con amortiguador de acetato de piridina.

25. La resina (grado normal, unas 30 mallas), contenida en una columna de unos 60 cm de profundidad, se satura al 80% aproximadamente con cefalosporina C haciendo pasar por ella el filtrado tratado a 0,1 volúmenes del lecho aproximadamente por minuto. Es necesario proporcionar un 2% en volumen de resina, con relación al volumen de la cerveza, para lograr este nivel de saturación.

El efluente debe, como es natural, estar exento de cefalosporina C.

30. La columna se lava a continuación con agua desti-

204299 24



- lada a una velocidad de 0,1 volúmenes del lecho por minuto hasta que el efluente no da ninguna reacción a la ninhidrina. A esto sigue un lavado con ácido acético normal, que elimina una banda pigmentada que da reacción a la ninhidrina pero
5. no contiene cefalosporina C. Esta banda absorbe también fuertemente la luz ultravioleta a 260 μ , y es costumbre proseguir el lavado hasta que la absorción descienda a $E = 3$ o menos (célula de 1 cm). Se empieza entonces la elución empleando ácido acético normal, ajustado a pH 5,5
10. por la adición de piridina. Esta solución debe estar, de preferencia, enfriada a 0°C antes del uso y las fracciones del eluato se mantienen tan frías como sea posible después de recogerlas. El pH del efluente se remonta constantemente a 2,4 a 5,5 y cuando el pH está fijo a 5,5 puede detenerse la circulación. La cefalosporina C empieza a eluirse
15. cuando el pH del efluente se ha remontado a 4,0 aproximadamente y de ordinario queda totalmente eluída cuando el pH del efluente ha llegado a 5,2. El coeficiente de circulación o flujo es de 0,07 volúmenes del lecho aproximadamente por minuto y el efluente se recoge en fracciones, por ejemplo cada fracción = 0,16 de volumen del lecho. Hallamos que el ensayo biológico es el método más seguro para determinar los datos de la cefalosporina C, aunque puede emplearse la reacción a la ninhidrina.
- 20.
25. Las fracciones activas se combinan y evaporan en vacío a temperatura no superior a 25°C hasta formar un jarabe. Cuando más baja es la temperatura posible de evaporación, tanto menor es la destrucción de cefalosporina C. Es aconsejable comprobar que no existe cloruro antes de la evaporación, ya que la presencia de éste pro-
- 30.



264299

duce un pH bajo, que destruye cefalosporina C e impide también la precipitación subsiguiente por acetona. Si se halla presencia de cloruro, debe eliminarse éste determinándolo y añadiendo 0,95 equivalentes de solución de acetato argéntico. El cloruro argéntico precipitado se elimina por filtración.

5.

El jarabe se precipita por adición de 50 volúmenes, por lo menos, de acetona absoluta y el polvo resultante se muele en la acetona. El polvo puede separarse en la centrifugadora y lavarse completamente en acetona absoluta para eliminar el ácido acético. El polvo, que

10.

contiene el ácido libre bruto de la cefalosporina C, se seca en vacío. En esta fase tiene de ordinario una actividad de 1 unidad/mg aproximadamente. El polvo se disuelve en un poco de agua y su pH, que debe ser aproximadamente de 3, se ajusta a 5 por adición cuidadosa de hidróxido sódico.

15.

La sal sódica bruta de la cefalosporina C se aplica a una columna de la forma finamente dividida de resina Amberlite IR-4B conocida como XE58 en forma de acetato. El material se cromatografía luego por elución lenta con acetato piridínico diluido. La cefalosporina C está parcialmente libre de impurezas y la sal sódica subsiguiente puede cristalizarse con facilidad.

20.

La resina (150-200 mallas) está contenida en una columna y tiene aproximadamente 50 cm de profundidad. El volumen de resina necesario es de unas 0,0055 veces el volumen del filtrado del cultivo original. La columna se mantiene de preferencia en una sal refrigerada, a unos 4°C, y se emplea un colector automático de fracciones para fraccionar

25.

30.



264299

5. el efluente. El fluido irrigador (0,3 moles de ácido acético, ajustado a pH 5,0 con piridina) se suministra a la parte superior de la columna y su velocidad de flujo se controla mediante algún dispositivo adecuado. Nosotros hemos empleado un dispositivo hidrostático de carga constante o una bomba peristáltica, pero a la escala con que ahora se actúa, creemos que un depósito que contenga el fluido irrigador, sobre el cual se mantenga una presión constante de aire, da los resultados más seguros.

10. La solución de cefalosporina C sólida bruta se deja infiltrarse en la parte superior de la resina, después de lo cual se llena cuidadosamente la parte superior del aparato con fluido irrigador y se empieza la circulación regulándola a 0,1 volúmenes de lecho aproximadamente por hora. Se recogen fracciones de 0,018 volúmenes de lecho, pero éstas pueden ser mucho mayores si es conveniente.

15. Empleamos el ensayo biológico de las muestras para determinar la posición de la cefalosporina C, pero puede emplearse la reacción a la ninhidrina. La cefalosporina C emerge al cabo de 36 a 48 horas después de empezar el funcionamiento de la columna (fracciones 80-160 con una "cola" a 220 de nuestra escala).

20. Las fracciones activas se combinan y evaporan en vacío, hasta formar un jarabe, a la temperatura más baja posible. El jarabe se precipita por adición de 98 volúmenes por lo menos de acetona absoluta. El polvo resultante se lava varias veces con acetona absoluta y se seca. El ácido libre, en esta fase, tiene una actividad aproximada de 5-6 u/mg (pureza 50-60%).

30.



264299

24

5. El polvo de cefalosporina C libre de ácido se disuelve en un poco de agua, en la que debe tener $\text{pH} = 3$. Se añade cautamente solución de hidróxido sódico con agitación constante, hasta el $\text{pH} = 6,5$. Como la solución puede contener todavía algo de piridina u otras bases, es ventajoso pasar la solución por una pequeña columna de resina Dowex 50 x 8 en forma sódica. La columna se irriga luego con agua hasta que el efluente no da ya reacción a la ninhidrina. A continuación se concentra la solución en vacío, a la temperatura más baja posible, hasta formar un jarabe.

10. La cristalización se presenta espontáneamente en el jarabe concentrado. Nosotros dejamos reposar el jarabe a temperatura ambiente durante 24 horas. No se logra ventaja con el enfriamiento, pues la cristalización se desarrolla mejor a temperatura ambiente y algunas gomas indeseables se precipitan a temperaturas bajas.

15. La suspensión gomosa de microcristales se agita con una solución de etanol (70% en volumen) en agua y los cristales se separan por filtración o en la centrifugadora. Se les lava con solución de etanol al 70% hasta que no se destila más color, y se secan en vacío sobre pentóxido fosfórico. Las impurezas son mucho más solubles en etanol al 70% a 25°C que el antibiótico. Las lavazas se depositan y pueden evaporarse hasta formar jarabe, reprecipitarse con acetona y el polvo resultante disolverse en agua y evaporarse hasta un jarabe, en cuyo caso puede obtenerse una segunda cosecha de cristales, menos puros.

20. La invención, dentro de su esencialidad, puede ser desarrollada en otras formas de realización que difieran en

25.

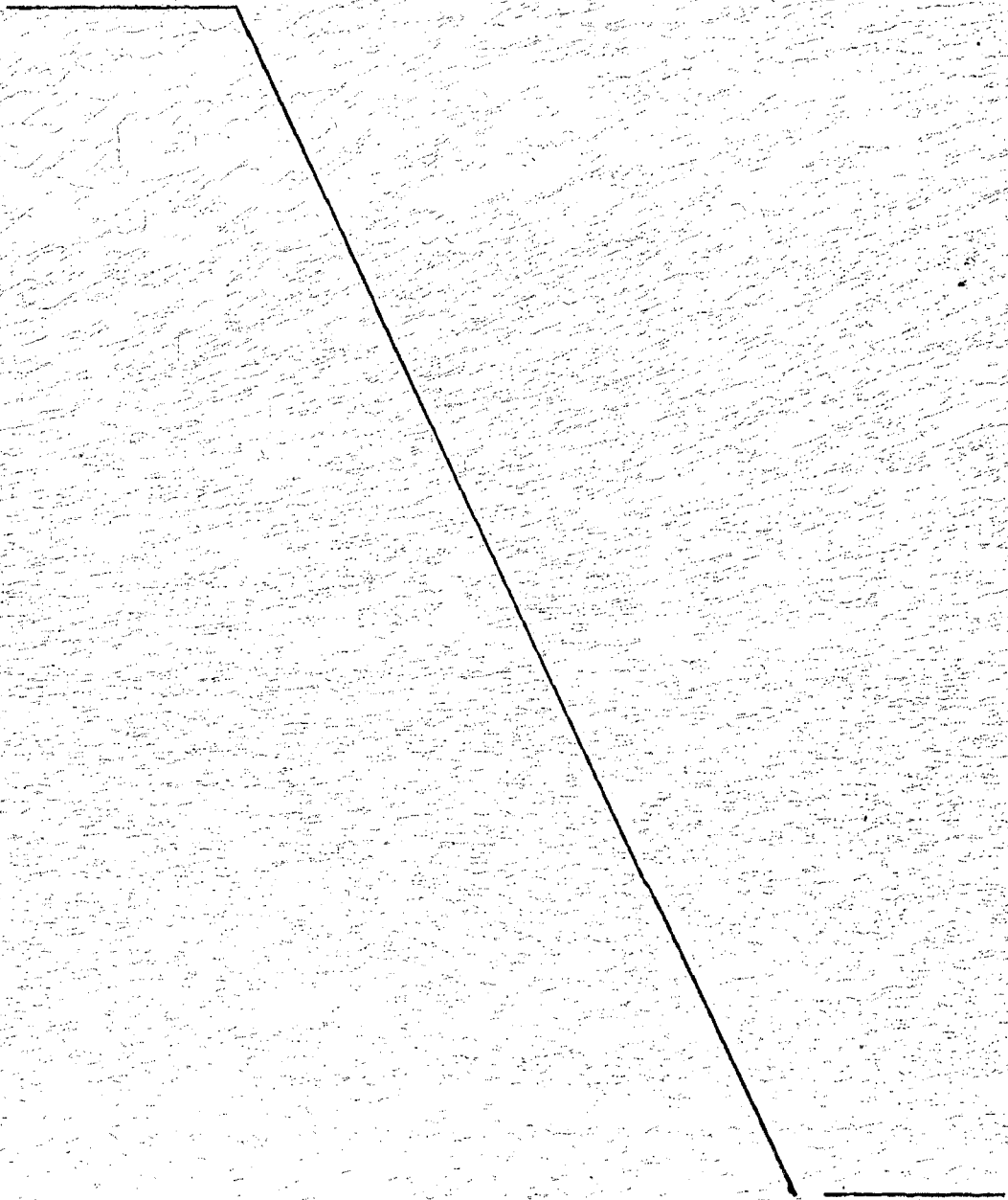
30.

264299

245



detalle de la indicada a título de ejemplo, a las cuales
alcanzará igualmente la protección que se recaba. Podrá,
pues, realizarse con los medios y aparatos más adecuados,
por quedar todo ello comprendido dentro del espíritu de
5. las reivindicaciones.



26429924E



NOTA

Descrito el objeto de la invención, se declara nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad inglesa nº 2706/60 del 25 de Enero de 1960.

5. 1. Un procedimiento para la recuperación de cefalosporina C contenida en una cerveza clarificada en que se halla junto con cefalosporina N, el cual comprende el disminuir el pH de la cerveza clarificada, por tratamiento con un material cambiador de cationes, que contiene grupos fuertemente ácidos, en forma hidrogenada, hasta un valor de 2,8 a 4,0, el separar del medio acidificado el material cambiador de cationes, el pasar luego el medio acidificado por un material fuertemente cambiador de aniones en forma de sal de un ácido orgánico monobásico, débil y volátil, para eliminar substancialmente todo el cloruro y otros aniones inorgánicos contenidos en él, y el separar a continuación la cefalosporina C del percolado.
10. 2. Un procedimiento en conformidad con lo definido en la reivindicación 1, caracterizado por ajustarse el pH de la cerveza a un valor de 5 a 6 antes de la clarificación.
15. 3. Un procedimiento en conformidad con lo definido en la reivindicación 2, caracterizado por ajustarse el pH de la cerveza clarificada a 3 mediante el empleo en forma hidrogenada del mencionado material fuertemente cambiador de cationes.
20. 4. Un procedimiento en conformidad con lo definido en la reivindicación 1, la reivindicación 2 o la reivindicación 3, caracterizado porque la cefalosporina C se separa del
- 25.

264299 247



5. percolado poniendo éste en contacto con un material cambiador de aniones en forma de sal de un ácido orgánico monobásico, débil y volátil, para absorber la cefalosporina C sobre él y eluyendo la cefalosporina C absorbida con un ácido escogido en el grupo constituido por los ácidos acético y fórmico.

10. 5. Un procedimiento en conformidad con lo definido en la reivindicación 5, caracterizado porque la mencionada base débil es la piridina y porque la solución eluida se concentra por destilación en vacío.

15. 7. Un procedimiento en conformidad con lo definido en la reivindicación 5, caracterizado porque la mencionada base débil es amoníaco y porque la solución eluida se concentra por destilación en vacío seguida por sublimación de las sales amónicas residuales mediante sublimación en alto vacío.

20. 8. Un procedimiento en conformidad con lo definido en la reivindicación 5, caracterizado por precipitarse la cefalosporina C de la solución eluida mediante la adición de acetona.

25. 9. Un procedimiento en conformidad con lo definido en la reivindicación 8, caracterizado porque la cefalosporina C precipitada se disuelve en agua y se convierte en su sal sódica, que luego se cristaliza de la solución.

30. 10. Un procedimiento en conformidad con lo definido en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la eliminación del cloruro y otros aniones inorgánicos se lleva a cabo empleando una pluralidad de secciones del material fuertemente cambiador de aniones mencionado y el flujo de medio acidificado, a la primera sección se desvía



264299

hacia una segunda sección cuando irrumpe el ión cloruro en la primera sección y se vuelve a desviar a otra sección sucesiva al irrumpir el ión de cloruro.

5. 11. Un procedimiento para la recuperación de cefalosporina C.

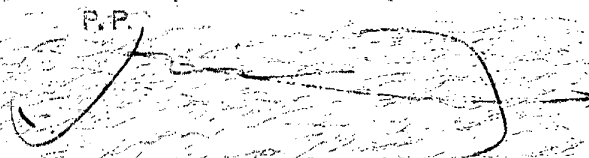
Según se describe y reivindica en la presente memoria que consta de dieciocho páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a 24 de enero de 1.961.

10. NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION.

p. a.

INDUSTRIAS QUÍMICAS
P.P.



R/pp.
tr:sb.