



39877

MEMORIA DESCRIPTIVA  
correspondiente a la solicitud de una  
PATENTE DE INVENCION

Solicitante: MERCK & CO., INC.

Residencia: RAHWAY, NEW JERSEY 07065, EE.UU.

Enunciado: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA RECUPERACION Y PURIFICACION DE UN ANTIBIOTICO".

Prioridad: de la solicitud de patente estadounidense N° 699.377 del 22 de enero de 1.968.

R/G.

POOR  
QUALITY

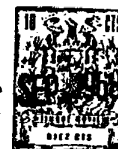


### ANTECEDENTES DEL INVENTO

1 El Antibiótico 833A es un nuevo y útil antibiótico formado por cultivo, en condiciones controladas, de una  
variedad previamente desconocida de microorganismo y se  
5 produce durante la fermentación aerobia de medios nutritivos acuosos adecuados. El caldo de fermentación y las soluciones crudas del antibiótico deben ser tratados para obtener el antibiótico en forma purificada. El Antibiótico  
833A es un material altamente polar, como indica la casi  
10 completa ausencia de adsorción de las soluciones acuosas por el carbón activo a pH 5. No es adsorbido en las arcillas ácidas y no es extraído fácilmente, incluso en presencia de aminas orgánicas, por los disolventes polares como el fenol. Para la utilización final del antibiótico, el caldo de  
15 fermentación crudo debe ser tratado con objeto de obtener el antibiótico en una forma purificada. El presente invento está dirigido a un procedimiento para obtener este nuevo antibiótico en forma pura por adsorción sobre alúmina con posterior elución con soluciones acuosas o hidroalcohólicas de  
20 hidróxido amónico.

### RESUMEN DEL INVENTO

Este invento se refiere a un método de purificación de una nueva sustancia antibiótica llamada Antibiótico 833A o, por su nombre químico, ácido 1-cis-1,2-epoxi-1-propilfosfónico, tratando el caldo de fermentación en el que  
25



1 se produce el antibiótico o las soluciones del mismo que  
contienen impurezas con alúmina y posterior elución de  
la alúmina con soluciones acuosas o hidroalcohólicas bá-  
sicas con objeto de obtener el antibiótico en forma purifi-  
5 cada. El Antibiótico 833A es muy eficaz en la inhibición  
del crecimiento de varios microorganismos Gram-negativos y  
Gram-positivos.

#### DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

10 El Antibiótico 833A es una sustancia ácida, soluble  
en agua, que forma sales con las bases orgánicas e inorgá-  
nicas. En el presente invento se ha encontrado que el Anti-  
biótico 833A puede ser obtenido en forma purificada tratan-  
do primero una solución del antibiótico, en forma de caldo  
de fermentación o en forma de sal, como la sal de sodio,  
15 potasio, calcio, magnesio o amonio o una sal de una base  
orgánica, con alúmina y eluyendo el material purificado  
con un eluyente básico adecuado, como hidróxido amónico  
acuoso o hidróxido amónico hidroalcohólico. Para esta pu-  
rificación es adecuada la alúmina lavada básica o ácida  
20 y los eluatos se recogen en fracciones.

Un método preferido de purificar una solución del  
antibiótico es tratar la solución con alúmina en condicio-  
nes esencialmente ácidas.

25 El pH preferido para llevar a cabo el procedimiento  
de purificación es alrededor de 5,7, pero también puede

14 SEP 1968



1 realizarse el proceso en un intervalo de pH de 3 a 7,5.  
Las soluciones de antibiótico empleadas como material de  
partida pueden obtenerse pasando el caldo de fermentación  
a través de una columna de resina cambiadora de anión del  
5 tipo de amonio cuaternario en una matriz de estireno-divi-  
nilbenceno (Dowex 1 x 2) en el ciclo de cloruro. La elu-  
ción con soluciones acuosas o hidroalcohólicas de sales  
como el cloruro amónico, cloruro sódico, acetato sódico,  
cloruro potásico y similares da la sal sódica, potásica o  
10 amónica de Antibiótico 833A.

El eluato obtenido de la resina cambiadora de anión  
se concentra generalmente antes de tratarlo con alúmina y  
en general se analiza por un procedimiento modificado uti-  
lizando Proteus vulgaris como organismo de ensayo. A conti-  
15 nuación se agita una solución acuosa de la sal con alúmina  
lavada con ácido durante 20 a 40 minutos, a un pH de 5-6.  
Después generalmente se filtra la mezcla. Se prepara una  
suspensión acuosa o hidroalcohólica del adsorbato median-  
te adición de agua o agua y alcohol al adsorbato en alúmi-  
20 na y el antibiótico se eluye mediante la adición de una ba-  
se, como hidróxido amónico concentrado, hasta que el pH de  
la suspensión es de 9-12 aproximadamente. Generalmente se  
emplean soluciones acuosas de la base aunque también se  
pueden emplear soluciones hidroalcohólicas. Aunque el anti-  
25 biótico se eluye a pH alcalino, prácticamente todo el anti



14

1 biótico se recupera a un pH de 11 a 12 aproximadamente. A  
continuación la suspensión básica se agita durante unos  
30 a 60 minutos y la alúmina se separa por filtración. El  
5 eluato o filtrado se concentra y el concentrado se analiza  
generalmente siguiendo un procedimiento de ensayo mo-  
dificado utilizando Proteus vulgaris como organismo de en-  
sayo:

Para una nueva purificación se añade metanol al con-  
centrado y se separa por filtración cualquier material in-  
10 soluble. Normalmente se emplea un volumen de metanol que  
es unas 8 a 10 veces el volumen del concentrado. El filtra-  
do contiene prácticamente la totalidad del Antibiótico  
833A y se pasa a través de una columna de alúmina lavada  
con ácido. El tamaño de la columna dependerá de la cantidad  
15 de material de partida y de la cantidad de alúmina que se  
va a emplear. Entonces se emplea para eluir el adsorbato  
de alúmina un gradiente de metanol conteniendo amoniaco  
2 N en aproximadamente metanol al 75 %, 50 % y 25 % y fi-  
nalmente amoniaco acuoso aproximadamente 2 N; las diver-  
20 sas fracciones se recogen y se analizan para determinar el  
contenido en Antibiótico 833A.

El Antibiótico 833A parcialmente purificado puede  
ser purificado todavía más liofilizando las fracciones ob-  
tenidas por elución con metanol y amoniaco acuoso, combi-  
25 nando los sólidos de las fracciones obtenidas por elución



1 con las diversas soluciones de metanol-amoniaco, es decir, con amoniaco acuoso 2 N en metanol a 75 %, 50 % y 25 %, teniendo cuidado de mantener separados todos los sólidos eluidos con una solución particular de metanol-amoniaco, agitando varias veces el solido con metanol y finalmente separando por filtración el material insoluble. En general, la cantidad mayor de material activo se encuentra en las fracciones eluidas con metanol al 50 % - amoniaco, aunque se encuentra cierta actividad en las restantes fracciones. Los extractos metanólicos separados se combinan y concentran y el concentrado se cromatografía en alúmina lavada con ácido empleando un gradiente continuo empezando con solución acuosa 2 N de amoniaco y metanol al 75 %, a razón de 1 ml por minuto aproximadamente y manteniendo el volumen original de la solución eluyente mediante la adición de amoniaco acuoso 2 N. El eluato resultante se recoge en fracciones de unos 20 ml y las fracciones más activas, determinadas por un procedimiento de análisis modificado, se combinan y concentran.

20 Los concentrados del antibiotico que han sufrido una purificación parcial pueden ser purificados de nuevo disolviendo el concentrado en metanol y añadiendo butanol a la solución resultante. Se emplea alrededor de 10 a 12 veces el volumen de metanol por volumen de concentrado. En 25 general se añade un volumen igual de butanol pero pueden



1 emplearse volúmenes tan altos como tres veces la cantidad  
de metanol. Este último se separa por evaporación, gene-  
ralmente a presión reducida y el material insoluble en bu-  
tanol se separa por filtración. El análisis del Antibió-  
5 tico 833A soluble en butanol obtenido de esta forma, si-  
guiendo un procedimiento de análisis modificado, da gene-  
ralmente una zona de inhibición de 25 mm a una concentra-  
ción de unos 0,005 mg/ml. En algunos casos puede ser más  
conveniente combinar primero todas las fracciones que con-  
10 tienen material activo y después proceder como antes para  
purificar el antibiótico semi-puro. Entonces puede obte-  
nerse el antibiótico sólido por eliminación del butanol o  
puede obtenerse una solución acuosa extrayendo el antibió-  
tico con pequeños volúmenes de agua.)

15 Otra posibilidad consiste en agitar directamente  
el caldo de fermentación con alúmina lavada con ácido du-  
rante unos 30-60 minutos. El pH del caldo se ajusta a 5-6  
aproximadamente con ácido diluido, como ácido clorhídrico,  
se filtra después la mezcla y el adsorbato en alúmina fil-  
20 trado se lava y eluye con amoníaco acuoso a un pH de 11-12  
aproximadamente. A continuación se evapora el eluato para  
separar el amoníaco y la zona de inhibición se determina  
por un procedimiento de análisis modificado. El Antibió-  
tico 833A parcialmente purificado puede ser purificado más  
25 por cromatografía de columna sobre alúmina lavada con áci-

14 SEP 1960

1 do, como se ha descrito antes.

Los caldos de fermentación de Antibiótico 833A utilizados como material de partida para los procedimientos de purificación aquí descritos tienen unas actividades  
5 que oscilan aproximadamente entre 1 y 10 unidades por mililitro cuando se analizan siguiendo el procedimiento normalizado empleando Proteus vulgaris como organismo de ensayo.

El Antibiótico 833A se analiza convenientemente mediante un procedimiento de disco-placa utilizando Proteus vulgaris MB-838 (ATCC 2100 y NRRL B-3361) como organismo  
10 de ensayo. El cultivo de ensayo se mantiene como cultivo inclinado en ágar nutritivo (Difco) más 0,2 % de extracto de levadura (Difco). Los cultivos inclinados inoculados  
15 se incuban a 37°C durante 18-24 horas y se mantienen a las temperaturas del refrigerador durante una semana, preparando tubos inclinados frescos cada semana.

El inoculum para las placas de ensayo se prepara cada día inoculando un erlemeyer de 250 ml que contiene 50  
20 ml de caldo nutritivo (Difco) más 0,2 % de extracto de levadura (Difco) con una muestra raspada del tubo inclinado. El matraz se incuba a 37°C en una máquina sacudidora durante 18-24 horas. El caldo de cultivo se ajusta entonces hasta una transmitancia del 40 % a una longitud de onda de  
25 660 mμ, utilizando un aparato Spectronic 20 de Bausch &



1 Lomb, mediante la adición al cultivo de solución de ex-  
tracto de levadura al 0,2 %. El caldo sin inocular se  
utiliza como blanco para esta determinación. Para inocu-  
lar un litro de medio se emplean 30 ml del caldo ajusta-  
5 do.

Como medio de ensayo se utiliza ágar nutritivo  
(Difco) más 0,2 % de extracto de levadura (Difco). Se pre-  
para este medio, se esteriliza en autoclave y se deja en-  
friar a 50°C. Después de inocular el medio, se añaden 10  
10 ml a unas placas petri estériles y el medio se deja soli-  
dificar.

La actividad se expresa en unidades, estando defini-  
da una unidad como la concentración de Antibiótico 833A por  
mililitro que sobre un disco de papel de 1/2" (12,7 mm)  
15 produce una zona de 28 mm de diámetro. Para la preparación  
de la curva patrón se emplean cuatro concentraciones de  
833A, a saber, 0,3, 0,4, 0,6 y 0,8 unidades por ml; obte-  
niéndose cada concentración por dilución en tampón de tri-  
(hidroximetil)aminometano ajustado a pH 8,0. Se colocan  
20 cuatro discos en cada una de las cinco placas para la pre-  
paración de la curva patrón, conteniendo cada placa un dis-  
co de cada una de las cuatro concentraciones de antibióti-  
co antes indicadas. Las placas se incuban durante 18 horas  
a 37°C y se miden los diámetros de las zonas de inhibición  
25 en milímetros. Se calcula un diámetro de zona medio para



14 SEP 1968

1 cada concentración y a partir de estos valores se prepara  
una curva patrón en papel semilogarítmico. La pendiente  
de la línea obtenida está comprendida entre 4 y 5.

5 Las muestras de Antibiótico 833A que se van a ana-  
lizar se diluyen en tampón 0,05 M a pH 8,0 hasta una con-  
centración apropiada. Los discos se sumergen en la solu-  
ción de ensayo y se colocan sobre la superficie de la pla-  
ca de ensayo; normalmente se colocan dos discos para cada  
muestra en una placa, uno frente a otro. Se colocan sobre  
10 la placa dos discos sumergidos en 0,4 unidades por ml de  
solución de Antibiótico 833A, en posición alternada con res-  
pecto a la muestra. Las placas se incuban a 37°C durante  
16 horas y se determinan los diámetros de las zonas en mi-  
límetros. La potencia de la muestra se determina mediante  
15 un nomograma o a partir de la curva patrón.

20 Cuando se emplea el procedimiento de análisis mo-  
dificado utilizando Proteus vulgaris como organismo de  
análisis, se utilizan 5 ml de medio inoculado en la placa  
petri y el antibiótico a analizar se coloca en un disco  
de papel de 1/2" (12,7 mm). La placa con los discos de en-  
sayo se incuba después durante 18 horas a 37°C y se miden  
las zonas de inhibición. La potencia se expresa como la  
cantidad de sólido por mililitro que produce una zona de  
inhibición de 25 mm en estas condiciones.

25 El Antibiótico 833A se produce durante la fermenta-

14 SEP 1950

1 ción aerobia de medios nutritivos acuosos adecuados, en  
condiciones controladas, por las variedades de S. fradiae  
productoras de Antibiótico 833A. Para la producción de  
Antibiótico 833A son adecuados los medios acuosos, como  
5 los empleados para la producción de otros antibióticos.  
Estos medios contienen fuentes de carbono y nitrógeno asi  
milables por el microorganismo y sales inorgánicas. Ade-  
más, los medios de fermentación contienen trazas de meta-  
les necesarios para el crecimiento del microorganismo, que  
10 son comúnmente suministrados como impurezas como consecuen-  
cia de la adición de otros constituyentes del medio. La  
cantidad exacta de la fuente o fuentes de hidrato de carbo-  
no utilizadas en el medio depende en parte de los restan-  
tes ingredientes del mismo, pero generalmente se encuentra  
15 que es satisfactoria una cantidad de hidrato de carbono com  
prendida entre 1 % y 6 % del peso del medio. Estas fuentes  
de carbono pueden ser utilizadas individualmente o bien se  
pueden combinar en el medio varias de estas fuentes de car-  
bono. Las fuentes de nitrógeno satisfactorias comprenden mi  
20 llares de materiales proteínáceos como diversas formas de  
hidrolizados de caseína, harina de soja, licor de infusión  
de maíz, solubles destilados, hidrolizados de levadura, pas  
ta de tomate y similares. Las diversas fuentes de nitróge-  
no, solas o en combinación, se utilizan en cantidades que  
25 oscilan aproximadamente entre 0,2 y 6 % del peso del medio

1 acuoso.

La fermentación utilizando los microorganismos  
productores de Antibiótico 833A puede llevarse a cabo a  
temperaturas comprendidas entre unos 25° y 31°C. Para  
5 obtener resultados óptimos lo más conveniente es realizar  
estas fermentaciones a temperaturas de 26° a 30°C. El  
pH de los medios nutritivos adecuados para cultivar Strepto-  
tomyces fradiae y producir Antibiótico 833A puede variar  
entre 5,5 y 7,5 aproximadamente.

10 El Antibiótico 833A y sus sales son agentes anti-  
microbianos útiles que son activos en la inhibición del  
crecimiento de las bacterias patógenas Gram-positivas y  
Gram-negativas. El antibiótico puede ser utilizado como  
agente antiséptico para eliminar los microorganismo sus-  
15 ceptibles del equipo farmacéutico, dental y médico. Ade-  
más, es útil en la separación de ciertos microorganismos  
de las mezclas de microorganismos. El antibiótico puede  
ser utilizado para tratar los ratones de laboratorio in-  
fectados con varios organismos Gram-negativos y eliminar  
20 de esta forma las fuentes de infección que de otra forma  
harían que los animales no fueran adecuados para las prue-  
bas de laboratorio. Como el antibiótico y sus sales son  
muy activos en la inhibición del crecimiento de varias es-  
pecies de Salmonella, puede ser utilizado como desinfectante  
25 en el lavado de huevos y de las zonas sometidas a



1 infección con Salmonella.

Los siguientes ejemplos ilustran los métodos de producción y recuperación de Antibiótico 833A.

EJEMPLO 1

5 Se emplean 500 ml de un cultivo vegetativo de Streptomyces fradiae MA-2898 (ATCC 21096) (NRRL B-3357) preparado cultivando el microorganismo en un erlenmeyer de 2 litros provisto de tabique, para inocular un fermentador de acero inoxidable de 200 galones (757,1 litros) conteniendo 467 litros de medio estéril de la siguiente composición:

	<u>g/litro</u>
Extracto de levadura	10
Glucosa	10
15 MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05
Tampón de fosfato <sup>#</sup>	2 ml
Agua destilada c.s.s.	el resto

<sup>#</sup> 91 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 95,0 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> llevados hasta 1 litro con agua destilada.

20 El medio inoculado se incuba a 28°C durante 24 horas, con agitación mecánica, mientras se mantiene un caudal de aire de 10 cfm (283 litros) a través del medio de fermentación, añadiendo una pequeña cantidad de Polyglycol 25 2000 para controlar la formación de espuma. Se emplean



1 215 litros del caldo de fermentación resultante para ino-  
 cular un fermentador de acero inoxidable de 1500 galo-  
 nes (5678 litros) conteniendo 1200 galones (4542,5 li-  
 tros) de medio nutritivo estéril de la siguiente compo-  
 5 sición:

	<u>g/litro</u>
Avena preparada para alimento	20
Solubles de destilería	10
Harina de soja	20
10 Citrato sódico	2
Ascorbato sódico	0,5
Agua destilada c.s.g.	el resto

ajustándose el medio a pH 6,5 antes de la esterilización.

15 El caldo inoculado se incuba a una temperatura de  
 28°C, con agitación, mientras se mantiene un caudal de  
 aire de 55 cfm (1557 litros/minuto) durante 2 días, aña-  
 diendo Polyglycol 2000 en pequeñas cantidades para contro-  
 lar la formación de espuma.

20 El caldo de fermentación resultante se filtra em-  
 pleando tierra de diatomáceas. Se pasan 550 galones (2082  
 litros) del caldo filtrado con una actividad de 0,34 uni-  
 dades/ml a través de una columna de resina cambiadora de  
 anión, previamente utilizada, del tipo de amonio cuaterna-  
 rio en una matriz de estireno-divinilbenceno (Dowex 1 x 2)  
 25 en el ciclo de cloruro. El adsorbato en resina resultante



1 se eluye con una solución acuosa al 3 % de cloruro sódico y el eluato resultante se recoge en fracciones de 5 galones (18,9 litros). El caldo gastado, después de pasar a través de la columna, es inactivo en el análisis con Proteus vulgaris. Las fracciones 5-12, que contienen la mayor parte de la actividad antibiótica, se combinan.

5 Se pasan 550 galones (2082 litros) adicionales del caldo de fermentación filtrado a través de una columna que contiene 40 galones (151,4 litros) de una nueva resina cambiadora de anión del mismo tipo descrito anteriormente y el adsorbato en resina resultante se eluye con una solución acuosa al 3 % de cloruro sódico, recogiendo el eluato en fracciones de 5 galones (18,9 litros). Las fracciones 2-11, que contienen la mayor parte de la actividad antibiótica, se combinan con las fracciones 5-12 procedentes de la primera cromatografía y se concentran hasta unos 7 galones (26,5 litros) a presión reducida. El concentrado resultante tiene un pH de 8,5 y una potencia de 0,2 unidades/mg determinada por el procedimiento normalizado con Proteus vulgaris antes descrito. Este concentrado del eluato de resina se analiza también por un procedimiento modificado empleando Proteus vulgaris como organismo de ensayo.

15 En este procedimiento modificado, se emplean 5 ml de medio inoculado en la placa petri y el antibiótico que

14 SEP. 1968



1 se va a analizar se coloca en un disco de papel de 1/2"  
(12,7 mm). A continuación la placa con los discos de en-  
sayo se incuba durante 18 horas a 37°C y se miden las zo-  
nas de inhibición. La potencia se expresa como la canti-  
5 dad de sólido por ml que produce una zona de inhibición  
de 25 mm.

Se encuentra que el eluato de resina (25,85 litros)  
contiene 10,4 kg de sólidos y da una zona de inhibición  
de 25 mm a una concentración de 2,7 mg/ml. Sobre estos  
10 25,85 litros de concentrado de eluato se añaden 15 kg de  
alúmina lavada con ácido y la mezcla se agita durante 30  
minutos a un pH de 5,7. A continuación se filtra la mez-  
cla y se encuentra que el filtrado contiene 9,5 kg de só-  
lidos y da una zona de inhibición de 25 mm a una concentra-  
15 ción de 6,1 mg/ml utilizando el procedimiento de análisis  
modificado antes descrito. El Antibiótico 833A adsorbido  
sobre alúmina se suspende con 25 litros de agua, ajustan-  
do la suspensión de alúmina a pH 11,1 mediante la adición  
de hidróxido amónico concentrado. Después de 40 minutos  
20 de agitación se filtra la alúmina y el eluato resultante  
se concentra hasta 1 litro a presión reducida. Este con-  
centrado contiene 361 g de sólidos y da una zona de inhi-  
bición de 25 mm a una concentración de 0,17 mg/ml.

Sobre 850 ml de este concentrado rico se añaden  
25 7650 ml de metanol y el material insoluble se separa por

14 SEP 1954

1 filtración. El filtrado, que contiene prácticamente to-  
 do el Antibiótico 833A, se pasa a través de una columna que  
 contiene 1 kg de alúmina lavada con ácido. A continuación  
 se emplea un gradiente de metanol conteniendo amoniaco  
 5 2 N en metanol al 75 %, 50 % y 25 % y finalmente amonia-  
 co acuoso 2 N para eluir el adsorbato en alúmina; empleán-  
 dose 4000 ml de cada una de las concentraciones de meta-  
 nol y el mismo volumen de amoniaco acuoso para la elución.  
 El eluato procedente de la elución con amoniaco 2 N - me-  
 10 tanol al 75 % se recoge en 4 fracciones de 1 litro y se  
 analiza. Los análisis indican que estas fracciones contie-  
 nen una actividad insignificante y por lo tanto se des-  
 precian.

15 El eluato procedente de la elución con amoniaco  
 2 N - metanol al 50 % se recoge igualmente en 4 fracciones  
 de 1 litro cada una. El contenido en sólidos y el análi-  
 sis de estas fracciones es el siguiente:

			<u>Análisis</u>
<u>Fracción</u>	<u>Sólidos totales, gramos</u>	<u>mg/ml x zona de in- hibición de 25 mm</u>	
1	15	0,75	
2	31	0,24	
3	16	0,13	
4	5	0,06	

25 El eluato procedente de la elución con amoniaco  
 2 N - metanol al 25 % se recoge en 4 fracciones de 1 li-



14 SEP 1968

1 tro cada una. El contenido en sólidos y el análisis de cada una de estas fracciones es el siguiente:

		<u>Análisis</u>
<u>Fracción</u>	<u>Sólidos totales, gramos</u>	<u>mg/ml por zona de inhibición de 25 ml</u>
5        1	4,99	0,10
2	8,1	0,04
3	4,4	0,03
4	2,0	0,04

El eluato procedente de la elución con amoniaco  
10 acuoso 2 N se recoge en 4 fracciones de 1 litro cada una. La primera fracción contiene un total de 2,9 g de sólidos con una actividad de 0,12 mg/ml por zona de inhibición de 22 mm y la segunda contiene 4,0 g de sólidos y una actividad de 0,16 mg/ml por zona de inhibición de 22 mm. Las dos  
15 fracciones restantes contienen solamente pequeñas cantidades de actividad de antibiótico y se desprecian.

Cada una de las fracciones de eluato obtenidas en la forma descrita es liofilizada. Los sólidos procedentes de las tres últimas fracciones obtenidas en la elución con  
20 metanol al 50 % - amoniaco 2 N se combinan y se suspenden tres veces con 500 ml de metanol y después se filtran. Los extractos metanólicos se combinan y se concentran hasta 500 ml a presión reducida. El concentrado resultante contiene 7,5 g de sólidos y da una zona de inhibición de 25  
25 mm a una concentración de 0,006 mg/ml.



14 SEP 1968

1           Se cromatografían 134 ml de este concentrado so-  
bre 100 g de alúmina lavada con ácido utilizando un gra-  
diente continuo (exponencial) empezando con 2 litros de  
metanol al 75 % - amoniaco 2 N, a razón de 1 ml/minuto  
5 y manteniendo continuamente los 2 litros de solución elu-  
yente en el mismo volumen mediante la adición de amoniaco  
acuoso 2 N. El eluato resultante se recoge en fracciones  
de 20 ml. Las fracciones más activas 10-25 se combinan  
y concentran a presión reducida hasta 1 ml, que después  
10 se disuelve en 12 ml de metanol y se añade un volumen  
igual de n-butanol. El metanol se evapora a presión redu-  
cida y se separa el material insoluble en butanol. El aná-  
lisis de la solución butanólica de Antibiótico 833A por  
el procedimiento de ensayo modificado descrito en este  
15 ejemplo da una zona de inhibición de 25 mm a una concen-  
tración de 0,005 mg/ml.

#### EJEMPLO 2

Se emplea un cultivo liofilizado de Streptomyces  
fradiae MA-2913 (ATCC 21099) (NRRL B-3360) para inocu-  
20 lar 50 ml de medio estéril de la siguiente composición en  
un matraz erlemmeyer con tabique de 250 ml:

	<u>g/litro</u>
Harina de avena molida	10
Hidrolizado de levadura	10
25 MgSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,05

1.		<u>g/litro</u>
	Tampón de fosfato <sup>xx</sup>	2 ml.
	Agua c.s. <sup>o</sup> :	el resto

5 <sup>xx</sup> 91 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 95 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  llevados hasta 1 litro con agua destilada:

El medio se ajusta a pH 6,5 antes de la esterilización:

10 El matraz inoculado se incuba a 28<sup>o</sup> C durante 24 horas en un sacudidor rotatorio. Se emplean 10 ml del caldo resultante para inocular un segundo erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml del mismo medio estéril. Después de incubar a 28<sup>o</sup> C durante 24 horas en un sacudidor rotatorio, el caldo de fermentación resultante se emplea  
15 para inocular un fermentador de 5 litros que contiene 3 litros de caldo nutritivo estéril de la siguiente composición:

		<u>g/litro</u>
	Harina de avena molida	30
20	Solubles de destilería	10
	Harina de soja	25
	Citrato sódico	4
	Ascorbato sódico	0,5
	Agua c.s. <sup>o</sup> :	el resto

25 El medio se ajusta a pH 6,5 antes de la esterili-



14

1 zación:

El medio inoculado se incuba después a 28°C,  
durante 4 días, mientras se agita y airea el caldo de  
fermentación con 3 litros de aire por minuto, añadiendo  
5 3 ml de un polímero de propilenglicol con un peso mole-  
cular de 2000 aproximadamente, vendido con el nombre co-  
mercial de Polyglycol R-2000 por la Dow Chemical Company,  
para impedir una excesiva formación de espuma. El caldo  
de fermentación resultante tiene una actividad de 5,9  
10 unidades /ml, determinada por análisis normal utilizando  
Proteus vulgaris:

Una segunda fermentación empleando este mismo pro-  
cedimiento da un caldo con una actividad de 6,75 unidades/  
ml:

15 Los caldos procedentes de las dos fermentaciones  
se combinan y se filtran. El caldo filtrado resultante  
contiene 20 mg de sólidos por mililitro y a una dilución  
de 1:32 da una zona de inhibición de 25 mm cuando se en-  
saya frente a Proteus vulgaris utilizando el procedimiento  
de análisis modificado descrito en el Ejemplo 1:  
20

Se agitan 96,5 ml del caldo durante 40 minutos con  
2,5 g de alúmina lavada con ácido. Se ajusta el pH a 5,7  
con ácido clorhídrico 2,5 N, se filtra la mezcla y se en-  
cuentra que el filtrado contiene 20 % de la actividad.  
25 El adsorbato en alúmina filtrado se lava y eluye con am



1

niaco acuoso a un pH de 11,2. El eluato se evapora para separar el amoniaco y se encuentra que da una zona de inhibición de 25 mm a una dilución de 0,125 mg/ml por el procedimiento de análisis modificado.

5

EJEMPLO 3

10

Un eluato en metanol al 25 % - amoniaco 2 N obtenido por el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 se seca por congelación obteniéndose 250 mg de sólidos que dan una zona de inhibición de 25 mm, a una dilución de 0,028 mg/ml, por el procedimiento de ensayo modificado con Proteus vulgaris descrito en el Ejemplo 1. El sólido seco se disuelve en 5 ml de metanol y a la solución metanólica se añaden 5 ml de n-butanol. La solución resultante se filtra y el filtrado se evapora a presión reducida para separar el metanol. Se filtra la solución butanólica para separar el material insoluble y se encuentra que el filtrado que contiene Antibiótico 833A da una zona de inhibición de 25 mm a una dilución de 0,0065 mg/ml.

15

EJEMPLO 4

20

Los eluatos combinados en amoniaco 2 N - metanol al 50 % y al 25 %, procedentes de la cromatografía en alúmina de Antibiótico 833A obtenido siguiendo los procedimientos descritos en el Ejemplo 1, se concentran a presión reducida hasta 500 ml. Sobre este concentrado se añaden 1500 ml de metanol y se filtra la solución resul-

25



1 tante. El filtrado se evapora a presión reducida para  
obtener una solución acuosa de Antibiótico 833A que,  
cuando se analiza por el procedimiento modificado con  
5 Proteus vulgaris descrito en el Ejemplo 1, da una zona  
de inhibición de 25 mm a una dilución de 0,0055 mg/ml.

Sobre 2 ml del concentrado anterior se agregan  
20 ml de metanol y se filtra la solución resultante. El  
filtrado se diluye con 60 ml de n-butanol y el material  
insoluble se separa por filtración. El filtrado que con-  
10 tiene Antibiótico 833A da una zona de inhibición de  
25 mm a una dilución de 0,0025 mg/ml. Se evapora el fil-  
trado hasta 8 ml y el material insoluble se separa por  
filtración. La solución resultante en n-butanol de Anti-  
biótico 833A da una zona de inhibición de 25 mm a una  
15 dilución de 0,0014 mg/ml por el procedimiento de análisis  
modificado con Proteus vulgaris.

20

25

1 . REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la recuperación y purificación de un antibiótico particularmente del Antibiótico 833A que consiste en agitar una solución del antibiótico que contiene impurezas con alúmina lavada con ácido, en condiciones ácidas, filtrar la mezcla resultante, eluir el adsorbato en alúmina filtrado con una solución acuosa o hidroalcohólica básica y, concentrar el eluato para producir una solución purificada del antibiótico, añadir un alcohol inferior a la solución purificada para precipitar el material insoluble, filtrar dicho material insoluble, pasar el filtrado a través de una columna de alúmina lavada con ácido, eluir el adsorbato con un gradiente alcohólico conteniendo amoníaco y un alcohol y finalmente amoníaco, recoger las fracciones para análisis y liofilizar de las fracciones obtenidas.

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el Antibiótico 833A en la solución de partida se encuentra en forma de una sal que está seleccionada entre el grupo formado por sales de metal alcalino, de metal alcalino-térreo, de amonio y sales de bases orgánicas.

3. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el alcohol es metanol y que además comprende la combinación de las fracciones eluidas con metanol al 50 % - amoniaco acuoso, la suspensión en metanol de los sólidos

28 NOV 1954

1 combinados, la filtración del material insoluble, la con-  
centración del filtrado, la cromatografía del concentrado  
sobre alúmina lavada con ácido utilizando un gradiente  
continuo empezando con metanol al 75 %-amoniacos acuoso,  
5 recogida de las fracciones de eluato, combinación de las  
fracciones más activas, concentración de las fracciones  
activas combinadas, disolución del concentrado en metanol,  
adición de un volumen igual de n-butanol, evaporación del  
metanol, filtración del material insoluble y recogida del  
10 filtrado butanólico resultante de Antibiótico 833A.

4. Un procedimiento según la reivindicación  
1, en el que el alcohol es metanol y que además comprende  
la combinación de las fracciones eluidas con metanol al  
25 % - amoniacos acuoso, el secado por congelación de las  
15 fracciones combinadas, la disolución en metanol de los sólidos  
resultantes, la adición de un volumen igual de butanol  
a la solución metanólica, la filtración del material  
insoluble, la evaporación del metanol, la filtración de  
los materiales insolubles y la recogida del filtrado buta-  
nólico resultante del Antibiótico 833A.  
20

5. Un procedimiento según la Reivindicación  
1, en el que el alcohol es metanol y que además comprende  
la combinación de las fracciones eluidas con metanol al  
50 % y al 25 % - amoniacos acuoso, la concentración de las  
25 fracciones combinadas, la adición de metanol al concentra-

28 NOV



1 do, la filtración del material insoluble, la dilución de  
la solución metanólica con n-butanol, la filtración del  
material insoluble, la concentración del filtrado, la  
filtración del material insoluble y la recogida de la so-  
5 lución n-butanólica resultante de Antibiótico 833A.

6. Se reivindica por último, como objeto  
sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se  
solicita: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA RECUPERACION Y PURI-  
FIGACION DE UN ANTIBIOTICO".

10 Todo conforme queda descrito y reivindica-  
do en la presente Memoria descriptiva, que consta de vein-  
tiseis páginas mecanografiadas.

Madrid, 14 Septiembre 1968 .

BERNARDO UNGRIA

p.p.

15

20

25