

379537

PATENTE DE INVENCION

ESPECIFICACIONES
CLASIFICACION
CLASE C. 12
SUBCLASE D

Case 5770/112

379537



Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA AISLAR ANTIBIOTICOS HIDROFILOS

Solicitante: CIBA SOCIETE ANONYME, entidad suiza,
residente en: BASILEA - (Suiza)

El aislamiento de los antibióticos hidrófilos de las soluciones de fermentación presenta frecuentemente grandes dificultades cuando el antibiótico se encuentra presente junto con otras sustancias que tienen propiedades físicas y químicas similares. Uno de los méto-

5.

Mod. 615

BAD ORIGINAL

379537

- dos empleados en éstos casos para el aislamiento de anti-
bióticos debilmente ácidos o debilmente básicos consiste
en absorber el antibiótico en intercambiadores de iones.
Este método se emplea también para el aislamiento de la
cefaloesporina C. Aquí existe el problema no solucionado
hasta ahora en forma satisfactoria de la reducida capaci-
dad de absorción y selectividad de los intercambiadores
de iones. Estos pueden absorber con gran capacidad el an-
tibiótico de las soluciones puras de cefaloesporina C pero no
sin embargo de las soluciones "impurificadas" obtenidas de
la fermentación. Así, por ejemplo, el empleo de intercambia-
dores de iones a base de poliaminas, poliestirenos o ácido
poliacrílico no da una absorción de cefaloesporina C satis-
factoria de las soluciones de cultivo. Tampoco se logra en
forma satisfactoria, mediante combinación de distintos in-
tercambiadores de iones, por ejemplo, ácidos y básicos, se-
parar las impurezas y después absorber de la solución pre-
viamente purificada sin grandes pérdidas el antibiótico.
- Se ha descubierto ahora que la cefaloesporina C -
se puede adsorber de las soluciones en las cuales se encuen-
tra en mezcla con las impurezas que provienen de la fermentación
con resinas de adsorción macroporosas, no iónicas, con gran superficie,
y en que con ello se puede lograr especialmente una purificación
previa satisfactoria de las soluciones de fermentación que contienen
cefaloesporina C.
- Las resinas mencionadas adsorben sorprendentemente la cefa-
loesporina C fuertemente hidrófila cuantitativamente de --
las soluciones mencionadas, especialmente de las solucio-
nes de fermentación, mientras no adsorben la mayor parte --
de las demás sustancias existentes en la solución. De esta
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



379537

Se puede separar hasta un 85 % de las impurezas de la cefaloesporina C y eluir casi cuantitativamente la cefaloesporina C adsorbida, por ejemplo, con alcohol acuoso. La capacidad de la resina de adsorción se puede aumentar mediante una eliminación extractiva previa de las impurezas lipófilas. La extracción se efectúa preferentemente en la zona de pH ácido, por ejemplo a aproximadamente 2, con un disolvente no miscible en agua o mezcla de disolventes, o preferentemente con un intercambiador de iones líquido, por ejemplo, "Amberlite" LA-2 en un disolvente o mezcla de disolventes no miscibles con agua en la zona pH de aproximadamente 2-7. Como disolvente no miscible con agua entran, por ejemplo, en consideración los hidrocarburos alifáticos, cicloalifáticos, aralifáticos y aromáticos con un máximo de 12 átomos de carbono, que en caso dado están sustituidos por átomos de halógeno, tal como bromo, fluor, especialmente cloro, por ejemplo, hexano, heptano, ciclohexano, bencina, éter de petróleo (p.eb. 110-140°), queroseno (p.eb. 210-240°), tetracloruro de carbono, cloroformo, cloruro de metileno, cloroformo metílico, cloruro de etileno, percloroetileno, perfluoretileno, bromuro de isopropilo, benceno, tolueno, xilenos, además los ésteres, especialmente el éster de alquilo inferior de ácidos grasos inferiores, tales como el éster acético, el acetato de butilo, el acetato de amilo, las cetonas, tales como la metilisoamil cetona, la metilisoamil cetona, los éteres, tales como el diisopropiléter, los alcoholes no miscibles o poco miscibles con agua, tales como butanol, 2-etilbutanol, etilhexanol, ciclopentanol, ciclohexanol.

5.



10.

15.

20.

25.

30.

379537

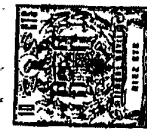


5. De las soluciones de la cefaloesporina C obtenidas por elución de la resina de absorción microporosa se puede purificar el antibiótico mediante los intercambiadores de iones usuales de manera que se puede precipitar de sus eluados directamente como ácido libre o cristalizar en forma de una sal de difícil solubilidad. El producto así obtenido es adecuado para su ulterior elaboración directa al ácido 7-amino-cefaloesporámico y sus productos de acilación activos.

10. El procedimiento de la presente invención se caracteriza, por lo tanto, porque la cefaloesporina C se adsorbe de las soluciones en las cuales se encuentra en mezcla con las impurezas que provienen de la fermentación, en caso dado después de una purificación previa extractiva --
15. con disolventes lipofílicos y/o intercambiadores de iones en la zona de pH de aproximadamente 2 - 7, en resinas de absorción no iónicas, macroporosas, con gran superficie.

Como resinas de absorción no iónicas, macroporosas, entran en consideración las resinas con estructura --
20. básica, aromática con un diámetro promedio de poros de 4 - 20 nm, preferentemente 7 - 10 nm, especialmente las resinas de poliestireno con una superficie de 100 - 1.000 m²/g, por ejemplo, los copolímeros de estireno-divinil-benceno -- (de la firma Rohm & Haas Co.) conocidas bajo la marca "Amberlite" XAD-1, XAD-2, XAD-4, XAD-5 y otras.
25.

El tratamiento con la resina de absorción se --
efectúa convenientemente a un pH de 1 a 8, preferentemente de 2 a 3. Este pH se puede graduar mediante un ácido arbitrario, por ejemplo, un ácido orgánico, tal como el ácido oxálico o mediante un ácido mineral, tal como ácido clorhídrico
30.



379537

drico, ácido fosfórico o, especialmente, ácido sulfúrico. Es ventajoso acidificar el caldo de fermentación antes de la filtración y después, como es usual, filtrar convenientemente en presencia de un agente auxiliar de filtración.

5. La solución de cultivo, en caso dado previamente extraída, se pone en la forma usual en contacto con la resina de absorción. Preferentemente se trabaja con columnas que contienen el lecho de resina. La absorción se efectúa entonces durante la percolación de la solución a través de la columna. El percolado no contiene antibiótico, o solamente en cantidades reducidas. Con agua se expulsa el resto de la solución fuera de la columna. Tampoco el percolado de lavado contiene antibiótico o solo en cantidades muy reducidas.

10. Para eluir el antibiótico de la resina se pueden emplear mezclas de agua y disolventes orgánicos miscibles con agua, especialmente soluciones acuosas de alcohol. Es especialmente adecuado el isopropanol acuoso al 10-20 %.

15. Para la regeneración de la resina son adecuadas las soluciones acuosas alcalinas o acuoso-alcohólicas, -- por ejemplo, una mezcla de metanol y agua (1:1) que es 1-N en lejía sódica. Los residuos de lejía sódica se pueden -- eliminar por ejemplo mediante lavado con ácido, por ejemplo, ácido sulfúrico y/o agua. Para la regeneración es -- además adecuado, por ejemplo, el hipoclorito de sodio acuoso; el agente de oxidación se puede retirar de la columna con un agente de reducción, por ejemplo, solución de bisulfito sódico o tiosulfato sódico. En combinación con los -- agentes de regeneración mencionados puede completar la regeneración un tratamiento con acetona o mezclas de agua --

20. 25. 30.

-acetona.

379537



5. El mencionado procedimiento de la absorción y regeneración de la resina se puede realizar, como es costumbre, en tandas o en forma continua en columnas individuales o columnas combinadas.

10. El eluado que contiene la cefaloesporina C se puede seguir purificando en la forma usual, preferentemente en intercambiadores de iones básicos, tales como "Amberlite" IR-4B (fenol-poliamina con grupos amino primarios y secundarios), "Amberlite" IRA-68 (Polímero de ácido metacrílico), "Amberlite" XE-265 (poliamina), "Imac" A 13 T ó "Imac" A 17 P (de la firma Imaacti-Maatsch). Estos intercambiadores de iones muestran para la absorción de la cefaloesporina C del eluado una mayor capacidad que del filtrado de cultivo. De las soluciones así purificadas 15. ulteriormente se puede precipitar la cefaloesporina C, por ejemplo, después de concentrar, como ácido libre, por ejemplo, mediante disolventes orgánicos miscibles con agua, tales como acetona o isopropanol, o se puede aislar en forma de un complejo de metal pesado microcristalino, de difícil 20. solubilidad, por ejemplo, de un complejo con cobre, mercurio, cadmio, plomo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, o especialmente en forma del complejo de cinc (véase la patente Belga nº 734.565.)

25. La invención se describe en los ejemplos siguientes. Las temperaturas se indican en grados centígrados.

Ejemplo 1.

30. Una solución de cultivo, que, en forma conocida, se obtiene por cultivo de la cepa productora de la cefaloesporina C de la clase Cephalosporium en un caldo de cultivo,



- Se enfría, después de alcanzar el máximo de la producción de cefaloesporina C, a 15°C y con ácido sulfúrico al 50 % (G/V) se acidifica a un pH de 2,8-3,0. El micelo y los componentes del caldo de cultivo insolubles se separan por filtración bajo adición de agentes auxiliares de filtración (por ejemplo, "Dicalite"). El filtrado de cultivo así obtenido tiene un pH de 3, éste contiene 2,1 g. de cefaloesporina C y 5,4 % de residuo seco. Está teñido de marrón.
- 5.
10. 6 l. de "Amberlite" XAD-2 se introducen junto con agua en la forma usual para los intercambiadores de iones en una columna de cristal de 10 cm. de diámetro. El lecho de resina tiene una altura de 76 cm. A través de esta columna se pasan 6 l. del filtrado del cultivo obtenido
15. según el método arriba descrito a una velocidad de 6 l/hora. El filtrado se desplaza a la misma velocidad de paso con 3 l. de agua desionizada y la columna se eluye con alcohol isopropílico acuoso al 10 %. Los percolados de absorción y de lavado se recogen en fracciones de 1½ litros, los eluados de color amarillo-naranja en fracciones de 1 litro. La "Amberlite" XAD-2 se regenera con 6 litros de alcohol metílico acuoso al 50 %, que es 1-N en lejía y el agente de regeneración se lava con agua. La columna está entonces lista para una nueva absorción.
- 20.
25. El resultado de la absorción elución es el siguiente: aproximadamente un 65 - 70 % de impurezas del filtrado del cultivo se encuentran en las fracciones inactivas de percolación y lavado así como en las dos primeras fracciones de eluado que solo contienen una traza de cefaloesporina C.
- 30.

379537



5. Las fracciones de eluado biologicamente activas tienen un volumen de 12 litros y contienen un 95 % de la cefaloesporina C existente en el filtrado de cultivo, así como un 20 - 25 % de las impurezas del filtrado de cultivo. Las fracciones de eluado activas están libres de aniones inorgánicos.

Ejemplo 2.

10. 4 litros de un filtrado de cultivo, que contiene 2,2 g. de cefaloesporina C por litro y que se obtiene según el método descrito en el ejemplo 1, pero que se acidificó con ácido oxálico en lugar de ácido sulfúrico, se pasó a una velocidad de 12 l/h a través de la columna descrita en el ejemplo 1, llenada con "Amberlite" XAD-2. El percolado se desplaza con 3 litros de agua desionizada y la columna se eluye con un total de 12 litros de alcohol isopropílico acuoso al 10 %. Para la regeneración de la "Amberlite" XAD-2 se pasa solución de hipoclorito sódico, que contiene un 3 % de cloro activo, y después 4 litros de solución al 0,2 % de bisulfito de sodio a través de la columna. Después empieza de nuevo el ciclo mediante la absorción de 4 litros de filtrado de cultivo. El rendimiento promedio de varios ciclos consecutivos en cefaloesporina C asciende a un 85,2 % en las fracciones de eluado activas, que están libres de aniones inorgánicos. Un 9,2 % se encuentran en las primeras fracciones de eluado que aún contienen aniones inorgánicos y que se pueden recuperar volviendo a adsorber. Los eluados principales activos contienen un 30 - 35 % de las impurezas contenidas en el filtrado de cultivo.

15.

20.

25.

30.



21-5-73

379537

Ejemplo 3.

- 30 litros de un filtrado de cultivo que se obtiene según el método descrito en el ejemplo 1 y que contiene 2,10 g. de cefaloesporina C por litro se pasa a una velocidad de 30 l/h a través de una columna con 30 litros de "Amberlite" XAD-2. El diámetro interior de la columna asciende a 15 cm. El filtrado de cultivo se desplaza con 15 litros de agua desionizada y la columna se eluye con 60 litros de alcohol isopropílico acuoso al 10 %. La velocidad de elución asciende a 60 l/h. La cantidad principal de la cefaloesporina C se encuentra en 45 litros de eluado. La "Amberlite" XAD-2 se regenera a continuación mediante pasadas consecutivas de 15 litros de lejía sódica 1-N, 10 litros de ácido sulfúrico 0,2-N y 10 litros de agua. Después comienza de nuevo el ciclo por absorción de 30 litros de filtrado de cultivo. El rendimiento promedio de varios ciclos consecutivos en cefaloesporina C en las fracciones de eluado activas, que están libres de aniones inorgánicos, asciende a un 95 %. Aproximadamente un 3 % de la cefaloesporina C se encuentra en las primeras fracciones de eluado que aún contienen iones de cloro y de sulfato. De estas fracciones se obtiene el antibiótico volviendo a adsorber. Los eluados principales activos contienen un 28 % de la sustancia seca existente en el filtrado de cultivo. "Amberlite" IRA-68 se suspende en isopropanol acuoso al 10 % y se introduce en una columna de gas con un diámetro interior de 5 cm. El volumen de llenado asciende a 1 litro. A través de esta columna se pasan 45 litros del eluado arriba obtenido. La solución de adsorción contiene 1367 mg. de cefaloesporina C por litro con una proporción en materia só
- 5.
 - 10.
 - 15.
 - 20.
 - 25.
 - 30.



5. lida de un 0,684 %. La velocidad de absorción asciende a 10 litros/h. La solución de absorción se desplaza con 1 litros de agua. El percolado de absorción y de lavado contiene un 3 % de la cefaloesporina C empleada y aproximadamente un 35 - 40 % de las impurezas existentes en la solución de absorción.

10. La cefaloesporina C se eluye con tampón de acetato de piridina, pH 5,5. El tampón es 0,44 molar en piridina y 0,2 molar en ácido acético. La velocidad de elución es de 1 litro /hora. Un 92,3 % de la cefaloesporina C empleada se encuentra en 3 litros de eluado de las fracciones principales con un contenido de 18,5 g. de cefaloesporina C por litro. Otro 3 % se encuentra en 1,25 litros de las fracciones secundarias.

15. Las fracciones principales con un pH de 4,9 se mezclan con 185 g. de acetato de cinc. A la solución clara se agregan bajo agitación, en el plazo de 20 minutos, 3 litros de isopropanol. Hacia final de la adición comienza a cristalizar el complejo de cefaloesporina-C-cinc.

20. La mezcla se enfría a 2° y se agita durante 4 horas a esta temperatura. El precipitado se filtra en vacío y se lava dos veces, cada una con 300 cc. de agua y una vez con 300 cc. de acetona y se seca en vacío a 40°. El rendimiento asciende a 36,6 g. de complejo de cefaloesporina-C-cinc como polvo blanco con un contenido determinado por medición de la absorción en ultravioleta de un 91,6 %.

25.

Ejemplo 4.

La absorción/elución descrita en el ejemplo 3 en "Amberlite" IRA-68 se efectúa en forma análoga con



5. "Amberlite" XE-265, adsorbiéndose 50 litros del eluado de XAD-2 obtenido según el ejemplo 3. El percolado de adsorción y lavado contiene un 5,9 % de la cefaloesporina C empleada y aproximadamente un 40 - 45 % de las impurezas existentes en la solución de adsorción.

10. La cefaloesporina C se eluye como se ha descrito en el ejemplo 3 con tampón de acetato de piridina. Un 75,4 % de la cantidad de cefaloesporina C se encuentra en 4 litros de eluado de las fracciones principales con un contenido de 12,05 g. de cefaloesporina C por litro. Otro 9,5 % se encuentran en los 2,75 litros de las fracciones secundarias.

15. Las fracciones principales se concentran por evaporación a 400 cc. y el concentrado se vierte bajo agitación en 4,8 litros de isopropanol. El precipitado voluminoso se filtra en vacío, se lava con 200 cc. de isopropanol y 200 cc. de acetona y a continuación se seca en vacío a 40°. Se obtienen 45 g. de un polvo beige que según la comprobación biológica se compone en un 84,3 % de cefaloesporina C. El rendimiento de la precipitación asciende a un 56 %. De la lejía madre se puede obtener en su mayor parte la restante cefaloesporina C después de concentrar y volver a precipitar.

20. Ejemplo 5.

25. Una columna de cristal de 2,5 cm. de diámetro se alimenta con 200 cc. de "Amberlite" XAD-2 en agua. 200 cc. de filtrado de cultivo, que contiene 1,96 g. de cefaloesporina C por litro y que se obtiene según el ejemplo 1, se acidifica con ácido sulfúrico a un pH de 2 y se pasa a una velocidad de 400 cc/h a través de la "Am

30.

379537



- berlita" XAD-2. El filtrado se desplaza con 100 cc. de agua desionizada y la cefaloesporina C se eluye con isopropanol acuoso al 10 %. La columna se regenera según el método descrito en el ejemplo 2 y nuevamente se emplea para la absorción. Las fracciones de percolación y de lavado no contiene ninguna cefaloesporina C. En las primeras fracciones de eluado, que aún contienen aniones inorgánicos, se encuentran un 6 % en las restantes fracciones de eluado un 90 % de la cefaloesporina contenida en el filtrado de cultivo.
- 5.
- 10.

Ejemplo 6.

- 30 litros del filtrado de cultivo obtenido según el método del ejemplo 2 con 2,12 g. de cefaloesporina C y unos 34 g. de impurezas por litro se extraen en un extractor a contracorriente con 15 litros de una solución de un 5 % de "Amberlite" LA-2 (base libre) en etilhexanol. Las partes disueltas en el filtrado de cultivo extraído se reducen de aproximadamente un 3,6 % a aproximadamente un 3,35 %. 12 litros del filtrado de cultivo extraído se ajustan con ácido sulfúrico al 50 % a un pH de 2,7, se pasa a una velocidad de 6 litros por hora a través de 6 litros de "Amberlite" XAD-2 y se desplaza con 3 litros de agua desionizada. La pasada no contiene ninguna cefaloesporina C. La cefaloesporina C adsorbida se eluye con un total de 12 litros de isopropanol acuoso al 10 %. El eluado contiene un 97 % de la cefaloesporina contenida en el filtrado de cultivo (aproximadamente un 2% se encuentra en una fracción previa salina). En el eluado existente aún un 15 % de las impurezas del filtrado del cultivo.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

379537



La "Amberlita" XAD-2 se regenera como se ha ---
descrito en el ejemplo 2 y adicionalmente se percola con
3 litros de acetona-agua en proporción 1:1. La acetona --
se desplaza con agua, después de lo cual la columna está
lista para una nueva adsorción.

5.

- N O T A -

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental; también se hace constar que el invento se refiere a una solicitud de patentes presentadas en Suiza, con los nos: 7286/69 de 13 de mayo de 1969, 3702/70 de 12 de marzo de 1970, acogiéndose por lo tanto, a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita patente de invención por 20 años, sobre: PROCEDIMIENTO PARA AISLAR ANTIBIOTICOS HIDROFILOS, caracterizándose por lo siguiente:

10.

15.

20.

25.

1.-Procedimiento para aislar antibióticos hidrófilos, especialmente la cefalosporina C de soluciones en las cuales se encuentra en mezcla con las impurezas que proviene de la fermentación, caracterizado porque las soluciones, en caso dado después de una purificación previa por extracción con disolvente lipófilos y/o intercambiadores de iones líquidos en la zona pH de aproximadamente 2-7, se tratan en resinas de absorción no iónicas, macroporosas con gran superficie.

30.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, - caracterizado porque como resina de absorción se emplea una resina con una superficie de 100 a 1.000 m²/g.

379537



- 3^a.- Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque como resina de absorción se emplea una resina con un diámetro de poros promedio 7-10 nm.
5. 4^a.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 3, caracterizado porque como resina de absorción se emplea una resina reticulada con una estructura básica aromática.
10. 5^a.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque como resina de absorción se emplea un polímero de estireno macroporoso reticulado con un divinil benceno.
15. 6^a.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 5, caracterizado porque el tratamiento con la resina de absorción se efectúa en soluciones con un pH de 1 - 8.
20. 7^a.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 5, caracterizado porque el tratamiento con la resina de absorción se efectúa en soluciones con un pH de 2 - 4.
20. 8^a.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 7, caracterizado porque como solución de partida se emplea el filtrado de un caldo de fermentación acidificado al pH necesario.
25. 9^a.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 7, caracterizado porque como solución de partida se emplea el filtrado de un caldo de fermentación acidificado con ácido sulfúrico ó ácido oxálico al pH necesario.
30. 10^a.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 7, caracterizado porque como solución de --



379537

partida se emplea un filtrado de cultivo que con un intercambiador de iones líquidos se ha extraído previamente en un disolvente no miscible con agua a un pH de aproximadamente 2 - 6.

5. 11ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 10, caracterizado porque para la elución de la cefaloesporina C de la resina de absorción se emplea una mezcla de agua y de disolventes orgánicos miscibles con agua.

10. 12ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 10, caracterizado porque para la elución de la cefaloesporina C de la resina de absorción se emplea una mezcla de agua-alcohol inferior.

15. 13ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 10, caracterizado porque para la elución de la cefaloesporina C de la resina de absorción se emplea isopropanol acuoso.

20. 14ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 13, caracterizado porque la resina se regenera con soluciones acuosas alcalinas o acuosas-alcohólicas.

15ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 13, caracterizado porque la resina se regenera con metanol acuoso alcalino.

25. 16ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 13, caracterizado porque la resina se regenera con hipoclorito de sodio acuoso.

30. 17ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 16, caracterizado porque el procedimiento se realiza en forma continua.

379537



5. 18ª.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 17, caracterizado porque la solución obtenida, que contiene la cefaloesporina C, se sigue purificando con intercambiadores de iones y la cefaloesporina C se --
aisla, en caso dado, en forma libre o en forma de sus sales o bien complejos.

19ª.- Procedimiento para el aislamiento de la cefaloesporina C según descrito en los ejemplos.

10. 20.-Procedimiento para aislar antibióticos hidrófilos, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria e ilustrado en los dibujos adjuntos.

Esta Memoria consta de 16 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 11 MAY. 1970

CIBA SOCIÉTÉ ANONYME

L. GOMEZ ACEBO Y MODESTO
a. d. Firmado: F. Hernández Ruiz