

433975

Int. CIA. C.I.D. 9/16//P615

## MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

RESIDENCIA: No. 3, 4-chome, Dosho-machi, Higashi-ku,

OSAKA, Japón

ENUNCIADO: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACION  
DE BICICLOMICINA.

Prioridad: Patente japonesa n.º 9481/1974 del 21-1-1974

IN.-

POOR  
QUALITY

1                    PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACION DE BICICLOMICINA

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para la purificación de la biciclomicina. Mas particularmente se refiere a un nuevo procedimiento para la purificación de la biciclomicina mediante el uso de una resina de adsorción no iónica macroporo.

5                    La biciclomicina es un antibiótico conocido aislado del caldo de fermentación de una cepa del género Streptomyces, detalles del cual se exponen en THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS, vol. XXV, Nº 10, 569-575 y en la solicitud de Patente Alemana 2150593 en la cual la biciclomicina se designa como substancia WS-4545.

10                   En la bibliografía precedente citada se describen procedimientos que utilizan una columna de carbón activo, celulosa, ácido silícico o tierra de infusorios para la separación y purificación de biciclomicina a partir de un caldo de fermentación.

15                   Sin embargo, no ha conducido a resultado satisfactorio práctico utilizar los citados procedimientos precedentes en la fabricación industrial de biciclomicina debido a que requiere relativamente muchas etapas para la separación y purificación de biciclomicina, de modo que la recuperación de biciclomicina es relativamente pobre.

20                   Así pues, como resultado del estudio de un procedimiento mas útil desde el punto de vista industrial, los autores de esta invención han descubierto un procedimiento nuevo para la purificación de biciclomicina como una etapa de la recuperación, mediante el cual se puede obtener la biciclomicina con rendimiento mas alto que mediante los procedimientos precedentes. . Además, se debe indicar que este procedi-

25                   to mas útil desde el punto de vista industrial, los autores de esta invención han descubierto un procedimiento nuevo para la purificación de biciclomicina como una etapa de la recuperación, mediante el cual se puede obtener la biciclomicina con rendimiento mas alto que mediante los procedimientos precedentes. . Además, se debe indicar que este procedi-

30                   tos precedentes. . Además, se debe indicar que este procedi-

1 miento nuevo es mas sencillo y cómodo en su realización  
práctica y mas económico a escala industrial debido a que  
la resina agotada se puede regenerar para ser utilizada de  
nuevo.

5 Por consiguiente, es objeto de la presente invención  
proporcionar un procedimiento nuevo para la purificación  
de biciclomicina utilizando una resina de adsorción no ióni-  
ca macroporo.

10 Otro objetivo de la presente invención es proporcio-  
nar un procedimiento nuevo para la purificación de biciclo-  
micina, mediante el cual la biciclomicina se obtiene con  
rendimiento mayor que por los procedimientos precedentes.

15 Un objetivo ulterior de la presente invención es pro-  
porcionar un procedimiento para la purificación de biciclo-  
micina sencillo, cómodo y económico.

20 La presente invención se basa en la observación de que  
la biciclomicina se puede adsorber de una disolución acuosa  
que la contiene mezclada con impurezas por una resina de ad-  
sorción no iónica macroporo y se puede eluir de la resina  
con sistemas disolventes hidrofílicos.

25 La resina de adsorción no iónica macroporo que se uti-  
liza de acuerdo con la presente invención es conocida y pue-  
de ser una resina entrelazada de estructura básica aromáti-  
ca. Las resinas preferidas son polímeros de estireno entre-  
cruzados con divinilbenceno. Ejemplos de tales resinas son  
Amberlita XAD-1, XAD-2, XAD-4, XAD-7 y XAD-8 ( nombres comer-  
ciales, fabricante: Rohn & Haas Co.), Diaion HP 10, HP 20,  
HP 30, HP 40 y HP 50 (nombre comercial, fabricante: Mitsus-  
bishi Kasei Co., Ltd.), Hitachigel Nº 3010 (nombre comercial,  
30 fabricante: Nissei Sangyo Co., Ltd.).

1 El procedimiento para la purificación de biciclomicina  
utilizando la resina de adsorción no iónica macroporo de la  
presente invención es aplicable a cualquier disolución acuosa  
que contenga biciclomicina junto con impurezas. Tales e-  
5 jemplos son un filtrado de caldo de cultivo preparado per  
se mediante cultivo de microorganismos que producen biciclo-  
micina en un medio nutritivo y una disolución de cultivo  
previamente extraída así como una disolución acuosa que con-  
tiene material sólido impuro con biciclomicina que se sepa-  
10 ra y purifica en algún grado previo a un filtrado del caldo  
de cultivo mediante métodos convencionales tales como un  
tratamiento opcional del filtrado con un disolvente adecua-  
do para la extracción y/o con una columna de carbón activo,  
celulosa, ácido silícico o tierra de infusorios.

15 En caso de utilizar un filtrado de cultivo es conve-  
niente utilizar una disolución de cultivo opcionalmente pre-  
extraído, y la disolución de cultivo opcionalemnte pre-ex-  
traída se pone en contacto con una resina de adsorción no  
iónica macroporo del modo habitual, preferiblemente utili-  
20 zando columna que tiene el lecho de resina. En esta pre-ope-  
ración, es conveniente acidificar el caldo de fermentación  
antes de filtrarlo y luego filtrarlo del modo habitual, me-  
jor en presencia de un filtro complementado.

25 La disolución acuosa que contiene biciclomicina mezcla-  
da con impurezas se pone en contacto con la resina de adsor-  
ción no iónica macroporo de un modo convencional, por ejem-  
plo de modo discontinuo o a través de columna. La biciclo-  
micina adsorbida se puede eluir de la resina con un sistema  
disolvente hidrofílico.

30 Para eluir la biciclomicina de la resina, se pueden

1 utilizar sistemas disolventes hidrofílicos, por ejemplo,  
dialquil cetonas inferiores tales como acetona, metil etil  
cetona y metil isobutil cetona, y un alcohol inferior tal  
como metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol o  
5 isobutanol. También se pueden utilizar mezclas de las ante-  
riores dialquil cetonas inferiores y alcoholes inferiores.  
Asimismo también se pueden utilizar mezclas de agua y éste-  
res alquílicos inferiores de ácidos alcanoicos inferiores  
(por ejemplo, acetato de metilo, acetato de etilo y acetato  
10 de butilo) y el alcohol inferior anteriormente mencionado.

El tratamiento de la disolución acuosa que contiene  
biciclomicina mezclada con impurezas en la resina de adsor-  
ción no iónica se lleva a cabo ventajosamente a valores de  
pH de 2 a 8, preferiblemente de 4 a 7 y los valores de pH  
15 ácidos se pueden alcanzar utilizando cualquier ácido que se  
desea, por ejemplo un ácido orgánico tal como el ácido oxá-  
lico o preferiblemente un ácido mineral tal como ácido clor-  
hídrico, ácido fosfórico o preferiblemente ácido sulfúrico.  
La resina agotada se puede regenerar de modo convencional,  
20 por ejemplo, lavando la citada resina con una disolución  
acuosa alcalina o acuosa-alcohólica alcalina.

El eluato así obtenido se somete a tratamientos con-  
vencionales tales como concentración, liofilización y cris-  
talización para obtener cristales puros de biciclomicina que  
25 es completamente adecuada para ser utilizada como medicamen-  
to.

Los siguientes ejemplos se presentan con el propósito  
de ilustrar la presente invención.

Ejemplo 1

30 A un caldo de cultivo que se prepara cultivando Strep-

1 tomices sapporonensis ATCC 21532 a 30°C durante 120 horas  
en 20 litros de un medio nutritivo que contiene 5% de al-  
midón de patata, 3 % de harinas de semillas de algodón, .1 %  
de  $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,09 % de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , 0,74 % de  $\text{PO}_4\text{HNa}_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  
5 se añade 1 % de Radiolita (marca comercial, un filtro com-  
plementado material vendido por Showa Kagaku Kogyo Co., Ltd.)  
y luego la mezcla se filtra. Un litro del filtrado obtenido  
(contenido en biciclomicina: 2,25 g) se pasa a través de una  
columna rellena de resina de adsorción no iónica macroporo,  
10 Amberlita XAD-4 (diámetro interno de la columna: 5 cm, altu-  
ra: 32 cm). Después que la columna se ha lavado con agua se  
eluye la biciclomicina con 1 litro de mezcla de acetona a-  
gua al 50 % hasta obtener 800 ml de eluato. El eluato se  
concentra para eliminar la acetona y el agua. Al residuo ob-  
15 tenido se añaden 150 ml de una mezcla de isopropanol:aceta-  
to de etilo (1:2) con agitación y a continuación se filtra  
la disolución. El filtrado se concentra a presión reducida  
para obtener 1,65 g de cristales de biciclomicina (pureza:  
casi 100 %).

20 Recuperado: 73 %

#### Ejemplo 2

1,8 g de cristales de biciclomicina (pureza: casi 100%)  
se obtienen por un procedimiento sustancialmente el mismo que  
el descrito en el Ejemplo 1 pero utilizando 1,2 litros de  
25 disolución acuosa de metanol al 50 % como disolvente para  
la elución en vez de acetona acuosa al 50 % utilizada en el  
Ejemplo 1.

Recuperado: 80 %

#### Ejemplo 3

30 Dos litros de disolución acuosa que contiene 10 g de

1 cristales impuros de biciclomicina (pureza: 90%) se pasan  
a través de una columna rellena de resina de adsorción no  
iónica macroporo, Amberlita XAD-4 (diámetro interno de la  
columna: 5cm., altura: 32 cm.). Después que se ha lavado  
5 la columna con agua se eluye la biciclomicina con 1 litro  
de disolución acuosa de isopropanol al 50% para obtener  
600 ml. de eluato. El eluato se concentra a presión reduci-  
da para obtener 8,6 g. de cristales de biciclomicina (pura-  
za: casi 100%).

10 Recuperado 96%.

Ejemplo 4.

Veinte litros del filtrado (contenido en biciclomicina:  
na: 2g.) del caldo de cultivo que se prepara por cultivo de  
Streptomyces griseoflavus var. bicyclomyeticus FER;-P No.  
15 1805 a 30°C durante 120 horas en 20 litros de un medio nu-  
tritivo que contiene 2% de almidón de patata, 1% de harina  
de semillas de algodón, 1% de harina de gluten, 1% de harina  
de soja, 1% de Ebios (nombre comercial) (obtenido por  
Ebios Yakuhin Co., Ltd), 2,1% de  $PO_4H_2K$  y 1,4% de  $PO_4H_2Na_2$ .  
20  $12H_2O$  se pasan a través de una columna rellena con resina  
de adsorción no iónica macroporo, Amberlita XAD-4 (diámetro  
interno de la columna: 5cm. , altura:32 cm ). Después que  
se ha lavado la columna con agua, el material activo se  
eluye con acetona acuosa al 50%. El eluato se concentra a  
25 presión reducida y se liofiliza para dar un polvo amorfo.  
Al polvo se añaden 50 ml. de metanol para extraer los mate-  
riales insolubles. La disolución metanólica se concentra  
para dar un residuo sinuoso. El residuo se pasa a través  
de una columna de gel de sílice y a continuación se desarro-  
30 lla la columna con una mezcla de cloroformo: metanol (10:1).

1. Se recoge la fracción activa y la disolución se concentra a presión reducida, y a continuación se seca hasta obtener un polvo blanco. El polvo se cristaliza a partir de acetona para obtener 1,5 gr. de cristales de biciclomicina (pureza: casi 100%).

5

Recuperado: 75%.

Ejemplo 5.

10 Un litro y medio del filtrado del caldo de cultivo (contenido en biciclomicina: 3,37 gr.) obtenidos por un procedimiento sustancialmente el mismo que el descrito en el Ejemplo 1 se pasa a través de una columna rellena con resina de adsorción no iónica macroporo, Diaion HP 20 (diámetro interno de la columna: 5 cm., altura: 32 cm.). Después que la columna se ha lavado con 500 ml. de agua, se eluye la biciclomicina con 600 ml. de acetona acuosa al 50%. Se recoge la fracción activa, y a continuación la disolución se concentra a presión reducida. Después que se ha obtenido el residuo se lava con n-butanol, y a continuación se concentra a presión reducida. Se añade al residuo una mezcla de isopropanol: acetato de etilo (1:2) y después que se han extraído los materiales insolubles, se concentra la disolución a presión reducida para obtener 2,52 g. de cristales de biciclomicina (pureza: casi 100%).

15

20

Recuperado: 75%.

25

En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes

REIVINDICACIONES

30

1. Un procedimiento para la purificación de biciclomicina que se caracteriza por dejar una disolución acuosa que contiene biciclomicina junto con impurezas en contacto

1 con una resina de adsorción no iónica macroporo y eluir la  
biciclomicina adsorbida de la resina con un sistema disol-  
vente hidrofílico.

5 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación  
1, en el que la disolución acuosa se utiliza en un filtrado  
de caldo de cultivo que contiene biciclomicina.

3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación  
1, en el que la disolución acuosa se utiliza en una disolu-  
ción de cultivo pre-extraída que contiene biciclomicina.

10 4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación  
1, en el que la disolución acuosa se utiliza en una disolu-  
ción acuosa de material sólido impuro que contiene biciclo-  
micina.

15 5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación  
1, en el que la resina de adsorción es una resina reticu- -  
lada macroporo de estructura básica aromática.

6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación  
5, en el que la resina entrelazada macroporo de estructura  
básica aromática es un polímero de estileno macroporo reti-  
culado con divinilbenceno.

20 7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación  
1, en el que el sistema disolvente hidrofílico es una mezcla  
de agua y un alcohol inferior.

25 8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación  
1, en el que el sistema disolvente hidrofílico es una mez-  
cla de agua y una dialquilcetona inferior.

9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación  
7, en el que el alcohol inferior es metanol.

30 10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación  
7, en el que el alcohol inferior es etanol.

1 11. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación  
7, en el que el alcohol inferior es propanol.

12. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación  
8, en el que la dialquiloetona inferior es acetona.

5 13. Se reivindica por último como objeto sobre el que  
ha de recaer la patente de invención que se solicita: UN PRO  
CEDIMIENTO PARA LA PURIFICACION DE BICICLOMICA.

10 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la pre  
sente memoria descriptiva que consta de diez páginas mecano  
grafiadas.

Madrid, 20 de Enero de 1.975

BERNARDO UNGRIA

P.P.



15

20

25

30