

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

⑫ ES	⑪	NUMERO	⑩ A 1
	⑲	436.092	
	⑳	FECHA DE PRESENTACION	
		26-3-75	

PATENTE DE INVENCION

③① PRIORIDADES:	③② FECHA	③③ PAIS
③① NUMERO		
36079/74	28-3-74	Japón
22140/75	21-2-75	Japón

④⑦ FECHA DE PUBLICIDAD	④① CLASIFICACION INTERNACIONAL	④② PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D	

④⑤ TITULO DE LA INVENCION

UN PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACION DE UN ANTIBIOTICO.

④⑥ SOLICITANTE (S)

MUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

1-6, 2-Chome, Kashima, Yodogawa-ku, OSAKA 532, Japón

④⑧ INVENTOR (ES)

Masaru Kurita; Kazuyoshi Jomon; Tadaaki Komori; Isami Nakatani y Masahiro Tsuji, todos ellos de nacionalidad japonesa, los cuales han cedido sus derechos a la compañía solicitante.

④⑨ TITULAR (ES)

④⑩ REPRESENTANTE

D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

★ POOR
QUALITY

1

5

10

15

20

25

30

Esta invención se refiere a un nuevo procedimiento para la purificación de la sustancia FR-1923. Más especialmente, se refiere a un nuevo procedimiento de purificación de la sustancia FR-1923, utilizando una resina no iónica macroporosa de adsorción.

La sustancia FR-1923 es un antibiótico conocido aislado del caldo de fermentación de una cepa del género Streptomyces, como se describe, por ejemplo, en la publicación de patente alemana 2.242.699.

En dicha literatura de la técnica anterior, se describen procedimientos que utilizan carbón activo, una resina cambiadora de anión y DEAE-Sephadex (marca registrada, fabricado por Pharmacia Co.) para aislar y purificar la sustancia FR-1923 de un caldo de fermentación.

Sin embargo, los procedimientos anteriores no han conducido a resultados satisfactorios en la manufactura industrial de sustancia FR-1923 porque requieren un número relativamente grande de operaciones para el aislamiento y la purificación de la sustancia FR-1923, de manera que la recuperación global del antibiótico es relativamente escasa.

Como resultado de extensos estudios, los inventores han encontrado ahora un nuevo procedimiento para la purificación de la sustancia FR-1923 como etapa en la recuperación de la misma, mediante el cual puede obtenerse sustancia FR-1923 con mayor rendimiento que por los procedimientos anteriores. Además, este nuevo procedimiento es más sencillo y más conveniente en la práctica y más económico a escala industrial porque la resina agotada puede ser regenerada para ser utilizada de nuevo.

Por consiguiente, un objeto de esta invención es

1 proporcionar un nuevo procedimiento para la purificación
de sustancia FR-1923 utilizando una resina macroporosa no
iónica de adsorción.

5 Otro objeto de esta invención es proporcionar un
nuevo procedimiento para la purificación de sustancia FR-
1923, mediante el cual se obtiene sustancia FR-1923 con ma-
yor rendimiento que por los procedimientos de la técnica
anterior.

10 Otro objeto de esta invención es proporcionar un
procedimiento más sencillo, más conveniente y más económi-
co para la purificación de la sustancia FR-1923.

15 Como ya se ha dicho, esta invención proporciona un
nuevo procedimiento para la purificación de la sustancia
FR-1923, utilizando una resina macroporosa no iónica de
adsorción, que comprende métodos alternativos en el uso de una
resina macroporosa no iónica de adsorción: uno de ellos es
un método en el que una solución acuosa que contiene la sus-
tancia FR-1923, junto con las impurezas, se pone en contac-
to con una resina macroporosa no iónica de adsorción, des-
pués de lo cual la sustancia FR-1923 adsorbida se eluye,
por ejemplo, con un sistema disolvente hidrofílico (en ade-
lante denominado convenientemente método A); el otro es un
método en el que una solución acuosa que contiene la sus-
tancia FR-1923, junto con las impurezas, se pone en contac-
to con una resina macroporosa no iónica de adsorción satura-
da de sustancia FR-1923 para adsorber las impurezas y la
sustancia FR-1923 se recupera de la solución pasada (denomi-
nado en adelante método B). Estos dos métodos alternativos
se explican con más detalle en lo que sigue.

1 Método A

De acuerdo con el método A de esta invención, se proporciona un procedimiento para la purificación de la sustancia FR-1923, en el que una solución acuosa que contiene sustancia FR-1923, junto con impurezas, se pone en contacto con una resina macroporosa no iónica de adsorción, después de lo cual la sustancia FR-1923 adsorbida se eluye, por ejemplo, con un sistema disolvente hidrofílico.

Las resinas macroporosas no iónicas de adsorción utilizadas de acuerdo con esta invención pueden ser resinas reticuladas con una estructura básica aromática. Las resinas preferidas son los polímeros de estireno, reticulados con divinilbenceno. Son ejemplos de estas resinas el Amberlite XAD-1, XAD-2, XAD-4, XAD-7 y XAD-8 (marca registrada, fabricante: Rohm and Haas Co.), Diaion HP 10, HP 20, HP 30, HP 40, y HP 50 (marca registrada, fabricante: Mitsubishi Kasei Co., Ltd) e Hitachigel nº 3010 (marca registrada, fabricante: Nissei Sangyo Co., Ltd.).

El procedimiento de purificación de la sustancia FR-1923 utilizando la resina macroporosa no iónica de adsorción, de acuerdo con el método A de esta invención, es aplicable a cualquier solución acuosa que contenga sustancia FR-1923 junto con impurezas. Son ejemplos de estas soluciones un filtrado de caldo de cultivo per se preparado cultivando un microorganismo productor de sustancia FR-1923 en un medio nutritivo y una solución de cultivo pre-extraída así como una solución acuosa que contiene material sólido crudo conteniendo sustancia FR-1923 (v.g. polvo crudo o cristales crudos conteniendo sustancia FR-1923) que primero es aislado y purificado hasta cierto punto a partir de un

1 filtrado del caldo de cultivo por métodos convencionales, tales como un tratamiento opcional del filtrado con un disolvente apropiado para la extracción y/o por adsorción sobre carbón activo.

5 Cuando se utiliza un filtrado de cultivo, es ventajoso utilizar una solución de cultivo opcionalmente pre-extraída, siendo puesta en contacto esta solución de cultivo opcionalmente pre-extraída con una resina macroporosa no iónica de adsorción en la forma habitual, preferiblemente
10 utilizando una columna que contiene un lecho de resina.

El tratamiento de la solución acuosa que contiene la sustancia FR-1923 en mezclas con impurezas con la resina no iónica de adsorción se realiza ventajosamente a un valor del pH comprendido entre 2 y 7 y preferiblemente entre 4 y 6. Pueden alcanzarse los valores ácidos del pH deseados utilizando cualquier ácido conveniente, por ejemplo un ácido orgánico, como ácido oxálico o preferiblemente un
15 ácido mineral, como ácido clorhídrico, fosfórico o sulfúrico.

Además, el tratamiento de la solución acuosa que
20 contiene sustancia FR-1923 en mezcla con impurezas con la resina no iónica de adsorción se lleva a cabo ventajosamente en el caso de que las impurezas sean una sal inorgánica, como cloruro sódico, bifosfato sódico y ortofosfato disódico.

En este método, la solución acuosa que contiene sustancia FR-1923 en mezcla con impurezas se pone en contacto
25 con la resina macroporosa no iónica de adsorción para adsorber la sustancia FR-1923, en la forma convencional, por ejemplo mediante una operación discontinua o una operación en columna, después de lo cual la sustancia FR-1923 adsorbida es eluída de la resina, por ejemplo con un sistema di-
30

1 solvente hidrofílico.

5 Los sistemas disolventes hidrofílicos utilizados para eluir la sustancia FR-1923 de la resina son, por ejemplo una dialquil(inferior)cetona (v.g. acetona y metil-etil-cetona) y un alcohol inferior (v.g. metanol, etanol, n-propañol, isopropanol, n-butanol e isobutanol). También pueden utilizarse mezclas de la dialquil(inferior)cetona y el alcohol inferior anteriores.

10 Además, también pueden utilizarse mezclas de agua o de un éster alquílico inferior de un ácido alcanoico inferior, por ejemplo acetato de metilo, acetato de etilo y acetato de butilo, con el alcohol inferior o la dialquil(inferior)cetona anteriores. Además, puede utilizarse un gran volumen de agua y una solución acuosa alcalina (preferiblemente a pH 8-13).

15 El eluato así obtenido se trata por métodos convencionales tales como concentración, ajuste de pH, liofilización y recristalización para obtener la sustancia FR-1923 cristalina que con frecuencia es suficientemente pura para uso como medicina.

20 Método B

25 De acuerdo con el método B de esta invención, se proporciona un procedimiento para la purificación de la sustancia FR-1923 en el que una solución acuosa que contiene la sustancia FR-1923, junto con las impurezas, se pone en contacto con una resina macroporosa no iónica de adsorción, saturada previamente con sustancia FR-1923, para adsorber las impurezas y la sustancia FR-1923 se recupera de la solución pasada.

30 Este método se basa en el hecho de que la capacidad

1 de adsorción de una resina macroporosa no iónica de adsor-
ción para la sustancia FR-1923 es menor que la capacidad de
adsorción de impurezas específicas tales como materias co-
5 lorantes procedentes del caldo de fermentación y un isóme-
ro de la sustancia FR-1923. Haciendo uso de la diferencia
de afinidades de la resina macroporosa no iónica de adsor-
ción entre la sustancia FR-1923 y las impurezas específicas,
estas últimas son selectivamente adsorbidas sobre la resina
saturada con sustancia FR-1923 desde una solución acuosa
10 que contiene sustancia FR-1923 junto con las impurezas y la
sustancia FR-1923 se recupera de la solución pasada.

La capacidad de adsorción de una resina macroporosa
no iónica de adsorción para la sustancia FR-1923 varía con
el estado de la solución acuosa que contiene la sustancia
15 FR-1923, junto con las impurezas y con la clase de resina
macroporosa no iónica de adsorción. A continuación damos
ejemplos de la capacidad de adsorción de sustancia FR-1923
por parte de una resina macroporosa no iónica de adsorción.
Los siguientes datos se obtienen poniendo en contacto con
20 la resina una solución reguladora de fosfato 0,2M (pH 4)
que contiene la sustancia FR-1923.

Ejemplos de la capacidad de adsorción de sustancia FR-1923

Aproximadamente 10 g/l de Diaion HP 20

Aproximadamente 18 g/l de Amberlite XAD-4

25 La resina macroporosa no iónica de adsorción, satu-
rada con sustancia FR-1923, se prepara poniendo en contacto
una solución acuosa que contiene sustancia FR-1923 con una
resina macroporosa no iónica de adsorción, donde dicha solu-
ción es preferiblemente neutra o ligeramente alcalina.

30 Como ejemplos de resina macroporosa no iónica de

1 adsorción, podemos citar los mismos ejemplos mencionados
en el método A.

5 El procedimiento para la purificación de sustancia
FR-1923 utilizando la resina macroporosa no iónica de adsor-
ción, de acuerdo con el método B de esta invención, es apli-
cable a cualquier solución acuosa que contenga sustancia
FR-1923 junto con impurezas, como en el caso del método A
antes mencionado, cuyos ejemplos pueden citarse también
aquí. Especialmente, cuando las impurezas son materias colo-
10 rantes o un isómero de la sustancia FR-1923 en la solución
acuosa, este método B da mejores resultados.

15 Cuando se pone en contacto una solución acuosa que
contiene sustancia FR-1923 junto con impurezas con la resi-
na macroporosa no iónica de adsorción saturada con sustan-
cia FR-1923, esta última no puede ser adsorbida todavía más
sobre la resina y, por otra parte, las impurezas son selec-
tivamente adsorbidas sobre ella.

20 El volumen de resina macroporosa no iónica de adsor-
ción a utilizar en este método varía con el contenido de
sustancia FR-1923 en la solución acuosa de sustancia FR-1923
e impurezas y con el tipo de resina a utilizar y, generalmen-
te, puede ser de 1 litro por cada 100-500 g de sustancia
FR-1923 en la solución acuosa.

25 La sustancia FR-1923 se recupera de la solución que
ha atravesado la resina, que se obtiene poniendo en contac-
to una solución acuosa de sustancia FR-1923 e impurezas con
la resina macroporosa no iónica de adsorción saturada de
sustancia FR-1923. La recuperación puede efectuarse por méto-
dos convencionales tales como ajuste del pH, tratamiento con
30 carbón activo, concentración, liofilización y recristaliza-

1 ción para dar sustancia FR-1923 cristalina que con frecuencia es suficientemente pura para uso como medicina.

5 Además, una solución acuosa que contiene sustancia FR-1923 junto con impurezas se pone en contacto con una resina macroporosa no iónica de adsorción, saturada de sustancia FR-1923, para adsorber las impurezas y después la columna se lava con un pequeño volumen de agua para obtener la sustancia FR-1923 que permanecía en el espacio situado entre la resina y la columna.

10 La resina agotada puede ser regenerada por métodos convencionales, v.g. lavando dicha resina con una solución acuosa o hidroalcohólica alcalina relativamente fuerte.

15 El método B es superior al método A y es más conveniente de practicar y más económico a escala industrial, por las siguientes razones. El método B no requiere un proceso para la elución de la sustancia FR-1923 de la resina y el volumen de la resina utilizada para purificar el método B es menor del 10 % respecto al utilizado en el método A, aunque la recuperación y la pureza de la sustancia FR-1923 son casi iguales en ambos métodos.

20 Los siguientes ensayos se dan con fines comparativos entre el método A y B como procedimiento para la purificación de sustancia FR-1923.

25 Los ensayos comparativos se realizan utilizando los mismos cristales crudos de sustancia FR-1923 y la misma resina en el mismo volumen en ambos métodos. Pero el volumen de los cristales crudos de sustancia FR-1923 en el método A está seleccionado dentro de la capacidad de la resina para adsorber sustancia FR-1923 y el volumen de los cristales crudos de la sustancia FR-1923 utilizado en el método B es

30

1 alrededor de 20 veces el utilizado en el método A.

Ensayo

(I) Capacidad de adsorción de sustancia FR-1923 por la resina Diaion HP 20

5 Se disuelven 1,4 g de sal sódica de sustancia FR-1923 (pureza: 95 %) en 1 litro de solución reguladora de fosfato 0,2M (pH 4,0). La solución se ajusta a pH 4,0 con ácido clorhídrico 5N y agitando. La solución (concentración de sustancia FR-1923: 1310 r/ml) se pasa por una columna rellena con
10 100 ml de Diaion HP 20 (diámetro interno de la columna: 300 mm, altura de relleno de la resina: 160 mm) a una velocidad $VE = 1$ ("VE" es la abreviatura de "velocidad especial"). La solución pasada se recoge en fracciones de 100 ml. El contenido de sustancia FR-1923 en la solución pasada se
15 determina por bioensayo utilizando Pseudomonas aeruginosa. La capacidad de adsorción de sustancia FR-1923 por la resina Diaion HP 20 se calcula en el momento en que la concentración de sustancia FR-1923 en la solución pasada es igual a la concentración de la solución de partida (1310 r/ml), dando un valor de 10,4 g /l.

(II). Purificación de la sustancia FR-1923 por el método A:

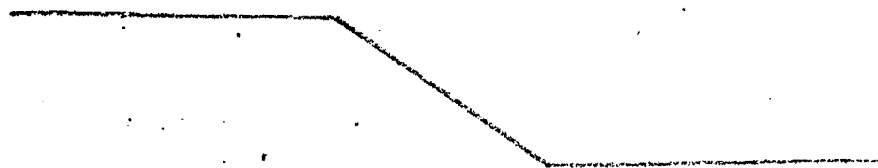
25 Se suspenden 9,5 g de cristales crudos de sustancia FR-1923 (contenido en sustancia FR-1923: 7,9 g) en 2,5 litros de agua. La suspensión se ajusta a pH 7,5 con una solución acuosa de hidróxido sódico 6N para disolverla. Después la solución se ajusta a pH 6,0 con ácido clorhídrico 6N y a la solución se añaden 150 g de cloruro sódico y agua hasta un volumen de 3 litros. La solución se pasa por una columna rellena con 1 litro de Diaion HP 20 (diámetro interno de la
30

1 columna: 77 mm, altura de relleno de la resina: 230 mm) a
una velocidad VE = 1. La sustancia FR-1923 adsorbida se elu
5 ye con metanol acuoso al 30 % y después la columna se lava
con agua. Se recoge la fracción activa (1950 ml) y se concen
tra a presión reducida. El concentrado se ajusta a pH 2,2
con agitación y se deja en reposo durante la noche en el
frigorífico para formar cristales. Estos últimos se recogen
por filtración y se secan. Los resultados se encuentran en
la siguiente tabla.

10 (III) Purificación de la sustancia FR-1923 por el
método B:

En 2 litros de agua se suspenden 200 g de cristales
crudos de sustancia FR-1923 (contenido de sustancia FR-1923:
15 168 g) que son los mismos cristales crudos utilizados en el
ensayo (II). La suspensión se ajusta a pH 7,2 para disolver-
la. La solución se hace pasar por una columna rellena con
1 litro de Diaion HP 20 saturado de sustancia FR-1923 (diá-
metro interno de la columna: 77 mm, altura de rellenc de la
resina: 230 mm) a una velocidad VE = 1. Se pasan 4 litros de
20 agua a través de la columna. Se recogen 4500 ml de fracciones
activas de la solución pasada y a la solución obtenida se
añade agua para dar 16 litros de solución. La solución se
ajusta a pH 2,5 con agitación y después se deja en reposo
durante la noche en el frigorífico para formar cristales.
25 Estos últimos se recogen por filtración y se secan. Los re-
sultados se encuentran en la siguiente table.

30



	<u>Método A</u>	<u>Método B</u>	
1			
	Capacidad de la resina para el tratamiento de cristales crudos de sustancia FR-1923	9,5 g/l de resina	187 g/l de resina
5	Recuperación de cristales	7,2 g	160 g
	Pureza de los cristales	92,7 %	98,4 %
	Recuperación calculada de sustancia FR-1923	84,5 %	93,6 %

Los resultados anteriores indican que el volumen de sustancia FR-1923 tratado por el método B es alrededor de 20 veces el volumen tratado por el método A, aunque la pureza y la recuperación de sustancia FR-1923 son casi iguales en ambos métodos, respectivamente.

Los siguientes ejemplos se dan con fines ilustrativos de esta invención.

15

EJEMPLO 1

A un caldo de cultivo preparado cultivando Nocardia uniformis var. tsuyamanensis ATCC 21806 a 30°C durante 120 horas, en 150 litros de un medio nutritivo que contiene, en peso, 3 % de glicerol, 2 % de harina de semilla de algodón, 2 % de levadura seca, 2,18 % de fosfato dihidrógeno potásico, 1,43 % de dodecahidrato de fosfato hidrógeno disódico, 0,5 % de heptahidrato de cloruro magnésico, se añade un 6 % de Radiolite (marca registrada, auxiliar de filtración vendido por Showa Kagaku Kogyo Co., Ltd.) y después se filtra la mezcla. Se hacen pasar 3 litros del filtrado obtenido (contenido en sustancia FR-1923: 3030 mg) a través de una columna rellena con una resina macroporosa no iónica de adsorción, Diaion HP 20 (diámetro interno de la columna: 8 cm, altura de relleno de la resina: 26 cm) a una velocidad VE = 1. La columna se lava con agua y después la sustancia

20

25

30

1 FR-1923 se eluye con una solución acuosa de metanol al 20 %.
Los 3 litros de eluato obtenidos se concentran a presión re-
ducida y después se ajustan a pH 2,5. La solución se deja en
reposo en el frigorífico para dar 2490 mg de cristales inco-
5 luros de sustancia FR-1923.

EJEMPLO 2

Un caldo de cultivo que se prepara prácticamente de
la misma forma descrita en el Ejemplo 1 se ajusta a pH 4,0
con ácido sulfúrico diluido y después se filtra el caldo de
10 cultivo. Al filtrado obtenido se añade un 6 % de Radiolite
después de lo cual se filtra la mezcla. Se hacen pasar 900
ml del filtrado obtenido (contenido en sustancia FR-1923:
774 mg) a través de una columna rellena con una resina macro-
porosa no iónica de adsorción, Amberlite XAD-4 (diámetro in-
15 terno de la columna: 3,6 cm, altura de relleno de la resina:
30 cm) a una velocidad $VE = 1$. Después la columna se lava
con agua y la sustancia FR-1923 se eluye con acetona acuosa
al 20 %. Los 600 ml de eluato obtenidos se concentran a pre-
sión reducida, se ajustan a pH 2,0 con ácido clorhídrico
20 diluido y después se dejan en reposo en un frigorífico para
dar 365 mg de cristales incoloros de sustancia FR-1923.

EJEMPLO 3

Se pasan 300 ml de un filtrado de cultivo (pH 4,0),
obtenido prácticamente de la misma forma que en el Ejemplo 1
25 a través de una columna de una resina macroporosa no iónica
de adsorción, Diaion HP 20 (diámetro interno de la columna:
30 mm, altura de relleno de la resina: 160 mm) a una veloci-
dad $VE = 1$. La columna se lava con agua y después la sustan-
cia FR-1923 se eluye con una solución acuosa de hidróxido
30 sódico (pH 12,0). Los 600 ml de fracción activa obtenidos se

1 recogen y concentran hasta 15 ml bajo presión reducida. El
concentrado se ajusta a pH 2,5 con ácido clorhídrico 6N
mientras se agita, después de lo cual la solución se deja
en reposo durante 24 horas en el frigorífico para dar 360 mg
5 de cristales incoloros de sustancia FR-1923.

EJEMPLO 4

Se suspenden 20 g de polvo crudo de sustancia FR-1923
(contenido de sustancia FR-1923: 10,2 g) en 6,2 litros de
agua. La suspensión se ajusta a pH 8,1 con una solución
10 acuosa de hidróxido sódico 6N y después se añaden 50 g de
cloruro sódico a la solución. La solución se pasa a través
de una columna de una resina macroporosa no iónica de adsor-
ción, Diaion HP 20 (diámetro interno de la columna: 87 mm,
altura de relleno de la resina: 520 mm) a una velocidad
15 VE = 1. La columna se lava con agua y después la sustancia
FR-1923 se eluye con solución acuosa de metanol al 30 %.
Se recogen las fracciones activas obtenidas (4,48 litros)
y después se concentran hasta un volumen de 400 ml bajo pre-
sión reducida. El concentrado se ajusta a pH 2,5 con ácido
20 clorhídrico 6N y después se deja en reposo durante la noche
en el frigorífico para dar 10,0 g de cristales incoloros
de sustancia FR-1923.

EJEMPLO 5

Se suspenden 18 g de polvo crudo de sustancia FR-
25 1923 (contenido de sustancia FR-1923: 10,2 g) en 360 ml de
agua y después la suspensión se ajusta a pH 7,0 con solución
acuosa de hidróxido sódico 6N para disolverla. La solución
se pasa por una columna rellena con una resina macroporosa
no iónica de adsorción, Amberlite XAD-8 (diámetro interno
30 de la columna: 30 mm, altura de relleno de la resina: 160

1 mm) saturada de sustancia FR-1923, a una velocidad $VE = 1$,
después de lo cual se pasan por la columna 400 ml de agua.
Se recogen 700 ml de fracciones activas procedentes de la
5 solución pasada y después la solución se concentra a pre-
sión reducida hasta un volumen de 200 ml. El concentrado
obtenido se ajusta a pH 2,5 con ácido clorhídrico 6N, con
agitación y después se deja en reposo en un frigorífico
durante 24 horas para dar 10,13 g de cristales incoloros
de sustancia FR-1923.

10 EJEMPLO 6

Se suspenden 18 g de polvo crudo de sustancia FR-1923
(contenido de sustancia FR-1923: 10,2 g) en 360 ml de agua
y se ajusta a pH 7,0 con solución acuosa de hidróxido sódi-
co 6N para disolverla. La solución se pasa por una columna
15 rellena con una resina macroporosa no iónica de adsorción,
Amberlite XAD-4 (diámetro interno de la columna: 30 mm,
altura de relleno de la resina: 160 mm) saturada de sus-
tancia FR-1923, a una velocidad $VE = 1$, después de lo cual
se pasan 540 ml de agua a través de la columna. Se recogen
20 900 ml de fracciones activas a partir de la solución pasa-
da y después la solución se concentra a presión reducida
hasta un volumen de 350 ml. El concentrado obtenido se ajus-
ta a pH 2,5 con ácido clorhídrico 6N, con agitación y des-
pués se deja en reposo en un frigorífico durante 24 horas
25 para dar 9,41 g de cristales incoloros de sustancia FR-1923.

EJEMPLO 7

Se suspenden 19 g de polvo crudo de sustancia FR-
1923 (contenido de sustancia FR-1923: 10,7 g) en 380 ml de
agua y después la suspensión se ajusta a pH 7,0 con solu-
30 ción acuosa de hidróxido sódico 6N para disolverla. La so-

1 lución se pasa por una columna rellena de resina macroporo-
sa no iónica de adsorción, Amberlite XAD-7 (diámetro inter-
no de la columna: 30 mm, altura de relleno de la resina:
160 mm) saturada de sustancia FR-1923, a una velocidad
5 VE = 1, después de lo cual se hacen pasar por la columna
400 ml de agua. Se recogen 700 ml de fracciones activas a
partir de la solución pasada y después la solución obtenida
se ajusta a pH 2,5 con ácido clorhídrico 6N, con agitación
y se deja en reposo en un frigorífico para dar 10,28 g de
10 cristales incoloros de sustancia FR-1923.

EJEMPLO 8

Se suspenden 19,75 g de polvo crudo de sustancia
FR-1923 (contenido de sustancia FR-1923: 17,16 g) en 395 ml
de agua y la suspensión se ajusta a pH 7,5 con solución acuosa
15 de hidróxido sódico 5N para disolverla. La solución se
pasa por una columna rellena con una resina macroporosa no
iónica de adsorción Diaion HP 20 (diámetro interno de la
columna: 30 mm, altura de relleno de la resina: 160 mm) sa-
turada de sustancia FR-1923, a una velocidad VE = 1, después
20 de lo cual se pasan por la columna 400 ml de agua. Se reco-
gen 600 ml de fracciones activas a partir de la solución pa-
sada y después la solución obtenida se ajusta a pH 2,5 con
ácido clorhídrico 6N, con agitación y se deja en reposo en
un frigorífico para dar 16,8 g de cristales incoloros de
25 sustancia FR-1923.

EJEMPLO 9

Se pasan 15 litros de un filtrado de cultivo (pH 4,0)
(contenido de sustancia FR-1923: 14,25 g), obtenido prácticame-
30 nte de la misma forma que en el Ejemplo 1, a través de
una columna rellena con una resina macroporosa no iónica de

1 adsorción, Diaion HP 20 (diámetro interno de la columna:
110 mm, altura de relleno de la resina: 550 mm) a una velo-
5 cidad VE = 1. La columna se lava con 5 litros de agua y des-
pués la sustancia FR-1923 se eluye con una solución acuosa
de metanol al 30 %. Se recogen 7940 ml de fracciones acti-
vas y después se ajusta a pH 3,3 con ácido clorhídrico 6N.
La solución se pasa por una columna de alúmina (ácida, diá-
metro interno de la columna: 46 mm, altura de relleno de
10 la alúmina: 300 mm). La columna se lava con 500 ml de agua
y después la sustancia FR-1923 se eluye con una solución
acuosa de bifosfato potásico 0,3M. Se recogen 1800 ml de
fracciones activas y después se concentran a presión redu-
cida hasta un volumen de 800 ml. El concentrado se ajusta
15 a pH 2,2 con ácido clorhídrico 6N mientras se agita y des-
pués la solución se deja en reposo durante la noche en un
frigorífico para dar 11,94 g de cristales incoloros de sus-
tancia FR-1923.

EJEMPLO 10

20 Se pasan 30 litros de un filtrado de cultivo (pH 4,0)
(contenido de sustancia FR-1923: 32,4 g), obtenido práctica-
mente por el mismo método que en el Ejemplo 1, a través de
una columna rellena con una resina macroporosa no iónica de
adsorción, Diaion HP 20 (diámetro interno de la columna:
25 140 mm, altura de relleno de la resina: 600 mm), a una ve-
locidad VE = 1. La columna se lava con 10 litros de agua y
después la sustancia FR-1923 se eluye con una solución acuo-
sa de hidróxido sódico 0,01N. Se recogen 30,1 litros de
fracciones activas y después se ajustan a pH 3,3 con ácido
clorhídrico 6N. La solución se pasa por una columna de alú-
30 mina (ácida, diámetro interno de la columna: 77 mm, altu-

1 ra de relleno de la alúmina: 440 mm). La columna se lava
con 2 litros de agua y después la sustancia FR-1923 se elu-
ye con una solución acuosa de bifosfato potásico 0,3M. Se
5 recogen 12,3 litros de fracciones activas y después se con-
centran a presión reducida hasta un volumen de 1600 mm. El
concentrado se ajusta a pH 2,2 con ácido clorhídrico 6N,
con agitación y después la solución se deja en reposo duran-
te la noche en un frigorífico para dar 25,95 g de cristales
incolores de sustancia FR-1923.

10 En resumen, la patente de invención que se solici-
ta deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

15 1. Un procedimiento para la purificación de un
antibiótico que consiste en poner en contacto una solución
acuosa que contiene sustancia FR-1923, junto con impurezas,
con una resina macroporosa no iónica de adsorción para ad-
sorber la sustancia FR-1923 y eluir de la resina la sustan-
cia FR-1923 adsorbida con un sistema disolvente hidrófilico
o con una solución acuosa alcalina, o poner en contacto una
20 solución acuosa que contiene sustancia FR-1923, junto con
impurezas, con una resina macroporosa no iónica de adsor-
ción, saturada previamente, de sustancia FR-1923, para ad-
sorber las impurezas y recuperar la sustancia FR-1923 a par-
tir de la solución pasada.

25 2. Un procedimiento según la reivindicación 1,
que consiste en poner en contacto una solución acuosa que
contiene sustancia FR-1923, junto con impurezas, con una re-
sina macroporosa no iónica de adsorción para adsorber la
sustancia FR-1923 y eluir de la resina la sustancia FR-1923
30 adsorbida con un sistema disolvente hidrófilico o con una

1 solución acuosa alcalina.

3. Un procedimiento según la reivindicación 1, que consiste en poner en contacto una solución acuosa que contiene sustancia FR-1923, junto con impurezas, con una resina macroporosa no iónica de adsorción, saturada previamente de sustancia FR-1923, para adsorber las impurezas y recuperar la sustancia FR-1923 a partir de la solución pasada.

4. Un procedimiento según las reivindicaciones 2 o 3, donde la solución acuosa que contiene la sustancia FR-1923 es un filtrado del caldo de cultivo que contiene la sustancia FR-1923.

5. Un procedimiento según las reivindicaciones 2 o 3, donde la solución acuosa que contiene la sustancia FR-1923 se utiliza en una solución de cultivo pre-extraída conteniendo la sustancia FR-1923.

6. Un procedimiento según las reivindicaciones 2 o 3, donde la solución acuosa que contiene la sustancia FR-1923 es una solución acuosa de material sólido crudo conteniendo sustancia FR-1923.

7. Un procedimiento según la reivindicación 3, donde la solución acuosa que contiene la sustancia FR-1923 es una solución acuosa que contiene sustancia FR-1923 junto con materias colorantes.

8. Un procedimiento según la reivindicación 3, donde la solución acuosa que contiene la sustancia FR-1923 es una solución acuosa que contiene sustancia FR-1923 junto con un isómero de la sustancia FR-1923.

9. Un procedimiento según las reivindicaciones 2 o 3, donde la resina de adsorción es una resina macroporosa

1

reticulada de estructura básica aromática.

5

10. Un procedimiento según la reivindicación 9, donde la resina reticulada macroporosa de estructura básica aromática es un polímero macroporoso de estireno reticulado con divinilbenceno.

10

11. Un procedimiento según la reivindicación 2, donde el sistema disolvente hidrofílico es una dialquil(inferior) cetona, un alcohol inferior, una mezcla de dicha dialquil-cetona y dicho alcohol inferior o una solución acuosa de dicha dialquil(inferior)cetona, de dicho alcohol inferior o de una mezcla de ambos.

15

12. Un procedimiento según la reivindicación 2, donde la elución se lleva a cabo con una solución alcalina a un pH de 8 a 13.

20

13. Un procedimiento según la reivindicación 11, donde el sistema disolvente hidrofílico es una mezcla de agua y un alcohol inferior.

14. Un procedimiento según la reivindicación 11, donde el sistema disolvente hidrofílico es una mezcla de agua y una dialquil(inferior)cetona.

15. Un procedimiento según la reivindicación 13, donde el alcohol inferior es metanol.

16. Un procedimiento según la reivindicación 13, donde el alcohol inferior es etanol.

25

17. Un procedimiento según la reivindicación 13, donde el alcohol inferior es propanol.

18. Un procedimiento según la reivindicación 14, donde la dialquil(inferior)cetona es acetona.

30

19. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la patente de invención que se solicita:

1 UN PROCEDIMIENTO PARA LA PURIFICACION DE UN ANTIBIOTICO.

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de veintiuna páginas mecanografiadas.

5

Madrid 26 marzo 1975

BERNARDO UNGRIA

p.p.



10

15

20

25

30