

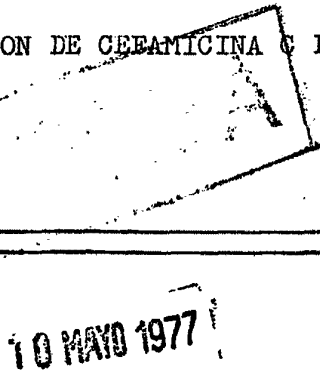


ESPAÑA

|    |    |                       |    |
|----|----|-----------------------|----|
| ES | 11 | NUMERO                | A1 |
|    | 21 | 445.054               |    |
|    | 22 | FECHA DE PRESENTACION |    |
|    |    | 10.2.76               |    |

PATENTE DE INVENCION

|   |                                |                                      |
|---|--------------------------------|--------------------------------------|
| 30 PRIORIDADES:   |                                |                                      |
| 31 NUMERO   | 32 FECHA                       | 33 PAIS                              |
| 548.466   | 10.2.75                        | Estados Unidos                       |
| 47 FECHA DE PUBLICIDAD  | 51 CLASIFICACION INTERNACIONAL | 62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA |
|   | C12D                           |                                      |
| 64 TITULO DE LA INVENCION   |                                |                                      |
| UN PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACION DE CEEAMICINA C DE LAS IMPUREZAS DEL CALDO DE FERMENTACION. |                                |                                      |
| 71 SOLICITANTE (S)  |                                |                                      |
| MERCK & CO., INC.   |                                |                                      |
| DOMICILIO DEL SOLICITANTE   |                                |                                      |
| 126 East Lincoln Avenue RAHWAY P.O. Box 2000 New Jersey, Estados Unidos.                        |                                |                                      |
| 72 INVENTOR (ES)  |                                |                                      |
| Seemon Pines, estadounidense.   |                                |                                      |
| 73 TITULAR (ES)   |                                |                                      |
| 74 REPRESENTANTE  |                                |                                      |
| D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU  |                                |                                      |



1

RESUMEN DE LA INVENCION

5

La cefamicina C se concentra y purifica sometiendo un caldo de fermentación que contiene cefamicina C a la siguiente secuencia de operaciones: filtración a pH ácido, adsorción del filtrado en carbón activo, separación del antibiótico adsorbido por contacto del carbón con una mezcla de agua y un disolvente orgánico polar, contacto del eluato con una resina cambiadora de anión y elución de la resina con una solución salina a un pH de 5,5 a 10 aproximadamente.

10

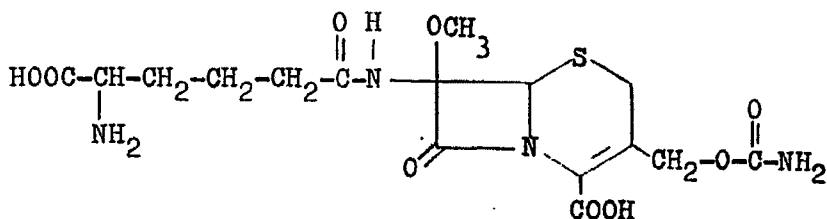
ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

Esta invención se refiere a la concentración y purificación de cefamicina C. Más especialmente, se refiere a la concentración y purificación de cefamicina C a partir de un caldo de fermentación que la contiene.

20

La cefamicina C es un antibiótico de cefalosporina con la siguiente formula estructural:



25

La preparación de este antibiótico por un proceso de fermentación ha sido descrita por Stapley y colaboradores, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Septiembre 1972, págs. 122-131. En este procedimiento, es necesario separar el producto deseado de grandes volúmenes de un líquido que contiene grandes cantidades de materias indeseables. Esta separación es laboriosa y cara.

30

Por consiguiente, un objeto de esta invención es proporcionar un método mejorado para la obtención de cefamicina

1 C a partir de un caldo de fermentación. Otro objeto es pro-  
porcionar un método de concentración y purificación de ce-  
famicina C a partir del caldo de fermentación en el que se  
5 ha preparado. Otro objeto es proporcionar un procedimiento  
sencillo y económico de concentración y purificación de la  
cefamicina C a partir de un caldo de fermentación. Estos y  
otros objetos de esta invención resultarán evidentes en la  
descripción que sigue.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

10 La cefamicina C se concentra y purifica sometiendo  
un caldo de fermentación que contiene cefamicina C a la  
siguiente secuencia de operaciones: filtración a pH ácido,  
adsorción del filtrado sobre carbón activo, separación del  
antibiótico adsorbido por contacto del carbón con una mezcla  
15 de agua y un disolvente orgánico polar, contacto del elua-  
to con una resina cambiadora de anión y elución de la resi-  
na con una solución salina a un pH comprendido entre 5,5 y  
10 aproximadamente.

DESCRIPCION DETALLADA

20 La cefamicina C se prepara por el proceso de fermen-  
tación descrito por Stapley y colaboradores, supra. Al fi-  
nal de la fermentación, la cefamicina C se encuentra en un  
gran volumen de líquido que contiene grandes cantidades de  
materias orgánicas e inorgánicas indeseables. De acuerdo con  
25 esta invención, la cefamicina C presente en este caldo de  
fermentación se concentra y purifica mediante una secuencia  
de operaciones que implican una acidulación, filtración,  
adsorción sobre carbón, lavando opcionalmente el adsorbato  
en carbón con agua y después eluyendo con una mezcla de  
30 agua y un disolvente orgánico polar, contacto del eluato con

1 una resina cambiadora de anión y elución de la resina a un  
pH de 5,5 a 10 aproximadamente. Las operaciones de este pro-  
cedimiento serán descritas ahora con detalle.

5 A. El caldo de fermentación se acidula a un pH de  
2,5 a 4,5 aproximadamente, de preferencia a un pH alrededor  
de 3,5, por adición de ácido, preferiblemente un ácido mine-  
ral por razones de economía y todavía mejor ácido sulfúrico.  
El caldo acidulado se filtra a continuación, preferiblemente  
10 después de añadir un auxiliar de filtración como, por ejem-  
plo, tierra de diatomeas.

B. El filtrado se pone en contacto con carbón activo  
que, opcional pero preferiblemente, ha sido previamente tra-  
tado con un ácido mineral y después lavado con agua de mane-  
ra que se ha eliminado sustancialmente la alcalinidad de las  
15 cenizas, preferiblemente adsorbiéndolo en una columna de car-  
bón donde el carbón tiene una gran porosidad y un tamaño de  
poro relativamente grande así como una buena resistencia fí-  
sica de manera que las partículas de carbón en el fondo de la  
columna no son trituradas por el peso de las partículas de  
20 carbón de la parte superior de la columna. Preferiblemente  
el tamaño de las partículas de carbón es tal que atraviesan  
un tamiz de 12 mallas de las normas Tyler y es retenido en  
un tamiz de 40 mallas Tyler. Un carbón adecuado es el carbón  
Pittsburgh CAL. La adsorción tiene lugar durante un tiempo  
25 de pseudocontacto de unos 15 minutos a 90 minutos (tiempo  
de permanencia del filtrado en la columna).

C. El carbón activo que contiene el antibiótico ad-  
sorbido es después opcional pero preferiblemente lavado con  
una cantidad de agua suficiente para desplazar las materias  
30 indeseables pero que al mismo tiempo no ejerza prácticamente

1 ningún efecto sobre la cefamicina C adsorbida.

5 D. A continuación, el carbón que contiene la cefamicina C adsorbida se pone en contacto con una mezcla de agua y un disolvente orgánico polar en cantidad suficiente para desorber la cefamicina C. El disolvente orgánico polar puede ser, por ejemplo, una cetona, un alcohol o un éster. Las mezclas preferidas son una mezcla 1:1 (en volumen) de acetona y agua, agua saturada con butanol o una mezcla saturada de acetato de etilo en agua.

10 E. La mezcla de agua y el disolvente orgánico polar, conteniendo la cefamicina C desorbida, se trata después con una resina cambiadora de anión que retiene la cefamicina C en la columna y permite que pase la mezcla de agua-disolvente e impurezas. En general, aunque funciona bien cualquier  
15 resina cambiadora de anión, no todas las resinas cambiadoras de anión son igualmente eficaces. Se prefieren las resinas cambiadoras de anión débilmente básicas. Son ejemplos de resinas adecuadas las resinas IRA 45, IRA 47, IRA 68 e IRA 93, manufacturadas por Rohm and Haas Company.

20 F. Después la resina cambiadora de anión se eluye con una sal con un pH de 5,5 a 10 aproximadamente, preferiblemente un pH superior a 7. Las sales adecuadas son  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaCl}$  o  $\text{NaHCO}_3$ . La cefamicina C en el eluyente está enriquecida de unas 20 a unas 70 veces con respecto a las impurezas  
25 que la acompañan en el caldo inicial. Alrededor del 45 al 65 % de la materia orgánica en el eluyente es cefamicina C.

Los siguientes ejemplos ilustran esta invención sin limitar la misma a ellos.

EJEMPLO 1

30 A 568 litros de un caldo de fermentación que contiene

1 cefamicina C, preparado en la forma descrita en la patente  
estadounidense 3.770.590, se agrega una cantidad de ácido  
sulfúrico 3N suficiente para ajustar el pH a 3,5 seguida de  
5 1,54 kg de tierra de diatomeas (Hyflo-Super-Cel). El caldo  
acidulado se filtra después por un filtro de tambor y el fil-  
trado se introduce en una columna de carbón activo (Pitts-  
burgh CAL) con un volumen del lecho de 44,3 litros de carbón  
y se pasa a través del lecho de carbón a una velocidad tal  
que el tiempo de permanencia en la columna es alrededor de  
10 30 minutos.

Después el carbón que contiene la cefamicina C ad-  
sorbida se lava con alrededor de 2 volúmenes del lecho de  
agua para desplazar de la columna las materias indeseables  
que permanecieron con el filtrado residual.

15 A continuación la columna de carbón se pone en con-  
tacto con 4,5 volúmenes de lecho de una mezcla 1:1 en volu-  
men de acetona y agua. El primer medio volumen de lecho de  
efluente se desprecia y el efluente restante que contiene  
20 la cefamicina C desorbida se pasa a través de una columna  
que contiene 44,3 litros de resina cambiadora de anión IRA 68.

Después la resina se eluye con una solución 0,5M  
de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ . Se desprecian los primeros 15 litros de eluyente  
y los 225 litros sucesivos se recogen para su posterior  
25 transformación. Alrededor del 52 % de la materia orgánica  
en esta parte del eluyente está constituido por cefamicina C  
mientras que en el caldo de fermentación de partida solamente  
alrededor del 3 % de las materias orgánicas era cefamicina C.  
La cantidad de cefacimina C medida en el eluyente es el 62 %  
30 de la cantidad presente en el caldo original.

EJEMPLO 2

1 Se repite el procedimiento del Ejemplo 1 a excepción de que en este caso el carbón activo ha sido sometido a un tratamiento previo con ácido.

5 El tratamiento previo con ácido del carbón consiste en pasar un volumen del lecho de ácido sulfúrico 1N a través de la columna a una temperatura superior a 50°C. Después la columna se lava en corriente ascendente con agua a una temperatura superior a 50°C y después se lava con agua sin  
10 calentar hasta que el pH del efluente es superior a 4,0. Alrededor del 58% de la materia orgánica en esa parte del eluyente de la resina cambiadora de anión que se recoge está constituida por cefamicina C mientras que en el caldo de fermentación de partida solamente alrededor del 3% de la materia  
15 orgánica era cefamicina C. La cantidad de cefamicina C medida en el eluyente es el 71% de la cantidad presente en el caldo original.

En resumen la patente de invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

20 REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la separación de cefamicina C de las impurezas del caldo de fermentación que consiste en filtrar un caldo de fermentación que contiene cefamicina C a un pH de 2,5 a 4,5 aproximadamente, adsorber el filtrado sobre carbón activo que opcionalmente puede haber sido tratado  
25 con un ácido previamente opcionalmente lavar con agua el carbón, separar la cefamicina C adsorbida del carbón por contacto de este último con una mezcla de agua y un disolvente orgánico polar, poner en contacto el filtrado desorbido con una  
30 resina cambiadora de anión y eluir la resina con una solución

salina a un pH de 5,5 a 10 aproximadamente.

1           2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde el caldo de fermentación se filtra a un pH de 3,5 aproximadamente.

5           3. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde el carbón activo tiene un tamaño de partícula inferior a unas 12 mallas y superior a unas 40 mallas según las normas Tyler.

10          4. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde el disolvente orgánico polar es acetona.

10          5. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde la resina cambiadora de anión es una resina cambiadora de anión débilmente básica.

15          6. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde la resina es eluída con  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ .

15          7. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde la resina es eluída a un pH superior a 7.

20          8. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde la cefamicina C adsorbida en el carbón activo se lava con agua antes de poner en contacto el carbón con una mezcla de agua y un disolvente orgánico polar.

25          9. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde el carbón activo ha sido previamente tratado con ácido hasta que se ha eliminado esencialmente la alcalinidad de las cenizas.

30          10. Un procedimiento según la Reivindicación 1 que consiste en filtrar un caldo de fermentación que contiene cefamicina C a un pH de 3,5 aproximadamente, adsorber el filtrado sobre un carbón activo previamente tratado con ácido, de un tamaño de partícula inferior a unas 12 mallas y superior a unas 40 mallas (normas Tyler), lavar el carbón

1 con agua, separar la cefamicina C del carbón por contacto de  
este último con una mezcla aproximadamente 1:1 en volumen de  
acetona y agua, poner en contacto el filtrado desorbido con  
una resina cambiadora de anión débilmente básica y eluir la  
5 resina con  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  a un pH superior a 7.

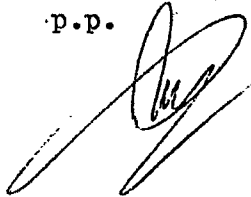
7. Se reivindica por último como objeto sobre el  
que ha de recaer la patente de invención que se solicita: UN  
PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACION DE CEFAMICINA C DE LAS IMPU  
REZAS DEL CALDO DE FERMENTACION.

10 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la  
presente memoria descriptiva que consta de nueve páginas me  
canografiadas.

Madrid, 10 de febrero de 1976

BERNARDO UNGRIA

p.p.



15

20

25

30