

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

(10) ES	(11) NUMERO 467.309	(12) A1
	(22) FECHA DE PRESENTACION 24-FEBRERO-1978	

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES: (31) NUMERO 773.354	(32) FECHA 1-3-1977	(33) PAIS ESTADOS UNIDOS
---	------------------------	-----------------------------

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL A61K, C04G	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
--------------------------	--	--

(54) TITULO DE LA INVENCION UN PROCEDIMIENTO PARA LA RECUPERACION DEL ANTIBIOTICO TIENANICINA DE LOS CALDOS DE FERMENTACION O DE LAS SOLUCIONES QUE CONTIENEN DICHO ANTIBIOTICO.
---

(71) SOLICITANTE (ES) MERCK & CO., INC.
--

DOMICILIO DEL SOLICITANTE 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey, Estados Unidos.
---

(72) INVENTOR (ES) RATHIN DATTA y GEORGE T. WILDMAN,
---

(73) TITULAR (ES)
-------------------

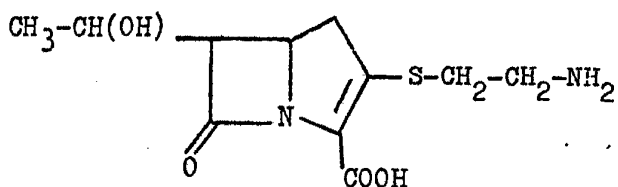
(74) REPRESENTANTE DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU
---

CM.-



1       centrífugos convencionales para el proceso de extracción por  
intercambio de ión conduce a mezclas y separaciones de fases  
extraordinariamente rápidas, reduciendo con ello al mínimo  
5       el tiempo de mantenimiento de la tienamicina en condiciones  
de pH adversas. Esto da lugar a una recuperación de la tie-  
namicina mayor que la obtenida utilizando los cambiadores con-  
vencionales sólidos de ión.

10       Esta invención se refiere a un método de recuperación  
y purificación del compuesto antibiótico tienamicina que res-  
ponde a la siguiente fórmula estructural:



15       de los caldos de fermentación en los que es producido el an-  
tibiótico o de las soluciones que contienen antibiótico par-  
cialmente purificado. Esto se consigue poniendo en contacto  
el caldo de fermentación en el que se produce el antibiótico  
20       o una solución de antibiótico parcialmente purificado con un  
cambiador líquido de ión disuelto en un disolvente orgánico  
para transferir el antibiótico al sistema cambiador líquido  
de ión (extracción directa) y después poner en contacto el  
sistema cambiador líquido de ión que contiene el antibiótico  
25       con una solución acuosa de tampón para efectuar la transfe-  
rencia del antibiótico a la fase acuosa de tampón (retro-  
extracción).

30       En los procesos de intercambio líquido de ión se pro-  
duce una purificación sustancial del antibiótico. El antibió-  
tico de Fórmula I también puede ser purificado mediante de-

1 salificación y cromatografía sobre adsorbentes poliméricos  
como Amberlite XAD-1, 2 y 4, preferiblemente XAD-2 (manufac-  
turada por Rohm and Haas Co., Philadelphia, Pensilvania),  
5 cromatografía sobre resinas fuertes cambiadoras de catión o  
anión como Dowex 50 x 2 (ciclo  $\text{Na}^+$ ) o Dowex 1 x 2 (ciclo  $\text{Cl}^-$ )  
(manufacturadas por Dow Chemical Co., Midland, Michigan) y  
por cromatografía de permeación de gel a través de geles de  
poliacrilamida.

10 Las ventajas principales del procedimiento de inter-  
cambio líquido de ión sobre los procedimientos convenciona-  
les de intercambios sólidos de ión son: 1) mayor recuperación  
de la tienamicina y 2) el proceso puede operar de forma ver-  
daderamente continua, consiguiéndose así las ventajas econó-  
micas de una operación continua.

15 DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

La tienamicina se produce durante la fermentación aeró-  
bia de medios nutritivos acuosos adecuados, en condiciones  
controladas, por una cepa de Streptomyces cattleya capaz de  
producir dicho compuesto, tal como Streptomyces cattleya  
20 NRRL 8057. Los medios acuosos como los empleados para la pro-  
ducción de otros antibióticos son adecuados para la produc-  
ción de tienamicina. Estos medios contienen fuentes de car-  
bono, nitrógeno y sales inorgánicas asimilables por el micro-  
organismo.

25 La producción y caracterización del antibiótico tienam-  
micina están descritos en la patente estadounidense 3.950.357  
que se incorpora aquí por referencia.

30 El nuevo procedimiento aquí utilizado se basa en cam-  
biadores líquidos de ión y un disolvente orgánico. Más espe-  
cialmente, los cambiadores de ión son cambiadores líquidos

1 de catión y cambiadores líquidos de anión.

Los cambiadores líquidos de catión utilizados en esta invención son preferiblemente de la variedad catiónica fuerte tales como ácido dinonilnaftalensulfónico (DNNS) en los  
5 ciclos de hidrógeno, sodio u otros. El término "ciclo" se refiere a la forma salina particular del radical cambiador de ión líquido. Otros cambiadores de ión líquidos catiónicos fuertes que pueden utilizarse son el ácido didodecilnaftalensulfónico y sus sales. También pueden utilizarse los cam-  
10 biadores líquidos catiónicos más débiles, como el ácido di(2-etilhexil)fosfórico; sin embargo, se prefieren los cambiadores de ión catiónicos fuertes.

El cambiador de catión se utiliza habitualmente en combinación con un disolvente orgánico como sistema de extrac-  
15 ción. Por el término "disolvente orgánico" se entiende un disolvente orgánico o una mezcla disolvente. El disolvente orgánico debe tener una constante dieléctrica moderadamente alta.

Por el término "constante dieléctrica moderadamente  
20 alta" se entiende una constante dieléctrica de 4 a 24 aproximadamente. Son representativos de estos disolventes orgánicos con constantes dieléctricas moderadamente altas los alcoholes de cadena lineal y ramificada conteniendo de 4 a  
25 10 átomos de carbono, las cetonas de cadena lineal y ramificada conteniendo de 4 a 8 átomos de carbono y los ésteres de cadena lineal y ramificada conteniendo de 4 a 10 átomos de carbono.

Son representativos de estos alcoholes el n-butanol, isobutanol, pentanol, isopentanol, hexanol, heptanol y si-  
30 milares. Son representativos de las cetonas la metiletil-

1 cetona, metilisobutilcetona y similares. Son representati-  
vos de los ésteres el acetato de etilo, el acetato de buti-  
lo y similares.

5 Cuando se utiliza una mezcla disolvente, puede combi-  
narse un disolvente de elevada constante dieléctrica con un  
disolvente de constante dieléctrica baja para obtener una  
mezcla disolvente con la constante dieléctrica deseada.

10 Por el término "constante dieléctrica elevada" se en-  
tiende un disolvente con una constante dieléctrica de 25 a  
100 aproximadamente. Por el término "constante dieléctrica  
baja" se entiende una constante inferior a 4. Asimismo, pue-  
de utilizarse una mezcla de disolventes con constantes die-  
léctricas moderadamente altas.

15 El cambiador de catión se utiliza habitualmente en  
una solución disolvente donde el cambiador de catión consti-  
tuye del 2 al 15 % en volumen. La solución de cambiador de  
catión líquido se ajusta después a un pH comprendido entre  
1 y 4, con un tampón acuoso adecuado.

20 Los cambiadores de anión líquidos son habitualmente  
sales de materiales aniónicos fuertes tales como compuestos  
de amonio cuaternario. El cambiador de anión líquido puede  
ser una sal de tricaprililmetilamonio tal como acetato, sul-  
fato, propionato, fosfato, cloruro y similares o como la for-  
ma hidroxilo. Otros tipos de cambiadores líquidos de anión  
25 que pueden utilizarse son las aminas primarias, secundarias  
y terciarias insolubles en agua.

30 El cambiador de anión líquido es también más eficaz  
cuando se utiliza con un disolvente o con una mezcla disol-  
vente con una constante dieléctrica moderadamente alta.

Los disolventes y mezclas disolventes antes descritos

1 que pueden utilizarse con el cambiador de catión también pueden utilizarse con el cambiador de anión.

5 El cambiador de anión se utiliza habitualmente en una solución disolvente donde el cambiador de anión constituye alrededor del 5 al 30 % en volumen.

10 El proceso para el aislamiento de la tienamicina se lleva a cabo poniendo en contacto el caldo o solución acidulados (alrededor de 2,5-4,5) que contiene tienamicina con el sistema líquido cambiador de catión. Después de separar las dos fases líquidas, la fase orgánica que ahora contiene la tienamicina se retroextrae con un tampón inorgánico acuoso como bicarbonato sódico, hidróxido amónico, fosfato sódico o fosfato potásico y similares o con piridina acuosa y la tienamicina pasa a la fase acuosa. Después se separa la fase acuosa de la fase orgánica.

15 Esta última fase acuosa que contiene la tienamicina se alcaliniza (alrededor de 8,0-11,0) y después se pone en íntimo contacto con el sistema líquido cambiador de anión. Después de separar las dos fases líquidas, la fase orgánica que ahora contiene la tienamicina se retroextrae con un tampón acuoso como acetato sódico, acetato potásico, cloruro potásico, cloruro de hidrógeno o citrato sódico y similares y la tienamicina pasa a la fase acuosa que después se separa de la fase orgánica.

20 Puede purificarse todavía más el antibiótico por desalificación y cromatografía sobre resinas adsorbentes poliméricas como Amberlite XAD-1, 2 y 4, preferiblemente XAD-2, cromatografía a pH neutro sobre resinas fuertes cambiadoras de catión o cambiadoras de anión, Dowex 50 x 2 (ciclo  $\text{Na}^+$ ) o Dowex 1 x 2 (ciclo  $\text{Cl}^-$ ) y por cromatografía de permeación

25

30

1 de gel utilizando geles de poliacrilamida.

5 El procedimiento aquí descrito puede utilizarse con caldos de fermentación o soluciones dentro de amplios límites de concentraciones del antibiótico. En general, cuanto mayor sea la concentración del antibiótico más eficaz es el procedimiento. Por ejemplo, la concentración de antibiótico puede oscilar aproximadamente entre 2 mg/l y unos 0,010 mg/l. Sin embargo, estos límites no excluyen las soluciones o caldo que han sido preparados a mayores concentraciones del antibiótico tienamicina.

10 Uno de estos procedimientos consiste en extraer la tienamicina con un sistema líquido cambiador de catión, fuertemente ácido, a pH ácido de 2,5 a 4,5 aproximadamente, (extracción directa), separar las fases y después poner en contacto la fase orgánica con un retroextractante acuoso, separar las fases seguido de contacto de la última fase acuosa con un sistema líquido cambiador de anión, fuertemente básico, a pH alcalino de 8,0 a 11,0 aproximadamente, (extracción directa), separar las fases y después poner en contacto la fase orgánica con otro retroextractante acuoso y después separar las fases. La última solución acuosa así obtenida puede purificarse de nuevo mediante los siguientes procedimientos: desalificación y cromatografía sobre un adsorbente polimérico, cromatografía sobre una resina cambiadora de anión del tipo de poliestireno-amonio cuaternario o cromatografía sobre una resina cambiadora de catión con un tampón o agua; filtración de gel y cromatografía sobre una resina adsorbente.

30 El procedimiento de la invención puede llevarse a cabo cuando se utiliza cualquiera de los cambiadores líquidos

1 de ión sin utilizar el otro. Así, puede utilizarse el cambia-  
dor líquido de anión con exclusión del cambiador líquido de  
catión o puede utilizarse el cambiador líquido de catión con  
exclusión del cambiador líquido de anión.

5 Sin embargo, si se utilizan consecutivamente ambos cam-  
biadores líquidos de ión, la secuencia en la cual se utili-  
zan no es crítica. Así, puede utilizarse el cambiador líqui-  
do de catión seguido del cambiador líquido de anión o el cam-  
biador líquido de anión seguido del cambiador líquido de  
10 catión.

El sistema extractor utilizado en esta invención pue-  
de ser cualquiera de los conocidos en este campo para la se-  
paración de líquidos de diferentes densidades. Los exper-  
tos en la técnica observarán que las diferentes centrífugas  
15 de tamaños y formas variables tendrán que ser ajustadas pa-  
ra obtener óptimos resultados.

EJEMPLO 1

Se abre asépticamente un tubo de cultivo liofilizado  
que contiene una cepa productora de tienamicina de Strepto-  
20 myces cattleya y el contenido se suspende en un Erlenmeyer  
de 250 ml provisto de tabique, que contiene 50 ml de Medio B  
estéril de la siguiente composición:

Medio B

25	Levadura autolizada tipo pH	10	g/l
	Dextrosa	10	g/l
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	50	mg/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,182	g/l
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,19	g/l
30	pH 6,5 antes de esterilizar.		

1 El matraz inoculado se sacude a 28°C en un sacudidor rotatorio a 150 rpm durante 24 horas. Después se sacan asépticamente tres partes alícuotas de 10 ml del caldo de 24 horas del Medio B. Cada parte alícuota de 10 ml se mezcla inmediatamente con 500 ml de Medio B contenidos en tres Erlenmeyers de 2 litros con tabiques. Se sacuden estos matraces de siembra a 28°C en un sacudidor rotatorio a 150 rpm durante 24 horas.

5  
10 Inmediatamente después se utilizan 1500 ml de los caldos de Medio B de 24 horas contenidos en los Erlenmeyers de 2 litros para inocular un fermentador de acero inoxidable de 756 litros que contiene 467 litros de Medio E con la siguiente composición:

15

<u>Medio E</u>	
Glicerol	10 g/l
Pharmamedia	5 g/l
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01 g/l
Solubles de destilería	10 g/l
CaCO <sub>3</sub>	3 g/l
20 Poliglicol 2000	2,5 g/l

pH 7,3 antes de esterilizar.

25 Este tanque opera a 28°C utilizando una velocidad de agitación de 130 rpm y un caudal de aire de 10 pies<sup>3</sup> (28 dm<sup>3</sup>) por minuto, durante 4 horas. Se determina el pH del caldo de fermentación a intervalos de 24 horas, encontrándose en la siguiente tabla:

30

<u>Horas</u>	<u>pH</u>
0	6,8
24	6,8
48	6,5

1           Inmediatamente después se utilizan 454 litros del cal-  
do de 48 horas anterior contenido en el fermentador de acero  
inoxidable de 756 litros para inocular un fermentador  
de acero inoxidable de 5670 litros que contiene 4082 litros  
5 de Medio G de la siguiente composición:

Medio G

	Licor de infusión de maíz	15	g/l
	Glicerol	10	g/l
	Pharmanedia	5	g/l
10	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,01	g/l
	$\text{CaCO}_3$	3	g/l
	Poliglicol 2000	2,5	g/l

pH 7,3 antes de esterilizar.

15           Este tanque opera a 25°C empleando una velocidad de  
agitación de 0,0154 rpm/litro y un caudal de aire de 0,012  
pies<sup>3</sup> (0,34 dm<sup>3</sup>)/litro durante 96 a 100 horas. El pH se con-  
trola a 6,0-7,0.

20           Los 4082 litros de caldo de fermentación se filtran  
mediante un filtro prensa de 30 pulgadas (76 cm) y una mez-  
cla auxiliar de filtración en la proporción del 4 % en peso/  
volumen. Se agregan al filtrado 12 g de la sal sódica del áci-  
do (etilendinitrilo)tetraacético. El filtrado se enfría a  
6°C.

25           El caldo filtrado se mezcla continuamente a unos 5°C  
con ácido sulfúrico 2,5 N para llevar el pH del caldo a 3,  
empleando un mezclador incorporado a la línea de producción.  
El caldo acidulado a pH 3 se introduce después a razón de  
60 galones por minuto (gpm) (227 litros/minuto) en un extrac-  
tor centrífugo donde se pone en contacto con ácido dinonil-  
30           naftalensulfónico (DNNS) frío (alrededor de 5°C) al 10 % en

1 volumen (fundamentalmente en el ciclo sódico), a pH 2, en  
una solución n-butanólica que se introduce en el extractor  
a razón de 30 galones/minuto (113,5 litros/minuto). En el  
5 extractor, las dos soluciones se mezclan íntimamente y la  
reacción de intercambio de catión ocurre entre los iones  
 $\text{Na}^+$  y  $\text{H}^+$  del radical DNNS y la forma catiónica amónica de la  
tienamicina, dando lugar a la transferencia de la tienamici-  
na desde la fase acuosa a la fase disolvente. Después se se-  
paran eficientemente las dos fases mediante un aparato  
10 Podbielniak Modelo D-36 que opera a 200 rpm, generando fuer-  
zas centrífugas de hasta 2000 g en el extractor. La fase di-  
solvente conteniendo la tienamicina, la corriente rica de  
DNNS/disolvente, se bombea después a razón de 30 galones/mi-  
nuto (113,5 litros/minuto) a un segundo extractor donde se  
15 pone en contacto con un tampón acuoso, piridina al 6 % en  
volumen conteniendo 5 g/l de fosfato sódico dibásico, para  
la retroextracción. El retroextractante se introduce a un  
caudal de 30 galones/minuto (113,5 litros/minuto) en el ex-  
tractor utilizado para la retroextracción.

20 Se extrae del caldo alrededor del 98 % de la tien-  
amicina a la fase DNNS/n-butanol del primer extractor y al-  
rededor del 95 % de tienamicina de la fase de DNNS/n-butanol  
al tampón acuoso utilizando el segundo extractor. Por lo  
tanto, la recuperación global de tienamicina es alrededor  
25 del 93 % desde el caldo al tampón acuoso a través del pro-  
ceso de intercambio líquido de catión.

30 El retroextractante acuoso del proceso de intercambio  
líquido de catión se mezcla ahora con hidróxido sódico  
2,5 N para llevar el pH a 11, utilizando un mezclador incor-  
porado a la línea de producción. Esta corriente acuosa, a

1 unos 5°C y pH 11, se introduce a 30 gpm (113,5 litros/minu-  
to) en un tercer extractor donde se pone en íntimo contacto  
con un cambiador líquido de anión, "Aliquat 336" al 30 % en  
5 volumen, acetato de tricaprilmetilamonio (ciclo acetato)  
en n-butanol que se introduce a 30 gpm (113,5 litros/minu-  
to). Se produce la reacción de intercambio de anión entre el  
ión acetato negativo del "Aliquat 336" y el anión carboxi-  
lato de la tienamicina, dando lugar a la transferencia de  
10 tienamicina desde la fase acuosa a la fase disolvente. Des-  
pués las dos fases son separadas eficientemente por las  
fuerzas centrífugas que operan en el extractor. La fase di-  
solvente que contiene tienamicina, corriente de Aliquat/di-  
solvente rica, se bombea después a un cuarto extractor don-  
de se pone en contacto con un tampón acuoso, acetato potási-  
15 co 0,40 M (pH 5,0) y de nuevo, mediante reacciones de in-  
tercambio de anión, es transferida la tienamicina, esta vez  
desde la fase disolvente a la fase de tampón acuoso. La fa-  
se disolvente agotada, que contiene el "Aliquat 336", se re-  
genera después continuamente al ciclo acetato utilizando  
20 columnas convencionales de extracción de líquidos.

Mediante el procedimiento descrito, se transfiere al-  
rededor del 80 al 85 % de la tienamicina desde la corriente  
acuosa de alimentación al tampón retroextractante a través  
del proceso de intercambio líquido de anión.

25 Así se consigue una purificación sustancial de la tie-  
namicina. La pureza se refiere a la relación del título de  
tienamicina al título de sólidos totales disueltos. En el  
ejemplo, la pureza aumentó 30 veces.

30 Si se desea, el extracto que contiene tienamicina pro-

1 cedente del proceso de intercambio líquido de anión se ajusta a pH 7-7,2 y se concentra hasta un volumen de 20 galones (75,7 litros) que después se aplica a una columna de Amberlite XAD-2 de 100 galones (378 litros), a un caudal de 2,5 galones/minuto (9,5 litros/minuto). La resina se eluye con agua desionizada a 5 galones/minuto (19 litros/minuto) y se recoge una fracción rica de 150 galones (568 litros) que se concentra hasta 2,5 litros y después se aplica a 40 litros de resina Dowex 50 x 2 (ciclo Na<sup>+</sup>) a un caudal de 600 ml/minuto. Después la resina se eluye a 600 ml/minuto con agua desionizada y se recoge una fracción rica de 17 galones (64 litros) que se concentra hasta 0,06 galones (0,23 litros) y se aplica a un lecho de 30 litros de Bio-gel P-2 (200-400 mallas) previamente equilibrado con tampón de acetato de 2,6-lutidina 0,1 M a pH 7,0. Después el gel se desarrolla con el mismo tampón. La fracción rica se concentra a 0,05 galones (0,19 litros) y se aplica a 4 litros de resina Amberlite XAD-2. Se concentra el eluato enriquecido y el concentrado se liofiliza dando tianamicina del 90 % aproximadamente de pureza.

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

#### REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento para la recuperación del antibiótico tianamicina de los caldos de fermentación o de las soluciones que contienen dicho antibiótico, cuyo procedimiento comprende el someter a reacción de intercambio dichos caldos o soluciones con un sistema cambiador líquido de ión insoluble en agua, disuelto en un disolvente orgánico, para transferir el antibiótico al sistema cambiador

1 líquido de ión (extracción directa) y después someter a  
reacción de intercambio al sistema cambiador líquido de  
ión que contiene el antibiótico con un tampón acuoso para  
5 efectuar la transferencia del antibiótico a la fase del  
tampón acuoso (retroextracción).

2.- Un procedimiento según la Reivindicación  
1, donde los sistemas cambiadores de ión, están seleccio-  
nados del grupo formado por, (a) un cambiador líquido de  
catión, (b) un cambiador líquido de anión, (c) un cambia-  
10 dor líquido de catión seguido de un cambiador líquido de  
anión y (d) un cambiador líquido de anión seguido de un  
cambiador líquido de catión.

3.- Un procedimiento según la Reivindicación 2,  
donde el sistema cambiador líquido de catión es ácido dino-  
15 nilnaftalensulfónico o sus sales.

4.- Un procedimiento según la Reivindicación 2,  
donde el cambiador líquido de anión es una sal seleccionada  
entre el grupo formado por acetato de tricaprililmetil-  
amonio, propionato de tricaprililmetilamonio, fosfato de  
20 tricaprililmetilamonio o sulfato de tricaprililmetilamonio.

5.- Un procedimiento según la Reivindicación 1,  
donde el disolvente utilizado con los cambiadores líquidos  
de ión tiene una constante dieléctrica moderadamente alta.

6.- Un procedimiento según la Reivindicación 5,  
25 donde el disolvente está seleccionado entre alcoholes que  
contienen de 4 a 10 átomos de carbono.

7.- Un procedimiento según la Reivindicación 5,  
donde el disolvente está seleccionado entre cetonas que  
30 contienen de 4 a 8 átomos de carbono.

8.- Un procedimiento según la reivindicación 5,

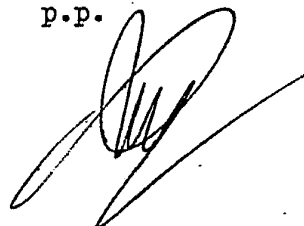
1 donde el disolvente está seleccionado entre ésteres que  
contienen de 4 a 10 átomos de carbono.

5 9.- Se reivindica por último como objeto sobre  
el que ha de recaer la Patente de Invención que se solici-  
ta: UN PROCEDIMIENTO PARA LA RECUPERACION DEL ANTIBIOTICO  
TIENAMICINA DE LOS CALDOS DE FERMENTACION O DE LAS SOLU-  
CIONES QUE CONTIENEN DICHO ANTIBIOTICO.

10 Todo conforme queda descrito y reivindicado en  
la presente Memoria Descriptiva que consta de dieciseis  
páginas mecanografiadas.

Madrid, 24 de Febrero de 1978

BERNARDO UNGRIA  
P.P.

15 

20

25

30