

1 91287

P.- 7875.-
Case 2.896.-



19 ENE 1950

191287

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

e n

E S P A Ñ A

pór VEINTE años

a nombre de MERCK & CO., INC., entidad norteamericana, establecida en 126 East Lincoln Avenue, Rahway, Nueva Jersey, Estados Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO DE PRODUCIR SULFATO DE DIHIDROESTREPTOMICINA CRISTALIZADO".

-o-

Esta solicitud es continuación de la Número 191.160.

Este invento se refiere a una nueva forma clínica superior de dihidroestreptomicina y a métodos para prepararla. Más especialmente, el invento se refiere a sulfato de dihidroestreptomicina cristalizado, y a procedimientos para prepararlo a partir de sulfato de dihidroestreptomicina amorfo y por metátesis de otras sales ácidas de dihidroestreptomicina.

Aunque el valor terapéutico del sulfato de dihidro-



1 91287

estreptomina ha sido reconocido durante algún tiempo, se ha
tropezado con dificultades para obtener un producto puro. Los
métodos hasta ahora disponibles comprendían la obtención de
5 sulfato de dihidroestreptomina, ya por secado por congela-
ción de una solución acuosa, ya por precipitación del produc-
to en estado amorfo desde solución acuosa por la adición de
un disolvente miscible, tal como metanol o acetona. Los pro-
ductos así obtenidos son amorfos y contienen impurezas, cuyos
últimos vestigios es virtualmente imposible eliminar. Además,
10 estos procesos para recuperar sulfato de dihidroestreptomina
son relativamente costosos.

Quando se usa el proceso de secado por congelación,
se comprueba que todas las impurezas contenidas en la solución
acuosa pasan al producto seco. Análogamente, al obtener el
15 producto por precipitación, el producto amorfo encierra impu-
rezas y/o las impurezas son de tal naturaleza que son co-precipi-
tadas junto con el producto deseado.

Asimismo, estos procedimientos son relativamente
antieconómicos. El proceso de secado por congelación requie-
re un equipo costoso y es relativamente caro en su operación,
20 ya que necesita el uso de temperaturas extremadamente bajas
y de un alto vacío. Análogamente, el proceso que implica la
precipitación del sulfato de dihidroestreptomina con un di-
solvente miscible, tal como acetona o metanol, es relativa-
mente costoso, ya que supone el uso de grandes cantidades de
25 disolventes orgánicos que deben tratarse y recuperarse desde
las aguas madres.

Por consiguiente era evidente a todos los que tra-



1 91287

bajaban en este campo que, a fin de preparar sulfato de dihidroestreptomina puro, sería en extremo deseable obtener el producto en forma cristalizada. Hasta ahora ha sido imposible, sin embargo, preparar sulfato de dihidroestreptomina en forma cristalizada.

De acuerdo con una realización del invento, se ha descubierto que es posible en ciertas condiciones controladas cristalizar sulfato de dihidroestreptomina y obtener así el producto en forma pura. Una vez que se dispone de cristales de este producto, es posible utilizar tales cristales para sembrar otras soluciones de sulfato de dihidroestreptomina en condiciones apropiadas para obtener cristales del producto.

El producto cristalizado puro así obtenido es un producto superior para inyección clínica y no produce ninguno de los efectos tóxicos, manifestados por dolor después de la inyección, que normalmente se experimentan con los preparados de estreptomina y dihidroestreptomina disponibles.

Se ha comprobado que es posible obtener sulfato de dihidroestreptomina cristalizado a partir de una solución acuosa preparada con sulfato de dihidroestreptomina amorfo y con un pH de aproximadamente 4.5, diluyendo dicha solución con un alcohol alifático inferior, con preferencia metanol, hasta que quede una turbiedad ligera y permanente. Esta solución turbia se deja entonces reposar hasta que el sulfato de dihidroestreptomina cristaliza, lo cual ocurre usualmente dentro de las 24 horas aproximadamente. Como an-

19 E



191287

tes se ha indicado, el metanol es el disolvente preferido para efectuar esta cristalización, aunque también pueden usarse para este fin otros alcoholes alifáticos inferiores miscibles con agua, tales como etanol e isopropanol.

5 Para obtener resultados óptimos, es deseable tener la solución acuosa de sulfato de dihidroestreptomina a un pH de aproximadamente 4.5, aunque pueden obtenerse cristales dentro de la gama de pH de 4 a 5.5. El pH de la solución se ajusta ventajosamente por la adición de la cantidad requerida de ácido sulfúrico diluido.

10

Es correspondientemente posible obtener el producto cristalizado desde soluciones acuosas que contengan 0.1 a 60% de sulfato de dihidroestreptomina, por el uso de metanol a concentraciones variables. Por ejemplo, con una solución

15 al 0.1% de sulfato de dihidroestreptomina, se usaron 6 volúmenes (aproximadamente 83%) de metanol, al paso que con una solución al 60% son necesarios aproximadamente 0.3 volúmenes (aproximadamente 23%) de metanol. La relación, por consiguiente, es aparente que cuando la solución de sulfato de di-

20 hidroestreptomina es más concentrada, se requieren cantidades relativamente menores de disolvente para producir la turbiedad. Debe observarse además que, a medida que avanza la cristalización de sulfato de dihidroestreptomina, es necesario, si se desea la máxima recuperación de productos crist-

25 talizados, añadir más disolvente de vez en cuando para mantener la solución sobre saturada con respecto al sulfato de dihidroestreptomina.



1 91287

El sulfato cristalizado de dihidroestreptomicina, cristalizado de acuerdo con el invento, puede recuperarse fácilmente en forma pura sólida por filtración o centrifugación, lavando el producto sólido con una solución acuosa de alcohol inferior, y secando el producto sólido. A este respecto, debe observarse que el sulfato de dihidroestreptomicina cristalizado así obtenido es un producto puro que posee propiedades físicas diferentes de las adscritas al producto amorfo. Por ejemplo, aunque ambos sulfatos de dihidroestreptomicina, el cristalizado y el amorfo, son muy solubles en agua, la forma cristalizada es de 50 a 100 veces menos soluble que la forma amorfa en metanol acuoso al 50%. Esta marcada diferencia en la solubilidad es también mostrada en otras mezclas disolventes orgánico-acuosas.

Se comprenderá por los técnicos que sembrando con unos pocos cristales del producto dado, es a menudo posible inducir a sustancias que de otro modo no lo harían, a cristalizar desde solución. Así, con cristales de sulfato de dihidroestreptomicina disponibles, es posible emplear estos cristales como semillas para inducir una cristalización de sulfato de dihidroestreptomicina desde solución que, en condiciones ordinarias, no depositarían el producto cristalizado. Por ejemplo, aunque no se ha podido obtener sulfato de dihidroestreptomicina cristalizado desde soluciones acuosas del mismo diluídas con acetona, la adición de una pequeña cantidad de la forma cristalizada inducirá la cristalización del sulfato de dihidroestreptomicina desde tales soluciones en



1950

1 91287

acetona acuosa.

Los disolventes adecuados para inducir la cristalización de sulfato de dihidroestreptomina desde solución acuosa cuando se dispone de cristales de semilla, incluyen acetona y disolventes miscibles con agua, en los cuales la solubilidad del sulfato de dihidroestreptomina sea al menos tan grande como en acetona, por ejemplo, etanol isopropanol y glicol etilénico.

La cantidad de disolvente orgánico a emplear varía con la concentración de sulfato de dihidroestreptomina en la solución acuosa, pero puede hacerse referencia a ella, en general, como la cantidad requerida para formar una solución ligeramente sobresaturada. Con algunos disolventes, especialmente acetona y los alcoholes alcohólicos inferiores, la aparición de una ligera turbiedad en la solución indica cuándo se ha alcanzado el debido grado de sobresaturación. La adición de demasiado disolvente causará la precipitación del sulfato en forma amorfa, pero tal precipitado puede disolverse de nuevo fácilmente añadiendo agua para compensar el exceso de disolvente presente. Como quiera que la nueva disolución del precipitado amorfo indeseado requiere tiempo y, portanto, es objeccionable en la producción en gran escala, es preferible ensayar una pequeña muestra de solución con el disolvente seleccionado para determinar la cantidad máxima de disolvente que puede añadirse sin precipitar sulfato amorfo, y añadir luego a la tanda una cantidad de disolvente igual a aproximadamente 90% de la cantidad máxima así de-



terminado.

No importa qué disolvente se emplee, es necesario, si se desea la máxima recuperación de producto cristalizado, añadir disolvente adicional de vez en cuando durante la cristalización para mantener la solución en estado sobresaturado con respecto al sulfato de dihidroestreptomicina.

La solución de partida de sulfato de dihidroestreptomicina puede prepararse disolviendo meramente en agua sulfato de dihidroestreptomicina amorfo obtenido, ya por hidrogenación de otras sales de estreptomicina, tales como el hidrocloreto, y conversión subsiguiente de la correspondiente sal de dihidroestreptomicina al sulfato, ya preparando sulfato de estreptomicina a partir de otras sales, tales como el hidrocloreto e hidrogenación subsiguiente a sulfato de dihidroestreptomicina. Si el sulfato de dihidroestreptomicina es obtenido tratando, por ejemplo, una solución acuosa, ésta puede usarse directamente sin separación intermedia del producto amorfo sólido.

Alternativamente la solución de sulfato de dihidroestreptomicina, puede formarse in situ por una reacción metatética entre otra sal de dihidroestreptomicina y una sal del ácido sulfúrico. Puede emplearse cualquier sal de dihidroestreptomicina que tenga una solubilidad moderada en la mezcla disolvente acuosa usada para la cristalización como, por ejemplo, el acetato, formiato, nitrato, hidrobromuro, hidrocloreto, y tartrato de dihidroestreptomicina. El requisito primordial con respecto a la sal del ácido sulfúrico empleada es



E. 1350

191287

que ambos, la sal del ácido sulfúrico y el producto de reacción del catión de dicha sal con el anión de la sal ácida de dihidroestreptomina de partida, sean más solubles que el sulfato de dihidroestreptomina en la mezcla disolvente empleada. Las sales adecuadas del ácido sulfúrico incluyen el sulfato amónico, los sulfatos de alcohol amina, tales como el sulfato de dimetilamina, y los sulfatos de alcohol amina, tales como el sulfato de trietanolamina. En la práctica, sin embargo, en razón de la facilidad de preparación y disponibilidad, la sal hidrocloreto de dihidroestreptomina y el sulfato de amonio son probablemente los compuestos más útiles a emplear en esta reacción metatética.

En la metátesis, la baja solubilidad del sulfato cristalizado de dihidroestreptomina en la mezcla disolvente orgánico-acuosa, actúa como fuerza motriz que lleva la reacción en la dirección deseada separando sulfato de dihidroestreptomina de la mezcla de reacción a medida que se forma. Cuando en la metátesis se usa un alcohol alcohólico inferior y, particularmente, metanol acuoso, pueden obtenerse cristales directamente sin sembrar. Es deseable, incluso con estos disolventes, sin embargo, sembrar la mezcla de reacción a fin de asegurar una rapidez de cristalización satisfactoria.

Se ha comprobado que después de realizado cierto número de cristalizaciones de sulfato de dihidroestreptomina en un ambiente particular, la cristalización de cantidades adicionales de sulfato de dihidroestreptomina puede



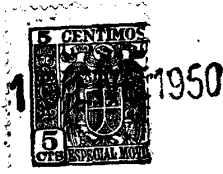
191287

efectuarse a veces sin la adición real de cristales-semilla. Esto ~~se~~ debe probablemente a la presencia en el aparato o en la atmósfera de diminutos cristales de sulfato de dihidroestreptomicina. A fin de proporcionar un control óptimo de la cristalización y de efectuar la cristalización en el tiempo más corto, es preferible, sin embargo, añadir cristales a la solución sobresaturada más bien que confiar en la acción sembradora de diminutos cristales presentes en el ambiente.

Se comprenderá que tanto la metátesis como la cristalización de sulfato de dihidroestreptomicina desde soluciones acuosas preparadas a partir del producto amorfo, puede realizarse en condiciones estériles, en cuyo caso el producto cristalizado puede recuperarse directamente en una forma conveniente para uso clínico.

El producto cristalizado puro así obtenido de acuerdo con el invento es un producto superior para inyección clínica, y no produce ninguno de los efectos tóxicos, manifestados como dolor después de la inyección, que se experimentan normalmente con los preparados disponibles de estreptomicina y dihidroestreptomicina. Así, cuando muestras de sulfato de dihidroestreptomicina amorfo y la sal correspondiente cristalizada se comparan por el ensayo de irritación en conejos, se comprueba que el producto amorfo es más de tres veces más irritante que el correspondiente producto cristalizado.

La ventaja farmacológica de la toxicidad reducida en el sulfato de dihidroestreptomicina cristalizado resultante, se debe probablemente en gran parte a la elevada pureza



1 91287

5 del producto, ya que la sal amorfa obtenida a partir del sulfato cristalizado es igualmente inocua. En los procedimientos de cristalización, las impurezas tales como las sales sulfáticas de estreptomina, mannisido-estreptomina y dihidromannisidoestreptomina no cristalizan en las condiciones usadas para la cristalización de sulfato de dihidroestreptomina. Además, otras impurezas y productos de descomposición son solubles en la mezcla disolvente y, por consiguiente, son eliminados del producto cristalizado.

10 Además de proporcionar una forma clínica mejorada de dihidroestreptomina en el producto cristalizado, los procedimientos de cristalización representan una mejora de considerable importancia sobre los métodos existentes para recuperar producto amorfo, especialmente al eliminar la necesidad
15 de eliminar grandes cantidades de agua por costosos procedimientos de secado por congelación o evaporación a baja temperatura.

20 Debe mencionarse además que la forma cristalizada de sulfato de dihidroestreptomina es especialmente ventajosa, ya que permite el manejo y el envasado más fáciles del producto final. Como quiera que la actividad de la forma cristalizada es siempre constante, no es necesario ensayar biológicamente el material antes de su envasado, como ocurre con el material amorfo de que antes se disponía.

25 La estructura de difracción a los rayos X de una muestra de sulfato de dihidroestreptomina cristalizado se tabula a continuación indicando los espaciamentos e intensi-



ENE. 1950

191287

dades relativas medidos por un espectrómetro "Norelco" con contador de Geiger.

DIFRACCION A LOS RAYOS X

	<u>Espaciamiento, A</u>	<u>Intensidad relativa, %</u>
5	8.74	50
	8.09	35
	7.64	40
	6.81	35
	6.32	25
10	5.62	40
	5.35	60
	4.78	85
	4.70	85
	4.32	60
15	4.13	50
	4.07	45
	3.81	30
	3.69	50
	3.62	75
20	3.42	100
	3.19	25
	3.14	40
	2.95	25

25 Las otras características cristalinas son como sigue:

$$\text{Índices de refracción } \alpha = 1.552 \pm 0.002$$

$$\beta = 1.558 \pm 0.004$$

$$\gamma = 1.566 \pm 0.002$$

Angulo de extinción 18°.

30 Los cristales de sulfato de dihidroestreptomina están característicamente formados como plaquitas delgadas, blancas, de forma irregular, que a menudo se dan en aglomerados.

Los ejemplos siguientes muestran cómo pueden

19E



191287

llevarse a cabo procedimientos para preparar sulfato de dihidroestreptomicina cristalizado de acuerdo con el presente invento, pero ha de entenderse que estos ejemplos se dan a modo de ilustración, y no de limitación.

5 Ejemplo 1.

Una muestra de sulfato de dihidroestreptomicina muy purificado, pero amorfo, se disolvió en agua y el pH de la solución se ajustó a un pH de 4.5 añadiendo una pequeña cantidad de ácido sulfúrico diluido. El volumen de la solución resultante se ajustó de tal modo que 20 grs. del producto se disolvieron en 100 c.c. de solución. Parte de la solución patrón se diluyó luego para producir soluciones que contenían 10, 5, 2 y 1 gr. por 100 c.c. Una pequeña muestra de cada una de estas soluciones se diluyó en un tubo de ensayo con metanol hasta que se volvió turbia y se dejó a un lado. Se preparó un segundo grupo y se diluyó con acetona. Después de transcurridas unas ocho horas, todos los tubos se reunieron. Veinticuatro horas más tarde, todos los tubos que contenían metanol contenían sulfato de dihidroestreptomicina cristalizado.

Análisis: calculado: C, 34.42; H, 6.05; N, 13.38; S, 6.56
hallado: C, 34.25; H, 6.32; N, 13.27; S, 6.59

Ejemplo 2

A una solución de 20 grs. de hidrocloreuro de dihidroestreptomicina y 6.5 grs. de sulfato amónico en 100 c.c. de agua se añadieron 100 c.c. de metanol. La solución clara

19



191287

resultante se agitó suavemente durante la noche en cuyo tiempo se separó sulfato de dihidroestreptomicina cristalizado. Se añadió una segunda porción de 100 c.c. de metanol, y la mezcla se agitó durante cuatro horas. El producto se filtró, se lavó, con metanol-agua al 50-50, con metanol y se secó a 100° en el vacío, peso 20 grs.

Ejemplo 3

Una solución de 60 grs. de sulfato de dihidroestreptomicine amorfo se ajustó a un pH de 4.5 con ácido sulfúrico diluido, y el volumen se ajustó a 300 c.c. Se añadió metanol a la solución hasta que persistía una ligera turbiedad (se requirieron 175 c.c.). Un gramo de sulfato de dihidroestreptomicina cristalizado se añadió luego y la mezcla se agitó durante 4 horas, durante cuyo tiempo el sulfato de dihidroestreptomicina cristalizado se separó de la solución. En este momento se retiró una muestra del líquido que sobrenadaba y se añadió metanol hasta que existió una ligera turbiedad. Esto requirió 34% de su volumen de metanol indicando que podían añadirse 160 c.c. de metanol sin precipitar sulfato de dihidroestreptomicina amorfo. A la mezcla se añadieron 140 c.c. de metanol (como 90% de lo tolerado) y se continuó la agitación a la temperatura ambiente durante 18 horas. Al final de este tiempo se retiró una muestra del líquido que sobrenadaba y se evaporó a sequedad. El peso obtenido, 1.7 mgrs. por c.c., indicaba que 0.95 grs. o 1.6% del sólido original quedaba en las aguas madres. La mezcla se filtró y el producto se lavó sobre el embudo con una por-



1950

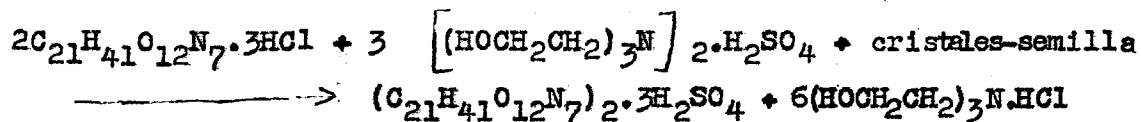
101287

ción de 100 c.c. de agua-metanol 50-50 y cinco porciones de 100 c.c. de metanol, y se secó al vacío. El peso del producto obtenido fué de 58 grs.

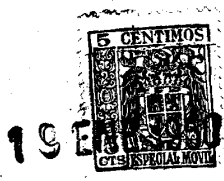
5 Las concentraciones citadas en el ejemplo anterior no son críticas. Se comprenderá que variando la concentración de sulfato de dihidroestreptomicina en agua y la proporción de metanol añadido, pueden obtenerse rendimientos igualmente elevados de producto cristalizado en una amplia gama de condiciones. El factor primordial a tener en cuenta es que
10 la cantidad de metanol no debe exceder la necesaria para producir una ligera turbiedad. Esta cantidad, por supuesto, variará en cada tanda, dependiendo de la concentración real de sulfato de dihidroestreptomicina en la solución de partida.

15 El procedimiento anterior se ha repetido usando como disolvente cada uno de los siguientes: isopropanol, etanol y acetona. Cantidades diferentes de estos disolventes son, desde luego, necesarias para llevar la solución a super-saturación (o turbiedad), pero en cada caso el sembrar la solución y el dejarla reposar con agitación dió como resultado
20 buenos rendimientos de producto cristalizado.

Ejemplo 4



25 A una solución de trietanolamina en metanol se le añadió ácido sulfúrico hasta un pH de aproximadamente 4.5. La solución resultante contenía como 0.1 equivalente de sulfato



101287

de trietanolamina por 100 c.c.

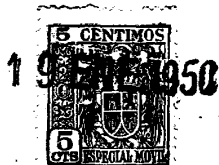
5 A una solución de 90.5 grs. de hidrocloreuro de di-
hidroestreptomocina en 460 c.c. de agua se añadieron 143 c.c.
de solución de sulfato de trietanolamina. La mezcla se sem-
bró con sulfato de dihidroestreptomocina cristalizado y se
añadieron 200 ml. de metanol. La mezcla se agitó durante 48
horas y se añadieron otros 286 c.c. del sulfato de trietano-
lamina. La mezcla se agitó durante otras 48 horas y se fil-
tró y se lavó con metanol. El producto seco, sulfato cris-
10 talizado de dihidroestreptomocina, pesó 80.5 grs.

Ejemplo 5

15 Una solución acuosa de hidrocloreuro de dihidroes-
treptomocina se preparó reduciendo sal doble de cloruro de
estreptomocina y calcio en solución acuosa con hidrógeno en
presencia de catalizador de Adam (óxido de platino), filtran-
do el catalizador, tratando la solución resultante con car-
bonato de plata para efectuar la separación de cloruro de
calcio y filtrando de la mezcla resultante el cloruro de pla-
ta y carbonato de calcio. La solución obtenida se ajustó a
20 pH de 4.5 con ácido clorhídrico. Un análisis de los sólidos
totales indicó una concentración de 377 mgrs. de hidrocloreu-
ro de dihidroestreptomocina por c.c. de solución.

25 Una solución acuosa de sulfato de trietanolamina
se preparó añadiendo una solución acuosa al 50% de ácido sul-
fúrico a una solución acuosa al 50% de trietanolamina. La
solución resultante contenía 2.2 equivalentes por litro.

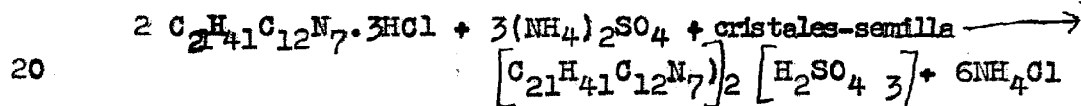
A 300 c.c. de la solución de dihidroestreptomocina



191287

que contiene 113 grs. (0.163 moles) de hidrocioruro de dihidroestreptomocina se añadieron 250 c.c. de solución de sulfato de trietanolamina conteniendo 0.55 equivalentes de trietanolamina (3.37 equivalentes por mol de dihidroestreptomocina) y 540 c.c. de metanol. La mezcla se sembró con sulfato de dihidroestreptomocina cristalizado y se agitó durante cuatro horas. Una muestra del líquido que sobrenadaba se retiró comprobándose que toleraba 62% de su volumen de metanol antes de quedar turbia. Se añadieron 600 c.c. de metanol (89% del volumen tolerado) y la agitación se continuó durante otras doce horas. Al final de este período, una rotación óptica del líquido que sobrenadaba indicó que la concentración residual de dihidroestreptomocina era de 1.7 mgrs. por c.c. o un rendimiento de cristalización de 97.5%. El producto se filtró, se lavó con metanol agua al 50-50, luego con metanol y se secó. El peso del producto obtenido fué de 119.6 grs. o 360 mgrs. por c.c. de solución de partida.

Ejemplo 6



El líquido rico en hidrocioruro de dihidroestreptomocina después de la etapa de tratamiento con carbonato de plata, como se mostró en el ejemplo 5, se ajusta a un pH de 4.5-4.7 y se añaden a la solución 30 grs. de sulfato amónico por 100 grs. de hidrocioruro de dihidroestreptomocina. Una vez que el sulfato amónico se ha disuelto, la solución

19 EN



191287

se trata con carbón activo. Después de filtración, el volú-
men del filtrado se ajusta con agua a la concentración de 200
mgrs. de hidrocloreuro de dihidroestreptomina por c.c. de so-
lución. Se añade metanol gradualmente a la mezcla hasta que
5 queda una ligera turbiedad, lo que usualmente requiere un vo-
lúmen igual de disolvente. Se añaden cristales-semilla de
sulfato de dihidroestreptomina en la cantidad de 2% del pe-
so de la dihidroestreptomina cargada. La mezcla se agita
durante seis a ocho horas. Se añade metanol hasta que el vo-
lúmen total de metanol añadido sea igual a 1 1/2 veces el vo-
lúmen de la solución acuosa al 20%. El sulfato de dihidroes-
treptomina cristalizado se elimina por centrifugación y se
lava con solución de agua-metanol al 50-50, seguido por un la-
vado con metanol. El producto se secó al vacío a 60° C.

15 Ejemplo 7

El procedimiento se repitió como se ha descrito en
el ejemplo 5, usando 5.370 c.c. de la solución de hidrocloreu-
ro de dihidroestreptomina y 4.120 c.c. de una solución de
sulfato de trietanolamina conteniendo 10.5 equivalentes de sul-
fato de trietanolamina (3.72 equivalentes por mol de dihidro-
estreptomina). Se añadió un total de 19 litros de metanol
20 en dos partes iguales. El producto se filtró en una centrifu-
ga de bombona y se lavó con 4 litros de agua-metanol al 50-50
y 4 litros de metanol y se secó. El peso del producto, 2,130
25 grs., corresponde a 376 mgrs. por c.c. de la solución origi-
nal de partida. Corrigiendo para 5% de constituyentes voláti-
les, el rendimiento es de 93% referido al análisis original de



191287

sólidos totales de la solución.

Este procedimiento conduce también a la preparación de sulfato cristalizado y estéril de dihidroestreptomicina, tomando las debidas precauciones al manejar las soluciones y el producto. La preparación de sulfato de dihidroestreptomicina cristalizado de gran pureza es así posible directamente a partir de sal doble cloruro de calcio y de estreptomycinina, usando sólo tres etapas, a saber, reducción; separación de cloruro de calcio; y cristalización.

Se comprenderá también que las concentraciones de dihidroestreptomycinina en agua y metanol pueden variarse dentro de amplios límites sin afectar de un modo serio a la operación práctica del proceso.

Ejemplo 8

Se preparó una solución de 20 grs. de hidrocloreto de dihidroestreptomycinina en 100 c.c. de agua. A la solución se añadieron 8 grs. de dimetilamina y la solución se neutralizó inmediatamente a pH 4.7 con ácido sulfúrico. La solución se diluyó con metanol hasta que se volvió turbia (se requirieron 110 c.c.) se sembró con sulfato de dihidroestreptomycinina cristalizado y se agitó. Después de 12 horas se añadió una porción adicional de 110 c.c. de metanol. Cuatro horas más tarde el líquido claro que sobrenadaba se ensayó, indicando cristalización mayor del 90%. El producto se filtró, se lavó con metanol 80% - agua 20%, luego con metanol y se secó al vacío. Peso, 19-20 grs. (rendimiento 90-95%).

A los técnicos se les ocurrirán diversos cambios y



1 0 1 2 8 7

modificaciones en los procedimientos que anteceden, y en la medida en que tales cambios y modificaciones queden abarcados por las reivindicaciones anejas, ha de entenderse que constituyen parte del invento.

5 Esta solicitud, que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, el 6 de Abril de 1949, bajo el Número 85.946, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto Ley sobre Propiedad Industrial.

----- N O T A -----

10 Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta Patente de Invención en España, son los siguientes:

1º. Sulfato de dihidroestreptomina cristalizado.

15 2º. Sulfato de dihidroestreptomina cristalizado con una estructura característica de difracción a los rayos X y que exhibe las siguientes características adicionales:

Indices de refracción α = 1.552 \pm 0.002

20 β = 1.558 \pm 0.004

γ = 1.566 \pm 0.002



191287

Angulo de extinción = 18°.

3°. El procedimiento de producir sulfato de dihidroestreptomina cristalizado, que comprende preparar una solución acuosa de sulfato de dihidroestreptomina, ajustar el pH de la solución a aproximadamente 4,5, añadir a la solución acuosa una cantidad de un alcohol alcohólico inferior meramente suficiente para producir una ligera turbiedad en la solución, y permitir que la solución repose para cristalización de sulfato de dihidroestreptomina desde la misma.

4°. El procedimiento de producir sulfato de dihidroestreptomina cristalizado, que comprende preparar una solución acuosa de sulfato de dihidroestreptomina, ajustar el pH de la solución a aproximadamente 4,5, añadir a la solución acuosa una cantidad de metanol meramente suficiente para producir una ligera turbiedad en la solución, y permitir que la solución repose para cristalización de sulfato de dihidroestreptomina desde la misma.

5°. El procedimiento de producir sulfato de dihidroestreptomina cristalizado que comprende preparar una solución acuosa de sulfato de dihidroestreptomina con un pH de aproximadamente 4,5, añadir a la solución acuosa una cantidad de un alcohol alcohólico inferior meramente suficiente para producir una ligera turbiedad, y permitir que la solución repose con agitación para cristalización de sulfato de dihidroestreptomina desde la misma.

6°. El procedimiento de producir sulfato de dihidroestreptomina cristalizado, que comprende preparar una so-



1950

191287

lución acuosa de sulfato de dihidroestreptomina con un pH de aproximadamente 4,5, añadir a la solución acuosa una cantidad de metanol meramente suficiente para producir una ligera turbiedad, y permitir que la solución repose con agitación para cristalización de sulfato de dihidroestreptomina desde la misma.

7°. El procedimiento de producir sulfato de dihidroestreptomina cristalizado, que comprende preparar una solución acuosa de sulfato de dihidroestreptomina con un pH de aproximadamente 4,5, añadir a la solución acuosa una cantidad de un alcohol alcohólico inferior, meramente suficiente para producir una ligera turbiedad, y permitir que la solución repose con agitación para cristalización de sulfato de dihidroestreptomina desde la misma, y añadir alcohol adicional de vez en cuando para llevar la cristalización virtualmente a terminación.

8°. El procedimiento de producir sulfato de dihidroestreptomina cristalizado, que comprende disolver en un alcohol alcohólico inferior acuosa otra sal ácida de dihidroestreptomina, y una sal del ácido sulfúrico elegida de la clase que consiste en sulfato amónico y sales del ácido sulfúrico de aminas alcohólicas y alcohilolíficas, para formar una solución con un pH de aproximadamente 4,5, y dejar que la solución repose con agitación para cristalización de sulfato de dihidroestreptomina desde la misma.

9°. El procedimiento de producir sulfato de dihidroestreptomina cristalizado, que comprende disolver en me-



1 01287

5

tanol acuoso otra sal ácida de dihidroestreptomicina, y sulfato amónico, para formar una solución con un pH de aproximadamente 4,5, y dejar que la solución repose con agitación para cristalización de sulfato de dihidroestreptomicina desde la misma.

10

10°. El procedimiento de producir sulfato de dihidroestreptomicina cristalizado, que comprende disolver en metanol acuoso otra sal ácida de dihidroestreptomicina, y una sal del ácido sulfúrico elegida de la clase que consiste en sulfato amónico y sales del ácido sulfúrico de aminas alcohólicas y alcohilofílicas, para formar una solución con un pH de aproximadamente 4,5, y dejar que la solución repose con agitación para cristalización de sulfato de dihidroestreptomicina desde la misma, y añadir alcohol adicional de vez en cuando para llevar la cristalización esencialmente a su terminación.

15

20

11°. En el método de obtener sulfato de dihidroestreptomicina cristalizado, la operación de cristalizar sulfato de dihidroestreptomicina amorfo desde una solución en alcohol alcohílico inferior acuoso.

25

12°. En el método de obtener sulfato de dihidroestreptomicina cristalizado, la operación de cristalizar el producto de reacción entre otra sal ácida de dihidroestreptomicina y una sal del ácido sulfúrico elegida de la clase consistente en sulfato amónico y sales del ácido sulfúrico de aminas alcohólicas y alcohilofílicas en una solución en alcohol alcohílico inferior acuoso, desde dicha solución.



1 01287

13^a. En el método de obtener sulfato de dihidroestrep-
estreptomina cristalizado, la operación de cristalizar el
producto de reacción entre hidrocioruro de dihidroestrepo-
micina y sulfato amónico en solución en metanol acuoso, desde
5 dicha solución.

14^a. El procedimiento de producir sulfato de di-
hidroestrep-
micina cristalizado, que comprende preparar una
solución acuosa que contiene sulfato de dihidroestrep-
micina y con un pH de aproximadamente 4,5, añadir a dicha solu-
10 ción un disolvente orgánico miscible con agua en el cual el
sulfato de dihidroestrep-
micina es al menos tan soluble co-
mo en acetona y en cantidad suficiente para formar una solu-
ción sobresaturada, exponer la solución sobresaturada a cris-
tales-semilla de sulfato de dihidroestrep-
micina y dejar que
15 la solución repose para cristalización de sulfato de dihidro-
estrep-
micina desde la misma.

15^a. El procedimiento de producir sulfato de di-
hidroestrep-
micina cristalizado, que comprende preparar una
solución acuosa que contiene sulfato de dihidroestrep-
micina y con un pH de aproximadamente 4,5, añadir a dicha solu-
20 ción un disolvente orgánico miscible con agua en el cual el
sulfa-to de dihidroestrep-
micina es al menos tan soluble co-
mo en acetona y en cantidad suficiente para formar una solu-
ción sobresaturada, exponer la solución sobresaturada a cris-
25 tales-semilla de sulfato de dihidroestrep-
micina, y dejar que
la solución repose con agitación para cristalización de sulfa-
to de dihidroestrep-
micina desde la misma.



191287

16°. El procedimiento de producir sulfato de dihidroestreptomina cristalizado, que comprende preparar una solución acuosa que contiene sulfato de dihidroestreptomina y con un pH de aproximadamente 4,5, añadir a dicha solución un disolvente orgánico miscible con agua en el cual el sulfato de dihidroestreptomina es al menos tan soluble como en acetona y en cantidad suficiente para formar una solución sobresaturada, exponer la solución sobresaturada a cristales-semilla de sulfato de dihidroestreptomina, dejar que la solución repose con agitación para cristalización de sulfato de dihidroestreptomina desde la misma, y añadir disolvente orgánico adicional durante la cristalización para mantener un estado sobresaturado llevando así la cristalización virtualmente a su terminación.

17°. El procedimiento de producir sulfato de dihidroestreptomina cristalizado, que comprende preparar una solución acuosa que contiene sulfato de dihidroestreptomina y que tiene un pH de aproximadamente 4,5, añadir a dicha solución un disolvente orgánico miscible con agua en el cual el sulfato de dihidroestreptomina es al menos tan soluble como en acetona y en una cantidad suficiente para formar una solución sobresaturada, exponer la solución sobresaturada a cristales-semilla de sulfato de dihidroestreptomina, dejar que la solución repose para cristalización de sulfato de dihidroestreptomina desde la misma, y conducir la cristalización en condiciones estériles obteniendo así sulfato de dihidroestreptomina cristalizado directamente en forma adecuada

19E



191287

para uso terapéutico.

5 18°. El procedimiento de producir sulfato de dihidroestreptomina cristalizado, que comprende preparar una solución acuosa que contiene sulfato de dihidroestreptomina y con un pH de aproximadamente 4,5, añadir a dicha solución una cantidad de un alcohol alcohólico inferior meramente suficiente para producir una ligera turbiedad en la solución, exponer la solución turbia a cristales-semilla de sulfato de dihidroestreptomina, y dejar que la solución repose para cristalización de sulfato de dihidroestreptomina desde la misma.

15 19°. El procedimiento que comprende preparar una solución acuosa que contiene sulfato de dihidroestreptomina y un disolvente orgánico miscible con agua en el cual el sulfato de dihidroestreptomina es al menos tan soluble como en acetona y con un pH de aproximadamente 4,5, ajustar la concentración de dicho disolvente orgánico a una cantidad suficiente para producir una solución sobresaturada, exponer la solución sobresaturada a cristales-semilla de sulfato de dihidroestreptomina, y dejar que la solución repose para cristalización de sulfato de dihidroestreptomina desde la misma.

20 20°. El procedimiento que comprende preparar una solución acuosa que contiene sulfato de dihidroestreptomina y un disolvente orgánico miscible con agua en el cual la solubilidad del sulfato de dihidroestreptomina es al menos tan grande como en acetona y con un pH de aproximadamente 4,5,



E. 1950

1 91287

siendo dicho sulfato de dihidroestreptomicina formado in situ por reacción entre otra sal ácida de dihidroestreptomicina y una sal del ácido sulfúrico seleccionada de la clase consistente en sulfato amónico y sales del ácido sulfúrico de aminas alcohólicas y alcohilolíficas, ajustar la concentración de dicho disolvente orgánico a una cantidad suficiente para producir una solución sobresaturada, exponer la solución a cristales-semilla de sulfato de dihidroestreptomicina, y dejar que la solución repose para cristalización de sulfato de dihidroestreptomicina desde la misma.

21°. El procedimiento que comprende preparar una solución acuosa que contiene sulfato de dihidroestreptomicina y un disolvente orgánico miscible con agua en el cual la solubilidad del sulfato de dihidroestreptomicina es al menos tan grande como en acetona y que tiene un pH de aproximadamente 4,5, siendo dicho sulfato de dihidroestreptomicina formado in situ por reacción entre otra sal ácida de dihidroestreptomicina y una sal del ácido sulfúrico seleccionada de la clase consistente en sulfato amónico y sales del ácido sulfúrico de aminas alcohólicas y alcohilolíficas, ajustar la concentración de dicho disolvente orgánico a una cantidad suficiente para producir una solución sobresaturada, exponer la solución a cristales-semilla de sulfato de dihidroestreptomicina, dejar que la solución repose para cristalización de sulfato de dihidroestreptomicina desde la misma y añadir disolvente orgánico adicional durante la cristalización para mantener dicha solución en estado sobresaturado.



1 01287

22*. El procedimiento que comprende preparar una solución acuosa que contiene sulfato de dihidroestreptomicina y metanol y que tiene un pH de aproximadamente 4,5, siendo dicho sulfato de dihidroestreptomicina formado in situ por reacción entre otra sal ácida de dihidroestreptomicina y una sal del ácido sulfúrico seleccionada de la clase que consiste en sulfato amónico y sales del ácido sulfúrico de aminas alcohólicas y alcohololíficas, ajustar la concentración de metanol a una cantidad meramente suficiente para producir una ligera turbiedad en la solución, exponer la solución a cristales-semilla de sulfato de dihidroestreptomicina, y dejar que la solución repose para cristalización de sulfato de dihidroestreptomicina desde la misma.

23*. El procedimiento de producir sulfato de dihidroestreptomicina cristalizado, que comprende preparar una solución acuosa que contiene otra sal ácida de dihidroestreptomicina, una sal del ácido sulfúrico elegida de la clase consistente en sulfato amónico y sales del ácido sulfúrico de aminas alcohólicas y alcohololíficas, y un disolvente miscible con agua en el cual la solubilidad del sulfato de dihidroestreptomicina es al menos tan grande como en acetona, teniendo dicha solución un pH de aproximadamente 4,5, ajustar la concentración de dicho disolvente orgánico a una cantidad suficiente para producir una solución sobresaturada, exponer la solución sobresaturada a cristales-semilla de sulfato de dihidroestreptomicina, y dejar que la solución repose para cristalización de sulfato de dihidroestreptomicina desde la



1 91287

misma.

24°. El procedimiento de producir sulfato de dihidroestreptomicina cristalizado, que comprende preparar una solución acuosa que contiene hidrocioruro de estreptomicina, sulfato de trietanolamina y metanol, y que tiene un pH de aproximadamente 4,5, ajustar la concentración de metanol en dicha solución a una cantidad meramente suficiente para producir una ligera turbiedad de la solución, exponer la solución turbia a cristales-semilla de sulfato de dihidroestreptomicina, y dejar que la solución repose para cristalización de sulfato de dihidroestreptomicina desde la misma.

25°. El procedimiento de producir sulfato de dihidroestreptomicina cristalizado, que comprende preparar una solución acuosa que contiene hidrocioruro de estreptomicina, sulfato de dimetilamina, y metanol, y con un pH de aproximadamente 4,5, ajustar la concentración de metanol en dicha solución a una cantidad meramente suficiente para producir una ligera turbiedad en la solución, exponer la solución turbia a cristales-semilla de sulfato de dihidroestreptomicina, y dejar que la solución repose para cristalización de sulfato de dihidroestreptomicina desde la misma.

26°. El procedimiento de producir sulfato de dihidroestreptomicina cristalizado, que comprende preparar una solución acuosa que contiene hidrocioruro de estreptomicina, sulfato amónico, y metanol, y con un pH de aproximadamente 4,5, ajustar la concentración de metanol en dicha solución a una cantidad meramente suficiente para producir



191287

una ligera turbiedad de la solución, exponer la solución turbia a cristales-semilla de sulfato de dihidroestreptomocina, y dejar que la solución repose para cristalización de sulfato de dihidroestreptomocina desde la misma.

5

27°. El procedimiento de producir sulfato de dihidroestreptomocina cristalizado, que comprende preparar una solución acuosa que contiene hidrocloreto de estreptomocina, sulfato amónico y metanol, y con un pH de aproximadamente 4,5, ajustar la concentración de metanol en dicha solución a una cantidad meramente suficiente para producir una ligera turbiedad en la solución, exponer la solución turbia a cristales-semilla de sulfato de dihidroestreptomocina, dejar que la solución repose para cristalización de sulfato de dihidroestreptomocina desde la misma, y emplear condiciones estériles en todo el citado proceso obteniendo de este modo sulfato de dihidroestreptomocina cristalizado directamente en una forma adecuada para uso terapéutico.

10

15

28°. Un procedimiento de producir sulfato de dihidroestreptomocina cristalizado.

20

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

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

19 ENE. 1950

Madrid a

P. A.
Alberto de Eizaburu
Por Dofes

M/L/L.