

mo/

201690

201690



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

=====

a favor de

MERCK & CO., INC., - de nacionalidad norteamericana -
 domiciliada en RAHWAY (New Jersey, E.U.) 126 East Lin-
 coln Avenue,

por:

" Procedimiento para la obtención de un sulfato de dihi-
 droestreptomocina "

=====:oOo:=====

M e m o r i a D e s c r i p t i v a

Esta patente se refiere al procedimiento para
 la obtención de una forma de dihidroestreptomocina perfec-
 cionada. Más especialmente esta patente se refiere a nue-



201690

5 vos productos de dihidroestreptomicina constituidos por mezclas de sales del ácido sulfúrico de la dihidroestreptomicina dotados de la propiedad característica y ventajosa de dar con el agua soluciones con un valor pH comprendido entre 7 y 8.

10 El sulfato de dihidroestreptomicina cristalizado de fórmula $(C_{12}H_{41}O_{12}N_7)_2 \cdot 3SO_4H_2$ llamado sesqui-sulfato de dihidroestreptomicina ofrece la propiedad de dar con el agua soluciones acuosas con un pH 4,5 aproximadamente. Aún cuando este pH es algo inferior a la neutralidad no es sin embargo lo suficientemente bajo para presentar dificultades cuando la dihidroestreptomicina se emplea sola para usos terapéuticos o clínicos. Recientemente se ha presentado, sin embargo, la tendencia por parte de la profesión médica a reconocer la conveniencia de administrar dos o más anti-
15 bióticos al mismo tiempo y, en la administración de mezclas de antibióticos, el pH característico de las soluciones acuosas obtenidas con sulfato de dihidroestreptomicina cristalizado constituye una dificultad cuando se desea mezclar
20 esta forma de dihidroestreptomicina con un antibiótico sensible a los ácidos como la penicilina. Es ya sabido, por ejemplo, que la penicilina se destruye o descompone rápidamente a un pH bajo como 4,5.

25 Es, posible preparar un agente terapéutico mixto constituido por sulfato de dihidroestreptomicina cristalizado y penicilina en forma de solución estable añadiendo una gran cantidad de un agente amortiguador para regular el valor pH. Pero la adición de un producto amortiguador en gran cantidad constituye, un inconveniente especialmente cuando la preparación está destinada al uso parenteral.
30 Así pues el sesqui-sulfato de dihidroestreptomicina no se

201630



presta, de por sí, a ser empleado en la práctica en preparaciones de antibióticos mixtos que contengan sustancias sensibles a los ácidos como la penicilina.

5 Se ha intentado modificar el procedimiento de obtención de sesqui-sulfato de dihidroestreptomicina regulando el valor pH de la mezcla en reacción, durante la cristalización del sulfato de dihidroestreptomicina a un pH neutro o ligeramente alcalino. El efecto de dicha regulación, consiste sencillamente, sin embargo, en interferir y prolongar
10 la fase de cristalización y se ha observado que el producto obtenido conserve todavía la característica de formar al ser disuelto en agua soluciones con un pH de aproximadamente 4,5 - 5,0.

15 Conforme con esta invención se ha observado que es posible superar las desventajas mencionadas del sulfato de dihidroestreptomicina cristalizado y obtener un producto de sulfato de dihidroestreptomicina que en solución acuosa presente un pH de 7 a 8 preparando una mezcla de dos sales del ácido sulfúrico de la dihidroestreptomicina, es decir: el sesqui-sulfato de dihidroestreptomicina cristalizado, primeramente preparado, de fórmula $(C_{12}H_{41}O_{12}N_7)_2 \cdot 3SO_4H_2$ y una segunda sal que puede representarse por la
20 fórmula $C_{21}H_{41}O_{12}N_7 \cdot SO_4H_2$ a la que llamaremos en lo sucesivo monosulfato de dihidroestreptomicina. Este nuevo producto puede prepararse ventajosamente haciendo reaccionar
25 entre sí en un disolvente apropiado una sal ácida de dihidroestreptomicina, más soluble que el sulfato de dihidroestreptomicina en el disolvente empleado y una sal del ácido sulfúrico y más especialmente sulfato amónico o cualquier
30 sal del ácido sulfúrico de una alquilamina o de una alquilolamina que sea más soluble en el disolvente que el sulfato de

2851



202690

5 dihidroestreptomocina y regulando en esta reacción la cantidad de la sal del ácido sulfúrico de modo que se introduzca una menor cantidad de sulfato que la necesaria para convertir toda la dihidroestreptomocina en sesqui-sulfato de la fórmula $(C_{21}H_{41}O_{12}N_7)_2 \cdot 3SO_4H_2$ es decir menos de 1,5 moles de sulfato por mol de dihidroestreptomocina.

10 En este sentido se prepara una solución acuosa de una sal de dihidroestreptomocina, como el acetato, formiato, nitrato, hidrobromuro, hidrocloreuro o tartato de dihidroestreptomocina y se añade a esta solución una sal del ácido sulfúrico como sulfato amónico, sulfato de dimetilamina, sulfato de trietanolamina y análogo en cantidad suficiente para conseguir una concentración en sulfato de 1,2 a 1,4 moles por mol de dihidroestreptomocina base.
15 Esta relación molar representa aproximadamente de 80 a 94% de la cantidad de sulfato necesaria para convertir toda la dihidroestreptomocina base en sesqui-sulfato de dihidroestreptomocina.

20 A la solución así obtenida se añade un disolvente orgánico como metanol, etanol, isopropanol, glicol etilénico o acetona para provocar la precipitación, la cristalización o ambas cosas a la vez del sulfato de dihidroestreptomocina. En general puede emplearse cualquier disolvente miscible con el agua en el cual la solubilidad del sulfato de dihidroestreptomocina sea por lo menos tan considerable como en la acetona. Sin embargo se prefiere el empleo del metanol ya que este conduce más fácilmente a la formación de un producto cristalino. El disolvente se añade preferiblemente a porciones, añadiéndose al principio solo una
25 cantidad estrictamente suficiente para producir un enturbiamiento o ligera precipitación o cristalización en la solu-
30

2016 30



ción y añadiendo cantidades adicionales a medida que avanza la precipitación o cristalización hasta que esta es prácticamente completa. Por ejemplo, si se emplea una solución inicial conteniendo hidrocioruro de dihidroestreptomomicina en cantidad equivalente a un 25% de dihidroestreptomomicina base y si se usa metanol como disolvente para provocar la cristalización, la cantidad de metanol añadida inicialmente será aproximadamente de 1,2 veces el volumen de la mezcla en reacción y añadiendo de vez en cuando metanol hasta alcanzar una concentración de metanol de aproximadamente 75% se separa un 95% o más de dihidroestreptomomicina en forma de este nuevo sulfato de dihidroestreptomomicina de elevado valor pH.

El producto filtrado, lavado con metanol y seco presenta un aspecto general cristalino y prácticamente está constituido por una mezcla de sesqui-sulfato de dihidroestreptomomicina cristalizado de fórmula $(C_{21}H_{41}O_{12}N_7)_2 \cdot 3SO_4H_2$ y monosulfato de dihidroestreptomomicina de fórmula $C_{21}H_{41}O_{12}N_7 \cdot SO_4H_2$. Este producto al disolverse en agua forma soluciones del 25 al 50% con un pH aproximado de 7,0 a 8,0. El valor pH obtenido en tales soluciones depende de la composición del sulfato de dihidroestreptomomicina determinada por la cantidad inicialmente empleada de sal del ácido sulfúrico, en la reacción. Estas mezclas pueden variar en los límites de 70 a 85% de sesqui-sulfato de dihidroestreptomomicina de la fórmula $(C_{21}H_{41}O_{12}N_7)_2 \cdot 3SO_4H_2$ y 15 a 30% de monosulfato de dihidroestreptomomicina de fórmula $C_{21}H_{41}O_{12}N_7 \cdot SO_4H_2$, pues las pequeñas cantidades de sal del ácido sulfúrico empleadas producen mayores proporciones de monosulfato de dihidroestreptomomicina con valores pH más elevados en la solución acuosa del producto resultante.

200000



5 Una variante en la obtención de mezclas de sulfatos de dihidroestreptomocina de elevado valor pH, cuando se dispone de cantidades de sulfato de dihidroestreptomocina de bajo valor pH consiste en tratar este último con resinas de cambio amónico en el ciclo hidroxido a fin de separar una cantidad previamente determinada de iones sulfato. Las resinas convenientes comprenden las resinas de cambio aniónico de melamina y fenol formaldehído como las Ionac A-300, Amberlite IR4B, Dowex 1A y Duolite 3A.

10 Este procedimiento por cambio iónico puede llevarse a cabo poniendo en contacto una solución de sulfato de dihidroestreptomocina de bajo valor pH con una resina de cambio aniónico, dotada de una capacidad conocida para los iones sulfato, en cantidad suficiente para separar la cantidad calculada de iones sulfato de la solución de sulfato de dihidroestreptomocina de bajo valor pH. La solución de sulfato de dihidroestreptomocina puede ponerse en contacto con la resina por simple mezcla o por cargas aisladas o bien y preferiblemente haciendo pasar la solución de sulfato de dihidroestreptomocina a través de una columna llena de la resina.

25 Al pasar una solución de sulfato de dihidroestreptomocina a través de una columna de resina se ensaya de vez en cuando la solución fluente para determinar el momento en que aparece por primera vez dihidroestreptomocina. (La solución se ensaya fácilmente en cuanto a la presencia de dihidroestreptomocina añadiendo metanol a una porción de la misma, un enturbiamiento en la mezcla resultante indica la presencia de dihidroestreptomocina). En este momento se suspende preferiblemente la adición de solución por un tiempo de 10 a 15 minutos para permitir que entre la solución



20.000

y la resina se establezca un equilibrio, añadiendo luego el resto de la solución a través de la columna mientras se recoge la solución fluuyente resultante. Recogida toda la solución se hace pasar a través de la columna una cierta cantidad de agua para separar de la columna todo el sulfato de dihidroestreptomocina residual y las aguas de lavado junto con la solución recogida se hacen cristalizar para obtener de ellas el sulfato de dihidroestreptomocina de valor pH elevado. Así, regulando la concentración de esta solución a 20% aproximadamente de dihidroestreptomocina base y añadiendo unos tres volúmenes de metanol cristaliza una mezcla de sulfatos de dihidroestreptomocina del valor pH elevado que se deseaba es decir comprendido entre 7 y 8.

Se comprenderá que la obtención de sulfato de dihidroestreptomocina de alto valor pH por cambio iónico tal como se ha descrito si bien es claramente ventajosa cuando se dispone de sulfato de dihidroestreptomocina de bajo valor pH, implica una fase adicional e innecesaria cuando el nuevo sulfato de valor pH elevado se prepara a partir de otras sales de dihidroestreptomocina, por ejemplo el hidrocloreuro de dihidroestreptomocina. Cuando se parte de una sal diferente de dihidroestreptomocina, el gobierno conveniente de la reacción de intercambio, tal como se describe conduce directamente al sulfato de dihidroestreptomocina del deseado valor pH elevado. Sin embargo, el proceso de intercambio antes descrito requiere efectivamente un tratamiento suplementario para regular la composición de la mezcla de sulfatos de dihidroestreptomocina de pH elevado en el caso en que el producto obtenido por intercambio contenga una proporción excesiva de sequi-



sulfato es decir más de 85%.

En los siguientes ejemplos puede verse la forma en que se lleva a la práctica este nuevo procedimiento pero se comprenderá que los mismos se dan únicamente como ilustración y no en sentido alguno limitativo.

EJEMPLO I.

Una cantidad de hidrocioruro de dihidroestreptomina rico en agua fué retirado de las operaciones normales de fábrica para la obtención del sulfato de dihidroestreptomina de pH bajo, después de ser sometido a tratamiento por carbonato de plata para separar todo el cloro libre. Este hidrocioruro rico en agua contenia 34,6% de materia sólida y 25,2% de dihidroestreptomina base (determinada por rotación óptica). Varias porciones de 160 cc. de este producto rico en agua, es decir porciones que contenian 40 gr. o 0,0686 moles de dihidroestreptomina base se ajustaron a pH 9,2 por adición de 21 cc. de solución 6 N de amoniaco. El volumen de cada porción fué establecido luego a 200 cc. A una de estas soluciones se añadieron 12,60 gr. (0,096 moles) de sulfato amónico. Esta cantidad de sulfato amónico corresponde a 93,3% de la cantidad calculada necesaria para la total conversión del hidrocioruro de dihidroestreptomina en sesqui-sulfato de dihidroestreptomina de la fórmula $(C_{21}H_{41}O_{12}N_7)_2 \cdot 3SO_4H_2$. A la solución resultante se añadió, agitando, metanol para hacer cristalizar el sulfato de dihidroestreptomina. La cantidad de metanol necesaria para producir el enturbiamiento inicial fué de unos 360 cc. (1,8 volúmenes). Se continuó la agitación añadiendo de vez en cuando nuevas cantidades de metanol hasta que la concentración en este fué aproximadamente de 75%, momento en el cual nuevas adiciones de me-

201090



tanol no produjeron enturbiamiento en la solución o mezcla de reacción. Se filtró el producto cristalizado se lavó con una mezcla a partes iguales de metanol y agua y se secó obteniéndose 49 gr. de un producto conteniendo 38,2 gr. de dihidroestreptomicina base (determinada por rotación óptica). Esto representa una recuperación de la dihidroestreptomicina de 95,5%. Este producto disuelto en agua produce una solución a 25% con un valor pH de 7,3 y una solución a 50% con un valor pH de 7,5.

Otras porciones de la solución inicial se trataron con 11,78 gr. y 10,87 gr. respectivamente de sulfato amónico siguiendo el procedimiento descrito. En la siguiente tabla se indican los resultados obtenidos:

15	Sulfato amónico empleado	Dihidroestreptomicina base empleada	Producto cristalizado	Base contenida en el producto (por rotación % Gramos.)	
	R/M .) Gramos.	Gramos.	Gramos.	%	Gramos.
	1,2	10,87	40	78	33,4
	1,3	11,78	40	78,2	36,5
20	1,4	12,68	40	78	38,2
	Rendimiento %	Valor pH del producto final solución a			
		25 %	50 %		
	83,5	7,7	7,9		
	91,4	7,4	7,6		
25	95,5	7,3	7,5		

.) R/M = Relación molar (moles por mol de dihidroestreptomicina base).

EJEMPLO II.

Una determinada cantidad del sulfato de dihidro-



202090

estreptomycin de valor pH elevado obtenido en el ejemplo I (el producto que produce soluciones a pH 7,3 y 7,5) se hizo recristalizar del metanol acuoso por diversos procedimientos a fin de determinar la influencia de la concentración de la solución y de la concentración en metanol sobre el rendimiento de la cristalización. Se prepararon soluciones del sulfato de dihidroestreptomycin de pH elevado conteniendo 18,5, 20 y 25% de sólido total y de ellas se hizo cristalizar el sulfato de dihidroestreptomycin por adición de diferentes cantidades totales de metanol. En cada caso se filtró el producto cristalizado, se lavó con unos 3 cc. por gramo de metanol y se secó an el vacio a 65° C. En la tabla siguiente se indican los rendimientos en producto cristalizado y las cantidades de sulfato de dihidroestreptomycin residuales en las soluciones madre.

Solución de dihidroestreptomycin. Sólido total.	Concentración final en metanol.	Rendimiento por ciento, por rotación optica.	Dihidroestreptomycin en las soluciones madre % por rotación optica.
18,5%	66%	95,3	4,1
	75%	98,0	2,6
20,0%	55%	93,2	4,6
	66%	95,0	3,2
	75%	97,4	1,5
25,0%	66%	95,8	1,9
	75%	98,6	1,2

Los datos anteriores indican que la cristalización óptima de sulfato de dihidroestreptomycin de valor pH elevado se obtiene con una concentración final en metanol de unos 75%. Como comparación diremos que la cristalización óptima del sulfato de dihidroestreptomycin de pH bajo de la fórmula $(C_{21}H_{41}O_{12}N_7)_2 \cdot 3SO_4H_2$ se obtiene con una concentración final en metanol de 55% aproximadamente.

201090



EJEMPLO III.

Unos 150 cc. (100 gr.) de una resina de cambio anionico, Ionac A-300, resina tipo de base débil melamina, fabricada por la American Cyanamid Co. fué preparada en una columna y tratada con 450 cc. de ácido sulfúrico 10%, 450 cc. de agua y con 450 cc. de hidrato sódico a 10% a fin de convertir la resina al ciclo hidroxido. Se hicieron pasar a través de la columna 760 cc. de una solución a 40% de sulfato de dihidroestreptomocina de bajo valor pH conteniendo 210 gr. de dihidroestreptomocina base, determinada por rotación óptica, a una velocidad de 12,5 cc. por minuto (tiempo de contacto 12 minutos). La adición del sulfato de dihidroestreptomocina se efectuó rápidamente hasta que se comprobó positivamente su presencia en el líquido fluyente (la presencia de sulfato de dihidroestreptomocina se demuestra por la formación de un precipitado al añadir metanol a la solución). Se interrumpió entonces la circulación de líquido y se dejó el todo en reposo durante unos 15 minutos antes de renudar la operación. Se añadió entonces el resto de solución inicial a la columna y se recogió el líquido fluyente conteniendo sulfato de dihidroestreptomocina de valor pH elevado. Cuando se hubieron añadido a la columna la totalidad de los 700 cc. de solución, se lavó la columna con 450 cc. de agua y el líquido resultante se combinó con el principal o primeramente obtenido. La solución combinada contenía 200,6 gr. de dihidroestreptomocina base, determinada por rotación óptica, representando una recuperación del 95% en el tratamiento por la resina.

En este procedimiento el líquido inicialmente pasado por la columna y lo recogido presentaba un valor pH entre 10,4 y 10,8 mientras que la solución principal pre-

201890



5 sentó un pH de 7,5 a 7,6. Cuando el líquido y las aguas de lavado se diluyeron para obtener una solución a 20% de sulfato de dihidroestreptomina y se cristalizó este producto, por adición de tres volúmenes de metanol, el producto cristalizado obtenido constituyó el deseado producto de valor pH elevado que disuelto en agua a la concentración de 25% aproximadamente dió una solución de un valor pH de 7,4 aproximadamente.

10

-----/: N O T A :/-----

Se reivindica como objeto de esta patente:

15 1.- Procedimiento para la obtención de un sulfato de dihidroestreptomina, que una vez disuelto en agua produce una solución con un valor pH relativamente elevado que consiste en convertir una sal de dihidroestreptomina en una mezcla que contiene sesqui-sulfato de dihidroestreptomina y mono-sulfato de dihidroestreptomina.

20 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, en el cual dicha mezcla disuelta en agua produce una solución con un valor pH comprendido entre 7 y 8.

25 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, por el cual dicha sal de dihidroestreptomina se convierte en una mezcla de 70-80% de sesqui-sulfato de dihidroestreptomina y 15-30% de monosulfato de dihidroestreptomina.

30 4.- Procedimiento para la obtención de un sulfato de dihidroestreptomina de alto valor pH que consiste en hacer reaccionar entre sí en un medio disolvente orgánico-acuoso una sal de dihidroestreptomina más soluble en dicho disolvente que el sulfato de dihidroestreptomina y sulfato amónico o una sal del ácido sulfúrico de un alquil



201635

o alquilol amina más soluble que el sulfato de dihidroestrep-
tomicina en dicho medio disolvente, siendo la relación mole-
cular entre el ion sulfato en la mezcla de reacción y la di-
hidroestreptomycinina menor que 1,5.

5 5.- Procedimiento según la reivindicación 4, en
el cual la relación molecular entre el ion sulfato en la mez-
cla de reacción y la dihidroestreptomycinina es de 1,2 a 1,4.

10 6.- Procedimiento para la obtención de un sulfato
de dihidroestreptomycinina de alto valor pH que consiste en
añadir a una solución acuosa de una sal de dihidroestrepto-
micina sulfato amónico o una sal del ácido sulfúrico de una
alkil o alquilol amina más soluble que el sulfato de dihidro-
estreptomycinina, siendo dicha sal de dihidroestreptomycinina más
soluble que el sulfato de dihidroestreptomycinina y siendo la
15 relación molecular entre el ion sulfato en la mezcla de reac-
ción y la dihidroestreptomycinina menor de 1,5 y precipitar el
sulfato de dihidroestreptomycinina de pH elevado contenido en
la mezcla de reacción por adición de un disolvente orgánico
miscible con el agua.

20 7.- Procedimiento según la reivindicación 6, en
el cual la relación molecular entre el ion sulfato en la mez-
cla de reacción y la dihidroestreptomycinina es de 1,2 a 1,4
aproximadamente.

25 8.- Procedimiento según la reivindicación 6, se-
gún el cual el disolvente orgánico se añade por porciones y
el sulfato de dihidroestreptomycinina de pH elevado se separa
en forma de un precipitado esencialmente cristalino.

9.- Procedimiento según la reivindicación 6, en
el cual el disolvente empleado es el metanol.

30 10.- Procedimiento para la obtención de un sulfa-
to de dihidroestreptomycinina de alto valor pH, que consiste en

2016 20
50



añadir a una solución acuosa de una sal de dihidroestrep-
tomicina, sulfato amónico o una sal del ácido sulfúrico de
una alquil o alquilol amina más soluble que el sulfato de di-
hidroestreptomina, siendo dicha sal de dihidroestreptomi-
5 cina más soluble que el sulfato de dihidroestreptomina y
siendo la relación molecular entre el ion sulfato en la mez-
cla de reacción y la dihidroestreptomina menor de 1,5,
añadir a la mezcla de reacción unos 1,8 volúmenes de metanol
produciéndose así la separación de un precipitado esencial-
10 mente cristalino y aumentar gradualmente la concentración
en metanol hasta unos 75% para asegurar la máxima recupera-
ción de sulfato de dihidroestreptomina esencialmente cris-
talino y de elevado valor pH.

11.- Procedimiento para la obtención de un sulfa-
15 to de dihidroestreptomina de elevado valor pH, que consis-
te en añadir sulfato amónico a una solución acuosa de hidro-
cloruro de estreptomina en cantidad de unos 1.2 a 1.4 mo-
les por mol de dihidroestreptomina y precipitar sulfato
de dihidroestreptomina de elevado valor pH por adición de
20 un disolvente orgánico miscible con el agua.

12.- Procedimiento según la reivindicación 11,
en el cual el disolvente precipitante es el metanol.

13.- Procedimiento para la obtención de un sul-
fato de dihidroestreptomina de elevado valor pH que con-
25 siste en añadir sulfato amónico a una solución acuosa de hi-
drocloruro de dihidroestreptomina en cantidad de 0,2 a 1,4
moles por mol de dihidroestreptomina; añadir a la mezcla
de reacción unos 1,8 volúmenes de metanol provocando así
la separación de un precipitado esencialmente cristalino y
30 aumentar gradualmente la concentración de metanol hasta
unos 75% para asegurar la máxima recuperación de un sulfato
de dihidroestreptomina esencialmente cristalino y de ele-

201630



vado valor pH.

14.- Procedimiento para la obtención de un sulfato de dihidroestreptomina de elevado valor pH, que comprende poner en contacto una solución de sulfato de dihidroestreptomina de bajo valor pH con una resina de cambio anionico con una capacidad conocida para el ion sulfato y en cantidad suficiente para separar de dicha solución una cantidad calculada de ion sulfato y hacer cristalizar de la solución resultante sulfato de dihidroestreptomina de valor pH elevado por adición de un disolvente orgánico miscible con el agua.

15.- Procedimiento para la obtención de un sulfato de dihidroestreptomina de elevado valor pH, que consiste en poner en contacto una solución acuosa de sesqui-sulfato de dihidroestreptomina con una cantidad calculada de una resina de cambio anionico con una capacidad conocida para el ion sulfato, a fin de convertir una cantidad proporcional de dicho sesqui-sulfato en monosulfato de dihidroestreptomina.

16.- Procedimiento para la obtención de un sulfato de dihidroestreptomina.

Esta memoria consta de quince páginas, escritas por una sola cara.

BARCELONA,

P.A.