

223 309

P - 13.586.-

A. 12987.-
Case U.S. 447.639.-

223 309

29 DIC. 1955



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

por VEINTE años

a nombre de COMMERCIAL SOLVENTS CORPORATION, entidad norteamericana, establecida en 260, Madison Avenue, Nueva York, N.Y., Estados Unidos de América, por:

" UN PROCEDIMIENTO PARA RECUPERAR CICLOSERINA " .-

-0-

El invento se refiere a la cicloserina antibiótica y, más particularmente, se refiere a un procedimiento para separar cicloserina desde el medio nutricional en el cual se produce.



223309

La cicloserina antibiótica es un agente antibacteriano de amplio espectro que posee actividad contra bacterias gram-negativas y bacterias gram-positivas, con inclusión de micobacterias tales como Mycobacterium Ranae. El nuevo antibiótico se produce por una especie de microorganismo que ha sido denominado Streptomyces orchidaceus. El antibiótico es una sustancia anfótera que posee grupos débilmente ácidos y débilmente básicos, siendo el antibiótico muy soluble en agua, parcialmente soluble en glicoles, alcohol isopropílico, metanol, etanol y acetona. El material es insoluble en hexano, benceno, cloroformo, éter, éter de petróleo, dioxano, 1-butanol, acetato de etilo y dicloruro de etileno. El antibiótico funde con descomposición a unos 153°C y se hidroliza a 140°C con ácido clorhídrico 1N.

En la producción de la nueva cicloserina antibiótica, el microorganismo Streptomyces orchidaceus se cultiva en un medio nutritivo. Un medio que contenga una reserva adecuada de proteína y una reserva adecuada de carbohidrato es satisfactorio para la producción de cicloserina suministrándose aire al medio que se incubaba a una temperatura entre unos 20 y 30°C.

Se ha descubierto ahora un método para la recuperación de la cicloserina antibiótica desde soluciones acuosas impuras de la misma que incluyen medios nutritivos en los cuales se produce. El nuevo método es conveniente, económico y eficaz para separar buenos rendimien-



223309

tos del antibiótico en forma amorfa o cristalina.

El nuevo procedimiento para separar cicloserina desde sus soluciones acuosas impuras con inclusión de medios nutricios en los cuales se produce, implica en esencia la adsorción del antibiótico desde la solución acuosa impura sobre una resina de permutación aniónica fuertemente básica en la forma de hidróxido, elución del antibiótico desde la resina de permutación aniónica, formación de una sal metálica intermedia insoluble en agua de cicloserina, descomposición de la sal metálica y disolución del antibiótico seguida por secado por congelación bajo vacío para obtener el antibiótico en forma amorfa o cristalización del antibiótico por adición de un disolvente miscible con agua a una solución acuosa del antibiótico.

Para llevar a cabo el invento, filtramos primero o clarificamos de otros modos la solución acuosa impura de cicloserina. Preferimos filtrar y decolorar la solución con carbón activo. Como hemos indicado antes absorbemos luego el antibiótico desde la solución acuosa sobre una resina de permutación aniónica fuertemente básica en la forma de hidróxido. Las resinas de permutación aniónica fuertemente básicas adecuadas, que pueden emplearse incluyen Dowex-1, Dowex-2, producidas ambas por Dow Chemical Company, Midland, Michigan, (Estados Unidos) y Amberlite XE-75, Amberlite XE-98, Amberlite IRA-400, Amberlite IRA-410, producidas por



223309

Rohm & Haas Company, Filadelfia, Pensilvania, (Estados Unidos).

Después de la adsorción del antibiótico sobre la resina de permutación aniónica fuertemente básica, eluimos luego el antibiótico desde la resina empleando una solución acuosa de un material que tenga un anión capaz de desplazar cicloserina desde la resina, siendo dicho anión distinto del OH^- . Los materiales de elución adecuados incluyen sulfatos, cloruros, acetatos, formiatos, fosfatos, citratos, osalatos, etc., solubles en agua y ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fórmico, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido oxálico, etc., El procedimiento para adsorber cicloserina sobre la resina de permutación aniónica está dentro de la técnica, siendo un método conveniente hacer pasar la solución acuosa del antibiótico a través de una columna que contiene la resina hasta que haya sido adsorbida sobre la resina la cantidad máxima del antibiótico como se indica por una solución de continuidad del antibiótico que se encuentra entonces en cantidades crecientes en el efluente de la columna. Al eluir el antibiótico desde la resina, el agente de elución en solución acuosa es hecho pasar a través de la columna hasta que el antibiótico haya sido eluido por completo como es puesto de manifiesto por cantidades decrecientes y, finalmente, por la ausencia del antibiótico en el efluente del eluato.

Después de la elución del antibiótico



223309

desde la resina de permutación aniónica, decoloramos el eluato con carbón activo si es preciso y precipitamos luego el antibiótico desde la solución acuosa como sal metálica insoluble. Al llevar a cabo esta operación del proceso, añadimos a la solución acuosa de cicloserina una sal metálica soluble en agua de un metal que forme una sal insoluble con el antibiótico precipitando así la sal metálica de cicloserina. Antes de la adición de la sal metálica a la solución de cicloserina, ajustamos el pH de la solución de cicloserina a un valor entre 5,5 y 9 aproximadamente y reajustamos el pH a un valor dentro de esta gama después de la adición de la sal metálica. Preferimos emplear un pH de 6,5. A un pH inferior a 5,5, se forma muy poca sal metálica insoluble de cicloserina mientras que a un pH superior a 9 se forman cantidades excesivas de hidróxido metálico al añadir la sal acuoso-luble metálica a la solución acuosa de cicloserina. Se ha visto que los metales que forman sales insolubles con la cicloserina antibiótica incluyen plata, cobre, mercurio, cinc, plomo, aluminio y cobalto y, por tanto, pueden añadirse sales solubles en agua de estos metales a una solución acuosa del antibiótico cicloserina y el antibiótico precipitará como sal de metal empleado. Las sales adecuadas solubles en agua de los diversos metales arriba mencionados incluyen nitrato de plata, cloruro cúprico, sulfato de cobre, acetato mercurico, nitrato de cinc, sulfato de cinc, acetato de plomo, nitrato de plomo, cloruro de aluminio, nitrato de cobalto, cloruro de cobalto, sulfato



223309

de cobalto, etc.

Es evidente, por supuesto, que pueden precipitarse sales metálicas insolubles de la cicloserina antibiótica desde cualquier solución acuosa del antibiótico y hemos encontrado que podemos precipitar el antibiótico como sal metálica insoluble desde un medio nutritivo clarificado en el cual se produce sin necesidad de adsorber el antibiótico sobre una resina de permutación aniónica y de eluir desde ella el antibiótico. Cuando se emplea tal procedimiento, filtramos el medio nutritivo en el cual se produce el antibiótico y luego lo clarificamos empleando carbón activo, haciendo una papilla con el carbón en el medio nutritivo filtrado y separando luego desde él por filtración el carbón activo para dar una solución acuosa parcialmente purificada del antibiótico. Podemos precipitar el antibiótico desde el medio nutritivo clarificado como sal metálica insoluble, según hemos descrito.

Después de la precipitación de la cicloserina y de la retirada de la sal metálica insoluble desde el líquido que sobrenada, hacemos entonces una papilla con agua y la sal metálica insoluble y le añadimos un material capaz de precipitar el ión metálico como sal insoluble poniendo así en libertad la cicloserina que pasa a solución en el agua presente. Por ejemplo, si hemos precipitado la cicloserina como sal de plata, podemos hacer una papilla con la sal de plata de cicloserina en agua y añadir ácido clorhídrico a la misma. La plata precipita



223309

como cloruro de plata mientras que la cicloserina pasa a
solución acuosa en la forma ácida libre. Si se emplea su-
ficiente ácido clorhídrico, la cicloserina puede convertir-
se en el hidroccloruro al mismo tiempo que la plata es
5 precipitada como cloruro de plata. Del mismo modo, puede
emplearse sulfuro de hidrógeno, precipitando la plata
como sulfuro de plata y pasando la cicloserina al agua
presente. Puede emplearse una combinación de agentes de
precipitación del metal, es decir, que pueden usarse tan-
10 to ácido clorhídrico como sulfuro de hidrógeno para asegu-
rar la separación completa de la plata. Si la sal de co-
bre insoluble de la cicloserina se lleva a la forma
de papilla en agua y se añade sulfuro de hidrógeno, el
cobre precipitará como sulfuro de cobre, y la cicloserina
15 pasará a solución en el agua presente. Análogamente, pue-
de precipitarse mercurio como sulfuro y los otros meta-
les pueden separarse en forma similar.

Después de la separación del ión metálico
usado en la formación de la sal metálica insoluble del
20 antibiótico, la solución acuosa del antibiótico se de-
colora preferiblemente si es preciso y luego se seca por
congelación bajo vacío para obtener un preparado amorfo
de pureza muy grande. La forma amorfa es adecuada para
la mayoría de los usos del material antibiótico.

25 La cicloserina antibiótica puede crista-
lizarse desde solución acuosa en lugar de obtenerse en



1955

223309

la forma amorfa. El material se cristaliza añadiendo un disolvente miscible con agua a una solución acuosa purificada del antibiótico, siendo el material antibiótico insoluble o solo ligeramente soluble en el disolvente miscible con agua. Los disolventes adecuados miscibles con agua que pueden emplearse para cristalizar cicloserina desde soluciones acuosas incluyen acetona, metanol, dioxano etc.,

Los ejemplos siguientes se dan para ilustrar la separación de cicloserina desde sus soluciones acuosas impuras. No pretendemos limitarnos a los materiales específicos o a los procedimientos específicos mostrados y en cambio deseamos que el invento incluya todos los equivalentes dentro del alcance de esta Memoria y de las reivindicaciones anejas.

EJEMPLO I.

Una parte de 340 litros de medio nutritivo en el cual se había producido cicloserina y que contenía 4,8 unidades de cicloserina por mililitro se filtró y se hizo pasar a través de una columna que contenía 10 litros de Dowex-2 (una resina de permutación aniónica fuertemente básica) en la forma de OH^- a una proporción de paso de 1.200 mls. por minuto. Luego, la columna fué lavada con agua y la cicloserina se eluyó desde la resina con ácido sulfúrico 0,2 N en una proporción de 1.200 mls. por minuto, recogién dose el eluato en 18 fracciones de dos litros. El pH de las fracciones del eluato se ajustó luego a aproxi-



223309

madamente 7 después de lo cual se mezcló 1% en peso de carbón decolorante con la fracción de eluato y luego se filtró desde ella. Al eluato decolorado se añadieron entonces 0,5 mlg. de nitrato de plata por unidad de actividad antibiótica contenida en el eluato, manteniéndose el pH a 6,5 con hidróxido sódico. Desde el eluato precipitó un derivado cristalizado de plata y de cicloserina y se secó bajo vacío.

La tabla siguiente da los resultados para 9 de las citadas reacciones de eluato.

TABLA

<u>Eluato Nº</u>	<u>Eluato Vol./ml</u>	<u>Potencia Unidades/ml.</u>	<u>Filtrado decolorado Vol/ml</u>	<u>Potencia Unidades/ml.</u>	<u>AgNO₃ Gramos</u>	<u>Prod. Gramos</u>	<u>Potencia Unidades/mg.</u>
10	2260	15	2400	12	22,6	12,8	1,92
11	2280	27	--	21	24,0	24,4	1,23
12	2180	34	2340	31	35,0	33,9	1,80
13	2020	47	2120	-	43,4	29,7	2,12
14	2220	55	2400	-	53,3	38,2	2,5
15	2160	32	2465	28	35,7	29,4	2,4
16	2130	25	2370	20	28,8	24,4	2,0
17	2050	17	2220	13	22,6	21,8	1,18
18	1960	11	2100	8	12,7	10,4	0

Una porción de 10 grs. del derivado cristalizado de plata del eluato 14 mostrado en la citada tabla se mezcló con 60 mls. de agua y a esta mezcla se añadieron 89 mls. de ácido clorhídrico 0,5165 N. Precipitó cloruro



1955

223309

de plata desde la solución y se retiró de ella por filtración. La solución restante se seco por congelación bajo vacío para obtener 4,4 grs. de cicloserina amorfa sólida que arrojó 5,15 U/mlg.

5 EJEMPLO II.

Una porción de 1 gr. de la cicloserina amorfa obtenida como hemos descrito antes en el ejemplo I se disolvió en 7,5 mls. de agua y a esta solución se añadieron 5 mls. de acetona. Desde la solución precipitó 10 cicloserina cristalizada, después de lo cual se añadieron otros 5 mls. de acetona para asegurar la cristalización completa. Los cristales se separaron por filtración desde la solución y se lavaron con acetona para dar 0,6177 grs. de cristales secados al aire que arrojaron 4,32 U/mgr. y 15 que contenían 14% de humedad. Al eliminar la humedad por secado, el material arrojó 5,02 U/mgr.

EJEMPLO III.

Una porción de 102 mls. de medio nutricio que contenía 5 U/ml. de cicloserina se mezcló con 4% 20 de carbón activo, y la mezcla se agitó y se filtró. Al filtrado se le añadieron 170 mlgr. de nitrato de plata y la sal de plata de cicloserina precipitó en forma de pequeños cristales blancos. Los cristales se filtraron y se secaron para obtener 160 mlg. de sal cristalizada de plata y cicloserina. La sal cristalizada de plata y cicloserina se 25 llevó luego a la forma de papilla con 10 mls. de agua y se añadieron 1,47 mls. de ácido clorhídrico 0,505 N. Pre-



223309

precipitó cloruro de plata desde la solución y se centrifugó desde ella. La solución remanente se trató con carbón activo y luego se secó por congelación bajo vacío, para obtener hidrocioruro de cicloserina que arrojó 4,85 U/mgr.

5 EJEMPLO IV.-

Una solución acuosa de 100 mls. de cicloserina que contenía 88 U de cicloserina por ml. se mezcló con 4,89 grs. de sulfato de cobre y el pH se ajustó a 6,7 con hidróxido sódico. Se formó un precipitado de la sal de cobre de cicloserina y se filtró, se lavó con acetona y se secó para obtener 3,92 grs. de la sal de cobre de cicloserina que arrojó 1,88 U/mgr. Una porción de 1 gr. de la sal de cobre de cicloserina se puso en suspensión en 20 mls. de agua y se hizo burbujear sulfuro de hidrógeno a través de la suspensión durante 5 minutos. Precipitó sulfuro de cobre insoluble desde la solución y se separó por filtración, secándose el filtrado por congelación bajo vacío para obtener 0,457 grs. de cicloserina que arrojaron 3,3 U/mgr.

20 Esta solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América el 3 de Agosto de 1954 bajo el nº 447.639 se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.



223309

- O - N O T A - O -

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

5

1ª.- Un procedimiento para recuperar cicloserina, que comprende precipitar cicloserina desde una solución acuosa impura de la misma, como una sal metálica insoluble, separar la sal de cicloserina precipitada del líquido que sobrenada, mezclar la sal insoluble en agua de cicloserina, con agua, precipitar el ión metálico de la sal insoluble de cicloserina como sal insoluble en agua, y recuperar cicloserina de la solución acuosa resultante purificada de la misma.

10

15

2ª.- Un procedimiento para recuperar cicloserina desde una solución acuosa impura de la misma, que comprende añadir una sal soluble en agua de un metal capaz de formar una sal de cicloserina insoluble en agua, a una solución acuosa impura de cicloserina a un pH que va desde 5,5 a 9,0, separar la sal metálica de cicloserina precipitada del líquido que sobrenada, hacer una papilla con la sal metálica insoluble en agua de cicloserina y agua,

20



223309

añadir a la papilla un ácido que tenga un anión capaz de formar una sal insoluble en agua con el catión metálico de la sal metálica de cicloserina insoluble en agua, separar la sal metálica precipitada insoluble en agua, y recuperar cicloserina desde la solución acuosa purificada de la misma.

5
10
15
20

3^a.- Un procedimiento para recuperar cicloserina desde una solución acuosa impura de la misma, que comprende adsorber la cicloserina desde la solución acuosa impura de la misma, sobre una resina fuertemente básica de cambio aniónico en la forma de OH^- , eluir la cicloserina de la resina con un anión diferente al OH^- , precipitar cicloserina desde el eluato acuoso como sal metálica insoluble, separar la sal metálica precipitada de cicloserina del líquido que sobrenada, hacer una papilla con la sal metálica de cicloserina insoluble en agua, y agua, precipitar el ión metálico de la sal insoluble de cicloserina como sal insoluble en agua, y recuperar cicloserina desde la solución acuosa resultante purificada de la misma.

25

4^a.- Un procedimiento para recuperar cicloserina desde una solución acuosa impura de la misma, que comprende adsorber cicloserina desde una solución acuosa impura de la misma, sobre una resina fuertemente básica de permutación aniónica en la forma de OH^- , eluir la cicloserina desde la resina con un anión diferente al OH^- , añadir al eluato acuoso resultante a un pH que va



223309

desde 5,5 a 9,0 una sal soluble en agua de un metal ca-
paz de formar una sal de cicloserina insoluble en agua,
separar la sal precipitada metálica de cicloserina inso-
luble en agua del líquido que sobrenada hacer una papi-
5 lla con la sal metálica de cicloserina insoluble en agua,
y agua precipitar el ión metálico de la sal metálica
de cicloserina insoluble en agua como sal insoluble en
agua y recuperar cicloserina desde la solución acuosa
resultante purificada de la misma.

10 5^a.- Un procedimiento para recuperar
cicloserina desde una solución acuosa impura de la misma
que comprende añadir nitrato de plata a una solución
acuosa impura de cicloserina, a un pH que va desde 5,5
a 9,0, separar del líquido que sobrenada la sal de pla-
15 ta precipitada de cicloserina, hacer una papilla con la
sal de plata de cicloserina en agua, añadir ácido clor-
hídrico a la papilla, separar de la solución el cloruro
de plata precipitado, y recuperar cicloserina purificada
desde la solución acuosa resultante purificada de la mis-
20 ma.

25 6^a.- Un procedimiento para recuperar
cicloserina desde una solución acuosa impura de la misma,
que comprende añadir nitrato de plata a una solución acuo-
sa impura de cicloserina, a un pH de aproximadamente 6,5,
separar la sal de plata precipitada de cicloserina del
líquido que sobrenada hacer una papilla con la sal de pla-
ta de cicloserina en agua, añadir ácido clorhídrico a la



223309

5 papilla, separar el cloruro de plata precipitado de la solución, añadir un disolvente orgánico miscible con agua, el cual es un no disolvente para la cicloserina, a la solución acuosa purificada de cicloserina, y recuperar cristales de cicloserina que se forman.

10 7^a.- Un procedimiento para recuperar cicloserina desde una solución acuosa impura de la misma, que comprende añadir una sal de cobre soluble en agua a una solución acuosa impura de cicloserina a un pH que va desde 5,5 a 9,0, separar la sal de cobre precipitada de cicloserina del líquido que sobrenada, hacer una papilla con la sal de cobre de cicloserina con agua, añadir sulfuro de hidrógeno a la papilla, separar el sulfuro de cobre precipitado de la solución, y recuperar
15 cicloserina de la solución acuosa resultante purificada de la misma.

20 8^a.- Un procedimiento para recuperar cicloserina desde una solución acuosa impura de la misma, que comprende adsorber cicloserina desde una solución acuosa impura de la misma sobre una resina fuertemente básica de permutación aniónica en la forma de OH^- , separar la cicloserina de la resina por elución con un anión diferente al OH^- , añadir una sal de plata soluble en agua a la solución acuosa de eluato de cicloserina a un pH que
25 va desde 5,5 a 9,0, separar del líquido que sobrenada la sal de plata precipitada de cicloserina, hacer una papilla con la sal de plata de cicloserina en agua, añadir



223309

ácido clorhídrico a la papilla, separar de la solución el cloruro de plata precipitado, recuperar cicloserina de la solución acuosa resultante purificada de la misma.

5 9^a.- Un procedimiento para recuperar cicloserina desde una solución acuosa impura de la misma, que comprende adsorber la cicloserina desde una solución acuosa impura de la misma, sobre una resina fuertemente básica de permutación aniónica en la forma de OH⁻, eluir la cicloserina de la resina con un anión diferente al OH⁻, añadir a la solución acuosa del eluato de cicloserina una sal de plata soluble en agua a un pH de aproximadamente 6,5, separar del líquido que sobrenada la sal de plata precipitada de cicloserina, hacer una papilla con la sal de plata de cicloserina en agua, añadir
10 ácido clorhídrico a la papilla, separar el cloruro de plata precipitado de la solución resultante, añadir un disolvente orgánico miscible con agua, el cual es un no disolvente para la cicloserina, a la solución acuosa purificada de cicloserina, y separar la cicloserina cristalizada que se forma.
15
20

 10^a.- Un procedimiento para recuperar cicloserina desde una solución acuosa impura de la misma, que comprende añadir una sal soluble en agua de un metal capaz de formar una sal de cicloserina insoluble en agua, a una solución acuosa impura de cicloserina a un pH que va desde aproximadamente 5,5 a 9,0 separar
25



223309

del líquido que sobrenada la sal metálica precipitada de cicloserina, hacer una papilla con la sal metálica de cicloserina insoluble en agua y agua, añadir a la papilla un ácido que tenga un anión capaz de formar una sal insoluble en agua con el catión metálico de la sal metálica insoluble en agua de cicloserina extraer la sal metálica precipitada insoluble en agua de la restante solución acuosa de cicloserina, secar por congelación en vacío la solución acuosa purificada de cicloserina para obtener cicloserina amorfa sólida.

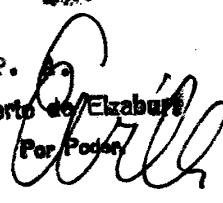
11^a. - Un procedimiento para la producción de una sal de plata de cicloserina, que comprende, añadir nitrato de plata a una solución acuosa impura de cicloserina a un pH que va desde 5,5 a 9 y recuperar la cicloserina de plata precipitada.

12^a. - Un procedimiento para recuperar cicloserina.

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

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

Madrid, 29 DIC. 1955

P. 
Alberto de Ezaburu
Por Poder