

229039

229039

P.- 14.714.-

A 18001 Case 15.564.-

8 JUN. 1956



JUN 1956

MEMORIA DESCRIPTIVA
para solicitar
P A T E N T E D E I N V E N C I O N
en
E S P A Ñ A
por VEINTE años

a nombre de AMERICAN CYANAMID COMPANY, entidad norteamericana, establecida en 30 Rockefeller Plaza, Nueva York, N.Y, Estados Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO DE REFINACION DE ANTIBIOTICOS DE TETRACICLINA IMPUROS"

=====

Esta invención se refiere a la refinación de antibióticos de tetraciclina impuros y es particularmente útil para la refinación de clorotetraciclina.

Desde el descubrimiento de los antibióticos de tetraciclina, clorotetraciclina, oxitetraciclina, tetraci-

5

229039



clina y bromotetraciclina se han ideado numerosos procesos de recuperación de estos materiales en forma farmacéuticamente aceptable. Aún cuando algunos de estos procesos son relativamente sencillos, la presente invención proporciona, 5 sin embargo, un proceso todavía mejor de obtención de dichos materiales en forma muy pura con un mínimo de operaciones de tratamiento usando disolventes y equipo poco costosos.

Un proceso ya conocido de recuperación de cloro-
tetraciclina a partir de caldos de fermentación consiste en
10 insolubilizar clorotetraciclina, filtrar la solución y extraer la torta de filtración con un disolvente orgánico. De este disolvente se obtiene luego el antibiótico por cristalización reduciendo el volumen y la temperatura de la solución. Aunque este proceso es sencillo no es, sin embargo completa-
15 mente satisfactorio, puesto que los rendimientos son relativamente bajos y la calidad del producto no es tan buena como sería de desear. La presente invención representa un claro mejoramiento con relación a este procedimiento porque proporciona rendimientos considerablemente más altos y se obtiene
20 una calidad farmacéuticamente pura y aceptable de antibiótico en la primera cristalización.

Aunque la presente invención es particularmente útil en el aislamiento y la cristalización de la clorotetraciclina, se ha encontrado también que es útil en el aislamiento de otros antibióticos de la serie de la tetraciclina, 25 tales como los indicados anteriormente. La descripción siguiente de la invención se referirá principalmente a la re-



5 recuperación de una calidad terapéutica de clorotetraciclina a partir de líquidos de fermentación que la contengan. Se comprenderá, por supuesto, que estos mismos principios generales son aplicables a la refinación de otros antibióticos de esta serie a partir de soluciones acuosas que los contengan.

10 De acuerdo con la invención, se proporciona un proceso para refinar antibióticos de tetraciclina impuros que consiste en tratar un antibiótico de tetraciclina impuro con un disolvente orgánico polar que contenga por lo menos 1 equivalente molecular de una sal del grupo que forman el cloruro magnésico, el cloruro cálcico, el cloruro de estroncio, el cloruro de cinc y el cloruro bórico y recuperar luego el antibiótico en forma purificada de la solución resultante.

15 En la realización de la invención aplicada a la refinación de clorotetraciclina impura, se prepara una solución ácida de la clorotetraciclina impura y se filtra a un pH de aproximadamente 1,5 para separar las impurezas insolubles.

20 La concentración de iones hidrógeno de la solución se eleva después hasta que esté comprendida entre los valores de pH 4 y pH 12 con un álcali que puede incluir materiales tales como amoníaco, hidróxido amónico, hidróxido potásico, hidróxido sódico, hidróxido cálcico, hidróxido bórico, carbonato sódico, trietilamina y otras aminas y análogos. Esto conduce a la formación de un precipitado insoluble de la cloro-
25 tetraciclina si hay iones calcio presentes en la solución. Ordinariamente, hay bastantes iones calcio presentes en los



1956

líquidos de fermentación y el ajuste de la solución con nuevas cantidades de calcio es generalmente innecesario. Debe haber por lo menos 1 mol de ión de calcio por cada mol de clorotetraciclina contenida en la solución cuyo pH se eleva con el álcali. Cuando se ha de purificar clorotetraciclina cruda por el proceso de la presente invención no es necesario formar el precipitado insoluble que se discute. El material crudo puede extraerse, si se desea, de acuerdo con el procedimiento que se describe a continuación.

En lugar de iones de calcio la solución puede contener una cantidad equivalente de iones de bario o de magnesio, pues estos iones tienen poco más o menos la misma acción insolubilizadora que el calcio.

La temperatura de la precipitación no es crítica, siendo adecuada cualquiera comprendida entre la de congelación, 0° C., y una temperatura a la cual la clorotetraciclina es inestable, 50°C. aproximadamente. El precipitado se forma rápidamente. No son necesarios largos periodos de agitación, siembra, envejecimiento, etc. A las concentraciones óptimas de iones hidrógeno, pH 7 - pH 9, la clorotetraciclina precipita de la solución en forma de una sal compleja insoluble casi cuantitativamente.

Al precipitado se añade un auxiliar de la filtración tal como tierra de diatomáceas y la solución se filtra. Si se desea se puede emplear centrifugación u otro medio de separación del precipitado insoluble de sus aguas madres.



Corrientemente no es necesario lavar el precipitado. Sin embargo, se ha encontrado que un exceso de agua en la torta de filtración es un claro inconveniente porque, en general, resultan rendimientos bajos cuando hay presente demasiada agua. Por ésto, la torta de filtración se debe dejar libre de agua por lavado con un poco de metanol anhidro o de otro disolvente, o la torta se puede prensar o secar de otras maneras para reducir el contenido de agua.

La operación siguiente del proceso es una operación crítica y distingue la presente invención de los procesos anteriores. Esta operación consiste en fragmentar la torta de filtración y convertirla en una papilla con metanol u otros disolventes del tipo que más adelante se mencionará que contengan una pequeña cantidad de cloruro de magnesio o cloruro cálcico u otra sal divalente, tal como cloruro bórico, cloruro de estroncio, cloruro de cinc y análogos. Por alguna razón desconocida, la presencia del cloruro de magnesio o de las otras sales citadas en el disolvente incrementa grandemente su poder de disolución hasta el punto de que se extraen proporciones extremadamente elevadas de la clorotetraciclina contenida en la torta de filtración. La teoría de este fenómeno no se conoce, pero es probable que intervenga la formación de sales complejas y/o alcoholatos en los cuales el cloruro de magnesio, el disolvente orgánico y la sal de clorotetraciclina contenidos en la torta de filtración intervienen todos.

Con el fin de ilustrar los fenómenos más particular-



mente, se da la descripción siguiente. Un volumen de caldo de fermentación que contenía clorotetraciclina procedente de un fermentador se mezcló con un volumen igual de agua y la concentración de iones hidrógeno de la solución se
5 ajustó a pH 1,5 con ácido sulfúrico. La solución se filtró después. La torta de filtración se volvió a transformar de nuevo en una papilla con 1-1/2 volúmenes de agua. El pH se ajustó nuevamente a 1,5 y la torta vuelta a transformar en papilla se calentó a 70° C., después se enfrió a la temperatura ambiente y se filtró. Los dos filtrados se juntaron
10 luego para dar aproximadamente 2-1/2 litros.

La solución anterior se ajustó después a pH 8,7 con hidróxido sódico y se añadieron 15 gramos de auxiliar de la filtración de tierra de diatomáceas. La solución se filtró después y la torta de filtración se convirtió en papilla
15 con 170 mililitros de alcohol metílico. Esta papilla se dividió luego en 5 partes iguales. Se añadió cloruro magnésico a las varias partes alícuotas según se ve en la siguiente tabla. Los porcentajes de cloruro de magnesio se expresan sobre la base de peso/volumen, es decir, 12,5 partes en peso de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ se llevaron a 100 partes en volumen con metanol. La papilla se agitó durante un rato y después se filtró. La torta de filtración se volvió a transformar en papilla con la solución de metanol que contenía cloruro de magnesio como antes. Los filtrados de cada parte
20 se ensayaron luego para ver su contenido de clorotetraciclina. Los resultados fueron los siguientes:

229039



Tabla I

Parte alícuota	% $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Primera extracción.	Segunda extracción.	Total
A	12,5 p./v.	81,0 %	12,7%	93,7 %
B	6,2	78,8	20,3	99,1
C	3,2	54,4	45,2	99,6
D	1,5	36,4	59,2	95,6
E	0	1,2	1,2	2,4

Como se verá, una solución de metanol que contenía 12,5 % de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ extrajo 81 % del total de antibiótico contenido en la torta de filtración en una sola extracción. En dos extracciones con una solución al 3,2 % de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ se recuperó un total de 99,6 % del antibiótico presente en la torta de filtración. Cuando en el metanol no había nada de cloruro de magnesio, solo se recuperó el 2,4 % de la actividad.

Sustancialmente se obtienen iguales resultados con el cloruro cálcico como se verá en la siguiente tabla:

Tabla II

Moles de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Primera extracción	Moles de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Segunda extracción
1,5	65,7	1,0	17,7
3,0	67,6	2,0	19,2

La torta de filtración que se transformó en una papilla con metanol que contenía cloruro de magnesio estaba formada típicamente por 50 % de sólidos, de los cuales 4 partes eran clorotetraciclina, 12 partes impurezas insolubles y 10 partes auxiliar de la filtración de tierra de diatomáceas. Se comprenderá que las proporciones de estos varios componentes



pueden variar ampliamente. Las proporciones relativas de los diversos componentes insolubles de la torta de filtración no son críticas. El contenido de humedad debe mantenerse tan bajo como sea posible, pero se obtienen buenos resultados cuando puede ser tan alto como de 75 % del peso de la torta.

Típicamente, una torta de filtración de la composición acaba de indicar se convertiría en papilla con unas 100 partes en volumen de metanol que contuviese 1 -5 partes en peso de cloruro de magnesio $6H_2O$. Cuanto más antibiótico de tetraciclina haya contenido en la torta de filtración más cloruro de magnesio será necesario. Aún cuando la teoría del proceso no se conoce, parece ser que debe haber por lo menos 1 equivalente molecular de cloruro de magnesio por cada equivalente molecular de clorotetraciclina o de otro antibiótico de tetraciclina en la torta de filtración que se está tratando.

Para recuperar la clorotetraciclina del extracto metanólico, es preferible concentrar el extracto por destilación en vacío hasta que la clorotetraciclina comience a precipitar. Una parte importante de este procedimiento es recuperar los cristales de clorotetraciclina en forma de sal ácida, por ejemplo, el clorhidrato. Por alguna razón desconocida, si la concentración de la clorotetraciclina resulta suficiente en la solución metanólica a medida que ésta se evapora, se deposita un material gomoso difícil que puede ser la sal de magnesio o algún complejo de la misma con clorotetraciclina, o puede ser clorotetraciclina neutra. Este material

es muy difícil de trabajar y es conveniente, pues, que el pH de la solución metanólica se ajuste a pH 3 o menos durante la evaporación de manera que cuando comiencen a depositarse cristales de la solución dichos cristales estén en forma de una sal ácida.

Aunque el metanol es un disolvente preferido de la presente invención, se pueden emplear otros alcoholes alifáticos inferiores, tales como, alcohol etílico, alcohol propílico normal y alcohol butílico normal, y acetona, tetrahidrofurano, 2-etoxietanol y otros "cellosolves" y otros disolventes polares.

En los ejemplos siguientes se dan ahora realizaciones específicas de procedimientos particulares.

Ejemplo 1

Una parte alícuota de 3 litros de filtrado ácido combinado o reunido, refinado (CAFP), (caldo de fermentación acidificado y filtrado), que contenía 2720 g/ml., se ajustó a pH 8,7 con hidróxido sódico 9,5 N y se agitó durante 15 minutos. El precipitado que se formó se dejó sedimentar por la noche a 5° C. La solución que flotaba se decantó. El precipitado sedimentado se mezcló con 15 g. de "Hyflo" (tierra de diatomáceas) y se filtró. El sólido se convirtió en una papilla durante 20 minutos con 175 ml. de una solución metanólica de cloruro de magnesio (0,025 mg./ml.) y se filtró. Se hizo una segunda extracción del sólido utilizando 100 ml. de la solución metanólica seguida de un lavado de la torta con 50 ml. de metanol. Los extractos se juntaron y se concen-

traron por destilación en vacío hasta 60 ml. Durante la concentración se añadieron 30 ml. de metanol que contenían 4 ml. de ácido clorhídrico concentrado para impedir la precipitación de clorotetraciclina neutra. La solución concentrada se ajustó a pH 1,9 con ácido clorhídrico concentrado y los cristales que se formaron se dejaron envejecer durante 24 horas. Los cristales se lavaron con "Cellosolve" (2-etoxietanol), con agua y con isopropanol.

Ensayo de los cristales: clorotetraciclina 986 gammas/milígramo (AF); rendimiento, % = 78,7 (basado en el ensayo Af).

Según se verá del análisis anterior el producto que se obtiene es farmacéuticamente aceptable y se puede usar en la mayoría de las formulaciones de clorotetraciclina sin purificación.

Ejemplo 2

Ocho gramos de una clorotetraciclina cruda húmeda con disolvente que contenía 535 gammas/milígramo de clorotetraciclina se transformaron en papilla con 40 ml. de 2-etoxi-etanol que contenía 2 moles de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ hasta que se disolvieron. La solución se filtró y el pH del filtrado se ajustó a 0,80 con ácido clorhídrico. Los cristales que se formaron se envejecieron durante un periodo de 24 horas. Los cristales se filtraron y se lavaron con 2-etoxietanol, agua e isopropanol. Los cristales secos pesaban 3,83 gramos y dieron en ensayo 969 gammas/milígramo de clorhidrato de clorotetraciclina; el rendimiento por ciento de



crudo a cristales fué de 86,7.

Esta solicitud, que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América el 10 de Junio de 1.955, bajo el Núm. 514.766, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

N O T A
.=.=.=.=.=.

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

10 1º.- Un procedimiento de refinación de antibióticos de tetraciclina impuros, caracterizado porque se trata un antibiótico de tetraciclina impuro con un disolvente orgánico polar que contenga por lo menos 1 equivalente molecular de una sal del grupo que forman el cloruro de magnesio, el cloruro cálcico, el cloruro de estroncio, el
15 cloruro de cinc y el cloruro de bario y luego se recupera el antibiótico en forma purificada de la solución resultante.

20 2º.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el disolvente orgánico polar es un alcohol alifático inferior.

229039

56

- 8

5 3^a. - Un procedimiento de acuerdo con las reivindicación 1 ó 2, caracterizado por el hecho de que el antibiótico se recupera en forma purificada reduciendo el volumen de la solución en disolvente, acidificando dicha solución a un pH menor de 3 y recuperando una sal ácida del antibiótico de dicha solución.

10 4^a. - Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la recuperación de un antibiótico de tetraciclina purificado a partir de un líquido de fermentación que lo contenga, caracterizado por las operaciones preliminares de ajustar el pH del líquido de fermentación a un pH inferior a 4 y preferiblemente inferior a 1,5, recuperar material insoluble, ajustar el pH de la solución a entre pH 4 y pH 12, recuperar el precipitado
15 resultante y tratar luego dicho precipitado con dicho disolvente orgánico polar y dicha sal.

5^a. - Un procedimiento de refinación de antibióticos de tetraciclina impuros.

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

Esta Memoria consta de doce hojas escritas por una sola cara.

Madrid, - 8 JUN. 1956

P.A.

Alberto de Eizaburu
Por Poder