

70112

P.- 20.408

A-52347 Case 17.507
LJR/LJR



262812

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud
de

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

formulada el 28 de Noviembre de 1960, con el N° 262.812

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de AMERICAN CYANAMID COMPANY, entidad nortea-
mericana, establecida en 30 Rockefeller Plaza, Nueva -
York, N.Y., Estados Unidos de América.

por:

" UN PROCEDIMIENTO DE OBTENER DESMETILCLORO-
TETRACICLINA PURIFICADA "

Este invento se refiere a la refinación de des-
metilclorotetraciclina y más particularmente a un proce-
dimiento mejorado para extraer desmetilclorotetraciclina
de los mostos de fermentación que la contienen.

5 Las desmetiltetraciclinas, desmetiltetraciclina
misma y desmetilclorotetraciclina (7-cloro-6-desmetilte-
traciclina) son miembros de una nueva familia de antibió-
ticos de tetraciclina que se describen y reivindican en la
patente americana N° 2.878.289 de McCormick y col.- Las
10 desmetiltetraciclinas allí descritas se producen por cier-
tas cepas mutantes de Streptomyces aureofaciens derivadas

262812



del producto aislado de suelo productor de clorotetraciclina S. aureofaciens A-377 descrito en la patente americana N° 2.482.055 de Duggar y depositado en el Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, como -
5 NRRL 2209.- Las nuevas cepas productoras de desmetiltetraciclina se derivaron por tratamiento de A-377 con -
agentes mutagénicos.- Cultivos de las nuevas cepas productoras de desmetiltetraciclina de S. aureofaciens están depositados en la American Type Culture Collection,
10 Washington, D.C., bajo los números de accesión ATCC -
12551, 12552, 12553 y 12554.

La desmetilclorotetraciclina, en comparación con el antibiótico de amplio espectro bien conocido tetraciclina, consigue singularmente una actividad antibiótica
15 mucha mayor contra organismos susceptibles con una cantidad de droga mucho menor; posee una estabilidad notablemente mayor en los fluidos del organismo; y tiene -
una resistencia mejorada a la degradación y un índice -
bajo de liberación renal, al mismo tiempo que soporta -
20 niveles altos de actividad antibiótica durante períodos prolongados.

Se han experimentado considerables dificultades al desarrollar un procedimiento de refinación que fuera practicable en escala comercial para la recuperación de
25 desmetilclorotetraciclina del mosto de fermentación.- -
Podría suponerse, a causa de las analogías estructurales entre clorotetraciclina y desmetilclorotetraciclina que los procedimientos de purificación que fueron satisfactorios para la refinación de clorotetraciclina serían tam-
30 bién satisfactorios para la refinación de desmetilcloro-

262812



tetraciclina.- Sin embargo, en contra de lo esperado,
no ha sucedido así.- Cuando se intenta recuperar des-
metilclorotetraciclina por uno de los mejores procedi-
mientos desarrollados para la recuperación de clorote-
5 tetraciclina, p.ej., el procedimiento descrito en la pa-
tente americana Bo. 2.655.535 de Pidacks, que se basa
en la extracción de clorotetraciclina del mosto de fer-
mentación con butanol normal, a un pH de 1,5, aproxima-
damente, seguido de concentración del extracto butanó-
10 lico y recuperación de la clorotetraciclina como sal -
ácida, se ha encontrado que se obtienen rendimientos -
muy pobres, de alrededor de 35%, de desmetilclorotetra-
ciclina impura.- Evidentemente, ésto es debido a que,
en la recuperación de desmetilclorotetraciclina a par-
15 tir del extracto butanólico ácido, hay una degradación
considerable de la desmetilclorotetraciclina y forma--
ción de impurezas muy coloreadas que se recuperan junto
con la desmetilclorotetraciclina.- Cómo consecuencia,
el procedimiento de Pidacks no puede usarse satisfacto-
20 riamente para la refinación de desmetilclorotetracikli-
na.

De acuerdo con el invento, se proporciona un
procedimiento para obtener desmetilclorotetraciclina pu-
rificada de un mosto de fermentación que la contiene en
25 forma de un precipitado de metal alcalinotérreo, que com-
prende ajustar el mosto a un pH ácido para solubilizar la
desmetilclorotetraciclina, filtrar el mosto, reducir el
contenido de ion libre de metal alcalinotérreo del fil-
trado a un nivel predeterminado, añadir un compuesto de
30 amonio cuaternario y un disolvente orgánico inmiscible con
agua, ajustar la mezcla a un pH alcalino, y extraer la -



desmetilclorotetraciclina de la fase disolvente orgánico.- El antibiótico puede aislarse de la fase disolvente de cualquier modo conveniente según se indica con más detalle más adelante.

5 El presente invento se realiza preferiblemente acidificando primero el mosto para solubilizar los antibióticos que contiene.- En general, se producen pequeñas cantidades de clorotetraciclina biosintéticamente por la nueva cepa mutante de S. aureofaciens junto con
10 pequeñas cantidades de desmetiltetraciclina y la desmetilclorotetraciclina deseada.- El mosto se acidifica a un pH de 0,5-2,5, aproximadamente, y preferiblemente a un pH de 0,8-1,5, aproximadamente, con cualquier ácido mineral fuerte, tal como ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico o análogo.- El mosto acidificado
15 se filtra para separar la desmetilclorotetraciclina solubilizada y cualquier clorotetraciclina y desmetiltetraciclina que pueda contener.- Usualmente, se deja una porción del antibiótico en la torta de filtración, pudiendo
20 recuperarse por extracción de la torta de filtración con agua acidificada a un pH de 1, aproximadamente.- Las impurezas y los materiales del mosto sin disolver se separan nuevamente por filtración y éste filtrado secundario se añade al filtrado primario para formar un filtrado ácido combinado.- Este filtrado ácido combinado se
25 trata después con ácido oxálico o con oxalato amónico, en la proporción de 0,5% a 3,0%, aproximadamente, calculado con relación al volumen del mosto usado, con el fin de eliminar el exceso de iones calcio y/o magnesio
30 presentes.

262812



La cuestión de la eliminación del exceso de iones calcio es muy importante.- No se puede extraer desmetilclorotetraciclina en el disolvente orgánico si están ausentes los iones calcio.- Sin embargo, si existe una cantidad excesiva de calcio, se forma un precipitado denso de la sal cálcica de desmetilclorotetraciclina durante la extracción y no se disuelve por el disolvente orgánico.- Ajustando convenientemente los iones calcio mediante el empleo de ácido oxálico en las proporciones especificadas arriba, se forma, sin embargo, un complejo de iones calcio, desmetilclorotetraciclina y compuesto de amonio cuaternario, que se extrae fácilmente en la fase disolvente orgánico.- Es conveniente añadir el ácido oxálico o sal del mismo, después de la operación de filtración ácida, mejor que antes de dicha filtración ácida, ya que se necesitan menos cantidades para la descalcificación del filtrado ácido que las que se necesitan para descalcificar el mosto de recolección.

Después de la precipitación de la cantidad necesaria de iones calcio y magnesio, se separan por filtración los oxalatos metálicos que se han formado.- Sobre el filtrado ácido descalcificado, se añade una cantidad conveniente de un cloruro de alcoholtrimetil amonio o un cloruro de dialcoholidimetilamonio.- En general, la cantidad de compuesto de amonio cuaternario puede estar comprendida entre, aproximadamente, 0,5 moles de compuesto de amonio cuaternario por mol de desmetilclorotetraciclina y, aproximadamente, 3 moles de compuesto de amonio cuaternario por mol de desmetilclorotetraciclina.- Sobre la mezcla de filtrado ácido, ácido oxálico y com-

262812



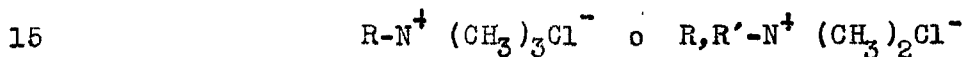
5 puesto de amonio cuaternario, se añade una cantidad con-
veniente de un disolvente orgánico, inmisible con agua,
estable, relativamente inerte, que tiene un punto de
ebullición comprendido entre, aproximadamente, 60° C. y
150° C. y una relación de distribución de antibiótico --
agua-disolvente de, por lo menos, 1 a 5 en favor del di-
solvente orgánico.- Hemos encontrado que las metil al-
cohil cetonas, son extraordinariamente efectivas como -
disolventes en éste procedimiento.- La cantidad de di-
10 solvente metil alcohol cetona que se usa está compendi-
da entre, aproximadamente, 5% y, aproximadamente, 50% -
del volúmen del filtrado.- Son metil alcohol cetonas -
adecuadas que pueden usarse en éste procedimiento: metil
butil cetona, metil propil cetona, metil isobutil cetona
15 y metil amil cetona.- La metil isobutil cetona es el di-
solvente preferible, ya que parece que funciona de un mo-
do particularmente favorable en la extracción de la des--
metilclorotetraciclina del filtrado acuoso.

20 La mezcla de filtrado ácido, ácido oxálico, -
compuesto de amonio cuaternario y disolvente metil alco-
hil cetona se agita y el pH se ajusta a un valor compren-
dido entre 8 y 12, y preferiblemente a 9-10, aproximada-
mente, por adición de una solución al 50% de hidróxido -
sódico o hidróxido amónico.- El hidróxido amónico es la
25 base preferida en ésta operación, ya que hay un incre-
mento en la recuperación de la desmetilclorotetraciclina
de 5%, aproximadamente, en comparación con el uso de hi-
dróxido sódico.- Además, el color de la desmetilcloro--
tetraciclina mejora también considerablemente.- Después
30 de la adición de hidróxido amónico, se continúa la agita-



ción durante 30 minutos o así, y la mezcla se somete luego a separación de fases, por ejemplo, en una centrífuga, que separará la fase de materiales insolubles, la fase disolvente orgánico y la fase acuosa.- La fase materiales insolubles y la fase acuosa se tiran y la desmetilclorotetraciclina se aísla de la fase orgánica como se indica con más detalle después.

Hemos encontrado que los compuestos de amonio cuaternario conocidos con el nombre de Arquads son vehículos particularmente efectivos para el procedimiento de extracción con disolvente anteriormente descrito.- Cómo se ha indicado, éstos compuestos son cloruros de alcoholtrimetilamonio o cloruros de dialcohildimetilamonio y pueden representarse por la fórmula



donde R es un grupo de cadena larga que tiene por lo menos 8 átomos de carbono y R' puede ser un grupo alcohol que tiene de 2 a 20 átomos de carbono.- Se dispone de una cierta variedad de compuestos de ésta clase, diferentes en cuanto a longitud y número de grupos alcohol de cadena larga unidos al átomo de nitrógeno.- En la lista que se dá a continuación figuran algunos Arquads representativos que se encuentran en el comercio y que pueden usarse ventajosamente en la realización del presente invento.

262812



	Grupos sustituídos	Longitud de cadena carbonada	Compuestos Arquad						
			2C ¹ %	2HT ¹ %	C %	S %	12 %	16 %	18 %
		8	8	--	8	--	--	--	--
		10	9	--	9	--	--	--	--
5	Dodecilo	12	47	--	47	--	90	--	--
	Tetradecilo	14	18	--	18	--	9	--	--
	Hexadecilo	16	8	30	8	10	--	90	6
	Octadecilo	18	10	70	5	10	--	6	93
	Octadecenilo	18	--	--	5	35	1	4	1
10	Octadecadienilo	18	--	--	--	45	--	--	--

1. Arquad 2C y Arquad HT son cloruros de dialcohildimetilamonio.- Los demás son cloruros de alcoholtrimetilamonio.

15 El compuesto Arquad que nosotros preferimos -
 emplear y con el que hemos obtenido los mejores resulta-
 dos es Arquad 16, que se admite que es un cloruro de al-
 cohiltrimetilamonio de cadena larga en el que los grupos
 alcoholilo están constituidos por 90% de hexadecilo, 6% de
 octadecilo y 4% de octadecenilo.- En esencia, es el clo-
 20 ruro de cetiltrimetilamonio.- Este compuesto se prefiere
 particularmente a causa de su bajo coste y del hecho de -
 que parece que es especialmente selectivo para dar desme-
 tilclorotetraciclina más pura.

25 Después del procedimiento de extracción descri-
 to, la desmetilclorotetraciclina puede recuperarse del -
 extracto del disolvente de varias maneras.- Un método -
 preferido es recuperar la desmetilclorotetraciclina como
 sal de ácido mineral, p.ej., en forma del hidrocioruro.-
 Esto puede realizarse añadiendo al extracto del disol- -
 30 vente metil alcohol cetona una cantidad conveniente de -

262812



agua, usualmente de alrededor de 10% en volúmen del vo-
lúmen de extracto.- La mezcla se acidifica después con
ácido clorhídrico concentrado a un pH de 1,5-2,5, apro-
ximadamente (a pH 0,5, cristaliza el hidrocioruro de -
5 desmetilclorotetraciclina).- La fase disolvente orgá-
nico y la fase acuosa se mezclan por agitación y luego-
se separan.- La sal ácida de desmetilclorotetraciclina
está ahora contenida en la fase acuosa que se trata con
sal, preferiblemente cloruro sódico, se pone en contac-
10 to con un alcohol inferior, tal como butanol normal, y
luego se concentra el extracto butanólico.- Después se
añade un alcoxi (inferior)-alcohol(inferior) tal como -
2-etoxietanol, se ajusta el pH a 1,0 con ácido clorhí-
drico concentrado, y la mezcla se siembra y se envejece
15 para efectuar la cristalización de la desmetilclorote-
traciclina.- Los cristales de hidrocioruro de desmetil-
clorotetraciclina presentes se recogen por filtración, -
se lavan con una mezcla de un alcohol inferior y un al-
coxi (inferior)-alcohol (inferior), y finalmente se se-
20 can en vacío.

El procedimiento de aislamiento descrito arri-
ba puede simplificarse, si la potencia del mosto de fer-
mentación original es suficientemente elevada.- Si la -
concentración de desmetilclorotetraciclina excede de 500
25 microgramos por mililitro, se prefiere el siguiente pro-
cedimiento: el extracto disolvente se mezcla con un vo-
lúmen de agua igual a 4% a 10% del volúmen de extracto -
disolvente.- El sistema bifásico se acidifica con ácido
clorhídrico concentrado hasta que el pH de la fase acuo-
30 sa es 0,5, aproximadamente.- Cristaliza el hidrocioruro



de la desmetilclorotetraciclina y se recupera por filtración.

Un procedimiento de aislamiento particularmente preferido se funda en aislar sulfato de urea desmetilclorotetraciclina, añadiendo aproximadamente 5% de una solución acuosa saturada de urea sobre el extracto de desmetilclorotetraciclina en metilisobutil cetona.- Esta solución se ajusta luego a un pH de 1, aproximadamente, con ácido sulfúrico concentrado, con lo cual precipita un complejo de sulfato de urea-desmetilclorotetraciclina.- La desmetilclorotetraciclina pura puede regenerarse luego fácilmente haciendo una papilla en agua y acidificando a un pH de 1, aproximadamente, con ácido clorhídrico, para formar hidrocioruro de desmetilclorotetraciclina purificado.- Este procedimiento de aislamiento es particularmente ventajoso porque resulta desmetilclorotetraciclina muy purificada que está libre de formas epiméricas.

El invento se describirá más detalladamente en relación con los siguientes ejemplos específicos.

E J E M P L O 1

Recuperación de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina neutra

Se ajustaron 2 kg. de un mosto de fermentación que contenía desmetilclorotetraciclina, a un pH de 1,8 mediante adición de ácido sulfúrico.- Se añadieron 150 gramos de Hyflo Super-Cel (agente auxiliar de filtración de tierra de diatomeas) y la mezcla se agitó durante 30 minutos antes de filtrar.- La torta

262812



de filtración se extrajo nuevamente con agua caliente a un pH de 1,7, y se filtró.- Estos dos filtrados ácidos se combinaron y el filtrado ácido combinado se trató con 31,9 gramos de oxalato amónico; se agitó durante 30 minutos y se filtró.- Sobre 2660 mililitros de éste filtrado acuoso se añadieron 319 mililitros de metil isobutil cetona y 12 mililitros de cloruro de cetiltrimetil amonio al 50% (Arquad 16) en isopropanol.- La mezcla se ajustó a pH 10,0 con hidróxido sódico, se agitó durante 30 minutos y luego se dejaron separar la fase orgánica y la fase acuosa.- Se retiró la mayor parte de la fase acuosa.- La mezcla bifásica restante se filtró usando Hyflo Super-Cel y el filtrado se guardó.- La torta de filtración se lavó con 70 mililitros de metil isobutil cetona, y luego se combinó el lavado y el filtrado guardado.- La fase disolvente se separó y se lavó con 45 mililitros de agua a pH 10.- El agua de lavado se separó y se tiró.- La fase disolvente se extrajo dos veces: primeramente con 70 mililitros de agua a pH 2 y luego con 35 mililitros de agua a un pH análogo.- Estos dos extractos de agua de retorno se combinaron, se añadieron 3 gramos de sal tetrasódica de ácido etilenodiaminatetracético (Versene) y el pH se ajustó a 6 con solución diluida de hidróxido sódico para precipitar desmetilclorotetraciclina neutra en forma cristalina.- El rendimiento a partir del mosto de desmetilclorotetraciclina fué 40%.

E J E M P L O 2

Recuperación de hidrocioruro de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina

Sobre 13 litros de mosto que contenía desmetil-

282812



clorotetraciclina se añadieron 1500 gramos de Hyflo Super-Cel.- La mezcla se ajustó a un pH de 1,3 con ácido sulfúrico, se agitó y se filtró.- El filtrado se guardó y la torta de filtración se extrajo nuevamente con agua caliente a un pH de 1,3, luego se filtró y el filtrado se guardó.- Los dos filtrados ácidos se combinaron, y sobre los 22 litros de filtrado ácido combinado se añadieron 300 gramos de oxalato amónico.- El pH de la mezcla se ajustó a 1,8 y la mezcla se agitó después y se filtró.- Sobre el filtrado acuoso se añadieron 1600 mililitros de metil isobutil cetona, 51 mililitros de cloruro de cetiltrimetilamonio al 50% (Arquad 16) y se ajustó el pH a 9,3 con 375 mililitros de solución de hidróxido sódico 18N.

La mezcla se agitó y se filtró, y el filtrado se guardó.- La torta de filtración se lavó con 100 mililitros de metil isobutil cetona que luego se combinaron con el filtrado.- Sobre 1260 mililitros de la fase disolvente, se añadieron 150 mililitros de agua.- La mezcla se acidificó con 5,5 mililitros de ácido clorhídrico 12N y se agitó.- El extracto acuoso se separó de la fase disolvente.- Sobre los 173 mililitros de extracto acuoso de retorno, se añadieron 82 mililitros de butanol normal y 17,4 gramos de cloruro sódico.- La mezcla se agitó antes de separar la fase acuosa y la fase disolvente orgánico.- Los 99 mililitros de extracto en butanol normal se concentraron a 60 mililitros en vacío a 30-35° C.- Se añadió una porción de 15 mililitros de 2-etoxietanol, se ajustó el pH a 1,0 con 2,1 mililitros de ácido clorhídrico concentrado y la mezcla se sembró y se envejeció.

262812



Los cristales que se formaron se separaron por filtra-
ción y se lavaron primero con 15 mililitros de una mez-
cla 1:3 de 2-etoxietanol y butanol normal, y luego con -
15 mililitros de éter.- Los cristales lavados se seca-
ron en vacío a 40°C.- Resultaron 6,21 gramos de un pro-
ducto que daba al análisis 921 mcg./mg. y representaban
un rendimiento de 31,2% calculado a partir del mosto. -

E J E M P L O 3

10 Recuperación de hidrocioruro de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina

Se ajustaron 4 kilogramos de un mosto de fer-
mentación que contenía desmetilclorotetraciclina, que daba
al análisis 1540 mcg./ml., a pH 1,3, con 130 mililitros
de solución de ácido sulfúrico al 25%, se agitó durante
15 30 minutos y se filtró, usando 100 gramos de Hyflo-Super-
Cel.- El filtrado se guardó.- La torta de filtración se
convirtió de nuevo en una papilla con 2 litros de agua a
50° C., se acidificó a pH 1,5, usando solución de ácido -
sulfúrico al 25%, se agitó durante 30 minutos y se filtró.
20 Los filtrados se combinaron para dar 5600 mililitros de un
filtrado ácido combinado.- Se separó una cantidad de 1870
mililitros de filtrado ácido (equivalente a un tercio del
lote total), y se descalcificó de la manera siguiente: se
añadieron 26,7 gramos de ácido oxálico sobre la parte ali-
cuota de filtrado ácido, y la mezcla se agitó hasta que se
25 había disuelto completamente el ácido oxálico.- Después -
se ajustó el pH a 2,0 con solución de hidróxido sódico al
25% y la mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente -
(25° ± 5° C.) durante una hora, para dar lugar a la preci-
30 pitación de oxalato cálcico.- El precipitado de oxalato -



cálcico se separó por filtración, dando 1980 mililitros de filtrado ácido combinado descalcificado.- Una parte alícuota de 990 mililitros de éste filtrado se trató para pasar a hidrocioruro de desmetilclorotetraciclina del modo siguiente: una cantidad de 5,2 mililitros de Arguad 5 16 (33%, acuoso) se añadió sobre los 990 mililitros del filtrado.- Además, se añadieron también al filtrado 100 mililitros de metilisobutilcetona.- El pH de la mezcla se ajustó a 9,5 con solución de hidróxido sódico al 25%. 10 La mezcla se agitó durante 30 minutos, luego se filtró, y el filtrado se dejó en reposo durante 30 minutos, para separar las dos fases.- La fase disolvente se separó por decantación y se mezcló con 7 mililitros de agua.- El pH de éste sistema bifásico se ajustó a 0,5 con 1,2 mililitros de ácido clorhídrico concentrado.- Después de envejecer durante 19,5 horas en un agitador, los cristales 15 formados se separaron por filtración y se lavaron sucesivamente con metil isobutil cetona y cloroformo.- Los cristales lavados se secaron luego en vacío a 60° C. durante 5 horas.- Se obtuvieron 0,595 gramos de hidrocioruro de desmetilclorotetraciclina, que daba al análisis 20 991 mcg./mg. y tenía un $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ a 460 m μ de 0,645.- El rendimiento fué 57,5%.

E J E M P L O 4

25

Se ajustaron 4 lotes separados de 1400 litros de mosto que contenía desmetilclorotetraciclina, a pH 1,0, con ácido sulfúrico al 25% y se añadió agente auxiliar de filtración Hyflo al 2% (peso/volumen).- Se agitó el mosto durante 30 minutos y luego se filtró sobre 30

262812



un filtro de vacío rotatorio pre-revestido.- El filtrado del mosto ácido se recogió y la torta se convirtió nuevamente en una papilla en 50% de agua (volumen/volumen) a temperatura ambiente ($25^{\circ} \pm 5^{\circ}$ C.).- Se ajustó el pH de la papilla a 1,0 con ácido sulfúrico al 25% y se mezcló durante 30 minutos.- La papilla se calentó a 60° C. y luego se filtró sobre el mismo filtro pre-revestido.- El filtrado, convertido nuevamente en papilla, se enfrió a temperatura ambiente y se combinó con el filtrado del mosto ácido para extracción.- La torta agotada se tiró.- Se añadió ácido oxálico, 2% del mosto original (peso/volumen) sobre el filtrado ácido combinado, y se ajustó el pH a 1,5 con solución de NaOH al 50%.
5 El lote se agitó luego durante 30 minutos para completar la precipitación de oxalato cálcico.- Se añadió Arquad 16 (solución en agua al 33%) sobre el filtrado ácido combinado "oxalatado" a un nivel de 4,8 ml.gm. de desmetilclorotetraciclina en el mosto y se añadió metil isobutil cetona, 10% del filtrado ácido combinado (volumen/volumen) al tanque de extracción.- El pH se ajustó a 9,0-9,5 con solución de NaOH al 50% y el lote se agitó durante 30 minutos para facilitar la extracción en la fase disolvente.- El extracto de metil isobutil cetona se separó de la centrífuga de extracción y se recogió para tratamiento posterior.- El filtrado ácido combinado agotado y el lodo se tiraron.- Se añadió un 10% de agua de la cañería (volumen/volumen) sobre el extracto de metil isobutil cetona y el pH se ajustó a 0,8-1,0 con ácido clorhídrico concentrado y se envejeció durante unas 15 horas a éste pH con agitación constante a temperatura ambiente.
10
15
20
25
30

262812



Después de completado el envejecimiento, los cristales se separaron de las aguas madres bifásicas por filtración.- El hidrocioruro de desmetilclorotetraciclina bruto se lavó por desplazamiento dos veces con 1% de volúmen de mosto de metil isobutil cetona.- Todas las corrientes de filtrado se enviaron a la recuperación de disolvente y los cristales se secaron en vacío a 50°C. durante unas 16 horas antes de pesar y tomar la muestra para el análisis.- Los resultados del ensayo se dan en la Tabla I a continuación:

Otros cuatro lotes separados de 1400 litros - (Nº 5, 6, 7, 8) de mosto que contenía desmetilclorotetraciclina se trataron como se ha indicado arriba, con excepción de que se usó solución de NH₄OH al 28% como base para la extracción, en lugar de solución de NaOH al 50%. Los resultados de los ensayos se indican en la Tabla I, a continuación:

T A B L A I

Lote No.	Potencia de mosto mcg./ml.	NH ₄ OH vs NaOH		Análisis				
		Bruto %	Desmetil-clorotetra-ciclina mcg./mg.	Desmetil-tetraciclina mcg./mg.	Espec-trofo-tométrico %	Micro-biológico &	1% E _{1cm} a 460 mμ	
1	1270	44.8	979	58	1010	1053	0.28	
25	2	1340	41.4	890	139	1014	861	0.41
3	1230	41.6	835	102	911	855	0.60	
4	1790	43.5	889	52	942	895	0.34	
Promedio 1407		42.8	898	88	969	916	0.41	
5	1310	58.0	910	90	977	891	0.26	
30	6	1200	61.8	900	120	983	1001	0.24

262812



7	820	71.7	914	125	1007	1039	0.25
8	790	65.5	909	82	1039	981	0.23
Promedio 1030		64.3	908	104	1002	978	0.25

5 Se observará, por los datos anteriores, que, tanto en lo que se refiere al rendimiento de producto bruto como al color del producto final, el procedimiento con NH_4OH es superior al procedimiento con NaOH .

10 Esta solicitud, que corresponde a la presentada en E.U.A, el 9 de Diciembre de 1959, bajo el N° 858.332 se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

15 N O T A

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

25 1º.- Un procedimiento de obtener desmetilclorotetraciclina purificada, a partir de un caldo de fermentación que la contiene en forma de un precipitado de metal alcalinotérreo, caracterizado por ajustar el mosto a un pH ácido, para solubilizar la desmetilclorotetraciclina, filtrar el mosto, reducir el contenido en iones de metal alcalinotérreo libres del filtrado a un nivel pre-

30 determinado, añadir un compuesto de amonio cuaternario y un disolvente orgánico inmiscible con agua, ajustar la -

262812



mezcla a un pH alcalino y extraer la desmetilclorotetra-
ciclina de la fase de disolvente orgánico.

2º.- Un procedimiento según el punto 1º, caracte-
rizado porque el mosto se ajusta primero a un pH ácido
5 de 0,5 a 2,5 y con preferencia de 0,8 a 1,5.

3º.- Un procedimiento según los puntos 1º ó 2º,
caracterizado porque el contenido en iones de metal alcali-
notérrico se reduce añadiendo ácido oxálico y/u oxalato
amónico.

10 4º.- Un procedimiento según cualquiera de los -
puntos 1º a 3º, caracterizado porque dicha mezcla disol-
vente se ajusta a un pH alcalino de 8 a 12, añadiendo un
álcali tal como hidróxido amónico.

15 5º.- Un procedimiento según cualquiera de los -
puntos 1º a 4º, caracterizado porque el compuesto de amo-
nio cuaternario se elige del grupo que comprende cloruros
de trimetil- o di-alcohol dimetil-amonio con alcohol de
cadena larga.

20 6º.- Un procedimiento según cualquiera de los -
puntos 1º a 5º, caracterizado porque el disolvente orgá-
nico es una metilalcoholcetona.

25 7º.- Un procedimiento según el punto 6º, caracte-
rizado porque la metilalcoholcetona se usa en una can-
tidad que oscila desde aproximadamente 5% hasta aproxima-
damente 50% en volumen referido al filtrado ácido.

30 8º.- Un procedimiento según cualquiera de los -
puntos 1º a 7º, caracterizado porque la desmetilclorote-
traciclina se aísla de la fase de disolvente orgánico aña-
diendole una solución acuosa saturada de urea, ajustando -
el pH a 1 aproximadamente por la adición de ácido de mane-

262812



ra que se forme un complejo de desmetilclorotetraciclina-
urea-ácido y regenerando desmetilclorotetraciclina pura -
poniendo en suspensión el complejo en agua y ajustando el pH
a 1 aproximadamente, con lo cual ocurre cristalización de la
5 desmetilclorotetraciclina como sal de ácido.

9º.- UN PROCEDIMIENTO DE OBTENER DESMETILCLORO-
TETRACICLINA PURIFICADA.

Tal y cómo se ha descrito en la Memoria que ante-
cede, y con los fines que se han especificado.

10 Esta Memoria consta de diecinueve hojas escritas
por una sola de sus caras.

Madrid,

P. A.

E.F.G.