



263083

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 AMERICAN CYANAMID COMPANY, entidad norteamerica, establecida en 30 Rockefeller Plaza, Nueva York, N.Y., Estados Unidos de América, por:
"UN PROCEDIMIENTO PARA OBTENER DESMETILCLOROTETRACICLINA PURIFICADA"

Este invento se refiere a la purificación de desmetilclorotetraciclina y más particularmente a un procedimiento mejorado para la recristalización acuosa de desmetilclorotetraciclina de manera que se produzcan rendimientos elevados de productos terapéuticamente valiosos.

Las desmetiltetraciclinas, la desmetiltetraciclina misma y la desmetilclorotetraciclina (7-cloro-6-desmetiltetraciclina) son miembros de una nueva familia de antibióticos de tetraciclina que están descritos y rei-

263083



vindicados en la patente americana No. 2.878.289 de —
McCormick y col. Las desmetiltetraciclinas allí descri-
tas se producen mediante ciertas cepas mutantes deriva-
das de Streptomyces aureofaciens derivadas del material
5 aislado del suelo S. aureofaciens A-377 productor de —
clorotetraciclina, descrito en la patente americana No.
2.482.055, de Duggar, y depositado en el Northern Regio-
nal Research Laboratory, Peoria, Illinois como NRRL —
2209. Las nuevas cepas productoras de desmetiltetraci-
10 clina se derivaron por tratamiento de A-377 con agentes
mutagénicos. Cultivos de las nuevas cepas productoras -
de desmetiltetraciclina de S. aureofaciens están deposi-
tados en la American Type Culture Collection, Washing-
ton, D.C., bajo los números de accesión ATCC, 12551, —
15 12552, 12553 y 12554.

La desmetilclorotetraciclina, en comparación con
el antibiótico de amplio espectro bien conocido tetraci-
clina, consigue singularmente una actividad antibiótica
mucho mayor frente a organismos susceptibles con canti-
20 dad menor de droga; posee una estabilidad notablemente
mayor en los flúidos del organismo; tiene mayor resis-
tencia a la degradación y una menor velocidad de libera-
ción renal, soportando al mismo tiempo elevados niveles
de actividad antibiótica durante períodos prolongados.

25 La desmetilclorotetraciclina, único producto de -
fermentación de una cepa mutante de Streptomyces aureo-
faciens, está casi invariablemente asociada con peque-
ñas cantidades de desmetiltetraciclina que es también -
un producto de la fermentación. Es preciso efectuar des-
30 pués una separación de estos dos antibióticos, o por lo

263083



menos recuperar desmetilclorotetraciclina en una forma muy purificada, libre de desmetiltetraciclina. Aunque - estos dos antibióticos pueden separarse de modo efectivo por técnicas de cromatografía sobre papel, esto no -
5 es práctico en operaciones comerciales en gran escala, - habiéndose realizado esfuerzos con vistas a desarrollar un procedimiento comercial práctico para la separación de desmetilclorotetraciclina esencialmente pura, de desmetiltetraciclina.

10 Uno de los procedimientos mejores para la purificación de clorotetraciclina y tetraciclina es el descrito por Winterbotton y con., en la patente americana No. 2.671.806. Este procedimiento se funda en disolver clorotetraciclina bruta, por ejemplo, en un disolvente orgánico hidroxilado, tal como un alcohol inferior, usando una base nitrogenada, p. ej. trietilamina, que sirve para neutralizar y solubilizar la clorotetraciclina.
15 Las impurezas no disueltas se separan por filtración y, por reajuste del pH del filtrado con ácido clorhídrico al nivel deseado, se precipita hidrocioruro de clorotetraciclina purificado.
20

Este procedimiento, aunque es eminentemente adecuado para la purificación de clorotetraciclina y tetraciclina porque da un producto terapéuticamente valioso
25 de alta calidad, no está exento de ciertos inconvenientes, particularmente porque implica el uso de disolventes orgánicos hidroxilados y bases orgánicas que hacen que el coste del procedimiento de preparación sea elevado. Además, y esto es aquí de la máxima importancia, la
30 recristalización de desmetilclorotetraciclina de los di



263083

solventes orgánicos del procedimiento Winterbotton, p. ej. butanol y 2-etoxietanol, no efectúa una reducción - apreciablemente en la desmetiltetraciclina, de manera - que el producto final tiene un porcentaje excesivo de -
5 desmetiltetraciclina para las normas especificadas.

De acuerdo con el invento, se proporciona un procedimiento para obtener desmetilclorotetraciclina purificada a partir de desmetilclorotetraciclina bruta que contenga también desmetiltetraciclina, que comprende di-
10 solver dicha desmetilclorotetraciclina bruta en agua -- por adición de álcali, filtrar la solución para separar las impurezas insolubles, y acidificar el filtrado con un ácido mineral, con lo que se precipita una sal de ácido mineral de desmetilclorotetraciclina sustancialmen-
15 te libre de desmetiltetraciclina. Por tanto, el presente invento alcanza un resultado que no se puede conseguir con el procedimiento Winterbotton, a saber, una se- paración de desmetilclorotetraciclina purificada libre de desmetiltetraciclina y de impurezas de fermentación.

20 Al poner en práctica el presente invento, se hace una papilla en agua de desmetilclorotetraciclina bruta, producida por fermentación de una cepa productora de des- metilclorotetraciclina de S. aureofaciens, según se des- cribe en la patente de McCormick antes mencionada, so-
25 bre una base de peso por volumen y que puede ser del or- den de 1:10, a un pH comprendido entre 7-9, aproximada- mente, agitando hasta que se obtiene una solución com- pleta. La solución se filtra después para separar impu- rezas de fermentación no disueltas. Puede usarse cual-
30 quier hidróxido de metal alcalino adecuado, tal como hi

263083



dróxido sódico, hidróxido potásico, etc., para hacer el necesario ajuste de pH. El filtrado alcalino se acidifica después con un ácido mineral fuerte, p. ej. ácido --
5 clorhídrico, por ejemplo a un pH de 0,5-1, y preferible-
mente a 0,6-0,7, para obtener los rendimientos máximos. La solución ácida se envejece con agitación durante 20-
24 horas a temperatura aproximadamente ambiente, y los
cristales precipitados de hidrocioruro de desmetilcloro
10 tetraciclina que se forman se recogen por filtración, --
se lavan con una mezcla de ácido clorhídrico concentra-
do en agua y se secan en vacío a 50° C., aproximadamen-
te.

Una modificación de este procedimiento se funda --
en el empleo de un sistema disolvente bifásico compues-
15 to de agua y un disolvente inmiscible con agua, tal co-
mo un disolvente de metilalcoholcetona, p. ej. metiliso-
butilcetona, metilpropilcetona y análogos. Esto da como
resultado el mejoramiento del aspecto del producto fi--
nal, ya que se producen cristales de color amarillo cla-
20 ro, que son convenientes. Preferiblemente, el sistema --
disolvente bifásico se compone de partes iguales de --
agua y metilisobutilcetona.

En todo caso resultan rendimientos elevados de la
desmetilclorotetraciclina deseada, y ambos procedimien-
25 tos efectúan la separación buscada de desmetilclorote--
traciclina purificada de la desmetiltetraciclina y las
impurezas de fermentación asociadas.

El invento se describirá con mayor detalle en re-
lación con los siguientes ejemplos específicos.

30

EJEMPLO 1

263083



5 Se preparó una papilla de 50 gramos de desmetil--
clorotetraciclina bruta, que daba al análisis 1015 mcg.
/mg., y contenía 83 mcg./mg. de desmetiltetraciclina, -
en 500 mililitros de agua. Se ajustó el pH del disolvente
te a 9,0 mediante adición de 23 mililitros de solución
de hidróxido sódico al 25 % (peso/volumen). La papilla
se agitó durante 15 minutos antes de efectuar la solu--
ción completa. La solución se pasó a través de un fil--
tro de vidrio sinterizado pre-revestido con Hyflo Super
10 -Cel (agente auxiliar de filtración de tierra de diato--
meas). El filtrado se acidificó con 27 mililitros de áci--
do clorhídrico concentrado a pH 0,65. La solución acidi--
ficada se envejeció, agitando, durante 20 horas a 25° C.
Los cristales formados se recogieron luego por filtra--
15 ción, se lavaron dos veces con cantidades de 25 milili--
tros de solución de ácido clorhídrico al 5 % (volumen/
volumen) y se secaron en vacío a 50° C. durante 24 horas.
Resultaron 45,49 gramos de material. El valor del ensa--
yo espectrofotométrico del producto final fué 1010 mcg/
20 mg. El rendimiento de hidrocloruro de desmetilclorote--
traciclina fué 91 %. El contenido de desmetiltetracikli--
na del producto fué 2,3 mcg./mg.

EJEMPLO 2

25 Se preparó una papilla de 10 gramos de desmetil--
clorotetraciclina bruta, que daba al análisis 969 mcg./
mg. y contenía 167 mcg./mg. de desmetiltetraciclina, en
un sistema disolvente bifásico compuesto de 100 milili--
tros de agua y 100 mililitros de metil isobutil cetona.
30 La papilla se alcalinizó a pH 9,0 por medio de una solu--

263083



ción de hidróxido sódico al 25 % (peso/volumen). El material bruto se disolvió completamente en 15 minutos. La solución se clarificó por filtración y el filtrado - se ajustó a pH 0,65 con ácido clorhídrico concentrado. 5 El filtrado acidificado se agitó y se envejeció durante 24 horas a 20-25^a C. Al terminar este período de envejecimiento, los cristales formados se recogieron por filtración, se lavaron con dos porciones de 10 mililitros de ácido clorhídrico al 5 % (volumen/volumen), más dos 10 porciones de 10 mililitros de metil isobutil cetona, y se secaron hasta peso constante en vacío a 50^a C. El valor del ensayo espectrofotométrico del producto final - fué 1002 mcg./mg. No se detectó desmetiltetraciclina. El rendimiento de hidrocioruro de desmetilclorotetraciclina fué 80 % (sobre base ponderal) y 88 % (sobre base 15 de ensayo ponderal). Un mejoramiento neto en el calor - de los cristales se acusaba por el cambio en la densidad óptica $\left[\frac{E^{1\%}}{1\text{cm.}} \text{ a } 460 \text{ m}\mu \right]$ desde 0,49 para el producto bruto hasta 0,25 para el producto final.

20 La presente solicitud que corresponde a la presentada en E.U.A., el 9 de Diciembre de 1959, bajo el número 858.330, se acoge a los beneficios del artículo 51 - del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

25
N O T A

30 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 si-

263083



güentes:

5 1º.- Un procedimiento de obtener desmetilclorotetraciclina purificada, a partir de desmetilclorotetraciclina bruta que también contiene desmetiltetraciclina, -
caracterizado por disolver dicha desmetilclorotetraci-
clina bruta en agua por la adición de álcali, filtrar la
solución para eliminar impurezas insolubles, y acidifi-
car el filtrado con un ácido mineral, con lo cual preci-
pita una sal de ácido mineral de desmetilclorotetraci-
10 clina sustancialmente exenta de desmetiltetraciclina.

2º.- Un procedimiento según el punto 1º, caracteri-
zado porque el álcali se añade a un pH de 7 a 9.

15 3º.- Un procedimiento según los puntos 1º o 2º, -
caracterizado porque el filtrado se acidifica a un pH -
de 0,5 a 1 y, con preferencia, 0,6 a 0,7.

4º.- Un procedimiento según los puntos 1º, 2º o -
3º, caracterizado porque se usa un sistema disolvente -
de dos fases compuesto de agua y de un disolvente inmig-
cible con agua, tal como metilalcooilcetona.

20 5º.- Un procedimiento según cualquiera de los pun-
tos 1º a 4º, caracterizado porque el ácido mineral es -
ácido clorhídrico.

6º.- Un procedimiento para obtener desmetilcloro-
tetraciclina purificada.

25 Tal y como se ha descrito en la Memoria que ante-
cede y para los fines que se han especificado.

263083



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

Madrid, - 7 de Mayo de 1911

[Handwritten signature]