

Ch/



memoria descriptiva 3 01 090

CLASE DE
REGISTRO

Patente de invención por veinte años en España.

NOMBRE Y
NACIONA-
LIDAD DEL
SOLICITANTE

NOVO TERAPEUTISK LABORATORIUM A/S
(sociedad danesa).

RESIDENCIA
Y DOMICILIO

Fuglebakkevej 115
Copenhagen (Dinamarca).

OBJETO

"PROCEDIMIENTO PARA PRECIPITAR BASE DE TETRACICLINA
EN FORMA CRISTALINA".

Inventor:

Gert Svanholm, de nacionalidad danesa.

Prioridad:

Solicitud patente danesa Nº 2868/63, del 17 de junio
de 1.963.

.....

16 JUN 1950



1

301090

1

5

El presente invento se refiere a un procedimiento para precipitar base de tetraciclina en forma cristalina.

10

15

20

25

En la preparación de tetraciclina un medio de cultivo acuoso conteniendo tetraciclina se somete a un procedimiento combinado de recuperación y purificación. Cuando este procedimiento es ejecutado por medio de extracción, es usual quitar primeramente del medio de cultivo el micelio del microorganismo que ha producido la tetraciclina. Después de este la tetraciclina es extraída con un disolvente orgánico, al que han sido añadidos soportes, si se desea, con un valor pH tal que se disuelva en la fase orgánica tanta tetraciclina como sea posible, manteniéndose el volumen de dicha fase considerablemente menor que el del medio de cultivo. La fase orgánica resultante contiene tetraciclina en forma concentrada, y algunas de las impurezas que estuvieron presentes en el medio de cultivo, no son transferidas a la fase orgánica, de modo que la tetraciclina tanto se concentrará, como en cierta extensión se purificará. La tetraciclina así purificada en parte después es aislada de la fase orgánica, por ejemplo, por extracción sobre agua, a un valor pH al que la tetraciclina es mucho más soluble en la fase acuosa.



2

301090

1 sa que en el disolvente orgánico. Si se hace uso de volver
a extraer sobre agua, el volúmen del agente extractor, en el
presente caso la fase acuosa, se mantiene considerablemente
menor que el volúmen de la fase orgánica, de modo que la so-
lución de tetraciclina es ulteriormente concentrada. Al mis-
5 mo tiempo algunas de las impurezas que estuvieron presentes
en la fase orgánica, permanecen en dicha fase. De esta mane-
ra se obtiene una solución acuosa concentrada de tetracikli-
na, de la que la principal parte de las impurezas original-
mente presentes en el medio de cultivo han sido eliminadas.

10 Las extracciones arriba mencionadas pueden ser
repetidas hasta que se obtenga una solución conteniendo la
tetraciclina en tal forma pura y concentrada que pueda ais-
larse como base de tetraciclina por cristalización. La base
15 libre de tetraciclina que primero cristaliza de la solución,
puede purificarse ulteriormente por una serie de recristali-
zaciones o la base de tetraciclina puede ser recuperada de
la solución concentrada por desecación de congelación.

20 Así la situación es que hasta ahora había sido
necesario ejecutar un número relativamente grande de pasos
de purificación con el fin de obtener una eliminación eficaz
de impurezas y un precipitado cristalino puro de base de te-
traciclina.

25 Cuando se produce tetraciclina por fermentación
al emplear un microorganismo produciendo tanto tetraciclina,
como clorotetraciclina, es frecuéntemente deseable adoptar

301090



3

1 adoptar medidas contra la formación de clorotetraciclina.
Es conocido de varias maneras el suprimir la formación de
clorotetraciclina, pero no se ha conseguido evitar completa-
mente tal formación.

5 Ahora se ha encontrado que es posible, en un so-
lo paso, precipitar base de tetraciclina pura diréctamente
en forma cristalina y en gran rendimiento desde una solución
acuosa impura conteniendo tetraciclina, por un procedimien-
to simple sin precipitar simultáneamente clorotetraciclina,
10 si la hubiera.

El presente invento se basa en la nueva y sor-
prendente observación de que la base de tetraciclina puede
ser precipitada diréctamente en forma cristalina y en eleva-
do rendimiento y de gran pureza cuando se cuida del efecto
15 parcial de que ciertos ésteres de ácido fosfórico o fosforo-
so estén presentes en una concentración edecuada en estado
disuelto en un disolvente orgánico que sea inmisible o li-
geramente miscible con agua, parcialmente de que no estén
presentes ninguna clase de iones de calcio u otros iones de
20 metal capaces de formar compuestos complejos con tetracikli-
na, en la solución acuosa conteniendo tetraciclina en canti-
dades tales que una parte apreciable de la tetraciclina es-
té enlazada en forma compleja.

25 Cuando se observan estas medidas, a partir de
una solución acuosa impura de tetraciclina, es posible obte-
ner la tetraciclina cristalizada en tal estado puro que es

301090



4

1 directamente aplicable para fines terapéuticos y ha sido si-
multáneamente liberada de la clorotetraciclina, que pudiera
estar presente en la solución acuosa.

5 Por consiguiente, el procedimiento según el in-
vento se caracteriza porque se añade a la solución acuosa
conteniendo tetraciclina, que está principalmente libre de
iones de calcio y otros iones de metal capaces de formar com-
puestos complejos de tetraciclina, un disolvente orgánico,
10 en que está disuelto un diéster o monoéster de ácido ortofos-
fórico o fosforoso, y ajustando el valor pH de la solución
acuosa a 3-8, preferentemente 5-7, antes o después de añadir
el disolvente orgánico, después de lo cual se separa de ello
la base de tetraciclina cristalizada.

15 De antemano no se podía anticipar que las impu-
rezas contenidas en la solución acuosa de partida, por este
tratamiento, pudieran quedar en una gran extensión en la fa-
se orgánica, de modo que la base de tetraciclina cristalina
precipitada posee un alto grado de pureza.

20 En el caso de que la solución acuosa de tetraci-
clina también contenga clorotetraciclina se obtiene por el
procedimiento presente una eliminación eficaz de la cloro-
tetraciclina, modo que los cristales de tetraciclina resultan
25 tes pueden satisfacer inmediátamente las demandas de pureza
que normalmente se imponen en lo que concierne a preparacio-
nes de tetraciclina. Así, ha resultado que, cuando se emplea
el procedimiento según el invento, se puede obtener, para

301090



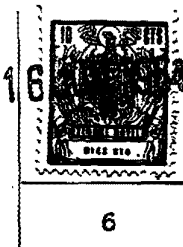
5

1 todos los fines prácticos, cristales de tetraciclina, que
están libres de clorotetraciclina aún cuando el material de
partida contenga incluso cantidades muy considerables de
clorotetraciclina.

5 Si la solución acuosa de partida conteniendo
tetraciclina solamente contiene una cantidad insignificante
de tetraciclina, el rendimiento de base de tetraciclina pura
es bajo, aunque es posible obtener un precipitado de cristales
de tetraciclina al emplear una solución conteniendo te-
traciclina en una cantidad tan baja como alrededor de 5000
10 unidades por mililitro. En la práctica las soluciones de
tetraciclina contendrán usualmente mucha más tetraciclina
y, por lo tanto, estarán bien adecuadas para el objeto del
invento.

15 Los ésteres de ácido fosfórico y fosforoso em-
pleados tienen que contener por lo menos un átomo de hidró-
geno dissociable en la molécula y ser solubles en el disolven-
te orgánico. La solubilidad requerida se procura porque el
radical orgánico, que constituye parte de la molécula de
20 éster, tiene tal naturaleza hidrófoba que se suprime la na-
turaleza hidrófila de la parte de ácido fosfórico o fosfo-
roso de la molécula de éster en tal extensión que el éster
se haga soluble en el disolvente orgánico empleado. Es fá-
cil, por simples experimentos, determinar cuales son los
25 ésteres dentro del grupo definido, los que son aplicables
para el propósito del invento. En el caso de que se haga

301090



6

1 uso de diésteres, los dos radicales orgánicos pueden ser
idénticos o diferentes. Particularmente son ésteres apropia-
do los de ácido di-(2-etilhexil)-fosfórico y del ácido dino-
nil-ortofosfórico. Cuando se usan estos ésteres, se obtiene
5 en buenos rendimientos una excelente purificación de la te-
traciclina y cristalización de la misma.

Dichos ésteres pueden utilizarse en concentra-
ciones relativamente variables. Ordinariamente, más de 25 %
de peso será inapropiado, debido a viscosidad incrementada
de la fase orgánica. Usualmente se hace uso de concentracio-
10 nes menores llegando hasta alrededor de 1 % de peso. Una con-
centración de los ésteres de alrededor de 5 % de peso da bue-
nos resultados en muchos casos. Un alcance adecuado de con-
centración es desde 2 a 10 % de peso.

15 El disolvente, en que se disuelve el éster em-
pleado puede ser elegido entre una larga serie de disolven-
tes orgánicos que son inmiscibles o sóloamente ligeramente
miscibles con agua. Se obtuvieron excelentes resultados al
emplear, por ejemplo, butilacetato, cloformo, alcohol amíli-
20 co y cetona metilisobutílica. La cantidad del disolvente or-
gánico depende del éster empleado, de su concentración, y
de la cantidad y naturaleza de las impurezas presentes. Es
necesario que estas últimas se mantengan disueltas en el di-
25 solvente orgánico conteniendo disuelto en el mismo éster em-
pleado con el fin de que la base de tetraciclina pueda ser
obligada a cristalizar. Con el fin de ilustrar este estado



301090

7

1 de cosas puede mencionarse que, cuando se usa una solución
acuosa cruda de tetraciclina con un contenido de tetraciclina
de 25.000 unidades por mililitro y butilacetato como di-
solvente orgánico con un contenido de ácido di-(2-etilhexil)-
5 orto-fosfórico en una cantidad de 5 % de peso, puede obtenerse
un rendimiento de base cristalina de tetraciclina de al-
rededor de 85 % cuando se hace uso de una proporción de vo-
lúmen entre el butil-acetato y la solución cruda de tetraci-
clina de 1:5.

10 Los iones de calcio y otros iones de metal que
forman compuestos complejos pueden haber sido eliminados de
la solución acuosa de tetraciclina antes de la cristaliza-
ción de la base de tetraciclina, por ejemplo, por intercam-
bio de iones o precipitación, o pueden mantenerse enlazados
15 al complejo durante la cristalización. Puede hacerse uso de
la posibilidad antes mencionada porque se añade a la solu-
ción acuosa de tetraciclina un agente gelante que tenga un
efecto formador de gelato más fuerte sobre dichos iones de
metal que la tetraciclina, antes de la cristalización. Un
20 agente gelante particularmente conveniente es, por ejemplo,
ácido tetra-acético de etilenodiamina.

25 El presente procedimiento se ilustra además en
los siguientes ejemplos. En esta relación se llama la aten-
ción sobre el hecho de que una unidad de tetraciclina co-
rresponde a 1 μ g de hidrocioruro de tetraciclina, y que
la base de tetraciclina cristaliza con agua de cristal que

3 1090

16 JUL



8

sólamente puede eliminarse por secado vigoroso, por ejemplo a 60°C al vacío durante 12 horas.

EJEMPLO 1

A 100 litros de un concentrado acuoso ácido de una mezcla de 60 % de tetraciclina y 40 % de clorotetraciclina preparada por extracción de un líquido de fermentación con butilacetato, a que se ha añadido 2,5 % de ácido di-(2-etilhexil)-fosfórico con pH neutro y volviendo a extraer sobre agua acidulada por la adición de ácido fosfórico, se agregan 24 litros de una solución al 5 % de ácido di-(2-etilhexil)-fosfórico en butilacetato, 24 litros de una solución al 40 % de ácido tetracético de etileno-diamina de sodio en agua y lejía de sosa 10 N hasta pH = 5,5. Se continúa agitando durante dos horas. La mezcla se deja durante la noche y se filtra después de lo cual el precipitado resultante es lavado con agua y butilacetato y se seca al vacío. Por ello se obtiene base de tetraciclina cristalina pura conteniendo menos de 5 % de clorotetraciclina en un rendimiento de 70 %, que puede convertirse directamente en hidrocioruro de tetraciclina USP.

EJEMPLO 2

A 89 litros de un concentrado crudo acuoso ácido conteniendo 12.000 unidades de tetraciclina por milígramo se añade agitando vigorosamente 13 litros de una solución al 40 % de ácido tetracético de etilendiamina de sodio y 10 litros de una solución al 10 % de ácido di-(2-etil-

301090



16

9

1 hexil)-fosfórico en butilacetato, después de lo cual el pH
es ajustado a 6,4 añadiendo lejía de sosa 10 N. Después de
reposar durante una noche se ejecuta un procedimiento de
filtrado y el precipitado resultante es lavado con agua y
butilacetato y se seca al vacío. El rendimiento importa
5 1012 gramos de base de tetraciclina pura de 885 unidades
por milígramo que puede convertirse directamente en hidro-
cloruro de tetraciclina USP.

EJEMPLO 3

10 10 gramos de tetraciclina cruda preparada por
extracción de butanol de líquido de cultivo se disuelven en
100 ml de agua y ácido clorhídrico concentrado hasta pH =
1,3, se filtra y lava con agua hasta que se obtengan 140 ml
de filtrado. A 130 ml de esto conteniendo 4,9 g de tetraci-
15 clina y 0,3 g de clorotetraciclina y alrededor de 0,5 g de
calcio se añade 1 ml de ácido di-(2-etil-hexil)-fosfórico,
9 ml de butilacetato y 10 g de ácido tetracético de etileno-
diamina disuelto en 10 ml de agua y 10 ml de lejía de sosa
20 10 N, después de lo cual se ejecuta una agitación vigorosa
y el pH de la mezcla se ajusta a 6,4. Después de haber cesa-
do la cristalización, la mezcla es filtrada y los cristales
son lavados con 10 ml de agua y 10 ml de butilacetato. Por
ello se obtienen 4,76 g de base de tetraciclina de color ama-
25 rillo claro teniendo una actividad de 900 unidades por milí-
gramo de tetraciclina, que son directamente aplicables en la
producción de hidrocioruro de tetraciclina USP.

301090



10

1 EJEMPLO 4

6 g de tetraciclina cruda conteniendo alrededor de 0,3 g de calcio y alrededor de 2,5 g de tetraciclina son suspendidos en 40 ml de agua y se añade ácido sulfúrico hasta pH = 1,5. La mezcla es filtrada y el precipitado que
5 principalmente consiste en sulfato de calcio, se revuelve en 20 ml de agua a pH 1,5, se filtra de nuevo y se lava con agua. Por ello se obtienen 87 ml de filtrado, al que se añaden agitando vigorosamente, 20 ml de butilacetato, 1,5 g de ácido di-(2-etilhexil)-orto-fosfórico y lejía de sosa
10 10 N hasta pH = 5,8. Después de haber cesado la cristalización, los cristales son filtrados para extraerlos, se lavan con 10 ml de agua y 8 ml de butilacetato y se seca al vacío. El rendimiento asciende a 1,55 g de base de tetraciclina
15 pura, de 1013 unidades de tetraciclina de actividad por mg, que pueden convertirse directamente en hidrocloreto de tetraciclina USP.

EJEMPLO 5

20 A 250 ml de concentrado crudo acuoso ácido conteniendo alrededor de 7 g de tetraciclina se añaden 50 ml de butilacetato y 10 ml de Lensodel A (Lensodel A se prepara por Shell en Gran Bretaña y contiene como componente activo fosfato de dinonilo de sodio) y 65 ml de una solución
25 al 40 % de ácido tetracético de etilenodiamina de sodio, después de lo cual el valor pH se ajusta a 5,8 agitando vigorosamente. Después de haber cesado la cristalización, se

16J



301090

11

1 sacan los cristales filtrando, se lavan con agua y butilacetato y se secan al vacío. El rendimiento asciende a 73 % de base de tetraciclina que puede usarse directamente para preparar hidrocloreto de tetraciclina USP.

5 EJEMPLO 6

5 A 200 ml de concentrado crudo acuoso ácido conteniendo 27.000 unidades de tetraciclina por ml y 5.000 unidades de clorotetraciclina por ml, se añade agitando vigorosamente 40 ml de metilisobutil cetona, 2 g de ácido di-(2-
10 etilhexil)-fosfórico, 50 ml de una solución al 40 % de ácido tetracético de etilnodiamina y lejía de sosa 10 N hasta pH= 6,0. Después de haber cesado la cristalización, los cristales son separados por filtrado lavados con 15 ml de agua y 5 ml de metilisobutil cetona y se secaron en vacío. El rendimiento asciende a 4,5 g de base de tetraciclina pura teniendo una actividad de 981 unidades por mg, que son directamente aplicables para preparar hidrocloreto de tetraciclina USP.

20 Entre otros ésteres, que han sido ensayados y que son adecuados para el propósito del invento, pueden mencionarse los siguientes: Decilfosfito, 2-etil-hexil-fosfato, decilfosfato, laurilfosfato y octil-fenil-fosfato.

25



16

301090

12

N O T A

=====

La presente patente de invención
comprende las siguientes reivindicaciones:

1.- Procedimiento para precipitar base de tetraciclina en forma cristalina desde una solución acuosa conteniendo tetraciclina, conteniendo por lo menos 5.000 unidades de tetraciclina por mililitro, caracterizado por añadir a la solución conteniendo tetraciclina, que está principalmente libre de iones de calcio y de otros iones de metal capaces de formar compuestos complejos con tetraciclina, un disolvente orgánico que es inmiscible o ligeramente miscible con agua y en que se disuelve diéster o monoéster de ácido orto-fosfórico o ácido fosforoso, y ajustando el valor pH de la solución acuosa a 3 - 8, preferentemente a 5 - 7, antes o después de añadir el disolvente orgánico, después de lo cual la base de tetraciclina cristalizada es separada.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se emplea como éster de ácido fosfórico, el ácido di-(2-etilhexil)- o dinonil-orto-fosfórico.

3.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por emplear el éster de ácido fosfórico en una cantidad de dos a diez por ciento de peso.

4.- Procedimiento según las reivindicaciones precedentes, caracterizado por añadir a la solución acuosa

301090

16 JUN



13

1 de tetraciclina, antes de la cristalización un agente gelante teniendo un efecto formador de gelato sobre iones de calcio y los iones de metal análogos más fuerte que la tetraciclina.

5 5.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por emplear ácido tetraacético de etilenodiamina como agente gelante.

6.- Procedimiento para precipitar base de tetraciclina en forma cristalina.

10 Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva, que consta de trece hojas foliadas y escritas por una sola de sus caras.

Madrid, a 16 JUN. 1964

CARLOS ROEB
P.P.

15

20

-0-0-0-

25