



P.- 34.266

A 94.436

Case P.C. 4944-LH
(SDG)

336517

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 7 de Febrero de 1.967, con el núm. 336.517

en

ESPAÑA

por VEINTE años

a nombre de CHAS. PFIZER & CO., INC, entidad norteamericana, establecida en 235 East 42nd Street, Nueva York, N.Y., Estados Unidos de América, por:

"PERFECCIONAMIENTOS EN EL PROCEDIMIENTO PARA OBTENER UN COMPLEJO DE UN ANTIBIOTICO DE TETRACICLINA".

La presente invención se refiere a un procedimiento perfeccionado para recuperar antibióticos del tipo de la tetraciclina. Más en particular, la presente invención se refiere a un procedimiento perfeccionado para recuperar antibióticos del tipo de la tetraciclina, que forman complejos de amonio cuaternario, de soluciones y suspensiones acuosas de los mismos.

5

El objeto de la invención es proporcionar un método para extraer selectivamente antibióticos del tipo de la tetraciclina, de caldos de fermentación que los

10



5 contienen, por formación de complejo del antibiótico con un nuevo tipo de sal de amonio cuaternario. Las sales de amonio cuaternario útiles en la invención son los haluros de trimetil-(2-metil-alcoholo de cadena larga)-amnio, corrientemente conocidos como beta-aminas cuaternizadas. Se ha hallado inesperadamente que estas beta-aminas cuaternarias son mucho más selectivas, para formar complejo con el antibiótico del tipo de la tetraciclina contenido en filtrados descalcificados de caldo de fermentación, que los haluros de alcoholo de larga cadena rectilínea-trimetilamonio normalmente usados para formar complejo con estos antibióticos. Además, se ha hallado que la selectividad de estas beta-aminas cuaternizadas es de tal grado que se pueden eliminar, sin sacrificio de la calidad del producto, las posteriores etapas de tratamiento, normalmente requeridas, para purificar la tetraciclina extraída por formación de complejo con sales de amonio cuaternario, tales como lavado de la torta de tetraciclina con alcohol, descoloración con carbono, y diversas etapas de blanqueamiento, conocidas por las personas familiarizadas con la técnica. Aun otro objeto de la invención es proporcionar un método para obtener un antibiótico con un contenido mucho menor de sal residual de amonio cuaternario. También se ha hallado que el procedimiento de la invención produce antibióticos que tienen mayor biopotencia y color perfeccionado, frente a los antibióticos obtenidos por formación de complejo del antibiótico con sales de trimetil-alcoholo de larga cadena-rectilínea-amonio cuaternario. Otro objeto de la invención es proporcionar un método para obtener mayores rendimientos de

10

15

20

25

30

2-3-61

336517



antibióticos recuperado de caldos de fermentación. Los
mayores rendimientos de antibiótico usable que se pueden
obtener por el procedimiento se pueden atribuir a que
se obtiene un producto puro que no requiere repetidas re-
5 cristalizaciones, con sus consiguientes pérdidas de pro-
ducto.

El uso de sales de trimetil-alcoholo de larga
cadena rectilínea-amonio cuaternario, para extraer anti-
bióticos del tipo de la tetraciclina, se expone en las
10 patentes EE.UU. 2.875.247, 2.734.018, 2.871.264 y 2.873.276.
En la patente EE.UU. 2.875.247, expedida a Sidney Martin
Fox y otros, se reivindica un método para extraer tetra-
ciclina y clorotetraciclina, formando complejos del anti-
bótico en una masa de fermentación descalcificada, a pH
15 de aproximadamente 5,5 a 11, con una sal de amonio cuater-
nario; someter el complejo a extracción con una metilal-
coholcetona; separar la cetona, y aislar de élla el anti-
biótico. En esta patente se exponen varios métodos para
purificar la clorotetraciclina y tetraciclina obtenidas
20 por este procedimiento. Por ejemplo, los cristales de
cloro-tatraciclina obtenidos del complejo, por acidifica-
ción, requieren ser lavados con agua, un alcoxi inferior-
alcanol inferior, y finalmente ser levados con un alcanol
inferior, antes de ser secados a vacío. Además, se descri-
25 be que los cristales secos requieren más tratamiento, con
un agente reductos, para blanquear las impurezas clorea-
das que son arrastradas en este procedimiento. Se indica
que los cristales de tetraciclina preparada por el proce-
dimiento de la invención requieren nueva formación de sus-
30 pensión en butanol-2-etoxietanol y ácido clorhídrico, para

336517



obtener tetraciclina de calidad de especificación. Además el procedimiento, como se expone en los ejemplos de esta patente, requiere tratamiento con un coadyuvante de filtración, seguido por repetidas extracciones con disolvente, para obtener un producto adecuado.

5

En la patente EE.UU. 2.734.018, expedida a Pasquale Paul Minieri y otros, se expone el uso de mezclas de cloruros de alcoholtrimetilamonio y cloruros de dialcoholdimetilamonio para extraer tetraciclina de un filtrado obtenido de un caldo de fermentación. Esta patente expone el uso de metanol para lavar el clorhidrato de tetraciclina cristalizado, obtenido del complejo exento de color. En la patente EE.UU. 2871.264, expedida a Pasquale P. Minieri y otros, se expone la preparación de complejos de tetraciclina-amonio cuaternario, con diversas sales de amonio cuaternario que contienen al menos un grupo alcohol de larga cadena rectilínea. La patente EE.UU. 2.873.276, expedida a Edwin W. Blase, reivindica el uso de sales de alcohol de cadena rectilínea-amonio cuaternario, para formar complejo con oxitetraciclina.

10

15

20

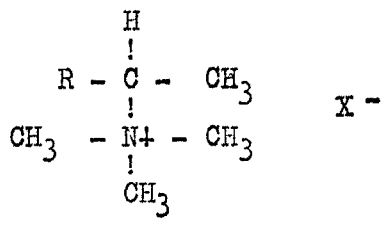
La presente invención se refiere a un procedimiento para obtener un complejo de un antibiótico de tetraciclina, partiendo de un medio acuoso que contiene un antibiótico de tetraciclina producido por fermentación obtenido de un caldo de fermentación filtrado descalcificado, haciendo reaccionar con él al menos una cantidad equivalente molar de una sal de amonio cuaternario, a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 12, donde la sal de amonio cuaternario tiene la fórmula:

25

30

336517

2-3-67



5 donde R es alcoholilo que tiene de 9 a 18 átomos de carbono,
y X es cloruro, bromuro y yoduro. Con el término antibió-
ticos de tetraciclina producidos por fermentación se quie-
re decir, desde luego, aquellos antibióticos de tetraci-
clina producidos por fermentación, entre los que se in-
10 cluyen la tetraciclina, oxitetraciclina, clorotetracicli-
na y 7-cloro-6-desmetiltetraciclina, Más específicamente,
la invención se refiere al procedimiento en que el pH está
comprendido entre aproximadamente 8 y 11. Además, en la
invención se incluye específicamente el procedimiento en
15 que el complejo de antibiótico con amonio cuaternario
antes indicado se deja precipitar y se filtra del siste-
ma acuoso. En la invención se incluye también el procedi-
miento en que el complejo de antibiótico y amonio cuater-
nario se pone en contacto con un disolvente orgánico po-
20 lar inmiscible con agua, para extraer del medio acuoso
el complejo de antibiótico con amonio cuaternario, sepa-
rando el extracto disolvente y aislando luego el antibió-
tico del extracto disolvente. En la invención se incluye
específicamente el procedimiento en que el antibiótico es
25 tetraciclina, en que el antibiótico es oxitetraciclina,
clorotetraciclina, y también en que el antibiótico es 7-
cloro-6-desmetiltetraciclina.

30 Una realización específica de la invención com-
prende descalcificar un caldo de fermentación que contie-
ne tetraciclina, oxitetraciclina, clorotetraciclina o

143 ABR. 19



7-cloro-6-desmetiltetraciclina, añadiendo al mismo ácido oxálico, o una sal soluble de ácido oxálico, para precipitar oxalato cálcico, y filtrar el caldo. También es posible, pero no preferido, obtener el complejo cuaternario de antibiótico, por este procedimiento, a partir de la totalidad del caldo, sin descalcificar ni filtrar.

Como es sabido bien, por las personas familiarizadas con la técnica de la fermentación, en el caldo de fermentación y filtrado hay presente una pequeña concentración de ión magnesio. Se ha hallado que la pequeña cantidad de ión magnesio normalmente presente en el caldo facilita el método de la presente invención. Después de descalcificar y filtrar, el filtrado resultante se ajusta a un pH de aproximadamente 5 a 12, y preferiblemente de 8 a 11, con un reactivo básico, y se le añade una cantidad molar equivalente de una beta-amina cuaternizada. El filtrado acuoso se puede también ajustar al pH antes indicado después de la adición de la sal de amonio cuaternario. Aunque se puede añadir a la mezcla menos de una cantidad molar equivalente de la sal, el método más eficaz y económico comprende añadir al filtrado al menos una cantidad molar equivalente, y preferiblemente un exceso de sal.

Las sales particularmente útiles en la invención son los cloruros de trimetil-2-metilalcohilamonio en los que el alcohol tiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 19 átomos de carbono. Son compuestos ilustrativos el cloruro de trimetil-2-metildecilamonio, cloruro de trimetil-2-metiltetradecilamonio, cloruro de trimetil-2-metilhexadecilamonio, cloruro de trimetil-2-metilnona-

2-3-67



5 decilamonio, y similares. Aunque las sales cloruro son las sales preferidas e ilustradas, se pueden usar los yoduros, bromuros, sulfatos y nitratos, cuando se dispone de ellos. Se dispone en el comercio de muchos de los compuestos de amonio cuaternario de la invención, en forma de mezclas, de la Armour Chemical División de Armour and Company. Estas mezclas se venden con el nombre registrado de Arquad L-11 y Arquad L-15. Se cree que el Arquad L-11 es una mezcla consistente principalmente en cloruros de trimetil-2-metilalcoholamonio en los que el alcohol tiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 13 átomos de carbono. Se cree que el Arquad L-15 es una mezcla consistente principalmente en cloruros de trimetil-2-metilalcoholamonio en los que el alcohol tiene de aproximadamente 14 a aproximadamente 19 átomos de carbono. Como será conocido por las personas versadas en la técnica, tales sales de amonio cuaternario se pueden preparar haciendo reaccionar alfa-olefinas obtenidas del petróleo con cloruro de hidrógeno, obteniendo el cloruro de 2-metil-alcoholo de cadena larga. Este producto se puede hacer reaccionar con dimetilamina, obteniendo N,N-dimetil-2-alcoholo de cadena larga-amina, que es cuaternizada con un haluro de metilo, tal como yoduro de metilo, obteniendo el haluro de trimetil-2-metilalcoholamonio.

25 La mezcla de reacción obtenida añadiendo al filtrado la sal de amonio cuaternario se deja reaccionar durante de aproximadamente 15 min hasta varias horas, según el tamaño de la muestra. Desde luego, los periodos de tiempo más largos producen algo de degradación del producto. En general, basta con 15 a 30 min para hacer reaccio-

30
336517



nar una tanda de 37.850 a 95.000 litros de filtrado, con
agitación adecuada. El precipitado coloidal del complejo
que se produce se puede filtrar de la mezcla, y secar. La
filtración y secado se efectúan por cualquiera de los mé-
5 todos con que están familiarizadas las personas versadas
en la técnica. Preferiblemente se usa un filtro prensa pa-
ra operaciones a escala de producción, y se usa un horno
de vacío para secar la torta de filtración. Así se consi-
guen economías significativas en el tiempo de procedimien-
10 to. El complejo cuaternario de antibiótico, en forma de
torta seca, es útil para alimentos para animales, y para
almacenar el producto en forma estable. El complejo de
antibiótico-amonio cuaternario, de la mezcla de reacción
se puede poner también en contacto con un disolvente orga-
15 nico polar inmiscible en agua, para extraer el complejo
del sistema acuoso. La solución en disolvente orgánico
se separa, y el antibiótico se puede aislar del complejo
en solución.

Cuando el antibiótico se ha de usar en su forma
20 de sal, o como base, la mezcla acuosa del complejo cuater-
nario de antibiótico, del filtrado, se extrae con un disol-
vente orgánico polar inmiscible con el agua, Son adecua-
dos una amplia variedad de tales disolventes, para la pre-
sente invención y la selección del mismo no es particu-
25 larmente crítica. Entre los disolventes preferidos, a
causa de su disponibilidad, se incluyen las cetonas alifá-
ticas saturadas que tienen al menos 5 y hasta 7 átomos
de carbono, tal como la metilisopropilcetona, metilisobu-
tilcetona, diisopropilcetona y metilisoamilcetona. Tam-
30 bién son eficaces los ésteres acetato alifáticos inmisci-

23.67

13 ABR 1952

bles con el agua, que tienen de 5 a 7 átomos de carbono, tal como el acetato de n-butilo, acetato de isobutilo, acetato de amilo y acetato de n-propilo. Los alcoholes preferidos son aquellos que tienen de 4 a 5 átomos de carbono, tal como alcohol n-butílico, alcohol isobutílico, alcohol sec-butílico y alcohol amílico. También son eficaces los hidrocarburos aromáticos, tal como benceno, tolueno y xileno, igual que los hidrocarburos clorados tales como cloroformo, dicloruro de etileno y tricloroetileno. Aunque el volumen total de disolvente y el número de extracciones no son factores críticos en el procedimiento de la invención, se ha hallado que la extracción se efectúa preferiblemente, respecto a la economía y eficacia en la extracción de la máxima cantidad de antibiótico, con aproximadamente un volumen igual del volumen total de filtrado, y preferiblemente en una multiplicidad de extracciones usando para cada extracción porciones del volumen total de disolvente. Desde luego, también se obtienen rendimientos económicos mediante extracciones únicas.

El antibiótico se recupera de la solución del mismo en disolvente antes mencionada, por cualquiera de los métodos bien conocidos por las personas versadas en la técnica. Entre estos métodos se pueden mencionar la preparación de la sal cálcica del antibiótico. En este método se añade una sal cálcica, tal como cloruro cálcico, a la solución del complejo en el disolvente orgánico, y cristaliza de ella la sal cálcica del antibiótico. Los cristales se filtran y secan, obteniendo un producto puro y estable. Un método alternativo que también es bien conocido por las personas familiarizadas con la técnica, impli-

336517



ca añadir agua a la solución del complejo en el disolvente orgánico, y acidificar hasta un pH de aproximadamente 1,5 con un ácido mineral, con lo que el antibiótico es extraído a la fase acuosa. La agitación de las dos fases durante corto tiempo facilita la extracción. Después de separar las fases, el disolvente orgánico se puede centrifugar, para aislar más de la fase acuosa. Las porciones acuosas se combinan y ajustan a un pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 4, con un reactivo básico tal como hidróxido sódico acuoso, hidróxido potásico, hidróxido amónico, o similares. La base libre cristaliza de la solución. Los cristales se filtran, se lavan con un alcohol inferior, y se secan a vacío, obteniendo el producto puro.

Ejemplo 1

Se añaden 40 g de ácido oxálico a 6 litros de caldo de fermentación de tetraciclina, y se ajusta la acidez a un pH de 2,0, con ácido sulfúrico. La mezcla se agita durante 30 min y se filtra. El filtrado, que contiene 1312 γ /ml, se divide en porciones de 1500 ml. Se añade a las muestras Arquad L-15 (al 50% en isopropanol/agua), en las cantidades relacionadas en la Tabla I, y la acidez se ajusta a un pH igual a 9,0, con hidróxido sódico acuoso al 50%. Las muestras se someten a extracción con 100 ml de metilisobutilcetona. El extracto de cetona se analiza por análisis de absorción ultravioleta, para determinar la concentración de tetraciclina.

Muestra	Arquad L-15 (50%) -(ml.)-	Tetraciclina, γ /ml.
A	1	28,500
B	2	37.300
C	3	43.930

2-3-67



Los extractos en cetona son transparentes, de color castaño oscuro, y no contienen impurezas no disueltas observables.

Ejemplo 2

5 A tres muestras de 1,8 litros de caldo de fermentación de tetraciclina, filtradas y descalcificadas, se añaden, respectivamente, 12 ml, 9,6 ml y 7,2 ml de Arquad L-11 (solución al 50%). La acidez de cada mezcla se ajustó a un pH igual a 9,0 con hidróxido sódico acuoso al 50%.
10 Se añadió a cada muestra metilisobutilcetona, 350 ml, y se agitó la mezcla durante 30 min. La cetona se descartó de la porción acuosa, y se analizó para determinar la tetraciclina, con los resultados que se muestran en la Tabla 2.

15

TABLA 2

<u>Muestra</u>	<u>Arquad L-11 (ml.)</u>	<u>Cetona extractora conc. de tetraciclina (%/ml).</u>	<u>Millones de unidades.</u>
A	12	16.430	6,0
B	9,6	15.975	6,1
C	7,2	17.780	6,1

25

Los extractos en cetona fueron transparentes y de color comparable al del extracto obtenido con Arquad L-15 en el Ejemplo 1. Cuando se aplica este método a caldos de fermentación descalcificados y filtrados que contienen oxitettraciclina, clorotetraciclina y 7-cloro-6-desmetiltetraciclina, se obtienen resultados similares.

Ejemplo 3

30

A. Se añadieron a dos porciones de 4 litros de un caldo de fermentación de tetraciclina, descalcificado

336517



5 y filtrado, que contenía 6000 γ /ml, porciones equimolares de una mezcla de cloruro de alcoholo de larga cadena rectilínea-trimetilamonio (Arquad 2C) y de una mezcla de cloruro de 2-metil-alcoholo de cadena larga-trimetilamonio (Arquad L-15) respectivamente. La acidez de cada muestra se ajustó a pH igual a 9,0, con hidróxido sódico acuoso al 25% se añadieron a cada una 1300 ml de metisobutilcetona, y se agitaron las mezclas durante 30 min. Se separaron las fases orgánicas y se determinó la tetraciclina, con los siguientes resultados:

10

TABLA III

Muestra	Volumen metil-isobutilcetona	γ /ml	Millones de unidades	Rendimiento por etapas.
L-15	1.225 ml.	18.084	22,1	92%
"2C	1.220 ml.	16.276	19,9	83%

15 B. Se añadieron 300 ml de agua destilada a cada una de varias muestras de 1 litro de los extractos de cetona de la operación A. La acidez se ajustó a 1,5 mediante ácido sulfúrico acuoso al 25%, con agitación. Las muestras se agitaron durante min adicionales, y se separaron las fases. Las fases acuosas ricas se filtraron y se determinó la tetraciclina, con los siguientes resultados:

20

Muestra	Volumen de agua	γ /ml	Millones de unidades por 1000 ml de cetona	Millones de unidades totales
L-15	285 ml.	60.000	17,1	21,0
2C	285 ml.	53.000	15,1	18,4

25 C. La acidez de los extractos acuosos de la parte B se ajustó a un pH igual a 3,5, con hidróxido sódico acuoso al 25%. Después de un periodo de granulación de 3 horas, se filtraron de cada muestra cristales de tetraciclina. Los cristales se lavaron con agua destilada y finalmente con una pequeña cantidad de alcohol isopropílico,

30

336517

2.3.67



para facilitar el secado. Luego se secaron los cristales durante 12 horas a 60°C, a vacío, resultando lo que se indica en la tabla 3.

TABLA 3

Muestra	Sal Arquad-	Tetraciclina producto	
		Millones de unidades	Total
L-15	16,8 g	19	79%
2C	16,7 g	17	71%

10 (1) Análisis por absorción ultravioleta

Análisis de productos

Muestra

Transparencia de la solución (2)	L-15 Transparente	Turbia ----- impurezas no disueltas presentes	2C
----------------------------------	----------------------	---	----

15	Cenizas	0,00%	0,21%
	Agua (3)	10,8%	11,2%
	Arquad residual (4)	114 ppm	377 ppm
	Biopotencia (5)	992 γ /mg	836 /mg
	Color	Amarillo Claro	Canela

20 Epitetraciclina (6) 4,9% 6,4%

(2) 1 g en 10 ml de metanol que contienen 1 ml de ácido clorhídrico 3N:

(3) Análisis por absorción ultravioleta

(5) Método turbidimétrico, determinación microbiológica.

25 organismo de ensayo: *Klebsiella pneumoniae*, ATCC 10031

(6) Aislamiento del epímero por cromatografía en papel, seguida por análisis por absorción ultravioleta.

30 Para obtener un producto de pureza equivalente a la de la muestra de Arquad L-15, la muestra de Arquad 2C requeriría una o más recristalizaciones adicionales,



con una pérdida de rendimiento de aproximadamente 10% por cada recristalización.

Ejemplo 4

5 Cuando se añaden 45 ml de Arquad L-15 (50% en isopropanol/agua) a 6,4 litros de un caldo de fermentación filtrado y descalcificado, que contiene 4792 γ /ml o 30,7 millones de unidades de tetraciclina, se ajusta el pH a 9,0 con solución acuosa de hidróxido sódico al 50%, y se agita la mezcla durante 30 min y se deja precipitar, el producto resultante, complejo de tetraciclina-amonio cuaternario, se obtiene con gran rendimiento y excelente pureza.

10 Se obtienen resultados similares cuando se aplica este método a caldos de fermentación filtrados y descalcificados que contienen oxitetraciclina, clorotetraciclina o 7-cloro-6-desmetiltetraciclina.

15 Esta solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América el 3 de Agosto de 1.966, con el número 569.801, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

N O T A

25

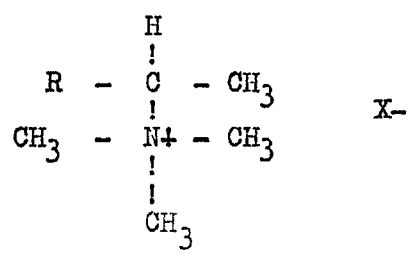
Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención, en España, por VEINTE años, son los siguientes.

30

336517



1.- Perfeccionamientos en el procedimiento para obtener un complejo de un antibiótico de tetraciclina, partiendo de un medio acuoso que contiene un antibiótico de tetraciclina producido por fermentación, obtenido de un caldo de fermentación filtrado y descalcificado, haciendo reaccionar con él al menos una cantidad equivalente molar de una sal de amonio cuaternario, a pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 12, caracterizado por el hecho de que dicha sal de amonio cuaternario tiene la fórmula



donde R es alcoholilo que tiene de 9 a 18 átomos de carbono, y X es cloruro, bromuro o yoduro.

2.- Perfeccionamientos según la reivindicación 1, caracterizados por el hecho de que dicho medio acuoso se ajusta a un pH de aproximadamente 8 a 11.

3.- Perfeccionamientos según la reivindicación 1, caracterizados por el hecho de que el complejo de antibiótico con amonio cuaternario se deja precipitar y se filtra del sistema acuoso.

4.- Perfeccionamientos según la reivindicación 1, caracterizados por el hecho de que el complejo de antibiótico con amonio cuaternario se pone en contacto con un disolvente orgánico polar inmiscible con agua, para

2.3.67

13 ABR



extraer de dicho medio acuoso el complejo de antibiótico con amonio cuaternario, separando el extracto disolvente, y aislando luego el antibiótico del extracto disolvente.

5 5.- Perfeccionamientos según la reivindicación 1, caracterizados por el hecho de que dicho antibiótico es tetraciclina.

6.- Perfeccionamientos según la reivindicación 1, caracterizados por el hecho de que dicho antibiótico es oxitetraciclina.

10 7.- Perfeccionamientos según la reivindicación 1, caracterizados por el hecho de que dicho antibiótico es clorotetraciclina.

15 8.- Perfeccionamientos según la reivindicación 1, caracterizados por el hecho de que dicho antibiótico es 7-cloro-6-desmetiltetraciclina.

9.- Perfeccionamientos en el procedimiento para obtener un complejo de un antibiótico de tetraciclina.

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

20 Esta Memoria consta de dieciseis hojas escritas por una sola cara.

13 ABR 1967

Madrid,

P.A.

Alberto de Elizaburu
Por Poder

336517