



MEMORIA DESCRIPTIVA
de una Patente de Invención, a nombre
de EPROVA Aktiengesellschaft, de na-
cionalidad Suiza, domiciliada en
Schaffhausen, Im Laternenacker 5 SUIZA,
por: "PROCEDIMIENTO DE FABRICACION DE
CICLOSERINA (D-4-AMINO-3-ISOXAZOLIDI-
NONA)".

= % = % = % = % = % = % =

El presente invento tiene por objeto un procedimiento sintético, ventajoso y técnicamente útil para la fabricación de cicloserina.

5 La cicloserina (D-4-amino-3-isoxazolidinona) es un anti-
biótico activo contra un gran número de microorganismos que se
emplea de preferencia para el tratamiento de la tuberculosis.

10 La fabricación racional de la cicloserina altamente sen-
sible ofrece muchas dificultades. Principalmente los problemas téc-
nicos de la síntesis química se encuentran hasta este momento tan a
falta de una solución satisfactoria, que hasta ahora se viene uti-
lizando prácticamente sólo la preparación microbiológica, aún cuan-
do se conocen ya numerosos métodos sintéticos de laboratorio.



Estos consisten en principio en la ciclización de ácido α -amino- β -halogen-propiohidroxámico o de éster y amida respectivamente de ácido α -amino- β -aminooxi-propiónico en presencia de álcalis.

5 Sin embargo, en cada caso es diferente la fabricación de las materias de partida.

El desdoblamiento en las antípodas ópticas tienen lugar antes o después de la ciclización.

10 En general el desdoblamiento al final no es económicamente factible puesto que hay que desechar L-4-amino-3-isoxazolidinona. La misma es biológicamente inactiva y su racemización está ya descartada sólo a causa de la escasa estabilidad. Por la separación de D- y L-4-amino-3-isoxazolidinona disminuye el rendimiento en cicloserina a menos de la mitad.

15 Mucho más económica es la separación en las antípodas ópticas en una fase temprana de la síntesis en la que todavía es posible la racemización, o cuando la forma I puede destinarse aún a otro empleo.

20 En la ciclización de ácido D- α -amino- β -halogen-propiohidroxámico se obtuvieron hasta ahora rendimientos insuficientes en cicloserina. Kirchensteiner y colaboradores, patente alemana 1.044.087, Boller y colaboradores, patente alemana 1.044.086, y Plattner y colaboradores, Helv. Chimica Acta XI (1957), pag. 1531 a 1552, señalan en la ciclización de ácido D- α -amino- β -cloro-propiohidroxámico con bases, coincidiendo entre sí, un rendimiento del 40% como máximo en cicloserina aislada.

25 Smart y colaboradores, patente alemana 1.053.512 indica para la misma ciclización en la escala de 1 a 10 gramos, un rendimiento



to del 50%. Este valor parecerá sorprendentemente alto al químico ya experimentado con la fabricación de cicloserina, dado que los autores tratan la cicloserina en solución fuertemente acética con lo que, como es sabido, se produce una rápida descomposición de este antibiótico, sobre todo en estado bruto. De todos modos, el método de Smrt y colaboradores apenas es realizable en escala técnica debido a la capacidad de descomposición de la cicloserina.

La ciclización de éster D,L- α -amino- β -aminooxi-propiónico suministra según Holly y colaboradores, patente alemana 1.026,319, rendimientos del 6% y 25% de D,L-4-amino-isoxazolidinona. Los ésteres D,L- α -amino- β -aminooxi-propiónicos son, además, muy difícilmente accesibles. Holly y colaboradores, op.cit., utilizaron el siguiente camino: serina ----> serinetiléster clorhidrato ----> 2-fenil-4-carbetoxi-oxazolina-(2) ----> 2-fenil-4-carbohidroxamido-oxazolin-(2) ----> D,L-4-benzoilamino-isoxazolidinona-(3) ----> metiléster D,L- α -amino- β -aminooxi-propiónico diclorhidrato.

Conforme a la patente danesa 104.058 y a la patente francesa 1.393.658, la ciclización de amida de ácido α -amino- β -aminooxi-propiónico suministra en la escala de 1 gramo, un rendimiento del 55% en D,L-4-amino-3-isoxazolidinona. Seguidamente es necesario todavía en desdoblamiento del racemato, por lo que el rendimiento en cicloserina se reduce al 25% máximo.

Evidentemente se carece todavía de un procedimiento de fabricación técnicamente sencillo, productivo y económicamente realizable, de cicloserina, aún cuando este problema fué ya objeto de minuciosos estudios por numerosos grupos de investigación.

Este sensible vacío es llenado ahora por el procedimiento tan sencillo del presente invento, por el que de una materia de par-



21
tida bien accesible se puede obtener directamente cicloserina pura, cristalina (D-4-amino-3-isoxazolidinona) con un rendimiento de más del 80%.

5 El procedimiento consiste en que el ácido D- α -amino- β -cloro-propionhidroxámico formado a partir de metiléster D- α -amino- β -cloro-propiónico y de hidroxilamina es ciclizado completamente, sin aislarlo, a un pH constante de la solución reaccionante de 10 a 11, de preferencia de 10,2 a 10,5, por adición continua de hidróxido alcalino, luego, dentro de un margen pH de 11 a 12, preferente-
10 mente de 11,5 la solución acuosa es evaporada en vacío, añadiendo un alcohol inferior, de preferencia metanol, se precipita y separa el cloruro alcalino, y por último por adición de ácido hasta un valor pH como de 6,5 a 6,9 se libera cicloserina de su sal alcalina y se le hace cristalizar.

15 La ciclización se hace principalmente a temperatura ambiente. Como hidróxido alcalino se emplea de preferencia hidróxido sódico.

El aislamiento por graduación de la solución metanólica en pH 6,5 a 6,9 se hace a 0 hasta 10°C, y la cristalización se pro-
20 duce durante la graduación del pH por adición de cristales inoculados recién preparados de cicloserina a partir de una muestra preliminar. Luego se conserva la temperatura durante unos 30 minutos en -5 a -10°C de preferencia -5 a -7°C, y después de filtra la cicloserina precipitada.

25 El rendimiento medio conseguido en 10 ensayos consecutivos, del 82,9% de cicloserina pura, aislada, ópticamente activa (D-4-amino-3-isoxazolidinona), calculado sobre el éster D- α -amino- β -cloro-propiónico clorhidrato utilizado, es extraordinariamente alto.



Este excelente resultado logrado con medios sencillísimos es muy sorprendente.

5 El rendimiento alcanzado de hasta el 89% de producto final aislado presupone, desde luego, que las dos reacciones necesarias, la formación del ácido hidroxámico y la ciclización, se desarrollen casi cuantitativamente, a pesar de que en cada fase hay que contar con distintas reacciones secundarias, de que la ciclización representa un proceso francamente complicado y, además, de que el producto de la reacción sea todavía muy inestable.

10 Debido a la inestabilidad de la cicloserina, además de su formación óptima, su aislamiento en forma pura representa también un complicado problema adicional.

15 En el momento en que por acidificación, la cicloserina es puesta en libertad a partir de su forma salina, empieza su rápida descomposición, y su cristalización lenta en forma bastante impura contrarresta entonces toda separación limpia y rápida a partir de su solución. Una precipitación rápida de cicloserina en lugar de una cristalización tiene como resultado precipitados voluminosos e impuros. Por consiguiente los métodos conocidos de aislamiento son
20 complicados, requieren varias operaciones y son poco productivos.

El tenerse que atener a condiciones muy rigurosas en la ciclización de ácido D- α -amino- β -cloro-propiohidroxámico y en el aislamiento de cicloserina, dió evidencia de ser un factor decisivo para el logro de un rendimiento bueno, Particularmente importante
25 resultó ser el hecho de tenerse que atener a márgenes pH estrechos determinados.

Como es sabido, la cicloserina es inestable en forma disuelta, y en función del pH intervienen ahí distintos mecanismos de



reacción, como por ejemplo: apertura de anillo, hidrólisis del enlace -CO-NH, formación de serina, hidroxilamina, ácido α -amino- β -aminooxi-propiónico, racemización, formación de derivados de la dicetopiperazina, etc.

5 Las transformaciones y descomposiciones se producen tanto en el margen pH alcalino, neutral como en el ácido.

Sin embargo, en el margen ácido, la descomposición se produce muy deprisa con pérdida simultánea de eficacia biológica.

10 En el medio neutral predomina la formación de derivados de dicetopiperazina.

Pero la medida de las reacciones de transformación de la cicloserina no depende solamente del valor pH, sino también de la composición de la solución. Las soluciones de cicloserina pura son mucho más estables que, por ejemplo, las soluciones de cicloserina impurificada. El contenido de sal reduce también considerablemente la estabilidad, sobre todo en el margen neutral o débilmente ácido.

15 La función sugerida por el invento consiste principalmente en el descubrimiento de las medida específicas, sorprendentemente sencillas, necesarias para la formación óptima, en la evitación de las transformaciones y descomposiciones que puedan darse bajo las más diferentes condiciones y en el aislamiento lo más productivo posible de éste sensible antibiótico en forma pura.

20 Por el procedimiento de que se dispone ahora según la idea del invento es ya posible una fabricación económica de cicloserina sintética, la cual compite por primera vez con éxito con el procedimiento biológico microbiano.

25 El procedimiento ha dado resultados óptimos no solo en el laboratorio, sino también al ser puesto en práctica a escala técnica.

21 JUN



En los siguientes ejemplos de realización se describe la fabricación a escala semi-técnica.

EJEMPLOS DE REALIZACION

1. Operaciones

5 a) Formación de ácido D- α -amino- β -cloro-propionhidroxámico.

2,19 kg de clorhidrato de hidroxilamina en 7,2 kg de agua se enfrían hasta menos 15°C. Solución I.

Luego, a -13 hasta -17°C y en unos 20 a 30 minutos se dejan pasar a la solución I, removiendo al mismo tiempo, 14,9 kg de una solución acuosa de hidróxido sódico al 30% y después, a la misma temperatura y en el transcurso de 30 a 45 minutos, 5,22 kg de metilester D- α -amino- β -cloro-propiónico clorhidrato en 6 litros de agua.

15 b) Ciclización a D-4-amino-3-isoxazolidinona (cicloserina)

Se juntan 2 preparados a), Se hace subir la temperatura hasta +15 a +20°C. Inmediatamente después se mete en la solución reaccionante un electrodo graduado pH y añadiendo un poco ácido clorhídrico concentrado se gradúa el valor pH en 10,5.

La ciclización es iniciada al momento, lo que se reconoce por la tendencia del pH a bajar. Por adición ininterrumpida de solución de hidróxido sódico al 30% (unos 2,6 kg) se conserva el pH en 10,2 a 10,5. La temperatura se ajusta en máx. 25°C.

Al cabo de 4 horas ha cesado casi por completo el consumo de NaOH y, por tanto, la ciclización.

25 En el transcurso de 15' se calienta la mezcla reaccionante hasta 40 a 45°C, después de lo cual se reanuda la reacción y, con ella, el consumo de NaOH para mantener el pH de 10,2 a 10,5.

21 JUN 1958

La región pH de 10,2 a 10,5 se conserva hasta que termina la ciclización.

c) Aislamiento

5 Se calienta la solución reaccionante hasta + 20°C, por adición de un poco HCl se gradúa el pH en 10,0 a 10,2, se mezcla aquella con unos 10 g de 8-hidroxi-quinoleína y 300 g de carbón activo, se remueve, se clarifica por filtraje y se lava con un poco de agua.

10 Por adición de un poco NaOH (100 a 150 g) se gradúa en 11,5 el valor pH de la solución. Esta solución (unos 80 kg) es evaporada en vacío a una temperatura de la camisa de calefacción de 70 a 75°C hasta que se hayan destilado unos 58 a 60 kg de agua.

15 El residuo de la evaporación de 20 a 22 kg se mezcla con 25 kg de metanol y se remueve a 40°C hasta que se disuelva completamente la fase oleosa, y después de enfría hasta 20°C. El cloruro sódico (NaCl) precipitado se separa por filtraje.

20 El filtrado metanólico (50 a 55 kg) se mezcla con unos 10 g de 8-hidroxi-quinoleína, se enfría hasta -5°C y se mezcla aproximadamente con la mitad de la cantidad de ácido acético metanólico (en total 4,7) kg de ácido acético glacial en 3,8 kg de metanol) que se necesita para liberar completamente la cicloserina existente. Inmediatamente después se inocula la solución con cicloserina recién precipitada, la cual se obtiene de una cantidad separada de antemano de 1 kg aproximadamente de la solución reaccionante metanólica.

25 Después de unos 30" se termina la liberación de cicloserina por adición de la segunda mitad del ácido acético metanólico a -7 hasta -5°C (pH 6,7 a 6,9). La suspensión se conserva a unos -10°C durante



30 minutos e inmediatamente después se separa la cicloserina por centrifugado, se lava con metanol y se seca a 30 hasta 35°C.

Rendimiento: 5,05 a 5,57 kg de cicloserina

Contenido: 99 ± 1%

$[\alpha]_D^{20}$: ± 112 a 114° (c = 1 en agua).

Rendimiento en % (referido al metilester D-α-amino-β-cloro propiónico clorhidrato utilizado): 81,5 a 89%

2 Resultados

Preparado n°	Rendimiento en cicloserina aislada, cristalina, referido al contenido puro	Pureza (Determinada voluméticamente) %
1	80,5 %	95,6%
2	81,5 %	98,2 %
3	83,3%	96,6 %
4	81,5%	98 %
5	82 %	98 %
6	83 %	98,8 %
7	81,4 %	100 %
8	82,2 %	97,7 %
9	89,2 %	98 %
10	84,3 %	98,1 %

* = con NaOH n/ 10



NOTA .

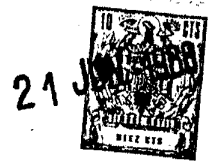
Se reivindican los términos siguientes:

5 1.- Procedimiento de fabricación de cicloserina (D-4-amino-3-isoxazolidinona) a partir del ácido D- α -amino- β -cloro-propionhidroxámico no aislado, en solución acuosa, formado por reacción de
10 éster D- α -amino- β -cloro-propiónico con hidroxilamina, caracterizado porque el ácido hidroxámico se cicliza totalmente, con pH constante de 10 a 11, de preferencia 10,2 a 10,5, por adición continua de hidróxido alcalino, luego, a un pH de 11 a 12, de preferencia de 11,8 se evapora en vacío la solución acuosa, por adición de un alcohol inferior, de preferencia metanol, se precipita y separa el cloruro alcalino, por último por adición cuidadosa de ácido hasta un pH como de 6,5 a 6,9, de preferencia 6,9, se libera cicloserina de su sal alcalina, se le hace cristalizar y luego se separa por filtraje.

15 2.- Procedimiento según lo reivindicado en el punto 1, caracterizado porque la ciclización se hace principalmente a temperatura ambiente.

20 3.- Procedimiento según lo reivindicado en los puntos anteriores, caracterizado porque como hidróxido alcalino se emplea hidróxido sódico y, para la precipitación del cloruro de sodio, metanol.

25 4.- Procedimiento según lo reivindicado en los puntos anteriores, caracterizado porque el ajuste de la solución metanólica se hace en pH 6,5 a 6,9 a C^o hasta -10^oC y al mismo tiempo se pone en marcha la cristalización por adición de cristales de cicloserina recién preparados, seguidamente se conserva la temperatura en -5 a -10^oC durante 30 minutos aproximadamente y después se filtra inmediatamente la cicloserina que se ha precipitado.



5.- PROCEDIMIENTO DE FABRICACION DE CICLOSERINA (D-4-amino-3-ISOXAZOLIDINONA).

Todo conforme queda descrito en la presente Memoria, que consta de ONCE HOJAS mecanografiadas por una sola cara y foliadas.

Madrid, 21 JUN. 1968

Guerra