

0393

SEC		INCA
C	ACIC	C
CLAS.	C.07	A.61
Subclase	0	V

P.- 45.949

862.952-S

384127



Memoria descriptiva

384127

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de E.R. SQUIBB & SONS, INC.

entidad / ~~de nacionalidad~~ norteamericana

con domicilio en 909 Third Avenue, Nueva York, N.Y., Estados Unidos de América

por: " UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UN ANTIBIOTICO DE TETRACICLINA " (Clase Internacional C07e)



Es un objeto de la presente Invención proporcionar un método mejorado para la recuperación de un antibiótico de tetraciclina. Otro objeto es un método para obtener un antibiótico de tetraciclina, libre de impurezas coloreadas. Estos y otros objetos de la presente Invención serán evidentes partiendo de la descripción siguiente.

Se ha descubierto actualmente, que puede obtenerse un antibiótico de tetraciclina, libre de impurezas coloreadas, tratando con una base orgánica, una solución del antibiótico conteniendo impurezas coloreadas, a un pH comprendido en el intervalo de 0,5, aproximadamente, a 4,5 aproximadamente.

La siguiente descripción detallada del procedimiento de esta Invención, está dirigida hacia la recuperación de tetraciclina. Sin embargo, como pueden comprender los expertos en la técnica, este procedimiento puede aplicarse, igualmente bien a otros productos de tetraciclina tales como la oxitetraciclina, así como a la recuperación y/o purificación de estos antibióticos de tetraciclina.

En la recuperación desde la masa de fermentación, la presente Invención puede efectuarse según técnicas convencionales, acidificando, primeramente, la masa para solubilizar el antibiótico de tetraciclina contenido en ella. La masa se acidifica a un pH de 0,5, aproximadamente, hasta 2,5, aproximadamente, preferentemente a un pH de 1,5 a 1,8, con un ácido mineral fuerte tal como el ácido clorhídrico, el ácido sulfúrico, el ácido fosfórico o semejantes. Este tratamiento ácido se lleva a cabo a temperatura ambiente. La masa acidificada se mezcla después con un auxiliar de filtración y se filtra para separar los productos inso-

384127

18



lubles de la fermentación. A la solución acidificada que contiene el antibiotico de tetraciclina, se añade entonces hidróxido sódico o hidroxido amónico en cantidad suficiente para elevar el pH a un valor comprendido entre 7, aproximadamente, y 11, aproximadamente, preferentemente a un pH comprendido entre 9,1, aproximadamente y 9,3, aproximadamente, precipitando de esta manera un complejo de antibiótico de tetraciclina-calcio-magnesio. (Puede añadirse un carbonato de metal alcalino o carbonato amónico, para controlar la proporción de Ca disuelto). El complejo así precipitado, después de filtrar, se acidifica con ácido oxálico a un pH comprendido entre 0,5, aproximadamente, y 2,5, aproximadamente, preferentemente a un pH comprendido entre 1,5, aproximadamente y 1,6, aproximadamente, al objeto de redissolver el antibiótico de tetraciclina y formar oxalato cálcico insoluble. (Alternativamente, puede utilizarse ácido sulfúrico o una mezcla de ácido sulfúrico y ácido oxálico).

La solución de antibiótico, que aún contiene impurezas coloreadas, se trata después según la presente Invención, mediante unos de los métodos siguientes, para efectuar la solubilización de las impurezas coloreadas:

1.- Mientras la solución está a un pH comprendido entre 0,5, aproximadamente, y 2,5, aproximadamente, se añade suficiente cantidad de base orgánica, con agitación, para solubilizar las impurezas coloreadas existentes en el antibiótico. Preferentemente se añade desde 0,5 l. aproximadamente, hasta 1,5 l. aproximadamente, de base orgánica, por kg. de actividad de antibiótico de tetraciclina en la solución con oxalato, y, lo mas preferentemente, desde

13.11.70

- 3 -

384127



0,75 l., aproximadamente, hasta 1,25 l., aproximadamente, por kg. de actividad.

2.- Alternativamente, se ha descubierto que puede emplearse menos cantidad de base orgánica, añadiendo ésta a un pH comprendido entre 0,5, aproximadamente y 2,5, aproximadamente, en dos etapas, con una operación de filtración que se lleva a cabo entre las dos adiciones. Se ha encontrado que la mayoría de las impurezas coloreadas se eliminan durante la filtración y que la cantidad de base orgánica necesaria para mantener en solución las impurezas restantes, es sustancialmente menor que si la totalidad de la base orgánica se añade en una etapa. Así pues, la cantidad de base orgánica añadida en cada etapa está comprendida entre 0,2 l., aproximadamente, y 0,6 l., aproximadamente de base orgánica por kg. de actividad de antibiótico de tetraciclina en la solución con oxalato, preferentemente desde unos 0,25 l. hasta unos 0,5 l., por kg. de actividad.

3.- El pH de la solución se eleva a un valor comprendido entre 2,5, aproximadamente y 4,5, aproximadamente, en cuyo momento se añade suficiente cantidad de base orgánica para solubilizar las impurezas coloreadas existentes en el antibiótico. No es necesario filtrar. Preferentemente se añade desde 0,5 l., aproximadamente, hasta 1,5 l., aproximadamente, de base orgánica por kg. de actividad de antibiotico de tetraciclina en la solución con oxalato, y lo mas preferentemente desde 0,75 l., aproximadamente, hasta 1,25 l., aproximadamente, por kg. de actividad.

Una ventaja de la presente Invención es que proporciona altos rendimientos de antibiotico esencialmente puro, de más del 95 por ciento de pureza. Además, el anti-



18

biótico obtenido es adecuado, en muchos casos, para su empleo farmacéutico directo, sin necesidad de procedimientos de cristalización y purificación adicionales.

Puede emplearse una diversidad de base orgánicas, en el procedimiento de la presente Invención. Son ejemplos de tales bases:

(a) Alcohilaminas primarias de 6 a 12 átomos de carbono en cadena lineal o ramificada. Esto incluye compuestos tales como n-octilamina, n-hexilamina, 1-metilheptilamina, decilamina, etc.

(b) Alcohilaminas secundarias, en las que dos grupos alcohol de 6 a 9 átomos de carbono, están unidos al nitrógeno. Estas cadenas pueden ser lineales o ramificadas y los grupos alcohol pueden ser iguales o diferentes, dentro de la limitación indicada. Son ejemplos de este tipo de compuestos di-n-hexilamina, di-n-octilamina, n-hexil-n-octilamina, di-2-etilhexilamina y di-heptilamina.

(c) 1-alcohol de cadena corta (ó alcohol de cadena corta 1-hidroxi sustituido)-2-alcohol de cadena larga-imidazolinas. En estos compuestos, el grupo alcohol de cadena corta tiene entre 1 y 4 átomos de carbono y puede haber un grupo hidroxilo, como sustituyente, sobre cualquiera de estos átomos de carbono. El grupo alcohol situado en la posición 2, tiene entre 7 y 17 átomos de carbono. Un cierto número de estos compuestos pueden adquirirse comercialmente e incluyen compuestos tales como la Amine C (Geigy Chemical Corporation), Amine O (Geigy), Amine S (Geigy), Amine 121 (una 1-beta-hidroxietil-imidazolina, preparada partiendo de la mezcla de aminas que deriva, co-

18 NOV



mercialmente, del aceite de coco, tal que la posición 2 de la imidazolina está sustituida con una mezola de grupos alcoholilo de 7 a 17 átomos de carbono, aproximadamente.)

(d) Fenilalcoholaminas primarias en las que el grupo alcoholilo tiene 1 a 3 átomos de carbono, como la bencilamina, la fenetilamina, la alfa-metil-bencilamina, la alfa-etilbencilamina, etc.

(e) Haluros de alcoholilo de cadena larga-trialcoholilo de cadena corta-amonio, en los que la cadena larga tiene de 8 a 18 átomos de carbono, la cadena corta tiene de 1 a 3 átomos de carbono y el haluro es cloruro, bromuro o yoduro. Puede adquirirse comercialmente una diversidad de estos compuestos, útiles en este procedimiento, tales como el cloruro de octadecil-trimetilamonio, el cloruro de decil-trietil-amonio, el bromuro de dodecil-trimetil-amonio, el cloruro de cetil-trimetil-amonio, mezclas de sales de trimetilamonio de la mezcla de aminas que deriva, mediante procedimientos llevados a cabo comercialmente, de los ácidos grasos de la soja, de los ácidos grasos del aceite de coco y de otras fuentes tales.

(f) Haluros de alcoholilo de cadena larga-dialcoholilo de cadena corta-bencilamonio, en donde el grupo alcoholilo de cadena larga tiene de 8 a 18 átomos de carbono, los grupos alcoholilo de cadena corta tiene de 1 a 3 átomos de carbono cada uno, y el haluro es cloruro, bromuro o yoduro. Un cierto número de estos compuestos pueden ser adquiridos comercialmente, o pueden prepararse fácilmente, como cloruro de cetil-dimetilbencil-amonio, Onyx BTC 824 (un cloruro de alcoholilo mixto-dimetilbencil-amonio), Onyx BTC 927 (un cloruro de alcoholilo mixto-dimetil-(dimetilbencil)-amonio), y



bromuro de dodecil-dietil-bencilamonio.

(g) Haluros de (alcoholo de cadena media)bencil-
-tri-alcoholo de cadena corta-amonio, en donde la cadena
media unida al grupo bencilo (en posición orto, meta o pa-
5 ra) tiene de 4 a 8 átomos de carbono y los grupos alcoholo
de cadena corta tienen de 1 a 3 átomos de carbono, cada
uno. Pueden adquirirse comercialmente compuestos de esta
naturaleza, e incluyen cloruro de (terc-butil)bencil-tri-
metilamonio, cloruro de (terc-octil)bencil-trietil-amonio,
10 bromuro de (n-hexil)bencil-tripropil-amonio, etc.

(h) Haluros de di-alcoholo de cadena media-di-al-
coholo de cadena corta-amonio, en donde los grupos alcoholo
de cadena media tienen de 6 a 18 átomos de carbono, y
los grupos alcoholo de cadena corta tienen de 1 a 3 átomos
15 de carbono. El haluro es bromuro, cloruro o yoduro. Los
ejemplos incluyen cloruro de di-dodecenil di-metil-amonio,
bromuro de dioctil-dipropil-amonio, yoduro de didecil-die-
til-amonio, cloruro de di-2-etilhexil-dietil-amonio, etc.

(i) Haluros de 1-alcoholo de cadena corta-2-al-
20coholo de cadena larga-3-alcoholo de cadena corta (o ben-
cilo) imidazolino, en donde el grupo alcoholo de cadena
corta tiene de 1 a 4 átomos de carbono y puede estar sus-
tituido con un grupo hidroxilo en uno cualquiera de estos
átomos de carbono. El grupo alcoholo de cadena larga tiene
25 de 7 a 17 átomos de carbono. Un cierto número de estos
compuestos son adquiribles comercialmente, y se forman me-
diante cuaternización del compuesto de imidazolina corres-
pondiente con un haluro de alcoholo o un haluro de aralco-
hilo. Ejemplos de este tipo de compuesto son: Quaternary
30 121Qb, que es un cloruro de imidazolino con un sustituyen-



te beta-hidroxietilo en la posición 1, y un grupo bencilo en la posición 3, preparado partiendo de la imidazolina formada partiendo de las aminas que derivan de los ácidos grasos del aceite de coco, y Quaternary 121Qc, un compuesto de estructura semejante con un grupo clorobutilo en la posición 3.

(j) Haluros de (alcoholo de cadena media)fenoxietoxietil-di-alcoholo de cadena corta-bencil-amonio, en donde el alcoholo de cadena media está ramificado o es de cadena lineal, tiene de 6 a 12 átomos de carbono, y está unido en la posición orto, meta o para, respecto al grupo fenoxi; los alcoholos de cadena corta tienen, cada uno, de 1 a 3 átomos de carbono y el haluro es cloruro, bromuro o yoduro. Son ejemplos de tales compuestos cloruro de p-(di-terc-butyl)fenoxietoxietil-dimetil-bencil-amonio, el bromuro de p-hexil-fenoxietoxietil-dietil-bencil-amonio, yoduro de o-decil-fenoxietoxietyl-dipropil-bencil-amonio, etc.

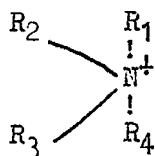
(k) Dihaluro de N,N'-di(bencil alcoholo de cadena media)dimetil amonio-acetil-etilendiamina, en donde el alcoholo de cadena media, sustituido en el anillo del grupo bencilo, tiene de 6 a 12 átomos de carbono y el haluro es cloruro, bromuro o yoduro. Los ejemplos incluyen los compuestos de p-di-terc-butyl-bencilo, los compuestos de o-hexilo, los compuestos de p-dodecilo, etc.

(l) Haluros de N-(alcanoilo de cadena larga etanolaminoformilmetil)-piridinio, en donde el grupo alcanoilo de cadena larga es un grupo de ácido carboxílico que tiene de 8 a 18 carbonos y el haluro es bromuro, cloruro o yoduro. Ejemplos incluyen cloruro de N-(lauroil-etanolaminoformilmetil)piridinio (Emcol E 607), bromuro de N-(estearoil-

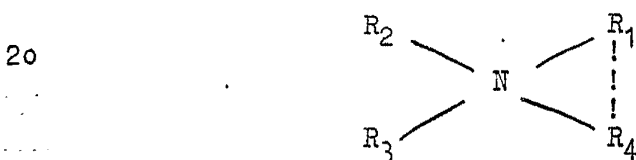


-etanolaminoformilmetil)piridinio, y yoduro de N-(tetrade-
canoil etanolaminoformilmetil)piridinio.

Son bases orgánicas preferidas para su empleo en
la presente Invención, los compuestos de amonio cuaterna-
rio representados mediante la fórmula general siguiente:



10 en donde R₁ es un radical alcohilo inferior o un radical
bencilo, R₂ es una cadena grasa larga de 8 átomos de carbo-
no por lo menos, R₃ es un radical alcohilo inferior, R₄ es
un radical alcohilo inferior, y R₁ y R₄, tomados conjunta-
mente, representan una cadena carbonada divalente de 2 a
15 5 átomos de carbono. Así pues, el nitrógeno puede consti-
tuir parte del anillo heterocíclico, como en compuestos del
tipo de la Onamine RO, tales como los descritos seguidamen-
te:



en donde R₁, R₂, R₃ y R₄ tienen el significado anteriormen-
te expuesto.

25 Los compuestos de amonio cuaternario, conocidos
como los Arquads, son compuestos particularmente eficaces
para el procedimiento de extracción con disolventes aquí
descrito. Estos compuestos son, principalmente, cloruros
de alcoholtrimetil amonio y pueden representarse mediante
30 la fórmula R-N(CH₃)₃Cl en la que R es un grupo alcohilo de

18 N



cadena larga que tiene 8 átomos de carbono, por lo menos.

Estos compuestos particulares de amonio cuaternario, se venden en el mercado por la firma Armour y Compañía bajo el nombre registrado "Arquad". Puede adquirirse una diversidad de compuestos de esta clase que varían en la longitud y número de grupos alcohol de cadena larga unidos al átomo de nitrógeno.

En la lista que figura a continuación están algunos Arquads representativos que pueden adquirirse comercialmente y que pueden emplearse, ventajosamente, al llevar a cabo la presente Invención.

ARQUADS--COMPOSICION PROMEDIA DE

INGREDIENTES ACTIVOS

15	Grupos sustituyentes	Longitud de la ca- dena car- bonada	Arquad	Arquad	Arquad	Arquad
			12	16	18	S-2C
			<u>Tanto por ciento</u>	<u>Tanto por ciento</u>	<u>Tanto por ciento</u>	<u>Tanto por ciento</u>
	Octilo	8	---	---	---	4
20	Decilo	10	---	---	---	5
	Dodecilo	12	90	---	---	23
	Tetradecilo	14	9	---	---	9
	Hexadecilo	16	---	90	6	9
	Octadecilo	18	---	6	93	10
25	Octadecenilo	18	1	4	1	18
	Octadecadienilo	18	---	---	---	22

5733

18 NO



	Grupos sustituyentes	Longitud de la ca- dena car- bonada	Arquad	Arquad	Arquad	Arquad
			C	S	2C	2HT
			<u>Tanto por ciento</u>	<u>Tanto por ciento</u>	<u>Tanto por ciento</u>	<u>Tanto por ciento</u>
5	Octilo	8	8	---	8	---
	Decilo	10	9	---	9	---
	Dodecilo	12	47	---	47	---
	Tetradecilo	14	18	---	18	---
	Hexadecilo	16	8	10	8	30
10	Octadecilo	18	5	10	10	70
	Octadecenilo	18	5	35	---	---
	Octadecadienilo	18	---	45	---	---

Una vez mantenidas en solución las impurezas, por la presencia de la base orgánica, la solución antibiótico-oxalato puede tratarse mas o menos convencionalmente, es decir, por la adición de un agente quelante para el calcio, magnesio, hierro y similares remanentes, por la adición de un agente reductor y estabilizante tal como, por ejemplo, sulfuro sódico o bisulfito sódico, y por cristalización de la tetraciclina presente en la solución mediante la adición de hidróxido amónico o hidróxido sódico hasta alcanzar el punto isoeléctrico de la tetraciclina (o a un pH de 4,0 a 5,8, aproximadamente).

La ventaja de la presente Invención sobre los procedimientos de la técnica anterior, radica, fundamentalmente, en el hecho de que las impurezas coloreadas indeseables, permanecen en solución y no precipitan durante la cristalización del antibiotico; de esta manera el producto, libre de color, se obtiene directamente con rendi-

13.11.70

384127



miento elevado, cuyo producto es esencialmente de calidad farmacéutica, en la mayoría de los casos de pureza superior al 95 por ciento.

5 Los ejemplos siguientes ilustran la presente invención, sin limitar, sin embargo, la misma a ésto.

Ejemplo 1

10 El pH de 55.000 l de caldo de tetraciclina, titulando 9,5 g de actividad por l se ajusta a 1,5 con ácido sulfurico concentrado y se agita. Se añade auxiliar de filtración en una proporción de alrededor del 3 por ciento en peso sobre la base de sólidos en volumen y el caldo, mezclado, se hace pasar a través de un filtro de tipo tambor, de acero inoxidable. La torta del filtro, procedente de esta etapa, se lava con agua y se recogen los filtrados y los lavados, juntos. EL pH del filtrado y los lavados reco-
15 gidos, se ajusta a 9,1 mediante la adición de una solución al 25% (p/p) de hidróxido sódico. La masa pastosa resultante se filtra después sobre un filtro de vacío, giratorio, previamente recubierto. La torta se lava con 5.000 l de agua, se recoge, se mezcla con agua, y se bombea hasta un depósito de alojamiento. Se añade a esta masa pastosa tan rápidamente como es posible, 480 kg de ácido oxálico pulverizado. La mezcla resultante se agita después durante
20 10 minutos, se ajusta el pH a 1,5 añadiendo más ácido oxálico, y entonces se filtra la mezcla sobre un filtro giratorio, previamente recubierto con Hyflo. La torta se lava con agua y el filtrado y los lavados, reunidos, se envían a un cristalizador. Cuando se ha recogido una cierta cantidad de filtrado rico en oxalato (1.500 l), se di-
3p



vide en tres partes alícuotas de 500 l. A una primera parte alícuota se añaden 89 l de una solución al 50 por ciento en isopropanol de Arquad 18, 12,5 kg de Versene, y 28 kg de bisulfito sódico, con agitación, y el pH se ajusta a un valor comprendido entre 4,5 y 6, agitando durante dos horas hasta completar la cristalización. La base de tetraciclina se recoge después por filtración obteniéndose un rendimiento de 125 kg de Actividad.

Ejemplo 2

A una segunda parte alícuota se añaden 44 l de una solución al 50% de Arquad 18 en isopropanol y la mezcla resultante se agita durante quince minutos y se filtra. Al filtrado se añaden 38 l de solución al 50%, en isopropanol de Arquad 18, 12,5 kg de Versena, y 28 kg de bisulfito sódico, con agitación. Se ajusta el pH a un valor comprendido entre 4, 5 y 6, con agitación, durante dos horas, para completar la cristalización. La base de tetraciclina se recoge después mediante filtración obteniéndose un rendimiento total de 125 kg de actividad.

Ejemplo 3

Se eleva el pH de la tercera parte alícuota a 3,5, añadiendo hidróxido sódico, y 89 l de una solución al 50%, en isopropanol de Arquad 18, 12,5 kg de Versene y 28 kg de bisulfito sódico, con agitación. El pH se ajusta después a un valor comprendido entre 4, 5 y 6, con agitación, durante dos horas para completar la cristalización. La base de tetraciclina se recoge después por filtración, obteniéndose un rendimiento total de 125 kg de actividad.

384127



18

Ejemplo 4

5 Se suspenden 27,8 g de polvo de oxitetraciclina, obtenida según métodos convencionales y que contiene impurezas coloreadas, en 390 ml de agua desionizada y se añaden 9,0 mml de ácido sulfurico al 63% p/p. Esto produce una solución transparente que tiene un pH de 1,2. A la solución se añaden 54 mg de NaHSO_3 , 1,66 g de carbon activo y 1,66 g de auxiliar de filtración. La mezcla resultante se
10 agita durante 15 minutos, se filtra y se lava. Al filtrado se añaden 8,1 ml de Arquad 18,8,5 ml de agua amoniacal y 1,26 ml de una solución al 20% p/v de Versenato amónico. La mezcla resultante se agita durante 30 minutos para iniciar la cristalización de la oxitetraciclina. Se añaden
15 3,9 ml de agua amoniacal y la mezcla se filtra después, se lava con agua y se seca durante unas 3 horas a 50°C, en vacio. El rendimiento es de 26,5 g (95,8%) de oxitetraciclina libre de impurezas coloreadas. La oxitetraciclina tiene una potencia de 1010 γ /mg, sobre base anhidra.

20 La presente solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América el 1 de Octubre de 1969, con el número 862.952, se acoge a los beneficios del articulo 51 del Vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

25

13.11.70

384127

SECRET

18



N O T A

5

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:

10

1ª.- Un procedimiento para la obtención de un antibiótico de tetraciclina libre de impurezas coloreadas que comprende poner en contacto una solución de antibiótico que contiene impurezas coloreadas a un pH de desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 4,5 con desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 4,5 litros de una base orgánica por kg de actividad de antibiótico de tetraciclina en la solución, y cristalizar la mezcla resultante para obtener un antibiótico de tetraciclina libre de impurezas coloreadas.

15

20

2ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que el pH es desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 2,5.

25

3ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que el pH es desde aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 4,5.

Handwritten scribbles and a date: 13.11.70

4ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en que se añade una porción de la base orgánica y la mezcla resultante es filtrada antes de que se añada una segunda porción de la base orgánica.

13.11.70

384127



18

5º.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que la solución de antibiótico crudo es una solución de oxalato.

6º.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que se añaden desde aproximadamente 0,75 hasta aproximadamente 1,25 litros de base orgánica por kg de actividad de antibiótico de tetraciclina en la solución de oxalato.

7º.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que la base orgánica es una sal de amonio cuaternario.

8º.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en que la sal de amonio cuaternario es un cloruro de alcoholtrimetilamonio.

9º.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que el antibiótico es tetraciclina.

10º.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en que el antibiótico es oxitetraciclina.

11º.- Un procedimiento para la obtención de un antibiótico de tetraciclina.

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

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

Madrid,

18 NOV. 1970

P.A.

384127

Ministerio de Sanidad
Por Poderes

13.11.70
MTR.