

P.- 9480.-  
A 1078.54.



1951

200794

200794

- 6 DIC. 1951

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 SCHENLEY INDUSTRIES, INC., entidad norteamericana, establecida en Empire State Building, 350 Fifth Avenue, Nueva York, N.Y., Estados Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO DE FABRICAR UN AGENTE ANTI-BIOTICO AFIN A LA ESTREPTOMICINA".

-----  
Nuestro invento se refiere a derivados antibióticos de estreptomycin y a un método de hacerlos.

La estreptomycin es un antibiótico que se obtiene de ciertas cepas de Streptomyces griseus. Se sabe bien que la estreptomycin queda virtualmente inactivada por completo desde el punto de vista antibiótico haciéndola reaccionar con ciertos compuestos que tienen grupos alfa-

5

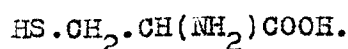
200794



C. 1951

amino-beta-mercapto. Entre estos compuestos que inactivan en esencia la estreptomina figuran la l-cisteina, la cistenil-glicina, la dl-beta-beta-dimetilcisteina, ester etílico de l-cisteina, y así sucesivamente.

5 El compuesto que arriba hemos denominado l-cisteina se denomina también ácido l-2-amino-3-mercaptopropánico, y también, l-beta-mercaptoalanina. Su fórmula es



La fórmula de la l alanina, designada también  
10 ácido l-2-aminopropánico es



Como luego se menciona, usamos hidrocloreto de cisteina a fin de producir el derivado inactivo de estreptomina. La fórmula del hidrocloreto de cisteina es

15  $\text{HS}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}(\text{NH}_2\cdot\text{HCl})\text{COOH}.$

Hemos descubierto que si los derivados de estreptomina resultantes, sustancialmente inactivos, se tratan con níquel de Raney, de modo que se produzca simultáneamente una acción de desulfuración y una acción de reducción,  
20 producimos nuevos derivados de estreptomina que son activos como antibióticos contra un gran número de organismos gram-positivos y gram-negativos.

Cuando en esta memoria se hace referencia a los alfa-amino-mercapto compuestos, designamos compuestos orgánicos en los cuales el grupo amínico y el grupo sulfhidrónico o mercapto, están sobre átomos de carbono adyacen-  
25



6 D

200794

tes de una cadena de carbonos recta.

Estos nuevos derivados no son inactivados por dichos alfa-amino-mercapto compuestos y por muchos otros compuestos que inactivan la estreptomicina.

5 La estreptomicina tiene un grupo aldehído-carbonílico libre que es una parte de la porción de estreptosa de la molécula. La composición de la estreptomicina se expone por Kuehl y otros en "Journal of American Chemical Society", (1946), vol. 68, página 2.096.

10 Según Kuehl y otros, la estreptomicina consiste en una base de diguanidina que se denomina estreptidina, unida glucosídicamente con una parte de disacárido denominado estreptobiosamina. La estreptobiosamina consiste en estreptosa, unida glucosídicamente a N-metil-1-glucosamina.  
15 na.

En gracia a la conveniencia, en lo que sigue el vocablo ("Strep" designa la molécula de estreptomicina con la excepción del grupo aldehído-carbonílico de la estreptosa.

20 Para los fines de nuestro ~~invento~~ invento, podemos usar el residuo de la molécula de estreptomicina que resulta de la eliminación del grupo aldehído-carbonílico, o el residuo de una molécula de estreptomicina que ha sido modificada en un grupo o grupos de la misma distintos del grupo aldehído-carbonílico, habiendo sido eliminado el grupo aldehído-carbonílico del residuo últimamente mencionado.  
25

Creemos que cuando la estreptomicina reaccio-

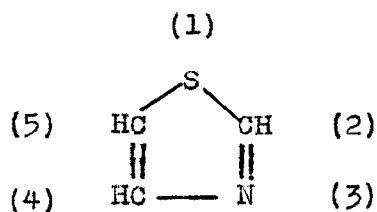
200794



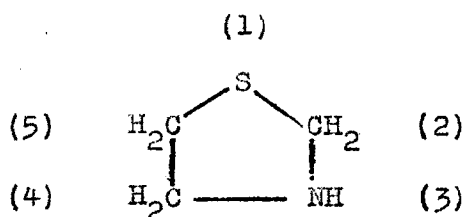
1951

na con cisteina a pH neutro se forma un compuesto de estreptomycinina con anillo de tiazolidina. Creemos que este derivado es inactivo a causa del tamaño y de la forma del grupo del anillo de tiazolidina.

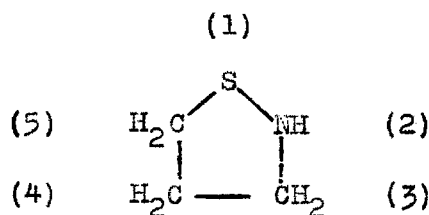
5 La fórmula estructural del tiazol,  $C_3H_3NS$ , es



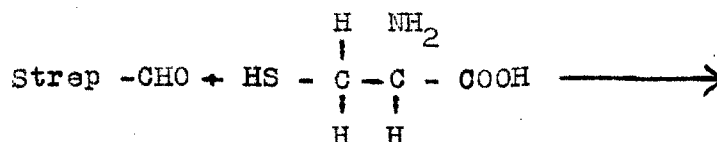
10 La fórmula estructural de la meta-tiazolidina,  $C_3H_7NS$ , es



15 La fórmula estructural de la orto-tiazolidina es



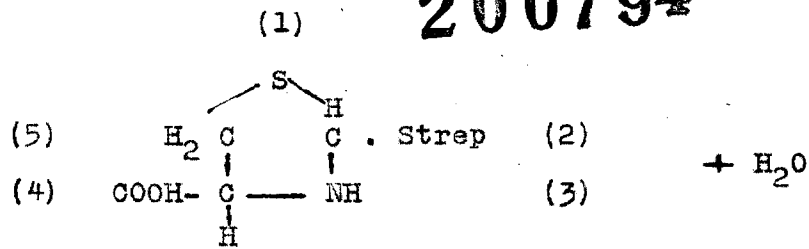
20 Cuando la estreptomycinina se hace reaccionar con l-cisteina, la reacción puede representarse como sigue





C. 1951

200794



5

Este compuesto puede denominarse

2 Strep-4-Carboxi-tiazolidina.

Es bien sabido que el níquel de Raney tiene una acción desulfurante y que actúa también como catalizador de reducción con hidrógeno. Esto se describe en "Journal of American Chemical Society", (1943), vol. 65, pág. 1.013; también en el vol. 66 (1944), página 909; también en el Vol. 68 (1946) página 724 y 1455. Se hace referencia también a "Journal of Biological Chemistry", Vol. 146, página 475. El níquel de Raney es hidruro de níquel o una composición que contiene hidruro de níquel.

15

Al usar níquel de Raney, el empleo de una atmósfera de hidrógeno es opcional. Según se prepara usualmente, el níquel de Raney contiene hidrógeno adsorbido suficiente para permitir que produzca efectos simultáneos de desulfuración e hidrogenación.

20

Nuestro invento se sigue describiendo en lo que sigue, con referencia a los ejemplos que ilustran diversos ejemplos de la clase que designamos como amino-mercapto compuestos.

25

Ejemplo 1.

131,5 mgrs. de estreptomicina parcialmente

200794



851

purificada que constituyen un total de 80.951 unidades o microgramos de base de estreptomocina se disolvieron junto con 55 mgrs. de hidrocioruro de cisteina, en 10 c.c. de agua a 20-25°C. El pH de la solución se ajustó a 6,2 y la solución se mantuvo a 37,5°C durante 3,5 horas. Al final de este tiempo, el análisis mostró que todavía estaba presente el 21,5% de la actividad original antibiótica de la estreptomocina. Se disolvieron en el agua de dicha solución 30 mgrs. adicionales de hidrocioruro de cisteina, y el pH se ajustó a 7. La solución se mantuvo a 37,5°C durante un periodo adicional de 3 horas. Quedó, después de este tratamiento, menos de 1,9% de actividad antibiótica residual, en comparación con el material de partida.

Esta solución se mezcló con agua hasta completar un volumen de 25 c.c. Se añadieron a la solución 1,25 grs. de níquel de Raney, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente de 20-25°C., durante 6 horas, en una atmósfera de hidrógeno que estaba a una presión de 760 mm. de mercurio.

El pH final fué de 6,5. La solución, después de filtración dió en el análisis 47.381 más o menos 1661 unidades (calculadas a estreptomocina). Esto constituía aproximadamente 55% de la actividad original, después de corrección por las muestras tomadas para el análisis. El nuevo producto en forma bruta, puede aislarse evaporando la solución hasta un pequeño volumen, disolviendo el nuevo producto en metanol mezclando dicha solución concentrada con



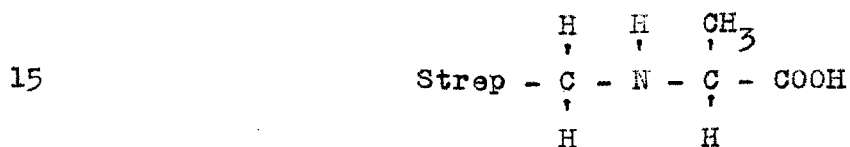
1954

200794

metanol anhidro, y precipitando el nuevo producto de la solución metanólica con varios volúmenes de eter etílico.

Algo del producto es adsorbido por el níquel de Raney. Como quiera que, al tratar una solución del nuevo producto con níquel de Raney nuevo, hubo una disminución en la actividad antibiótica del nuevo producto, ello sugiere que el nuevo producto que se forma tratando el producto de reacción de estreptomycinina y cisteína con níquel de Raney, puede tener al menos, y posiblemente más, 55% de la actividad de la propia estreptomycinina en una base de mol por mol.

Por el método de síntesis empleado, el nuevo derivado activo puede representarse como



Si el grupo,  $\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{Strep} - \text{C} - \\ | \\ \text{H} \end{array}$ , es denominado grupo estreptomícilico, podemos denominar al nuevo compuesto N-estreptomícil-1-alanina, ya que la fórmula de la l-alanina es  $\text{CH}_3 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2) \text{COOH}$ .

Al tratar este nuevo compuesto con cisteína en la forma arriba descrita, no resulta inactivación del nuevo compuesto. Esto muestra la ausencia de un grupo aldehído libre en este nuevo compuesto.

200794



C. 1951

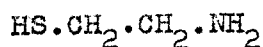
El antibiótico a que se hace referencia como N-estreptomicil-1-alanina, es activo como antibiótico contra muchos micro-organismos gram-positivos y gram-negativos.

5 Estos micro-organismos incluyen B.subtilis, B.mycoides, S.Aureus 209 P., E. Coli, S.marcesens y cocobacilos gram-negativos no clasificados.

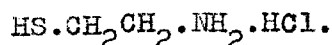
Ejemplo nº. 2.

10 En este ejemplo, usamos alfa-mercapto-etilamina para reaccionar con estreptomicina, a fin de producir un derivado de estreptomicina de baja actividad antibiótica.

La fórmula de la alfa-mercapto-etilamina es



15 Hemos usado hidrocloreuro de alfa-mercapto-etilamina, a saber



20 Como quiera que el grupo mercapto y el grupo amino están unidos a átomos de carbono adyacentes, cada uno de dichos compuestos puede denominarse, para los fines de nuestro invento, como un alfa-amino-mercapto compuesto.

Al tratar este derivado sustancialmente inactivo de estreptomicina con níquel de Raney, se obtuvo una amplia regeneración de actividad antibiótica.

25 Una mezcla de 211 mgrs. de estreptomicina par-

200794



C. 1954

5 cialmente purificada (representando 109.000 más o menos  
9.080 unidades o micro-gramos de base de estreptomina)  
y 113 mgrs. de hidrocloreto de beta-mercapto-etilamina se  
disolvió en 10 c.c. de agua; el pH se ajustó a 7 con una  
solución acuosa de hidróxido sódico, y la solución resul-  
tante se calentó a 50°C durante 75 minutos. El análisis  
al final de este periodo dió una recuperación de 17.500  
más o menos 770 unidades, lo cual es equivalente a 18% de  
la actividad original. Por consiguiente, había desapare-  
cido el 84% de la actividad original de la estreptomici-  
na.

15 Una mezcla de 5 c.c. de la mezcla de reacción,  
10 c.c. de agua y 0,4 grs. de catalizador de níquel de Ra-  
ney se sacudió a presión atmosférica de 760 mm. de mercurio  
en una atmósfera de hidrógeno y a temperatura ambiente  
de 20-25°C durante 4,5 horas. La solución se filtró.

20 El ensayo bacteriológico por el método usual  
de placas de cubeta y extrapolación hasta la cantidad to-  
tal de material de partida dió una recuperación de 67.800  
más o menos 3.850 unidades de estreptomina, o de 62% cal-  
culada a estreptomina.

25 Si la actividad de 16% que quedaba antes de  
la desulfuración y reducción con níquel de Raney se sus-  
trae del 62% se ha obtenido un aumento neto del 46% en ac-  
tividad antibiótica del derivado original.

Por las etapas empleadas en la síntesis, es  
muy probable que hayamos preparado lo que podemos denomi-

200794



nar N-estreptomiciletilamina.

En otro ejemplo de nuestro método, la estreptomicina fué sustancialmente inactivada por alfa-mercaptoetilamina en metanol anhidro. Al tratar con níquel de Raney en dicha solución metanólica se observó un aumento en la actividad similar al antes mencionado. Eso muestra que la formación de un derivado activo de estreptomicina desde el producto de reacción virtualmente inactivo que se obtiene cuando se hacen reaccionar estreptomicina y beta-mercapto-etilamina, puede ocurrir en un medio no acuoso bajo la influencia de níquel de Raney.

Ejemplo N<sup>o</sup>. 3.

Este ejemplo describe la reacción entre ester etílico de l-cisteina y estreptomicina y la hidrogenólisis del derivado inactivo resultante de estreptomicina con níquel de Raney a fin de producir un derivado activo de estreptomicina.

A - agua como disolvente.

Una mezcla de 212 mgrs. de estreptomicina parcialmente purificada (que representan 145.000 más o menos 3.820 unidades o micro gramos de base de estreptomicina) y 204 mgrs. de hidrocloreuro de ester etílico de l-cisteina se disolvió en 10 c.c. de agua a 20-25°C. El pH de esta solución acuosa se ajustó a 6,9 con una solución acuosa de álcali y la solución resultante, con un volumen de 10,6 c.c., se calentó a 50°C durante 1,5 horas, produciendo así una solución de los derivados de estreptomicina sus-

200794



C. 1951

tancialmente inactivos.

El ensayo bacteriológico al final de este periodo indicó que quedaban en dicho derivado 4.130 más o menos 387 unidades. Por consiguiente, esto representaba una inactivación del 97%.

Una mezcla de 5.c.c. de dicha solución, 10 c.c. de agua y 0,75 grs. de catalizador de níquel de Raney se sacudió en una atmósfera de hidrógeno a 25°C., durante 4,5 horas bajo una presión de 760 mm. de mercurio. El ensayo bacteriológico usando *S. Aureus* 209 P, que es una cepa *S. Aureus*, y extrapolando a la cantidad total de material de partida, dió una recuperación de 36.600 más o menos 6.480 unidades calculadas a estreptomina, o una recuperación del 25%.

B - Metanol anhidro como disolvente.

Una mezcla de 214 mgrs. de estreptomina parcialmente purificada (representando 128.000 más o menos 9.200 unidades o micro gramos de base de estreptomina pura) y 221 mgrs. de ester etílico de l-cisteina, se disolvió en 9 c.c. de metanol anhidro a 20-25°C, y esta solución se mezcló con 0,4 c.c. de una solución 1,85 N de metilato sódico,  $\text{CH}_3\text{ONa}$ , en metanol anhidro. La solución clara resultante se calentó a 50°C durante una hora, para producir la solución del derivado inactivo. El ensayo bacteriológico al final de este tiempo mostró una recuperación de 7.980 más o menos 1.440 unidades, lo cual corresponde a una inactivación del 94%.

200794



1951

Una mezcla de 5 c.c. de dicha solución, 10 c.c. de metanol anhidro y 0,75 grs. de catalizador de níquel de Raney se sacudió en una atmósfera de hidrógeno, a 25°C durante 6,5 horas a una presión de 760 mm. de mercurio.

5 El ensayo bacteriológico y la extrapolación a la cantidad total de material de partida dió una recuperación de 49.600 más o menos 6.530 unidades calculadas como estreptomycin, o una recuperación del 39%.

10 El nuevo derivado formado en cualquiera de los métodos de este ejemplo es probablemente el ester etílico de N-estreptomycinil-L-alanina.

Se ha comprobado que la cantidad de níquel de Raney usada es importante. Si se emplea demasiado, los productos descritos en los ejemplos anteriores pueden perderse sobre el níquel de Raney. Si se emplea demasiado poco, el níquel de Raney, aparentemente, es consumido por el exceso de mercapto reactivo usado, y no se recuperará actividad. Al añadir más níquel de Raney, la actividad puede recuperarse entonces. Esto fué especialmente cierto para el tratamiento con níquel de Raney del producto de reacción de estreptomycin y L-cisteína, como en el Ejemplo número 1.

20 Para cualquier caso dado, es asunto sencillo determinar por ensayos la mejor cantidad de níquel de Raney a usar.

25 Aun cuando en los ejemplos que anteceden se dispuso una atmósfera de hidrógeno durante la hidrogenolisis, hemos descubierto que el uso de una atmósfera de hidrógeno

200794



1957

no es necesaria porque el propio níquel de Raney da suficiente hidrógeno adsorbido para la reacción deseada.

5 Podemos hacer reaccionar estreptomocina con cualquiera de una pluralidad de reactivos que contienen los alfa-amino-mercapto grupos, y el derivado inactivo resultante puede tratarse luego con níquel de Raney para dar un antibiótico activo.

10 En lugar de usar estreptomocina como material de partida, para reaccionar con cisteína o sus sustituyentes, podemos usar derivados de estreptomocina que hayan retenido no modificado el grupo aldehído-carbonílico CHO de la estreptosa.

En lugar de usar l-cisteína, podemos usar d-cisteína, o la forma racémica, a saber dl-cisteína.

15 En lugar de usar cisteína, podemos usar péptidos que contienen cisteína, l o d, o dl. Tales péptidos tienen como ejemplo la cisteinil-glicina.

20 La cisteína es un ejemplo de mercapto amino ácidos y podemos usar tales ácidos en general, y sus ésteres acílicos y arílicos.

Podemos usar también dipeptidos o dipeptidos superiores que incluyan estos mercapto aminoácidos.

25 Podemos usar también residuos de cisteína sustituidos, l o d o racémicos, tales como beta-beta-dimetil cisteína o beta-metil-cisteína.

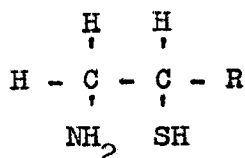
En general, podemos también hacer reaccionar estreptomocina o sus derivados que contienen el grupo al-

200794



1951

dehído-carbonílico de la estreptosa, con residuos alifáticos o aromáticos representados por

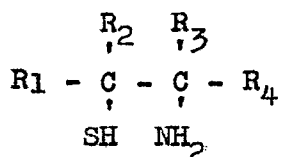


5

donde R es un grupo alcoholo de cadena recta sustituido por un alcoholo o arilo de cadena recta.

Adicionalmente, podemos hacer reaccionar estreptomycinina o uno de sus derivados funcionales que contienen el grupo aldehído-carbonílico de la estreptosa con una sustancia representada por la fórmula,

10



15

donde  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$ ,  $\text{R}_3$  y  $\text{R}_4$  tienen individualmente el mismo significado asignado antes a R.

El compuesto de reacción resultante se trata luego con níquel de Raney para desulfurar dicho compuesto de reacción, con reducción simultánea de dicho compuesto de reacción resultante.

20

Hemos descrito numerosas realizaciones de nuestro invento, pero pueden hacerse numerosos cambios y omisiones y adiciones sin apartarse por ello de su alcance.

Así, reivindicamos de modo general compuestos antibióticos de estreptomycinina y aminoácidos, particularmente con aminoácidos que ocurren en proteínas, en

25

200794



que la designación "estreptomina" incluye derivados de estreptomina que son reactivos con aminoácidos que contienen azufre, particularmente los que ocurren en proteínas. Los aminoácidos principales que han sido aislados de proteínas como se dice en las páginas 418-419 de "Organic Chemistry", de Desha, publicada en 1936 por McGraw Hill Book Company, Inc., incluyen glicina, serina, fenilalanina, tirosina, cistina, prolina e hidroxiprolina.

También reivindicamos de modo general derivados de estreptomina sustituidos de estreptomina como antibióticos, en que al menos un átomo de hidrógeno del grupo  $NH_2$  de estreptomina está sustituido por un sustituyente.

-----  
---- N O T A ----  
-----

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta Patente de Invención en España, son los siguientes:



200794

1º. El procedimiento de fabricar un agente anti-  
tibiótico afin a la estreptomocina, que comprende hacer reac-  
cionar una sustancia del grupo consistente en estreptomoci-  
na y sus derivados que tienen el grupo característico alde-  
hido-carbonílico de la esteptosa, con un compuesto alfa  
5 amino mercapto alifático de cadena recta en un medio de reac-  
ción disolvente, reducir luego este producto de reacción con  
níquel de Raney para producir una sustancia antibióticamen-  
te activa que difiere del material de partida porque el gru-  
10 po carbonilo de la estreptosa está sustituido por un susti-  
tuyente de la clase consistente en grupos alcohol amino me-  
tilénicos y grupos alcohol amino metilénicos sustituidos de  
la serie alcohólica inferior, y recuperar este compuesto hi-  
drogenado de la mezcla de reacción.

15 2º. Un procedimiento según se reivindica en  
el punto 1º., caracterizado además porque el producto de  
hidrogenación recuperado es un compuesto del grupo que con-  
siste en N-(1-carboxi)-etil estreptomocilamina, N-etil strep-  
tomicilamina y N-(1-carboetoxi)-etil estreptomocilamina.

20 3º. Un procedimiento de fabricar un agente  
antibiótico afin a la estreptomocina.

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

25 Esta Memoria consta de diez y seis hojas es-  
critas a máquina por una sola cara.

Madrid - 1 MAR. 1952

R. A.

Alberto de Elizaburu

Por Orden