

AÑO 1957

Expediente núm.



238208

238208

REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

PATENTE DE INVENCIÓN

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de

una **PATENTE DE** INVENCIÓN por VEINTE años, en España

a favor de

AMERICAN CYANAMID COMPANY, de nacionalidad
norteamericana domiciliado en 30 Rockefeller Plaza,
calles de Nueva York, N.Y., E.U.A. ~~RUSS~~

por:

UN PROCEDIMIENTO DE PRODUCIR TETRACICLINA"

Nº 3987

Agente Sr. ELZABURU

P- 16.336

A 29.381 Case 16.283

5-8 NOV 1957



7-8 NOV 1957

238208

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

PATENTE DE INVENCION

en

ESPAÑA

por VEINTE años

a nombre de AMERICAN CYANAMID COMPANY, entidad norteamericana, establecida en 30 Rockefeller Plaza, Nueva York, N.Y., Estados Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO DE PRODUCIR TETRACICLINA".

Este invento se refiere a la fabricación de tetraciclina y mas en particular está relacionado con la inhibición de la cloración fermentativa en las fermentaciones clorotetraciclina-tetraciclina con lo cual se producen rendimientos elevados de tetraciclina.

5

10

Se ha descubierto recientemente que los microorganismos del género Streptomyces que producen clorotetraciclina, producirán también tetraciclina particularmente si se mantiene baja la concentración de ion cloruro del medio de fermentación. Esto puede conseguirse utilizando medios de fermentación de los que se hayan eliminado los iones cloruro, bien componiendo el medio de fermentación con componentes sin cloruros, o bien tratando el medio con agentes que separen o enmascaren los iones cloruro,

238208



haciendo así que no se hallen disponibles para la formación de clorotetraciclina.

Desgraciadamente, algunos de los componentes mas eficaces de los medios de fermentación para la producción de antibióticos de tetraciclina contienen cantidades considerables de iones cloruro. El líquido de maceración de maiz es una de las sustancias nutritivas mas eficaces para la producción de los antibióticos de tetraciclina así como de muchos otros antibióticos. Aparentemente, este producto natural contiene algo que es deseado especialmente por el microorganismo en fermentación. Por tanto, los rendimientos más elevados de antibiótico se obtienen cuando se incluye una porción de líquido de maceración de maiz en el medio nutritivo acuoso.

Sin embargo, el líquido de maceración de maiz contiene una cantidad considerable de iones cloruro y si la formación de clorotetraciclina ha de mantenerse en niveles moderadamente bajos, se ha considerado hasta ahora necesario reducir el contenido en cloruros de este material. Lo mismo es aplicable a una serie de otros productos nutritivos que existen en la naturaleza, que se utilizan ventajosamente en el proceso de fermentación.

Se han propuesto diversos sistemas de reducir el contenido de ion cloruro de las soluciones nutritivas acuosas para la producción de tetraciclina. La precipitación del ion cloruro como cloruro de plata es un medio muy eficaz de reducir el contenido en ion cloruro. Sin embargo, es un procedimiento costoso que precisa materias primas caras, instalación especial, y un gas tóxico, el sulfuro de hidrógeno, para la recuperación de la plata.

Las resinas cambiadoras de iones se han propuesto también para la reducción del contenido en iones cloruro de los medios



de fermentación. Estas sustancias tienden a eliminar algunas sales y productos orgánicos de composición no identificada que son componentes convenientes de los medios de fermentación. Como resultado de esto, pueden obtenerse bajos rendimientos de antibiótico cuando se utilicen soluciones nutritivas que hayan sido pre-
5 tratadas con resinas cambiadoras de iones para eliminar los iones cloruro.

Los sistemas de eliminación de cloruros dejan todavía, sin embargo, mucho que desear, a causa de la inversión de capital
10 necesaria, del sistema relativamente complicado de eliminación de los iones cloruro del medio de fermentación, así como del hecho de que el medio de fermentación puede estar compuesto en tales casos solamente de aquellos materiales de partida de los que pueden eliminarse fácilmente los iones cloruro, o que existan
15 naturalmente con una escasa concentración de cloruro.

Se ha propuesto asimismo desplazar el equilibrio en una fermentación tetraciclina-clorotetraciclina mediante el empleo de bromuro que aparentemente detienen la formación de clorotetraciclina en algunos aspectos.

El presente invento basa su eficacia en la producción de rendimientos elevados de tetraciclina en un medio de fermentación en el que no sea necesario eliminar los iones cloruro del sistema. El presente invento se basa en el descubrimiento de que cuando se añade un inhibidor de la cloración tal como se describe en lo que sigue a un medio de fermentación que contenga cloruros, la actividad del microorganismo se dirige de la síntesis de clorotetraciclina a la síntesis de tetraciclina. El invento es de considerarle importancia práctica porque evita el gasto y desventajas de la eliminación de iones cloruro del medio de
25 fermentación. Así, de acuerdo con el presente invento una fer-
30



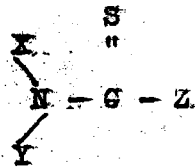
mentación de clorotetraciclina que contenga cloruro puede convertirse fácilmente en una fermentación de tetraciclina mediante la adición al medio nutritivo de una cantidad relativamente pequeña de los nuevos inhibidores de la cloración, tal como se describe en lo que sigue.

El presente invento no está relacionado particularmente con ningún microorganismo específico excepto en la medida en que se refiere a aquellos microorganismos que producen clorotetraciclina y tetraciclina mediante biosíntesis fermentativa.

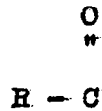
Por lo que se conoce hasta ahora, todos estos microorganismos son del género Streptomyces. La especie S. aureofaciens, que produce clorotetraciclina en medios de fermentación en los que se hallen presentes iones cloruro, así como numerosos mutantes naturales é inducidos son utilizados preferentemente y tales microorganismos producirán también, desde luego, tetraciclina cuando se eliminen los iones cloruro. En la bibliografía de patentes se han mencionado una serie de otros microorganismos productores de tetraciclina incluyéndose distintas especies de Streptomyces como por ejemplo S. viridifaciens, S. sayamaensis, S. feofaciens y aún otros. Los datos morfológicos publicados sobre estos microorganismos no son suficientemente decisivos para determinar si son o no nuevas especies o simplemente cepas de S. aureofaciens. Sin embargo, independientemente de esto, el presente invento no está relacionado con la selección de una especie particular de microorganismo, sino que como se indicó anteriormente, se refiere al empleo de determinados inhibidores de la cloración que dirigen la actividad del microorganismo de la síntesis de clorotetraciclina a la síntesis de tetraciclina. Por consiguiente, el presente invento incluye cualquier microorganismo que produzca clorotetraciclina y tetraciclina.



Los inhibidores de la cloración de este invento pueden representarse por la fórmula general siguiente:



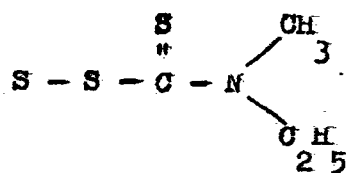
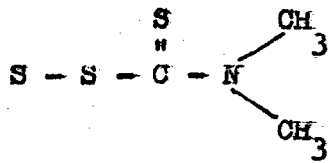
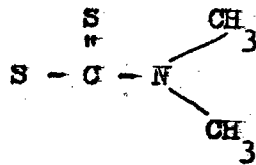
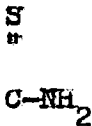
en la que X es un término del grupo que consta de hidrógeno y radicales alquilo inferiores como el metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, pentilo, hexilo, etc; Y es un término del grupo que consta de hidrógeno, fenilo, amino, alquilo inferior,



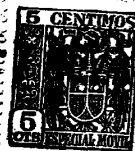
en el que R es fenilo o alquilo inferior, y



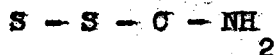
en el que R es fenilo o alquilo inferior; y Z es un término del grupo que consta de S(alquilo inferior), SCH_2 , SCH_2COOH , SCH_2-



238208



57



Entre los compuestos particularmente útiles para llevar a cabo el presente invento pueden mencionarse N-acetil-bencil-ditiocarbazato y N-bencil-ditiocarbazato con estos inhibidores
5 particulares se han encontrado rendimientos de tetraciclina tan elevados como 95-98%. Otros compuestos, de utilidad dentro del alcance de este invento serán evidentes de la consideración de los ejemplos detallados que aparecieran en lo que sigue.

10 Como en el caso del empleo de iones bromuro para disminuir la cloración fermentativa, los inhibidores del presente invento pueden ser algo tóxicos al microorganismo, especialmente cuando se utilizan en concentraciones elevadas. Afortunadamente, cantidades muy pequeñas de los inhibidores de este invento disminuyen
15 de manera muy marcada la formación de clorotetraciclina. Una cantidad tan pequeña como una parte por millón presenta algún efecto. Ordinariamente el intervalo preferido será de unas 5 partes por millón a 100 partes por millón, pero pueden utilizarse 500 partes por millón o incluso más si se desea. En términos generales, cuanto mayor cantidad de inhibidor se añada se producirá
20 menos clorotetraciclina. Por otra parte, cuando se añaden cantidades sucesivas de inhibidor empiezan a presentarse los efectos tóxicos y se reduce el rendimiento total de antibiótico. Por esto, no se ha observado ninguna ventaja en utilizar mas de
25 unas 500 partes por millón y en algunos casos incluso menos.

Una ventaja mas de este invento es que los inhibidores de la cloración hacen posible el empleo de una gran variedad de cepas de S. aureofaciens. Es decir, que con los sistemas de empobrecimiento de cloruros a menudo las cepas que producen más
30 tetraciclina, esto es las cepas eliminadoras de cloruros, no



podrían utilizarse porque producirían también un nivel elevado de clorotetraciclina. Sin embargo con este invento tales cepas pueden utilizarse con facilidad puesto que los inhibidores de cloración hacen posible desplazar fácilmente el equilibrio en favor de la tetraciclina.

Las condiciones de la fermentación son en general las mismas de los métodos conocidos actualmente para la producción de tetraciclina o clorotetraciclina por fermentación. Esto es, el medio de fermentación contiene las sustancias nutritivas y sustancias minerales usuales. Entre las sustancias nutritivas apropiadas que pueden proporcionar las sustancias necesarias se incluyen el almidón, dextrosa, azúcar de caña, glucosa, melazas, harina de soja, harina de cacahuete, levadura, extractos de carne, peptona, sulfato amónico, urea, líquido de maceración de maiz, solubles de destilería, harina de pescado y otras sustancias usuales. Las sales inorgánicas incluyen productos como el carbonato cálcico, sulfato amónico, cloruro amónico y los diversos elementos traza como el manganeso, cobalto, cinc, cobre, hierro y similares.

Las otras condiciones generales de la fermentación, como por ejemplo la concentración de ion hidrógeno, temperatura, tiempo, velocidad de aireación, preparación del medio de inoculación, esterilización, inoculación y similares son las usuales y pueden ser análogas a las de la producción de clorotetraciclina indicadas en la Patente número 186.883 y para la producción de tetraciclina indicadas en la patente número 217.171.

Análogamente, la recuperación de la tetraciclina del líquido de fermentación es la ordinaria y no necesita ser descrita, puesto que han sido publicados numerosos métodos de recuperación de tetraciclina a partir de líquidos de fermentación.

238208



En el ejemplo que sigue los rendimientos de tetraciclina y clorotetraciclina se expresan como gamas por milimetro (γ /ml.) El invento se describirá con mas detalle en relación con el siguiente ejemplo específico.

5

EJEMPLO

Un medio de fermentación de clorotetraciclina, como el que puede utilizarse para la producción en gran escala, y que contenga una gran cantidad de ion cloruro se compuso como sigue:

	Harina de maiz	14,5	gramos	por	litro
10	Almidón	47	"	"	"
	Líquido de maceración de maiz	25	"	"	"
	CaCO ₃	9	"	"	"
	(NH ₄) ₂ SO ₄	5,6	"	"	"
	MnSO ₄ (70%)	80	miligramos por litro		
15	COCl ₂ ·6H ₂ O	5	"	"	"
	Grasa de cerdo	3%	en volúmen		
	Cloruro amónico	1,7	gramos	por	litro

A este medio se le añadieron en operaciones separadas cantidades variables de los inhibidores de cloración relacionados a continuación. Los medios se distribuyeron en cantidades apropiadas en frascos, se esterilizaron, se inocularon con inóculo vegetativo de S aureofaciens (cepa B 77) y se incubaron a 26,5 ° C. en un agitador rotatorio durante 96 horas. Se ensayó su contenido en clorotetraciclina y tetraciclina. Los resultados obtenidos se indican a continuación en la tabla

25

Compuesto	p.p.m.	Clorotetraciclina	Tetraciclina	% de Tetraciclina
		γ /ml	γ /ml	
N-benzoil	0	4900	685	12.3
ditiocarbamato de	50	4950	850	14.6
etilo	100	4075	1175	22.3
	200	3025	1560	34.0

238208



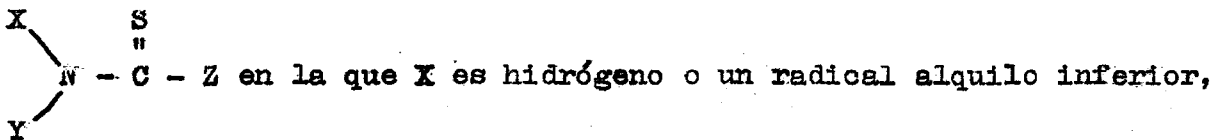
Compuesto	p.p.m.	Clorotetraciclina	Tetraciclina	% de
		γ/ml	γ/ml	Tetraciclina
Ditiocarbato de bencilo	0	6250	860	12.0
	5	6250	980	13.5
	10	5950	1165	16.3
	25	4500	2575	36.3
5 N-formil-bencil-ditiocarbato	0	6250	860	12.0
	5	480	5840	92.4
	10	1600	4870	75.2
	25	4525	2360	34.2
N-acetil-bencil-ditiocarbato	0	6750	835	11.0
	5	1150	4880	80.9
	10	520	5100	90.7
	25	280	5260	94.9
10 N-benzoil-bencil-ditiocarbato	0	6750	835	11.0
	5	530	5280	90.8
	10	190	6120	96.9
	25	45	1890	97.6

Esta solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América el 2 de Noviembre de 1956, bajo el número 619.947, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

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, por VEINTE años son los siguientes:

12.- Un procedimiento de producir tetraciclina caracterizado por la fermentación aerobia de un medio acuoso de fermentación que contenga iones cloruro con un microorganismo del género Streptomyces y adición a dicho medio de un inhibidor de cloración de la fórmula:



Y es hidrógeno, fenilo, amino, alquilo inferior, o el grupo

$$R - \overset{O}{\parallel} C - \text{ó} - \overset{O}{\parallel} C - NH$$
 siendo R fenilo o alquil inferior fenilo y

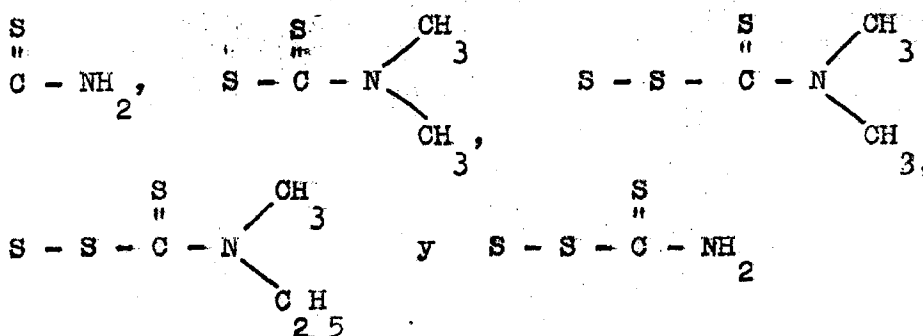
Z es un término del grupo que consta de S(alquil-inferior), SCH_2 , SCH_2COOH , SCH_2-  $-Cl$,

238208



Compuesto	p.p.m.	Clorotetraciclina	Tetraciclina	% de
		μ /ml	μ /ml	Tetraciclina
Ditio-oxamida	0	7800	725	8.5
	50	6400	917	12.5
	100	4400	947	17.7
	200	1800	342	15.9
5 Monosulfuro de tetra-	0	7800	725	8.5
	150	5750	1950	25.3
	100	4750	2840	37.4
	200	1925	3820	66.4
Disulfuro de tetra-	0	7800	725	8.5
	50	6950	957	12.1
	100	6400	1225	16.0
	200	5700	1750	23.4
10 Disulfuro de tiuram	0	7000	725	9.3
	50	5150	1635	24.0
	100	4600	2150	31.8
	200	2475	2245	47.5
Disulfuro de bis-(etil-me-til-tiuram	0	7100	845	10.6
	50	6500	1195	15.5
	100	4600	1145	19.9
	200	1590	442	21.7
15 Metil-N,N-dimetil-di-tiocarbamato	0	7100	845	10.6
	50	6225	775	11.0
	100	5075	815	13.8
	200	4050	800	46.4
Bencil-M-ace-til-ditiocar-bamato	0	6550	925	12.3
	50	5800	1215	17.3
	100	5300	1500	22.0
	200	4800	1425	22.8
20 Butil-terc-N-acetil-di-tiocarbamatol	0	6550	925	12.3
	50	6300	1245	16.5
	100	5750	1615	21.9
	200	5050	2195	30.3
Carboxi-metil N,N-dimetil-ditiocarba-mato	0	6550	925	12.3
	50	6000	970	13.9
	100	5450	1345	19.8
	200	5000	1385	21.7
25 N,N-dimetil-p-clorobencil-ditiocarba-mato	0	6550	925	12.3
	50	2800	2285	44.9
	100	5050	1410	21.8
	200	5100	1225	19.3
Metil-benzo-ilditiocarba-mato.	0	6550	925	12.3
	50	6300	1185	15.8
	100	5800	1380	19.2
	200	3850	1965	33.7

30



mediante lo cual se inhibe la formación de clorotetraciclina y se producen cantidades considerables de tetraciclina.

10 2º.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que se añaden a dicho medio acuoso de fermentación de 5 a 500 ppm de dicho inhibidor de cloración.

15 3º.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que dicho inhibidor de cloración es N-acetil-bencil-ditiocarbazato.

4º.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado por el hecho de que el inhibidor de cloración es N-benzoil-bencil-ditiocarbazato.

20 5º.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que dicho inhibidor de cloración es N-formil-bencil-ditiocarbazato.

6º.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado por el hecho de que dicho inhibidor de cloración es N,N-dimetil-p-clorobencil-ditiocarbamato.

25 7º.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que dicho inhibidor de cloración es el monosulfuro de tetrametiltiuram.

8º.- Un procedimiento de producir tetraciclina.

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

238208



Esta Memoria consta de doce hojas escritas a máquina
por una sola de sus caras.

Madrid,

50 NOV. 1950

P. A.

Albarrán de Elzaburo
[Handwritten signature]

MEM/.