

AÑO 1958

Expediente núm. _____

240760



REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

240760

PATENTE DE INVENCION

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de

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

a favor de

AMERICAN CYANAMID COMPANY, de nacionalidad
norteamericana domiciliado en 30 Rockefeller Plaza, Nueva
~~York~~ York, N.Y., Estados Unidos de América. ~~XXX~~

por:

UN METODO DE PRODUCIR MIEMBROS DE LA SERIE DE LA TETRA-
CICLINA".

Nº 6601

Agente Sr. ELZABURU

2474R

P - 16.792

A-31354 Case 16313 LJR



240760

MEMORIA DESCRIPTIVA
 para solicitar
 PATENTE DE INVENCIÓN
 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 METODO DE PRODUCIR MIEMBROS DE LA SERIE DE LA TETRACICLINA"

Esta invención se refiere a un nuevo método para produ-
 cir miembros de la serie de la tetraciclina, incluyendo el epí-
 mero en 5a de la tetraciclina, que es un compuesto nuevo.

En la actualidad, la tetraciclina se produce en escala
 5 comercial generalmente por uno de dos métodos conocidos. El mé-
 todo más ampliamente utilizado actualmente abarca la desclora-
 ción reductiva de clorotetraciclina.

De un modo convencional, este procedimiento se realiza
 reduciendo clorotetraciclina con hidrógeno en presencia de pa-
 10 ladio o platino metálicos sobre un catalizador de carbón vege-
 tal. La reducción se suele realizar en un disolvente orgánico

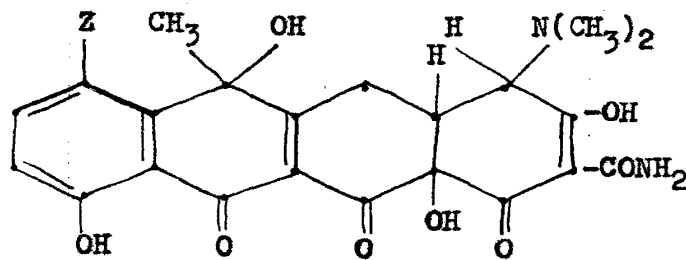


para la clorotetraciclina, tal como los alcoholes alifáticos bajos, glicol-éteres y análogos, Se han utilizado para ello disolventes tales como 2-etoxietanol, 2-metoxietanol, butanol normal, metanol, etanol y mezclas de los mismos. La reacción puede hacerse a temperaturas desde 0 a 100° C. y a presiones de hidrógeno del orden de 1,05 kg/cm² a 4,20 kg/cm² absolutas. Usualmente, hay presente un aceptor de ácido tal como trietilamina u otra base orgánica en la mezcla de reacción, en cantidad suficiente para combinarse con la totalidad del ácido clorhídrico liberado por la reacción de hidrogenolisis, de manera que la tetraciclina se produce y se recupera como base libre. Una vez que la reducción a tetraciclina ha sido completa, se separa el catalizador por filtración, se acidifica el filtrado que contiene la sustancia activa, se siembra y se envejece, y se cristaliza del mismo el clorhidrato de tetraciclina. Un procedimiento de hidrogenolisis, tal como se ha indicado arriba, se describe de modo más detallado en la revista J. Amer. Chem. Soc. 75, 4621 (1953).

El otro método general abarca la fermentación directa por microorganismos de las especies Streptomyces aureofaciens de un medio nutriente acuoso pobre en cloruro disponible, con lo cual se producen rendimientos tanto de tetraciclina como de clorotetraciclina, siendo la tetraciclina el producto predominante de la fermentación. Un procedimiento de fermentación de esta índole se describe en la patente americana No. 2.734.018, de Minieri.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que se pueden obtener miembros de la serie de la tetraciclina en cantidades útiles en escala comercial por la reducción catalítica de 5a(11a)-deshidrotetraciclinas que tienen la fórmula

240760



I

donde Z es hidrógeno, cloro o bromo, o un epímero en 4a de los mismos, hasta que se han absorbido aproximadamente 2 moles de hidrógeno por cada mol de 5a(11a)-deshidrotetraciclina.

5 Estas 5a(11a)-deshidrotetraciclina que tienen la fórmula I son en sí mismas antibióticos nuevos producidos por un procedimiento de fermentación descrito en la solicitud No. 240.767 presentada al mismo tiempo que ésta. Como se describe más detalladamente allí, los nuevos antibióticos tetraciclina, tal como
 10 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina, por ejemplo, se producen por un proceso de fermentación con ciertas nuevas cepas mutantes de S. aureofaciens, algunas de las cuales han sido designadas con las denominaciones S1308, S 1308-29, S1302-VI46 y S1308-V237 de las que se han depositado cultivos en la American Type Culture
 15 Collection en Washington D.C., donde se les ha asignado los números de acceso en la ATCC 12748, 12749, 12750 y 12751, respectivamente.

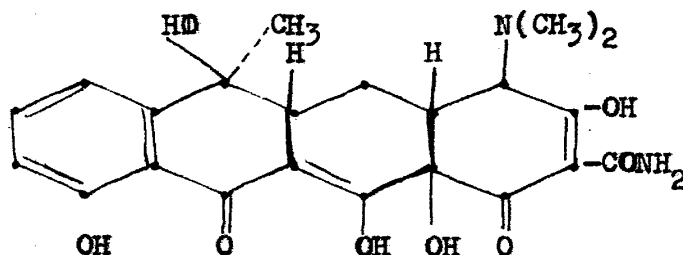
La discusión detallada que sigue se referirá principalmente a la reducción catalítica a tetraciclina de la 7-cloro-5a
 20 (11a)-deshidrotetraciclina, puesto que puede ser potencialmente el antibiótico más útil producido por fermentación con las nuevas cepas mutantes de S. aureofaciens. Sin embargo, ha de sobreentenderse que la reducción catalítica a tetraciclina puede realizarse con la misma facilidad con las otras nuevas tetracicli-
 25 nas que tienen la fórmula I, a saber, 5a(11a)deshidrotetraciclina



así como con los correspondientes epímeros en posición 4a de cada uno de estos nuevos antibióticos.

Al poner en práctica la presente invención, la 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina, por ejemplo, se reduce catalíticamente por contacto de una solución del antibiótico en un disolvente polar y teniendo un catalizador finamente dividido, tal como paladio metálico u otro metal de la familia del platino, sobre carbón vegetal suspendido en ella, con hidrógeno, hasta que han sido absorbidos aproximadamente 2 moles de hidrógeno. La reducción puede efectuarse a temperaturas comprendidas entre 0° C. y 100° C., y a presiones desde media a 100 atmósferas. Son disolventes polares útiles para la reacción la dimetilformamida, los alcoholes alifáticos bajos, tales como etanol, butanol normal, etc. y los alcoxialcanoles (con peso molecular bajo tanto del radical alcoxi como del alcohol) tal como 2-metoxi etanol, 2-etoxi etanol, etc., y mezclas de los mismos con los alcanoles bajos. La dimetilformamida parece ser el disolvente de elección, ya que la reacción llega a ser normalmente completa en unos 45 minutos. El sistema butanol alcoxi bajo alcohol bajo es considerablemente más lento, necesitando en general unas 18 horas a la temperatura ambiente para que la reacción llegue a ser completa.

La reducción de 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina da invariablemente dos productos siendo, naturalmente, uno de ellos tetraciclina, según se ha descrito, y el otro es un nuevo compuesto que se ha designado con el nombre de 5a-epitetraciclina. Este nuevo compuesto tiene la fórmula estructural siguiente:





y de acuerdo con la nomenclatura de Chemical Abstracts, tiene el mismo nombre sistemático que la tetraciclina. Un nombre común, como se ha indicado arriba, sería 5a-epitetraciclina. Nos referiremos aquí a este nombre.

5 La actividad antibacterial de este nuevo análogo de tetraciclina es bastante baja. Sin embargo, puede convertirse por un proceso de degradación ácida con rendimientos de 80-90 %, en el producto usual conocido como anhidro-tetraciclina, que es un agente antibacterial efectivo contra ciertas cepas de bacterias resistentes a la tetraciclina y a la clorotetraciclina.

10 La recuperación de tetraciclina a partir de la solución reducida de 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina puede realizarse de cualquier modo conveniente; por ejemplo, filtrando la solución reducida para eliminar el catalizador y concentrando la solución a sequedad en vacío. El residuo se disuelve en agua o en alcohol, se siembra y se envejece con lo cual precipitan del mismo cristales neutros de tetraciclina. Es particularmente fortuito que la 5a-epitetraciclina no tiende a co-cristalizar con la tetraciclina, tanto con el clorhidrato como con el producto neutro. Por consiguiente, no se presenta ningún problema en la recuperación de cantidades comercialmente útiles de tetraciclina a partir de la solución reducida. Cuando se desea aislar la 5a-epitetraciclina, se requiere usualmente cromatografía en columna sobre Celite utilizando un sistema butanol-cloroformo.

25 Como se ha indicado arriba, la 5a(11a)-deshidrotetraciclina y la 7-bromo-5a(11a)-deshidrotetraciclina pueden reducirse de modo análogo a tetraciclina de un modo sustancialmente igual a como se ha descrito detalladamente en relación con la 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina. Cuando los análogos no



2
5 clorado y bromado se reducen a tetraciclina, se producen también cantidades del nuevo compuesto 5a-epitetraciclina, lo mismo que se ha descrito con respecto a la reducción de 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina, y que pueden separarse de la tetraciclina como se ha descrito arriba.

Cuando se utilizan epímeros en 4a de 5a(11a)-deshidrotetraciclina, el producto reducido resultante es 4-epi-tetraciclina y no tetraciclina.

10 La invención se describirá con más detalle en relación con los siguientes ejemplos específicos en los cuales los rendimientos se expresan en gammas por miligramo (γ /mg).

EJEMPLO I

15 Se disuelve 1 gramo de 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina neutra, obtenida según se ha descrito en la solicitud antes mencionada y que da en el ensayo 1000 γ /mg., en 6 mililitros de dimetilformamida, y se añaden a la solución 0,56 mililitros de trietilamina. Se añaden 500 mg. de paladio al 5 % sobre carbón, y la mezcla se sacude en atmósfera de hidrógeno a la temperatura ambiente durante 45 minutos hasta que se han absorbido
20 dos moles de hidrógeno. La solución reducida se diluye con 6 mililitros de dimetilformamida, se filtra para eliminar el catalizador y se concentra a sequedad en vacío. Se añade una cantidad mínima de agua para disolver el residuo y la solución resultante se siembra con tetraciclina neutra para inducir la cristali-
25 zación.

Después de envejecer durante dos horas a la temperatura ambiente, se filtran los cristales, se lavan con agua, y se secan en vacío resultando 0,4 gramos de tetraciclina neutra que da en el ensayo 900 γ /mg.

30

EJEMPLO 2



Se disuelve 1 gramo de tetraciclina neutra, preparada por el proceso de reducción del ejemplo 1, en un volumen mínimo de butanol normal ajustado previamente a pH 1,5 con ácido clorhídrico concentrado. La solución se siembra con clorhidrato de tetraciclina y se envejece durante 4 horas para que se produzca la cristalización. Se filtra el producto, se lava con butanol, luego con eter, y se seca in vacuo resultando 0,76 gramos de clorhidrato de tetraciclina que acusa en el ensayo 994 γ /mg.

10

EJEMPLO 3

Se prepara una mezcla de 50 mililitros de butanol normal, 50 mililitros de 2-etoxietanol, 0,6 mililitros de agua y 0,6 mililitros de trietilamina. Se disuelven en 12 mililitros de la mezcla, 188 miligramos de 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina neutra que dan en el ensayo 1000 γ /mg., y se añaden 94 miligramos de paladio al 5% sobre carbón. La reducción se realiza sacudiendo en una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 18 horas. Después de filtrar para eliminar el catalizador, la solución reducida se concentra en vacío en agua y la solución acuosa se seca por congelación. El residuo se disuelve en un volumen mínimo de butanol saturado con agua, que se acidifica a pH 1,5 con ácido clorhídrico concentrado. La solución se siembra con clorhidrato de tetraciclina para favorecer la cristalización y, después de envejecer, se filtran los cristales, se lavan primero con butanol, luego con eter, y después se secan en vacío. Se obtiene un rendimiento de 45 miligramos de clorhidrato de tetraciclina que da en el ensayo 985 γ /mg.

15

20

25

EJEMPLO 4

30

Las aguas madres procedentes del ejemplo 3 se ponen en

240760



una columna de Celite de 70 gramos, de 2,54 cm. de diámetro, tamponada con 35 mililitros de HCl 0,01N. Para el desarrollo e revelado de la columna se utiliza una mezcla de 80 % de butanol y 20 % de cloroformo equilibrada con HCl 0,01N. Se toman fracciones de 10 mililitros cada una. Las fracciones 4-8 se concentran en vacío en agua y la solución acuosa se seca por congelación. La cristalización del residuo amorfo se realiza disolviéndolo en una cantidad mínima de butanol, ajustando el pH a 1,5 con ácido clorhídrico concentrado, y añadiendo dos volúmenes de eter para formar un precipitado amorfo que, después de sembrar, cristaliza por envejecimiento durante 3 horas a la temperatura ambiente. Los cristales se filtran, se lavan con butanol: eter, 2:1, de pH 1,5, luego con éter, y se secan en vacío resultando 25 miligramos de clorhidrato de 5a-epitetraciclina.

15 Análisis: Calculado para $C_{22}H_{25}N_2ClO_8 \cdot H_2O$. C, 52,9; H, 5,42; N, 5,61; Cl, 7,11; O, 28,8.

 Encontrado: C 53,12, H 5,33; N 5,36, Cl; 7,41; O, 28,75.

EJEMPLO 5

Una solución de 200 mg. de 5a-epitetraciclina, preparada como en el ejemplo 4, en 0,6 mililitros de ácido clorhídrico concentrado, se calienta a 60° C. durante 5 minutos. A la solución se añaden 1,5 mililitros de butanol normal, 0,4 mililitros de agua y 2,5 mililitros de acetona. La solución se siembra con clorhidrato de anhidrotetraciclina y se envejece durante 16 horas a la temperatura ambiente, después de lo cual el producto cristalino se filtra, se lava con acetona y se seca en vacío resultando 145 miligramos de clorhidrato de anhidrotetraciclina.

La identidad del producto se verifica por comparación de su espectro infrarrojo y de sus espectros ultravioleta ácido y

240760



alcalino con curvas de anhidrotetraciclina patrón.

EJEMPLO 6

Se sigue el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se usa como material de partida 5a(11a)-deshidrotetraciclina. Se produce tetraciclina.

EJEMPLO 7

Se sigue el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se usa como material de partida 7-bromo-5a(11a)-deshidrotetraciclina. Se produce tetraciclina.

EJEMPLOS 8-10

Se sigue el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se usan 7-cloro-5a(11a)-deshidro-4-epitetraciclina, 5a(11a)-deshidro-4-epitetraciclina, y 7-bromo-5a(11a)-deshidro-4-epitetraciclina, respectivamente, en una serie de reducciones separadas.

En todos los casos se produce 4-epitetraciclina.

Esta solicitud, que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América el 5 de Abril de 1957, bajo el Núm. 650.822, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

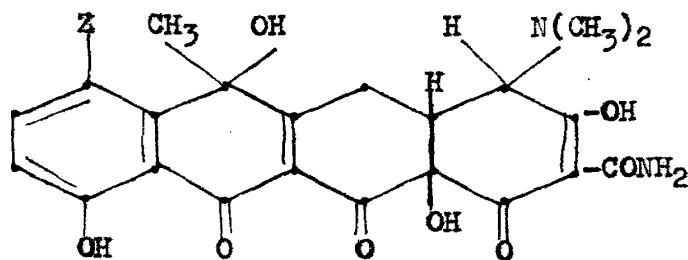
N O T A

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:

1ª. - Un método para producir miembros de la serie de la tetraciclina caracterizado por reducir catalíticamente una deshidrotetraciclina que tiene la fórmula



240760



I

donde Z es hidrógeno, cloro o bromo, o un epímero en 4a de la misma, hasta que se han absorbido aproximadamente dos moles de hidrógeno por cada mol de 5a(11a)-deshidrotetraciclina.

5

2a. - Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la reducción catalítica se efectúa con hidrógeno y un catalizador de metal noble finamente dividido tal como paladio metálico.

10

3a. - Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó la 2, caracterizado por el hecho de que la reducción catalítica se efectúa a una temperatura comprendida entre los límites de 0° C. y 100° C.

15

4a. - Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por el hecho de que se usa una solución en un disolvente polar de la 5a(11a)-deshidrotetraciclina.

5a. - Un método de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado por el hecho de que el disolvente polar es dimetilformamida.

20

6a. - Un método para reducir el doble enlace 5a(11a) de un antibiótico de la serie de la tetraciclina, caracterizado por la reducción catalítica de dicho antibiótico hasta que se han absorbido aproximadamente dos moles de hidrógeno por mol

240760



de dicho antibiótico.

7º. - Un método de producir miembros de la serie de la tetraciclina.

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

Esta Memoria consta de once hojas escritas por una sola cara.

Madrid,

24 MAR. 1958

P. A.

Alberto de Elzaburri

