

AÑO 1958

Expediente núm.

240761



REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

240761

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,
ciudad Nueva York, N.Y., Estados Unidos de América.

por:

UN METODO DE PRODUCIR TETRACICLINAS"

Nº 6701

Agente Sr. ELZABURU

P - 16.793.

A.316426 Case 16.413 LJR

22 NOV. 1958

240761



V. 1958

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

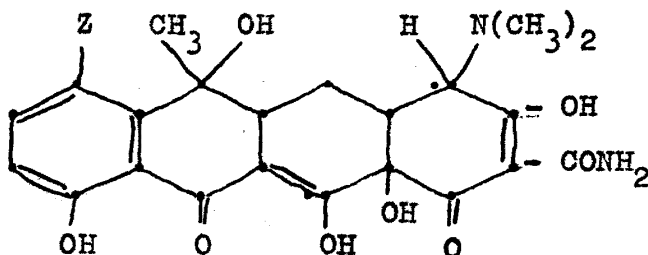
por VEINTE años

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

"UN METODO DE PRODUCIR TETRACICLINAS".

Esta invención se refiere a un nuevo método para producir compuestos de la serie de la tetraciclina, a saber, los antibióticos de amplio espectro tetraciclina, clorotetraciclina y bromotetraciclina.

Estas tetraciclinas tienen la fórmula

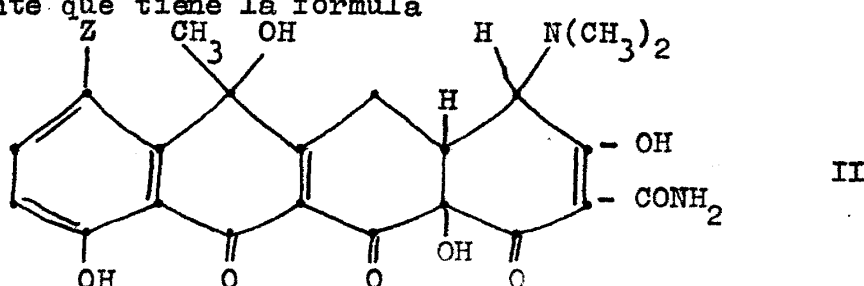


240761



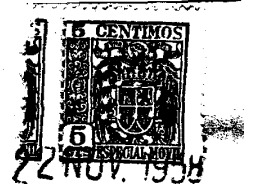
en la que Z es hidrógeno, cloro o bromo. Hasta ahora, estas tetraciclinas se han obtenido por fermentación aeróbica de un medio nutriente acuoso con un microorganismo de la especie S. aureofaciens u condiciones controladas con relación al contenido de iones y/o bromuro en el medio.

De acuerdo con la presente invención, estas tetraciclinas que tienen la fórmula I se producen fermentando aeróbicamente un medio nutriente acuoso con un microorganismo de la especie S. aureofaciens en presencia de una 5a(11a)-deshidrotetraciclina correspondiente que tiene la fórmula



donde Z tiene la misma significación que arriba.

Estas 5a(11a)-deshidrotetraciclinas que tienen la fórmula II son los mismos antibióticos nuevos producidos por un proceso de fermentación que se describe en la solicitud No. 240.767, presentada al mismo tiempo que ésta. Como se describe allí más detalladamente, estos nuevos antibióticos comprenden 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina, 5a(11a)-deshidrotetraciclina y 7-bromo-5a(11a)-deshidrotetraciclina, y se producen, bajo condiciones adecuadas de fermentación, por ciertas cepas mutantes, de S. aureofaciens, algunas de las cuales han sido designadas con las referencias S1308, S 1308-29, S1308-VI 46 y S 1308-V237, de las que se han depositado cultivos en la American Type Culture Collection en Washington D.C., donde se les ha asignado los números de acceso ATCC 12.748, 12.749, 12.750 y 12.751, respectivamente.



La actividad biológica de estas 5a(11a)-deshidrotetraciclina es bastante baja. Sin embargo, como las nuevas cepas mutantes de S. aureofaciens que producen estos nuevos antibióticos son cepas muy productoras, que dan frecuentemente hasta 9000-10000 gammas por mililitro de 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina, por ejemplo, se han realizado esfuerzos que tienden a la conversión de estos antibióticos en antibióticos que posean el deseado espectro amplio típico de actividad antibacterial.

La presente invención consigue el resultado apetecido por una transformación biológica de estos nuevos antibióticos en el antibiótico deseado de espectro amplio. Así, por ejemplo, de la manera que se describirá particularmente después, la 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina se convierte en clorotetraciclina, la 5a(11a)-deshidrotetraciclina se convierte en tetraciclina, y la 7-bromo-5a(11a)-deshidrotetraciclina se convierte en bromo tetraciclina.

La presente invención puede ponerse en práctica sencillamente añadiendo los nuevos antibióticos a un sistema de fermentación que emplea cepas corrientes de S. aureofaciens. Así, por ejemplo, la 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina, cuando se añade a un sistema de fermentación corriente que utiliza cepas productoras de clorotetraciclina convencionales de S. aureofaciens, se convierte en cloro-tetraciclina. Se ha observado ahora que la conversión es incompleta pero se ha encontrado en la mayoría de los casos que la conversión está comprendida entre 18 y 48%.

De un modo análogo, cuando se añade 7-bromo-5a(11a)-deshidrotetraciclina a un sistema de fermentación que emplea las cepas corrientes de S. aureofaciens, se convierte en bromotetraciclina.

Igualmente, la 5a(11a)-deshidrotetraciclina se convierte en tetraciclina en las mismas condiciones.

240761



Las condiciones de la fermentación son generalmente las mismas que para los métodos conocidos en la actualidad para producir clorotetraciclina y tetraciclina por fermentación, con la excepción, naturalmente, de que el nuevo antibiótico se añade preferiblemente al comienzo de la fermentación. El medio de fermentación contiene los nutrientes y sustancias minerales usuales. Entre las sustancias nutrientes adecuadas que pueden suministrar aquellas sustancias necesarias figuran: almidón, glucosa, dextrosa, sacarosa, azúcar de caña, melazas, harina de soja, harina de cacahete, levadura, extractos de carne, peptona, sulfato amónico, urea, líquido de maceración del maíz, productos solubles de destilería, harina de pescado y otras sustancias corrientes. Entre las sales inorgánicas figuran compuestos tales como carbonato cálcico, sulfato amónico, cloruro amónico, fosfato sódico dihidrógeno, y los diversos elementos traza tales como manganeso, cobalto, cinc, cobre, hierro y análogos.

Las restantes condiciones generales de la fermentación, tales como concentración de iones hidrógeno, temperatura, tiempo, velocidad de aireación, preparación del inóculo, esterilización, inoculación y análogas son corrientes y pueden ser semejantes a las que se utilizan para la producción de clorotetraciclina, según se explica en la patente norteamericana No. 2.482.055 de Duggar, y para la producción de tetraciclina, ilustrada en la patente norteamericana de Minieri, No. 2.734.018.

Análogamente, la recuperación de la clorotetraciclina y la tetraciclina a partir del líquido de fermentación es corriente y no necesita describirse, ya que se ha publicado numerosos métodos de recuperación de estos antibióticos a partir de los líquidos de fermentación. La bromotetraciclina puede recuperarse de una



OV. 1958

240761

manera análoga.

Se observará en los ejemplos que se describen más adelante que algunos de los ensayos de fermentación se han realizado en presencia de ciertos inhibidores de la cloración, por ejemplo, 2,5-dimercapto-1,3,4-tiadiazol y 2-(2-furil)-5-mercapto-1,3,4-oxadiazol. Estos inhibidores producen el efecto de alterar la relación de clorotetraciclina a tetraciclina en la fermentación normal de tetraciclina, de manera que se produce una proporción elevada de tetraciclina. De este modo, resulta posible observar con más facilidad la formación de clorotetraciclina que es debida a su conversión a partir de 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina, puesto que, en presencia de tales inhibidores, aumentos en clorotetraciclina debidos a la conversión de 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina pueden pasar inadvertidos.

La invención se describirá con mayor detalle en relación con lo siguientes ejemplos específicos.

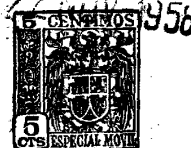
EJEMPLO I

Se prepara un medio de fermentación de la composición siguientes:

Almidón	55 gramos por litro
Líquido de maceración del maiz	25 " " "
CaCO ₃	9 " " "
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,6 " " "
MnSO ₄ (70 %)	80 miligramos por litro
CoCl ₂ ·6H ₂ O	5 miligramos por litro
NH ₄ Cl	1,7 gramos por litro
Aceite de manteca de cerdo	3,2 % en volumen.

Después de esterilización del medio, se inoculan 25 mililitros del mismo en un matraz Erlenmeyer de 250 mililitros con un

240761



inóculo vegetativo de S. aureofaciens (cepa S77). Se añaden 100 partes por millón de 2,5-dimercapto-1,3,4-tiadiazol y 500 gammas por mililitro de 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina, y se realiza la fermentación durante 120 horas a 25º C. sobre un sacudidor rotatorio. El mosto se ensaya fluorométricamente, determinando clorotetraciclina y se encuentra que el incremento en el ensayo fluorométrico debido a la adición de 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina alcanza 248 gammas por mililitro, lo que representa el 48% de la transformación teórica de 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina en clorotetraciclina.

EJEMPLO 2

Se sigue el procedimiento del ejemplo anterior con la única excepción de que se añaden al medio 10 partes por millón de 2-(2-furil)-5-mercapto-1,3,4-oxadiazol, como inhibidor de la cloración. El incremento en el ensayo fluorométrico para clorotetraciclina debido a la adición de la 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina alcanza a 170 gammas por mililitro, lo cual representa el 34% de la conversión teórica de la 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina añadida en clorotetraciclina.

EJEMPLO 3

Se sigue el procedimiento del ejemplo 1, a excepción de que se añade al sistema de fermentación 5a(11a)-deshidrotetraciclina y no se usa inhibidor. Después se inocula el medio con un inóculo vegetativo de S. aureofaciens (cepa S77). La conversión de la 5a(11a)-deshidrotetraciclina añadida en tetraciclina es completa aproximadamente en 35%.

EJEMPLO 4

Se sigue el procedimiento del ejemplo 1, a excepción de

240761



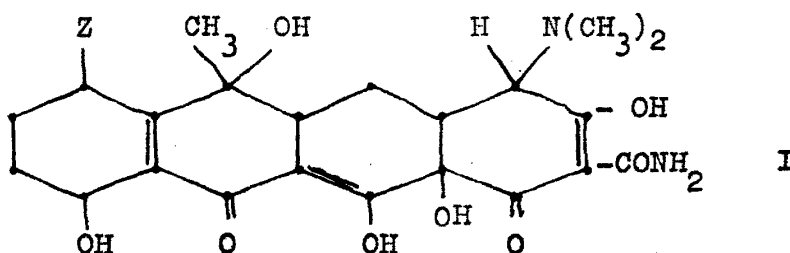
que se añade al sistema de fermentación 7-bromo-5a(11a)-deshidrotetraciclina. Se inocula el medio con un inóculo vegetativo de S. aureofaciens (cepa S 77). La conversión de la 7-bromo-5a(11a)-deshidrotetraciclina añadida en bromotetraciclina es completa en 30% aproximadamente.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América, el 5 de Abril de 1.957, bajo el Núm. 650.820, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

- N O T A -

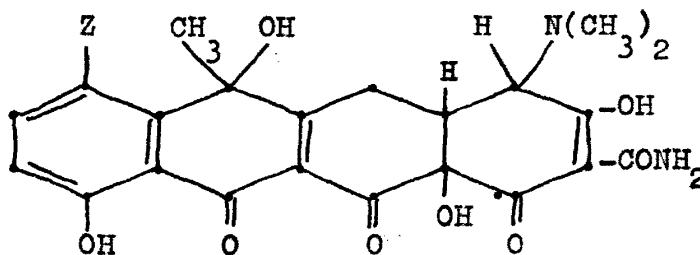
Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

1ª.- Un método para producir tetraciclinas que tienen la fórmula



donde Z es hidrógeno, cloro o bromo, caracterizado por fermentar aeróbicamente un medio nutriente acuoso con un microorganismo de la especie S. aureofaciens en presencia de una 5a(11a)-deshidrotetraciclina correspondiente que tiene la fórmula

240761



donde Z significa lo mismo que arriba.

2º.- Un método para reducir el doble enlace 5a(11a) de un antibiótico de la serie de la tetraciclina caracterizado por fermentar aeróbicamente un medio nutriente acuoso con un microorganismo de la especie S. aureofaciens en presencia de

5 de una 5a(11a)-deshidrotetraciclina correspondiente.

3º.- Un método de producir tetracilinas.

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

10 La presente Memoria consta de ocho hojas escritas a máquina ppr una sola cara.

Madrid,

22 NOV. 1956

Ministerio de Educación
y Ciencia

MCR/.