

AÑO 1958

Expediente núm. \_\_\_\_\_

240767

R



# REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

240767

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:

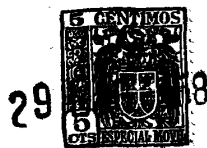
UN METODO PARA PREPARAR COMPUESTOS DE LA SERIE DE LA  
"TETRACICLINA".

Nº 6612

Agente Sr. ELZABURU

29 MAR 1958

P.- 16.791.-  
A. 31.117 Case 16312.



240767

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

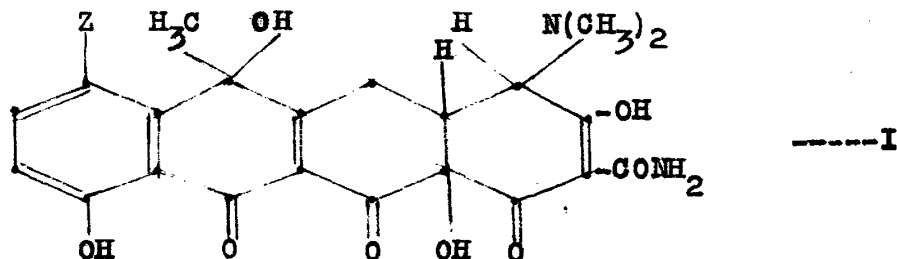
a nombre de AMERICAN CYANAMID COMPANY, entidad norteamericana, establecida en 30 Rockefeller Plaza, Nueva York, N.Y., Estados Unidos de América, por:

"UN METODO PARA PREPARAR COMPUESTOS DE LA SERIE DE LA TETRACICLI-  
NA".

Esta invención se refiere a la preparación de nuevos com-  
puestos de la serie tetraciclina.

Estos nuevos compuestos comprenden 5a (11a)-deshidrotetra-  
ciclinas que tienen la fórmula

5



donde Z es hidrógeno, bromo o cloro.

10

Un nombre químico apropiado para el nuevo clorotetracikli-

240767



na análogo de esta invención (por ejemplo, cuando Z es cloro en la fórmula I) de acuerdo con la nomenclatura de Chemical Abstracts, es 7-cloro-4-dimetilamino-1,4,4a,5,6,11,12,12a-octahidro-3,6,10,12a-tetrahidroxi-6-metil-1,11,12-trioxo-2-naftaceno-  
5 carboxamida. Un nombre común apropiado para el análogo cloro-tetraciclina sería 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina. Del mismo modo, el análogo tetraciclina (en el que Z es hidrógeno en la fórmula I) se llama 5a(11a)-deshidrotetraciclina y el análogo bromo tetraciclina (en el que Z es bromo en la fórmula  
10 I) se llama 7-bromo-5a(11a)-deshidrotetraciclina.

Los nuevos compuestos de la serie tetraciclina de la presente invención se producen por ciertas cepas mutantes de S. aureofaciens. Las nuevas cepas mutantes son especies de S. aureofaciens puesto que todas son descendientes directos de la especie productora de clorotetraciclina de S. aureofaciens designada con A377 y descrita en la patente americana Número 2.482.055, de Duggar, y depositada en el Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, y clasificada allí en el índice con la denominación NRRL 2209. La derivación de las nuevas cepas  
15 de S. aureofaciens a partir de la A 377 original aislada del suelo implica el tratamiento de A377 con agentes mutagénicos incluyendo irradiación ultravioleta y tratamiento con nicotina y "mostaza nitrogenada". La mutación espontánea de cepas productoras de clorotetraciclina de S. aureofaciens da como resultado cepas  
20 que producirán también los nuevos antibióticos de esta invención.

El método de acuerdo con la invención para producir 5a(11a)-deshidrotetraciclina que tienen la fórmula I comprende fermentar aeróbicamente un medio nutriente acuoso corriente que contiene iones cloruro, con una cepa de S. aureofaciens adaptada para  
30 producir el compuesto I en el cual Z es cloro, o un medio tal de-

240767



ficiente en iones cloruro con el cual se produzca el compuesto I en el que Z es hidrógeno, o un medio tal que contenga cantidades sustanciales de iones bromuro por el cual se produzca el compuesto I en el que Z es bromo.

5           La cepa original de S. aureofaciens, que hemos designado como S1308, que produce los nuevos antibióticos de esta invención, es bastante inestable. Cuando se somete a subcultivo, degenera rápidamente pasando a un cultivo mixto del cual puede aislarse un cierto número de variantes más estables de aspecto diferente. En general, todas estas cepas son características de 10 la especie S. aureofaciens pero difieren bastante entre sí y de las cepas anteriormente descritas de S. aureofaciens, principalmente en la pigmentación. Prácticamente, todas las cepas presentan una fluorescencia ultravioleta característica a 3600 Å 15 cuando crecen sobre medios de agar y líquido de maceración de maiz.

Mientras que la manera principal en que las nuevas cepas de S. aureofaciens y sus variantes difieren de las cepas anteriormente descritas de S. aureofaciens reside en la naturaleza 20 de los antibióticos producidos, las cepas estudiadas hasta ahora difieren bastante en la pigmentación sobre medios de cultivo diversos como se indica más adelante.

240767



Comparación de pigmentos fluorescentes difusibles en medio de agar

Cepa	Agar Q4	Agar AP4
A 377	Ninguno	Ninguno
5 S 1308	Amarillo verdoso brillante	Amarillo verdoso brillante

Formulación de Agar Q4

	Sacarosa	10 gramos
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,25 gramos
10	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 gramos
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 gramos
	Líquido de maceración del maiz	7,5 mililitros
	Agar bruto	30 gramos
15	H <sub>2</sub> O c.s.	10000 mililitros
	pH ajustado a 6,5	

Formulación de Agar AP4

	Sacarosa	10 gramos
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,25 gramos
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 gramos
20	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 gramos
	líquido de maceración del maiz	4 gramos
	Agar bacto (refinado)	20 gramos
	H <sub>2</sub> O c.s.	10000 mililitros

25 Formulación de Agar AP6

Lo mismo que el agar AP4, excepto que la concentración de líquido de maceración del maiz es 6 gramos por litro.

La cepa S 1308 se desarrolla vigorosamente sobre agar Q4, produciendo abundantes esporas gris oscuro. Sobre agar AP4 y 30 AP6, la colonia típica está fuertemente pigmentada de amarillo-pardo intenso que pasa a pardo-pardo rojizo por la luz incandescente, entera pero con un margen difuso, convexo y liso, que se convierte en papilada en el centro con la edad.

35 El desarrollo y el cultivo de la S 1308 original aislada ha conducido a la observación y aislamiento de un cierto número



1958

de tipos defectuosos de diferente aspecto, con color comprendido desde blanco a amarillo pálido, naranja intenso, pardo claro, y el típico pardo-amarillento y pardo-rojizo. Todos presentan la fluorescencia ultravioleta característica a 3600 Å con excepción de los tipos defectuosos blancos.

Para ilustrar las variaciones de color en las nuevas cepas de S. aureofaciens que producen el nuevo antibiótico aquí, se cultivaron sobre agar de líquido de maceración de maíz 6 cepas seleccionadas, y se hicieron las siguientes observaciones:

Observaciones del color (1): S. aureofaciens

Agar de líquido de maceración de maíz AP4

Incubación de 6 días a 26,5° C.

Cepa	Colonias simples	Desarrollo de masa
S 1308	Pardo cobre	Pardo oscuro
S 1308-V146	Cedro	Pino gigante oscuro
S 1308-V237	Canela oscuro	Ambar
S 1308-29	Moho naranja	Moho naranja

(1) La denominación de los colores corresponde a la del Color Harmony Manual, tercera edición, Container Corporation of America.

Observaciones del color (1): S. aureofaciens

Agar de líquido de maceración de maíz AP6

Incubación de 6 días a 26,5° C.

Cepa	Colonias simples	Desarrollo de masa
S1308	Alheña a pardo oscuro	Pardo oscuro
S1308-V146	Madera de sándalo	Pardo castaño
S1308-V237	Canela oscuro	Canela oscuro
S 1308-29	Pardo roble	Pardo roble

(1) La denominación de los colores corresponde a la del Color Harmony Manual, tercera edición, Container Corporation of America.

Las cepas mutantes que producen los nuevos antibióticos de la presente invención poseen las mismas características generales

# 240767



que las cepas que producen las tetraciclinas y difieren entre sí del mismo modo general que difieren entre ellas las cepas productoras de tetraciclina y las productoras de clorotetraciclina, como se ha descrito en varios artículos científicos publicados.

5 Los datos que se dan a continuación servirán para ilustrar la variación de las nuevas cepas con respecto a la cepa A 377 original, disponible como NRRL 2209.

10 Streptomyces aureofaciens cepa S 1308 se diferenci<sup>ó</sup> de Streptomyces aureofaciens cepa A 377 (NRRL 2209) por observación de las características de desarrollo sobre varios medios incubados a 26,5° C.

1. Agar de extracto de buey asparraguina glicerol

	Glicerol	1,0	por	ciento
	L-asparraguina	0,05	"	"
15	Extracto de buey	0,2	"	"
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,05	"	"
	Agar Bacto	1,5	"	"
	Agua destilada c.s.	100,0	"	"
	pH de ajuste del pH con KOH al 50%	7,0	"	"
20	pH de Post esterilización.	7,20	"	"

Streptomyces aureofaciens

Cepa S 1308

Cepa A 377

	Cepa S 1308	Cepa A 377
25	Desarrollo Bueno, camello (1)	Bueno
	Hifas aéreas Ligero a blanco moderado a gris	Ligero a rubio, blanco a gris claro
	Esporulación Rubio en focos grises	Gris claro
	Pigmento difusible Amarillo verdoso claro	Amarillo claro
30	Reverso Camello a pardo claro	Amarillo a naranja-amarillento claro.

(1) La denominación de los colores corresponde a la del Color Harmony Manual, tercera edición, Container Corporation of America.

# 240767



## 2. Agar dextrina Czapek-Dox

	Dextrina	1,0	por ciento
	NaNO <sub>3</sub>	0,2	" "
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1	" "
5	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05	" "
	KCl	0,05	" "
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,001	" "
	Agar Bacto	1,5	" "
	Agua destilada, c.s.	100,0	" "
10	pH de post esterilización	7,2	" "

## Streptomyces aureofaciens

	Cepa S 1308	Cepa A 377	
15	Desarrollo Hifas aéreas	Pobre, hialino Ninguna	Bueno Abundantes, gris ra- tón (1) a gris plomo (1), glóbulos de su- perficie clara como el agua
20	Esporulación Pigmento difusible	Ninguna Ninguno	Profusa Traza: amarillo páli- do.
	Reverso	Indicios de pig- to rojo anaran- jado.	Apigmentada, traza ro- sa.

25 (1) La denominación de los colores corresponde a la del Color Harmony Manual, tercera edición, Container Corporation of America.

## 3. Agar líquido de maceración del maíz AP 4.

	Líquido de maceración del maíz	0,4	por ciento
	Sacarosa	1,0	" "
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,025	" "
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2	" "
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2	" "
35	Agar Bacto	2,0	" "
	Agua de la cañería, c.s.	100,0	" "
	pH de post esterilización	6,5	" "

# 240767



## Streptomyces aureofaciens

	Cepa S 1308	Cepa A377	
5	<b>Desarrollo</b> <b>Hifas aéreas</b> <b>Esporulación</b> <b>Pigmento soluble</b>	<b>Bueno</b> Moderada a ciervo. abundante (1) Abundante, uniforme Pardo anaranjado intenso con sombra amarillo verdosa	<b>Excelente</b> Abundante, ciervo (1) Profusa, uniforme Amarillo claro a ambar
10	<b>Reverso</b>	Pardo chocolate (1) Canela claro (1)	

(1) La denominación de los colores corresponde a la del Color Harmony Manual, tercera edición. Container Corporation of America.

### 4. Otros medios de agar

	<u>Streptomyces aureofaciens</u>		
Medio	Cepa S 1308	Cepa A 377	
20	<b>Agar nutriente</b>	<b>Desarrollo favorable:</b> masilla (1) a pardo mostaza (1). Hifas aéreas. Reverso: ma- silla (1) que pasa a pardo mostaza (1). No hay pigmento soluble	<b>Buen desarrollo. No hay</b> <b>Hifas aéreas. Reverso:</b> <b>amarillo pálido. Pig-</b> <b>mento soluble amarillo</b> <b>pálido</b>
25	<b>Extracto de carne</b> <b>asparragui-</b> <b>na glucosa</b>	<b>Desarrollo abundante:</b> Canela (1) a canela cuero oscuro (1). Hi- fas aéreas abundantes: blanco a ciervo. Espo- rulación: abundante:	<b>Buen desarrollo. Hifas</b> <b>aéreas blancas que se</b> <b>hacen cada vez más gri-</b> <b>ses con incremento de</b> <b>formación de esporas.</b> <b>Reverso: amarillo claro</b> <b>a rosa-naranja. Indicios:</b> <b>pigmento soluble amari-</b> <b>llo-naranja.</b>
30	<b>reverso: canela cuero</b> <b>oscuro. Pigmento so-</b> <b>luble pardo-naranja</b>		
35	<b>Agar de líquido</b> <b>de maceración</b> <b>de maíz AP4</b>	<b>Buen desarrollo: ca-</b> <b>mello (1) a pardo ro-</b> <b>ble (1). Hifas aéreas</b> <b>bueno a abundante:</b> <b>ciervo (1). Esporula-</b> <b>ción: buena a abundan-</b> <b>te. Reverso: pardo</b> <b>chocolate (1). Pig-</b> <b>mento soluble pardo-</b> <b>naranja intenso con</b> <b>sombra amarillo ver-</b> <b>dosa.</b>	<b>Desarrollo excelente.</b> <b>Micelio aéreo profuso.</b> <b>Esporulación profusa:</b> <b>ciervo (1). Reverso:</b> <b>canela claro (1). Pig-</b> <b>mento soluble amarillo</b> <b>claro a ambar.</b>
40			

240767



4. Otros medios de agar.

Streptomyces aureofaciens

Medio	Cepa S 1308	Cepa A 377	
5 10	Agar de líquido de maceración de maíz AP6	Desarrollo abundante: rojo ladrillo (1) a pardo cobre (1). Hifas aéreas abundante a profuso: beige (1). Esporulación abundante. Reverso: pardo chocolate (1) pigmento soluble rojo-pardo intenso con sombra amarillo-verdosa.	Desarrollo excelente. Micelio aéreo profuso. Esporulación profusa: ciervo (1). Reverso: canela (1). Pigmento soluble ambar claro.
15 20 25	Agar Q4	Desarrollo excelente: pardo-cobre (1) a pardo-chocolate (1). Micelio aéreo profuso: beige (1). Esporulación profusa. Reverso: pardo chocolate (1). Pigmento soluble rojo-pardo muy intenso, con sombra amarillo-verdosa	Desarrollo excelente: amarillo pálido. Micelio aéreo profuso: pardo oscuro (1). Esporulación profusa. Reverso amarillo a amarillo-naranja. Pigmento soluble naranja-pardo.
30	Cultivo inclinado en patata.	Desarrollo Profuso, húmedo, liso, nodulado: moho naranja (1) a pardo intenso (1) a pardo claro (1). No hay pigmento soluble	Desarrollo Profuso, húmedo, liso, nodulado: pardo amarillento claro (1) a beige (1) a cedro (1). No hay pigmento soluble.
35 40	Leche púrpura	Collar de desarrollo amarillo chartreuse brite ligero pero definido. Peptonización parcial aparente pero cambio de pH poco significativo	Collar de desarrollo ligeramente blanco a amarillo pálido. Cambio de pH poco significativo y sin peptonización aparente en 14 días.

(1) Color Harmony Manual, tercera edición, Container Corporation of America.

240767

5. Observaciones microscópicasStreptomyces aureofaciens

Cepa S 1308

Cepa A 377

	Medio	Micelio	Esporas	Micelio	Esporas
5	Glicerol Aspara- guina Ex- tracto de carne	Flexuoso, continuo, ramificado, diam. 1,2 $\mu$ a 2,0 $\mu$	Esféricas a ovoidales Diam. 1,2 - 1,5 $\mu$	Flexuoso, continuo, ramificado Diam. 1,0 $\mu$ a 1,2 $\mu$	Esféricas a ovoidales. Diam. 1,2 a 1,5 $\mu$
10	Agar				
15	Agar lí- quido de macera- ción de maíz AP4	Flexuoso, continuo, ramificado Dímetro 0,8 $\mu$ a 1,0 $\mu$ .	Esféricas a ovoidales diámetro 1,2 a 1,5 $\mu$ .	Flexuoso, continuo ramificado Dímetro 0,8 $\mu$ a 1,0 $\mu$ .	Esféricas a ovoidales. Dímetro 1,2 a 1,5 $\mu$ .

20 La morfología micelial y de esporas para la cepa S 1308 es aparentemente análoga a la observada para la cepa A 377. Ambas cepas presentan micelio continuo, flexuoso, ramificado con tendencia ocasional de las hifas aéreas hacia la forma espiral. Las esporas características son de forma ovoidal a esférica.

25 Se han depositado cultivos viables de S. aureofaciens cepa S 1308 y algunos de sus variantes que producen los nuevos anti-  
bióticos de esta invención en la American Type Culture Collec-  
tion, en Washington D.C. habiéndoles asignado los números de ac-  
ceso ATCC Número 12748 a la cepa S 1308, ATCC Número 12749 a la  
cepa S 1308-29, ATCC Número 12750 a la cepa S 1308-V146 y ATCC  
Número 12751 a la cepa S 1308-V237.

30 El espectro antibacterial de la 7-cloro-5a(11a)-deshidro  
tetraciclina es estrechamente paralelo al de la tetraciclina y  
al de la clorotetraciclina, excepto que el nivel de actividad del  
nuevo antibiótico contra varios patógenos tales como estafilococ-  
cos y estreptococos, por ejemplo, es mucho menor. El uso princi-  
pal de la 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina es que puede con-

240767

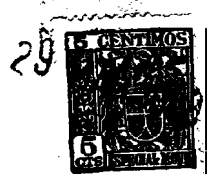


vertirse por un proceso de descloración reductiva en el antibiótico de amplio espectro bien conocido tetraciclina. Un procedimiento adecuado para la descloración reductiva catalítica para lograr esta transformación, se describe de modo más detallado y se reivindica en la solicitud Número 240.760, presentada al mismo tiempo que ésta.

También es posible efectuar una conversión biológica de 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina pasando al antibiótico de espectro ancho clorotetraciclina. Esta conversión puede realizarse añadiendo cristales del nuevo antibiótico de una fermentación que utiliza cepas corrientes sintetizadoras de clorotetraciclina de S. aureofaciens. Un procedimiento biológico adecuado para lograr esta conversión constituye la materia objeto de la solicitud Número 240.761, presentada también al mismo tiempo que ésta.

Las condiciones de la fermentación con las nuevas cepas mutantes de S. aureofaciens de esta invención para producir 7-cloro-5a-(11a)-deshidrotetraciclina son generalmente las mismas que para los métodos actualmente conocidos de producción de clorotetraciclina por fermentación. Es decir, el medio de fermentación contiene los nutrientes usuales y las sustancias minerales. Entre las sustancias nutrientes adecuadas que pueden proporcionar aquellas sustancias necesarias figuran almidón, glucosa, azúcar de caña, dextrosa, melazas, harina de soja, harina de cacahuete, levadura, extractos de carne, peptona, sulfato amónico, urea, líquido de maceración del maíz, productos solubles de destilería, harina de pescado y otras sustancias corrientes. Las sales inorgánicas incluyen productos tales como carbonato cálcico, sulfato amónico, cloruro amónico y los diversos elementos traza, tales como manganeso, cobalto, cinc, cobre, hierro y aná-

240767



logos.

Las otras condiciones generales de la fermentación, tales como concentración de ion hidrógeno, temperatura, velocidad de aireación, preparación del inóculo, esterilización, inoculación y análogas son convencionales y pueden ser análogas a las utilizadas para la producción de cloro-tetraciclina según se explica en la patente americana Número 2.482.055 de Duggar.

Sin embargo, hay una diferencia de las condiciones de fermentación de la clorotetraciclina que es de considerable importancia. Las nuevas cepas mutantes de S. aureofaciens parecen ser organismos deficientes en riboflavina y, por lo tanto, los rendimientos de los nuevos antibióticos son bajos cuando las fermentaciones se realizan con medios pobres en riboflavina o carentes de la misma. Por ejemplo, la fermentación con un medio de maceración de maíz corriente pero sin riboflavina añadida, producirá de 2500 a 4000 gammas por mililitro de los nuevos antibióticos. La adición de cantidades traza de riboflavina a este medio dará como resultado un incremento de la potencia. Por lo tanto, preferimos emplear un medio de maceración de maíz con mucha riboflavina y en este aspecto, hemos encontrado, que cuando el medio contiene de aproximadamente 0,1 a 2,0 partes por millón de riboflavina añadida, la potencia del mosto acusa en los ensayos valores tan elevados como 8000 a 10.000 gammas por mililitro, de donde resulta evidente que los nuevos mutantes son cepas productoras de antibiótico de gran rendimiento.

Durante la fermentación, se producen también pequeñas cantidades de clorotetraciclina y tetraciclina. Usualmente, las cantidades no son suficientemente grandes para interferir con el producto principal de la fermentación ni para justificar tampoco cualquier recuperación separada, puesto que generalmente se

240767

29 MAR



encuentran presentes en la fermentación solo en las proporciones de aproximadamente 200 a 400 gammas por mililitro, aunque la proporción relativa de estos tres antibióticos puede variar considerablemente según sea la cepa mutante de cada caso particular, el medio y las condiciones de fermentación empleadas.

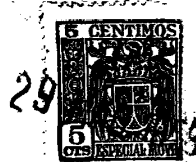
Se ha observado también que, si el medio de fermentación es pobre en ión cloruro disponible (ver Minieri, patente americana Número 2.734.018) se produce por las nuevas cepas mutantes de S. aureofaciens, el análogo de tetraciclina sin clorar 5a (11a)-deshidrotetraciclina: resulta claro que es idéntico al antibiótico clorado, cuya fórmula de estructura se ha señalado anteriormente, a excepción de que le falta un átomo de cloro en la posición 7 del anillo naftaceno. El análogo sin clorar puede reducirse catalíticamente a tetraciclina tal como se ha descrito antes al tratar del compuesto clorado. De un modo semejante, el análogo no clorado puede convertirse biológicamente en tetraciclina por procedimientos de fermentación adecuados.

Para producir este nuevo antibiótico no clorado, es necesario solamente modificar el medio de fermentación que contiene riboflavina de la manera que se especifica en la patente antes mencionada de Minieri y colaboradores, de forma que el medio resultante sea pobre en cloruro disponible, es decir, que contenga menos de aproximadamente 50 partes por millón de ion cloruro. Realizando la fermentación en este medio con cloruro restringido, con las nuevas cepas mutantes, pueden producirse cantidades satisfactorias de 5a(11a)-deshidrotetraciclina.

Se ha observado también que si el medio de fermentación contiene cantidades sustanciales de iones bromuro, se produce por las nuevas cepas mutantes de S. aureofaciens, el análogo de bromotetraciclina 7-bromo-5a(11a)-deshidrotetraciclina; resulta

- 3 -

240767



claro que es idéntico al antibiótico clorado cuya fórmula estructural se ha indicado arriba, con la excepción de que tiene un átomo de bromo en la posición 7 del anillo naftaceno, en lugar de un átomo de cloro. Este nuevo antibiótico puede también reducirse catalíticamente a tetraciclina lo mismo que se ha descrito arriba en relación con los compuestos clorados y no clorados. Análogamente, puede convertirse por procedimientos biológicos en bromotetraciclina, mediante procedimientos de fermentación adecuados.

10           Para producir este nuevo análogo, es necesario solamente modificar el medio de fermentación de manera que el medio resultante contenga por lo menos 50 partes por millón y preferiblemente 100-1500 partes por millón de iones bromuro y no más de 50 partes por millón de iones cloruro. Realizando la fermentación en este medio que contiene ion bromuro con las nuevas cepas mutantes de S. aureofaciens de esta invención, pueden producirse cantidades satisfactorias de 7-bromo-5a(11a)-deshidrotetraciclina.

15           Las deshidrotetraciclinas de esta invención pueden aislarse a partir del mosto de fermentación por cualquier medio conveniente. Un procedimiento preferido abarca una separación cromatográfica en la cual el mosto de fermentación se acidifica ajustando el pH a 1-2, con un ácido adecuado tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, etc. Después se filtra el mosto y el filtrado acuoso acidificado que contiene la actividad se pone en contacto con un alcohol, tal como butanol normal, por ejemplo, para formar un extracto alcohólico de la sustancia activa. El extracto se concentra y luego se cromatografía sobre una columna de tierra de diatomáceas de la manera usual y la columna se desarrolla con una mezcla de 80% de butanol normal y 20% de clo-

240767

29 M



roformo. Las fracciones eluidas se concentran y se secan por congelación. El material bruto secado por congelación se disuelve en metanol y entonces tiene lugar rápidamente la cristalización del antibiótico neutro. Los cristales se filtran, se lavan y se secan en vacío de la manera usual. Cualquier clorotetraciclina y tetraciclina residual que pueda haber presente, puede eliminarse por un procedimiento de recristalización que consiste en disolver el antibiótico en metanol acidificado, filtrar, neutralizar con álcali diluido y cristalizar por ejemplo, el producto 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina purificado.

Los nuevos antibióticos de esta invención tienen una forma epimérica en el átomo de carbono en posición 4, lo mismo que se ha descrito en relación con otros compuestos de tetraciclina. Este nuevo isómero puede formarse ajustando simplemente la concentración de ion hidrógeno de una solución concentrada del antibiótico entre los límites de pH 3,0 a 5,0 y dejando estar la solución hasta que la isomerización ha llegado a un equilibrio.

La manera más conveniente de realizar la isomerización es a la temperatura ambiente, aunque a temperaturas más elevadas tiene lugar una velocidad de conversión mayor. El pH tiene que estar comprendido entre los límites de 3,0 y 5,0, aproximadamente; preferiblemente, entre 3,5 y 4,5. Se producirá alguna epimerización a concentraciones de ion hidrógeno fuera de estos límites e incluso en agua destilada; pero la velocidad es muy pequeña. La concentración del antibiótico en la solución acuosa debe ser lo más elevada posible con el fin de obtener las velocidades de epimerización más rápidas. El equilibrio completo puede exigir un periodo de tiempo de unas 24 horas a 25° C. pero el equilibrio satisfactorio puede requerir un tiempo considerablemente más breve bajo condiciones específicas. Sin embargo, ordinariamente,

-15-

240767

29 MAR



los resultados mejores se obtienen dejando en reposo las soluciones durante periodos de una semana o más. En la mayoría de los casos, parece que se alcanza un equilibrio a 50% aproximadamente; es decir, aproximadamente la mitad del antibiótico está convertido en el epímero en el equilibrio.

Como la concentración es un factor importante para obtener rendimientos elevados en periodos de tiempo breves, hay que escoger un sistema disolvente que dé la máxima concentración del antibiótico. Estos sistemas disolventes tienen que estar tamponados para obtener un pH dentro de los límites preferidos. Entre los diversos disolventes figuran: metanol, etanol, butanol, acetona, 2-etoxietanol, 2-metoxipropanol, tetrahidrofurano, dimetilformamida y mezclas de estos disolventes. Pueden usarse también otros disolventes. Un agente de tamponado preferido es el fosfato sódico dihidrógeno, aun cuando pueden emplearse otros tampones y pares de tampones que mantendrán la concentración de ion hidrógeno dentro de los límites deseados.

Los nuevos antibióticos de esta invención forman sales del mismo tipo y del mismo modo general que las tetraciclinas conocidas, es decir, las sales de ácidos minerales, las sales de metales alcalinos y las sales de metales alcalinotérreos de las nuevas tetraciclinas pueden prepararse fácilmente. Así, por ejemplo, pueden prepararse las sales de ácido mineral por tratamiento con ácidos tales como ácido clorhídrico a un pH de menos de 4, aproximadamente. Puede obtenerse la base libre a un pH dentro de los límites de 4 a 7, aproximadamente. Las sales de metal alcalino y metal alcalinotérreo pueden formarse sencillamente tratando el compuesto anfótero con un equivalente aproximadamente de la base elegida, es decir, hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido cálcico, etc., a un pH de aproximadamente 7



240767

o mayor. Análogamente, pueden prepararse sales del compuesto epimérico.

La invención se describirá con mayor detalle en relación con los siguientes ejemplos específicos en los que los rendimientos se expresan en gammas por mililitro ( $\gamma$ /ml.).

#### Ejemplo 1

Esporas de una cepa de S. aureofaciens capaces de producir 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina, tal como la cepa S1308, se lavan de un cultivo de tubo inclinado de agar con agua destilada estéril para formar una suspensión que contiene aproximadamente 60-80 millones de esporas por mililitro. Se utiliza una porción de 0,33 mililitros de la suspensión para inocular un tubo Brewer que contiene 8 ml. de un medio preparado de acuerdo con la siguiente formulación:

15	sacarosa	30 gramos
	sulfato amónico	2 gramos
	Carbonato cálcico	7 gramos
	líquido de maceración del maíz	16,5 mililitros
20	Agua de la cañería c.s.	1000 mililitros

Antes de la inoculación, el medio se esteriliza durante 20 minutos a 1,05 Kgs/cm<sup>2</sup> de presión, durante cuyo tiempo el pH cambia de 6,3 a 6,9. El tubo de sacudir inoculado se incuba después durante 24 horas a 28° C., en un sacudidor de vaivén.

#### 25 Ejemplo 2

Se prepara una medio de la composición siguiente:

	<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidades</u>
	Sulfato amónico	5 gramos
	Cloruro amónico	1,5 "
30	Cloruro magnésico	2,0 "
	Almidón	55 "
	Cloruro potásico	1,28 "
	Acido fosfórico	0,4 "
	Carbonato cálcico	9,0 "
35	Solución de elementos traza	10 mililitros
	Aceite de manteca de cerdo	20 mililitros
	Agua c.s.	1000 mililitros

- 17 -

240767



Después de esterilización del medio nutriente, se inoculan 25 mililitros del medio en un matraz Erlenmeyer de 250 mililitros, con 1 mililitro de inóculo preparado como en el Ejemplo 1. La fermentación se realiza luego durante 120 horas a 25° C. sobre un sacudidor rotatorio que trabaja a 180 rpm. El mosto se ensaya fluorométricamente y espectrofotométricamente encontrándose que contiene 6  $\gamma$ /ml. de clorotetraciclina y 100  $\gamma$ /ml. de 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina.

EJEMPLO 3

Se repite el Ejemplo 2 usando el mismo medio que contiene 0.32  $\gamma$ /ml. de riboflavina. Se encuentra que el mosto resultante contiene 71  $\gamma$ /ml. de clorotetraciclina y 1450  $\gamma$ /ml. de 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina.

EJEMPLO 4

Se prepara un medio con la siguiente fórmula:

	<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidades</u>
	Sulfato amónico	5 gramos
	Carbonato cálcico	9 "
	Cloruro amónico	1,5 "
20	Cloruro magnésico.6H <sub>2</sub> O	2 "
	Sulfato ferroso.7H <sub>2</sub> O <sup>2</sup>	0,04 "
	Sulfato de manganeso.4H <sub>2</sub> O	0,05 "
	Cloruro de cobalto.6H <sub>2</sub> O	0,001 "
	Sulfato de cinc.7H <sub>2</sub> O	0,1 "
25	Líquido de maceración del maiz	25-30 "
	Almidón	55 "
	Aceite de manteca de cerdo	2 mililitros
	Agua c.s.	1000 "

Después de esterilización del medio en un autoclave, se inoculan 25 mililitros en un matraz Erlenmeyer de 250 mililitros, con 1 mililitro de inóculo preparado como en el Ejemplo 1. La fermentación se realiza durante 120 horas a 25° C. en un sacudidor rotatorio que trabaja a 180 r.p.m. El mosto resultante se ensaya fluorométricamente y espectrofotométricamente, encontrándose que contiene 84  $\gamma$ /ml. de clorotetraciclina y 2830  $\gamma$ /ml. de 7-

240767 29 M



cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina.

EJEMPLO 5

Se repite el Ejemplo 4, usando el mismo medio que contiene 2  $\gamma$ /ml. de riboflavina. Se encuentra que el mosto contiene  
5 760  $\gamma$ /ml. de clorotetraciclina y 9200  $\gamma$ /ml. de 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina.

EJEMPLO 6

Una porción de 200 ml. de mosto S 1308 que da en el ensayo 3940 gammas de 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina por milílitro, preparada como en el ejemplo 4, se ajusta a pH 1,5 con  
10 ácido clorhídrico concentrado y se filtra. La torta de filtración se vuelve a transformar en una papilla con 200 mililitros de agua a 40°C., se ajusta a pH 1,5 y se filtra. A los filtrados reunidos, se añade 54 gramos de cloruro sódico, y la solución  
15 resultante se extrae con tres porciones de 60 mililitros de butanol normal. Los extractos butanólicos reunidos se concentran hasta unos 17 mililitros, se saturan con agua, y se filtran. Este filtrado se pone en una columna de Celite de 5,08 cm. x 30,48  
20 cm. que contiene 1/2 mililitro de agua a pH 2 (HCl) por gramo de Celite. La columna se desarrolla luego con una mezcla de 80% de butanol normal-20% de cloroformo saturada con HCl 0,01N. Se recoge un total de 34 fracciones de 10 mililitros. Tomando como base los ensayos espectrofotométricos, se reúnen las fracciones  
25 ricas en antibióticos, 12-23, se concentran en presencia de agua para dar una solución acuosa y se secan por congelación. El producto bruto obtenido así se cristaliza de 1 mililitro de metanol. Los cristales se filtran, se lavan con metanol-éter 50-50 y luego con eter sólo. El producto se seca en vacío a 40° C. dando 128 mg. de 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina que da en  
30 el ensayo 927 gammas por miligramo, lo que representa un rendi-

240767

24



miento de 16 % en peso a partir del mosto.

El análisis elemental corresponde con mucha aproximación a una fórmula empírica de  $C_{22}H_{21-23}N_2ClO_8$  para 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina neutra. El PKa determinado resulta ser 5 6,05 en dimetilformamida. El equivalente de neutralización es 475,5. La rotación específica  $[\alpha]_D^{25}$ , determinada en una solución al 0,502 % en HCl 0,1 N, es -55,8°.

El espectro de absorción ultravioleta se determina a partir de una muestra del compuesto neutro en hidróxido sódico 0,1 N 10 a una concentración de 33,00 gammas por mililitro (peso/volumen). El espectro de absorción infrarrojo del producto neutro se obtiene de la manera corriente con el antibiótico en fase sólida comprimido en un disco con KBr.

#### EJEMPLO 7

15 Se forma una papilla con 1 gramo de la base libre obtenida en el Ejemplo 6, en 3 mililitros de metanol, y se añade ácido clorhídrico concentrado para efectuar la solución. Después de filtrar, se ajusta el pH de la solución a 4,0 con carbonato sódico saturado; se forman rápidamente cristales. Se filtran 20 los cristales de clorhidrato, se lavan con una mezcla de éter-metanol y finalmente con éter sólo. El producto secado en vacío pesa 500 mg..

#### EJEMPLO 8

Se recristaliza por el procedimiento indicado anteriormente 25 te, una mezcla preparada que contiene 75 por ciento de 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina y 25 % de clorotetraciclina, para dar un producto que contiene menos de 2 % de clorotetraciclina, según se determina por análisis fluorométrico.

#### EJEMPLO 9

30 Se disuelve una porción de 102 miligramos de la base neu-

240767

29

MA



tra en 0,17 mililitros de dimetilformamida y se añaden 0,34 mililitros de agua. Los cristales que se forman rápidamente se filtran, se lavan dos veces con agua, y se secan en vacío a 40°C. para dar un rendimiento de 78 miligramos de 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina neutra.

EJEMPLO 10

Se disuelve 1 gramo de la base neutra en una cantidad suficientemente pequeña de butano normal para formar una solución casi saturada. Se filtra luego la solución, se ajusta a pH 1,5 con ácido clorhídrico concentrado, y se añade eter hasta que se forma una turbidez ligera permanente. La mezcla se siembra, luego se envejece durante 24 horas a la temperatura ambiente, después de lo cual se filtra el producto cristalino, se lava con butanol normal, luego con éter, y se seca en vacío. Se obtiene un rendimiento de 0,78 gramos de clorhidrato de 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina. El producto es soluble en agua y da un precipitado de cloruro de plata al tratar con nitrato de plata.

EJEMPLO 11

Se sigue el procedimiento del ejemplo 4, excepto que el medio empleado tiene menos de 50 partes, aproximadamente, por millón de ion cloruro, Se produce 5a(11a)-deshidrotetraciclina.

EJEMPLO 12

A 5 miligramos de 7-cloro-5a(11a)-deshidrotetraciclina, se añade 1 mililitro de ácido acético glacial. La mezcla se sacude y se deja que se equilibre a la temperatura ambiente durante 18 horas y luego se filtra. La cromatografía en tiras de papel del filtrado indica la presencia de 7-cloro-5a(11a)-deshidro-4-epi-tetraciclina.

240767

29



EJEMPLO 13

Se sigue el procedimiento del ejemplo 4, excepto que se modifica el medio de manera que tenga más de 50 partes por millón de iones bromuro y menos de 50 partes por millón de iones cloruro. Se produce 7-bromo-5a(11a)-deshidrotetraciclina.

EJEMPLO 14

Se repite el procedimiento del ejemplo 12, excepto que se usa 5a(11a)-deshidrotetraciclina. La cromatografía del filtrado en tiras de papel indica la presencia de 5a(11a)-deshidro-4-epi-tetraciclina.

EJEMPLO 15

Se repite el procedimiento del Ejemplo 12, excepto que se usa 7-bromo-5a(11a)-deshidrotetraciclina. La cromatografía del filtrado en tiras de papel indica la presencia de 7-bromo-5a(11a)-deshidro-4-epi-tetraciclina.

Esta solicitud, que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, el 5 de Abril de 1957, bajo el Número 650821, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto Ley sobre Propiedad Industrial.

20

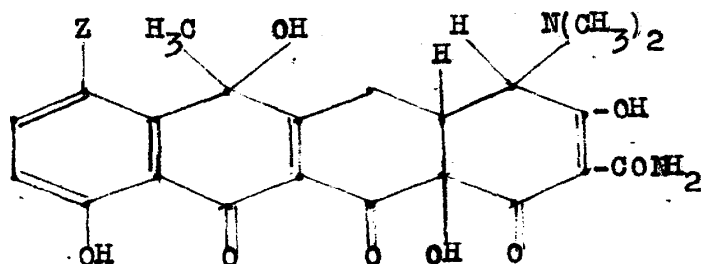
N O T A

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

1º. Un método de preparación de 5a(11a)-deshidrotetraciclina que tienen la fórmula

240767

29



-----I

5 donde Z es hidrógeno, bromo o cloro, caracterizado por fermentar aeróbicamente un medio nutriente acuoso corriente que contiene ion cloruro con una cepa de S. aureofaciens adaptada para producir compuesto I, en la que Z es cloro, o un medio tal deficiente en iones cloruro con lo que se produce compuesto I en el que  
 10 Z es hidrógeno, o un medio tal que contiene cantidades sustanciales de iones bromuro con lo que se produce compuesto I en el que Z es bromo.

2º. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que se añade riboflavina a dicho medio.

15 3º. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó la 2, caracterizado por el hecho de que se usa un medio que contiene menos de 50 p.p.m. de ion cloruro e ion bromuro para producir compuesto I en el que R<sub>1</sub> es hidrógeno.

20 4º. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó la 2, caracterizado por el hecho de que se usa un medio que contiene menos de 50 p.p.m. de ion cloruro y por lo menos 50 p.p.m. de ion bromuro para producir compuesto I, en el cual R<sub>1</sub> es bromo.

25 5º. Un método de preparación de 5a(11a)-deshidrotetraciclina epímeras en 4a, que tienen la fórmula I, caracterizado porque se ajusta una solución concentrada de 5a(11a)-deshidrotetraciclina que tiene la fórmula I a pH comprendido entre 3,0 y 5,0 y se deja la solución en reposo hasta que la isomerización ha alcanzado un equilibrio.

30 6º. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado por el hecho de que el pH esté entre los límites 3,5 y

240767

29



4,5 en un sistema disolvente tamponado.

7º. Un método de preparación de sales ácidas y básicas de 5a(11a)-deshidrotetraciclinas que tienen la fórmula I y los epímeros en posición 4a de las mismas, caracterizado porque se hace reaccionar una solución de la mencionada 5a(11a)-deshidrotetraciclina o un epímero en 4a, de la misma con un ácido o una base.

8º. Un método para la preparación de complejos de 5a(11a)-deshidrotetraciclinas que tienen la fórmula I y los epímeros en 4a de las mismas, caracterizado porque se hace reaccionar una solución de dicha 5a(11a)-deshidrotetraciclina o un epímero en 4a de la misma con un compuesto formador de complejo.

9º. Un método para preparar compuestos de la serie de la tetraciclina.

15 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, ilustrado en el dibujo que se acompaña y para los fines que se han especificado.

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

Madrid

29 MAR 1958

P. A.  
Alberto de Echevarría  
SECRETARIO