

AÑO 1959

Expediente núm.

247688
247689



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,
~~XXXX~~ Nueva York, N.Y., E.U.A. ~~XXXX~~

por:

« UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE MIEMBROS DE LA
SERIE DE LA TETRACICLINA »

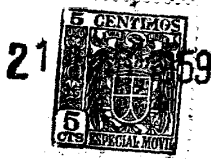
Nº 13243

Agente Sr. ELZABURU.

21 MAR 1959

P.- 17.273.-

A 38701 Case 16926 LJR.



247689

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 PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE MIEMBROS DE LA SERIE DE LA TETRACICLINA".

Esta invención se refiere a un nuevo procedimiento para la preparación de miembros de la serie de la tetraciclina.

El procedimiento de acuerdo con la invención comprende efectuar la 12a-hidroxilación de una 12a-desoxitetraciclina sometiendo esta última a la acción de una o más cepas oxigenantes de microorganismos de la clase Fungi Imperfecti.

Las 12a-desoxitetraciclinas son nuevos miembros de la serie de la tetraciclina. Por ejemplo, la 12a-desoxitetraciclina se prepara por reducción química de tetraciclina con cinc metálico en una solución acuosa de amoníaco. Preferiblemente, el amoníaco acuoso se usa como una solución al 10-20%. El empleo de amoníaco acuoso como disolvente se ha encontrado que es necesario,

247689

21



ya que otros medios disolventes, como por ejemplo un medio ligeramente ácido, no contribuyen a la reducción de tetraciclina para pasar a la 12a-desoxitetraciclina o bien dan como resultado la formación de otros productos de reducción indeseables.

5 La reacción puede realizarse a temperaturas comprendidas entre 10°C y 50°C., aproximadamente pero, preferiblemente, se realiza a temperatura próxima a la ambiente, o sea, comprendida entre unos 20°C. y unos 25°C. El tiempo que dura la reacción no es demasiado crítico. En general, puede estar comprendido entre 1 hora, aproximadamente y, 4 horas, aproximadamente. Para 10 la reacción, da resultado satisfactorio una concentración de 4%, aproximadamente (peso/volumen) del antibiótico tetraciclina en el medio amoniacal acuoso. El cinc utilizado en la reacción debe estar preferiblemente en forma finamente dividida, 15 por ejemplo, cinc en polvo, y el metal debe usarse en la proporción de dos partes, por lo menos, en peso, del metal por cada parte en peso del antibiótico tetraciclina. En general, no son necesarias proporciones de metal mayores de 4 partes, aproximadamente, en peso.

20 Análogamente pueden prepararse: 6-desmetil-12a-desoxitetraciclina por la reducción química de 6-desmetiltetraciclina; 7-cloro-6-desmetil-12a-desoxitetraciclina por la reducción química de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina; 6,12a-didesoxitetraciclina por la reducción química de 6-desoxitetraciclina y 6-des- 25 metil-6-12a-didesoxitetraciclina por la reducción química de 6-desmetil-6-desoxitetraciclina.

Las 12a-desoxitetraciclinas obtenidas de este modo son productos intermedios valiosos para la preparación de 12a-desoxianhidrotetraciclinas. Puede prepararse 12a-desoxianhidrotetra- 30 ciclina tratando 12a-desoxitetraciclina con un agente deshidratante.



te, por ejemplo cualquier ácido mineral fuerte como el ácido acético glacial, a una temperatura comprendida entre 0°-100°C., aproximadamente. La 12a-desoxianhidrotetraciclina así obtenida es biológicamente activa y posee actividad contra diversos microorganismo gram-positivos y gram-negativos, y particularmente contra ciertas cepas de bacterias resistentes a la tetraciclina.

Entre las especies de la clase Fungi Imperfecti que se han encontrado útiles para la realización de esta invención figuran las especies Myrothecium roridum (Gilman, J.C. "A Manual of Soil Fungi", página 398, 2ª. ed., Iowa State College Press., Ames Iowa, 1957); Horodendrum hordei (Ibid. 330); Horodendrum pallidum (Ibid. 330); Curvularia lunata (NRRL 2380 Ibid. 338); Curvularia lunata (QM 34B Ibid. 338); Curvularia pallescens (NRRL 2381 Ibid. 338); y Botrytis cinerea (ATCC 12481 Ibid. 306).

Estos microorganismos pueden obtenerse de fuentes conocidas tales como Northern Regional Research Laboratories, Peoria, Illinois, American Type Culture Collection, Washington, D.C., Headquarters Quartermaster Research and Development Command, Quartermaster Research and Development Center, U.S. Army, Natick, Mass., o del Centraalbureau voor Schimmelcultuur de Baarn, Holanda. O también, pueden obtenerse de fuentes naturales utilizando técnicas conocidas para los microbiólogos.

Al poner en práctica el procedimiento de esta invención, la 12a-desoxitetraciclina que se quiere oxigenar se somete a la acción de una cepa oxigenante de hongos de la clase mencionada arriba. Esto se realiza convenientemente desarrollando el microorganismo en condiciones aerobicas en un medio nutriente adecuado en íntimo contacto con la 12a-desoxitetraciclina que se quiere oxigenar, continuando el desarrollo del microorganismo hasta

247689



que se ha verificado la 12a-hidroxilación deseada. Alternati-
vamente, puede llevarse a cabo el procedimiento desarrollando
primero el microorganismo en un medio de fermentación adecuado,
en condiciones aerobicas, separando después las células del me-
5 dio de fermentación y, finalmente, añadiendo la 12a-desoxite-
traciclina al filtrado exento de células y aireando durante un
tiempo suficiente para lograr la hidroxilación apetecida.

La 12a-desoxitetraciclina puede añadirse al medio nutrien-
te en forma de una suspensión en un disolvente adecuado, por
10 ejemplo, agua, o como solución en un disolvente tal como aceto-
na, propilenglicol, dimetilformamida, etc. En general, es con-
veniente que la 12a-desoxitetraciclina esté presente en forma
finamente dividida con el fin de lograr el máximo contacto con
el medio de cultivo oxigenante y asegurar una reacción comple-
15 ta.

Las condiciones de la fermentación son generalmente las
mismas que para los métodos conocidos de producción de tatraci-
clina por fermentación. El medio de fermentación contiene los
nutrientes y sustancias minerales usuales. Entre las sustancias
20 nutrientes adecuadas que pueden proporcionar estos elementos ne-
cesarios figuran: almidón, dextrosa, sacarosa, glucosa, melazas,
harina de soja, harina de cacahuete, levadura, extractos de car-
ne, peptona, sulfato amónico, urea, líquido de maceración del
maiz, productos solubles de destiladores, harina de pescado y
25 otras sustancias corrientes. Entre las sales inorgánicas figu-
ran: carbonato cálcico, sulfato amónico, cloruro amónico, fos-
fato sódico dihidrógeno y los diversos elementos traza, tales co-
mo manganeso, cobalto, cinc, cobre, hierro y análogos.

Las otras condiciones generales de la fermentación, tales
30 como concentración de ion hidrógeno, temperatura, tiempo, velo-



cidad de aireación, preparación del inoculum, esterilización, inoculación y análogas, son corrientes y pueden ser semejantes a las utilizadas para la obtención de tetraciclina descritas en la patente americana Número 2.734.018, de Minieri.

- 5 A continuación se dan ejemplos de medios nutrientes acuosos adecuados que pueden utilizarse en nuestro procedimiento para hidroxilar las 12a-desoxitetraciclinas.

Medio N^o. 1

10	Líquido de maceración del maiz	20 gramos por litro
	Sacarosa	30 gramos por litro
	CaCO ₃	7 gramos por litro
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2 gramos por litro

Medio N^o. 2

15	Harina de maiz	20 gramos por litro
	Amina B, N-Z (hidrolizado de caseina)	10 gramos por litro
	"Cerelesa"	10 gramos por litro
	Extracto de levadura Difco	2 gramos por litro
	K ₂ HPO ₄	1 gramo por litro
	CaCO ₃	5 gramos por litro

- 20 Se agrega agua de la cañería hasta completar un volumen total de un litro de medio nutriente; se ajusta el pH a 6,5-7,0 y se trata la solución en autoclave.

Como se ha indicado arriba, el procedimiento de esta invención es particularmente útil en la oxigenación de la 12a-desoxitetraciclina pero no está en modo alguno limitado a la hidroxilación de esta 12a-desoxitetraciclina particular. Es decir, las otras 12a-desoxitetraciclinas, o sea, las que derivan de 7-cloro-6-desmetil-tetraciclina, 6-desoxitetraciclina, 6-desmetil-tetraciclina y 6-desmetil-6-desoxitetraciclina, pueden oxigenarse del mismo modo con las cepas oxigenantes de los microorganismos descritos. Además, la hidroxilación descrita se ha aplicado satisfactoriamente a la 12a-desoxidesdimetilaminotetraciclina, formándose desdimetilaminotetraciclina. El material de partida, 12a-desoxidesdimetilaminotetraciclina, puede prepararse po-



niendo en contacto tetraciclina con cinc metálico en un medio suavemente ácido, por ejemplo, ácido acético glacial, durante un período de 72 horas por lo menos. Esta reacción da como resultado la eliminación del grupo hidroxilo en la posición 12a del núcleo tetraciclina, y la eliminación del grupo dimetilamino en la posición 4 del núcleo tetraciclina. El compuesto resultante podría denominarse 12a-desoxidesdimetilaminotetraciclina. Esta reacción en la que se utiliza clorotetraciclina como material de partida y que conduce a la 12a-desoxidesdimetilaminoclorotetraciclina, está descrita en Journal of the American Chemical Society 76, 3575 (1954).

La 12a-desoxitetraclina puede oxigenarse de acuerdo con esta invención por el procedimiento siguiente:

Un medio de cultivo estéril, por ejemplo el medio N^o. 1 indicado arriba, se inocular primero introduciendo una pequeña cantidad de suspensión de esporas o desarrollo vegetativo de una cepa oxigenante de Fungi Imperfecti, tal como la especie Curvularia lunata. El medio nutriente inoculado se incuba luego durante 48 horas en un agitador de vaivén a 28°C. Se retira una parte alícuota del inoculum y se coloca en un matraz de fermentación que contiene el Medio N^o. 2. El matraz de fermentación inoculado se incuba en un agitador rotatorio durante 20 horas, por lo menos, antes de la adición de la 12a-desoxitetraclina, que se añade en forma de una suspensión-solución acuosa que contiene de 10 a 20 miligramos por mililitro. La agitación y la aireación del medio nutriente se continúa desde unas 2 a 72 horas, o hasta que la oxigenación es completa. Si se desea, la oxigenación puede realizarse en el caldo de fermentación según se ha descrito, o el caldo puede filtrarse y añadir la 12a-desoxitetraclina al mosto exento de células, realizan-



do la incubación durante un tiempo adicional hasta que la oxigenación se ha completado.

5 Cuando la oxigenación ha terminado, puede recuperarse la tetraciclina del caldo de fermentación o del líquido exento de células, de cualquier modo conveniente. Se han publicado numerosos métodos para la extracción de tetraciclina de los caldos de fermentación pudiendo utilizarse para la extracción de la tetraciclina obtenida en el procedimiento aquí descrito.

10 La invención se describirá con más detalle por los siguientes ejemplos específicos.

EJEMPLO 1

Se esterilizan durante 20 minutos, a 150°C., en un matraz de 500 mililitros, unos 50 mililitros de un medio de cultivo que tiene la composición descrita como Medium N^o. 1. Se inocula 15 la luego el medio con 2 mililitros, aproximadamente, de una suspensión acuosa de un inoculum vegetativo de Curvularia lunata (NRRL 2380). La mezcla se incuba durante 48 horas sobre un agitador de vaivén a 28°C. Entonces se retira una parte alícuota de 4% del inoculum y se coloca en un matraz de 500 mililitros 20 que contiene 50 mililitros de un medio cuya composición es la que se ha descrito como Medio N^o. 2. El matraz de fermentación inoculado se incuba en un agitador rotatorio durante 24 horas. Al cabo de este tiempo se añaden al matraz de fermentación 2 mililitros de una solución al 0,25% de la 12a-desoxitetraciclina. 25 Después de fermentar durante 1 hora, el caldo de fermentación acusa en el análisis 31,9 gammas por mililitro de tetraciclina, mientras que, en el tiempo cero, la muestra indica 2,5 gammas por mililitro.

EJEMPLO 2

30 Se sigue un procedimiento análogo al del Ejemplo 1, excep-



to que se filtra un caldo de fermentación de 48 horas. Se añaden 6 mililitros del licor exento de células en un matraz de 250 mililitros, junto con 3,8 mililitros de amortiguador citrato-fosfato preparado a un pH de 3,8, y 0,2 mililitros (como solución al 2,5%) de la 12a-desoxitetraciclina. El matraz se incuba en un agitador de vaivén a 28°C. durante 2 horas. La actividad antibacteriana aumenta desde un valor inicial de 12 gammas por mililitros a 186 gammas por mililitro.

EJEMPLO 3

Se sigue un procedimiento análogo al del Ejemplo 1, excepto que el medio se inocula con un cultivo de Myrothecium roridum. Después de fermentar durante un periodo de 24 horas, se añade al matraz de fermentación 1 mililitro de una solución de 12a-desoxitetraciclina al 0,25%. Se incuba el matraz en un agitador rotatorio a 28°C. durante 72 horas. Al cabo de este tiempo, la actividad antibacteriana medida como tetraciclina acuosa 34,1 gammas por mililitro. La actividad antibacteriana inicial es 2,6 gammas por mililitro.

EJEMPLO 4

Se repite el procedimiento del Ejemplo anterior, excepto que se usa un cultivo de Horrodendrum hordei. La fermentación se realiza como en el Ejemplo 3 y se añade la 12a-desoxitetraciclina al matraz de fermentación como en el Ejemplo 3. Después de fermentar durante 72 horas, la actividad antibacteriana medida como tetraciclina alcanza 17,3 gammas por mililitro.

EJEMPLO 5

Se repite el procedimiento del Ejemplo anterior, a excepción de que se utiliza un cultivo de Horrodendrum pallidum. La fermentación se realiza como en el Ejemplo 3 y la 12a-desoxitetraciclina se agrega como en el Ejemplo 3. Al cabo de un perio-



do de fermentación de 72 horas, la actividad antibacteriana medida como tetraciclina alcanza a 23,0 gammas por mililitro.

EJEMPLO 6

5 Se repite el procedimiento del Ejemplo 2, excepto que se usa un cultivo de Curvularia pallescens (NRRL 2381). Se añade 12a-desoxitetraciclina al licor exento de células, como en el Ejemplo 2. Después de incubación durante 2 horas, la actividad antibacteriana medida como tetraciclina alcanza 93,8 gammas por mililitro.

10

EJEMPLO 7

Se repite el procedimiento del Ejemplo anterior, excepto que se usa un cultivo de Botrytis cinerea (ATCC 12481). La 12a-desoxitetraciclina se añade al licor exento de células como en el Ejemplo 2. Después de incubación durante 2 horas, la actividad antibacteriana medida como tetraciclina alcanza 185 gammas por mililitro.

15

EJEMPLO 8

20 Se añaden 5 mililitros de una solución metanólica de 12a-desoxidesimetilamino tetraciclina a una concentración de 1 mg./ml., y preparada por contacto de tetraciclina con cinc metálico en ácido acético glacial durante 72 horas, sobre 2 mililitros de amortiguador citrato-fosfato preparado a pH 3,8 y sobre 3,0 mililitros de un filtrado de mosto de fermentación preparado por fermentación de un cultivo de Curvularia lunata (NRRL 2380).
25 Se agita el matraz en un agitador de vaivén durante 2 horas a 28°C. La 12a-hidroxilación del sustrato se manifiesta por una disminución en la absorción a 465 m μ en solución de borato sódico M/10, que es característica del compuesto 12a-desoxidesimetilamino, y por el incremento de actividad antibacteriana, tal
30 como se determina por el ensayo turbidimétrico con Micrococcus pyogenes.

247689



<u>Tiempo</u> <u>min.</u>	<u>Densidad óptica</u> <u>a 465 mμ</u> <u>en borato M/10</u>	<u>μgr/ml. como DDMATC &)</u>
0	0,442	50,3
5 30	0,291	121,0
120	0,152	149,0

&) Desdimetilaminotetraciclina.

Además, los datos de cromatografía sobre papel indican que se ha producido 12a-hidroxilación.

10

EJEMPLO 9

Una suspensión acuosa de Curvularia lunata (NRRL 2380) procedente de un cultivo inclinado de agar de patata-dextrosa, se inocula en 4 matraces estériles de 500 mililitros cada uno de los cuales contiene 50 mililitros de un medio cuya composición es la que se ha descrito como Medio Nº. 1. Los matraces se incuban después durante 48 horas en un agitador de vaivén a 28°C. Después se agrega un inoculum al 4 % a una serie de matraces cada uno de los cuales contiene 50 mililitros de un medio cuya composición es la que se ha descrito como Medio Nº. 2. Estos 20 matraces de fermentación inoculados se incuban en un agitador rotatorio durante 44 horas a 28°C. Después de esto se separa el micelio del licor de fermentación filtrando por lechos filtrantes Seitz. Sobre 1044 mililitros de este licor exento de células se agregan 66 mililitros de una suspensión-solución de 850 25 miligramos de 12a-desoxitetraciclina. Si la mezcla de reacción se deja en reposo a la temperatura ambiente durante unas 24 horas, la actividad antibacteriana como tetraciclina se hace unas 10 veces mayor. La velocidad de reacción puede incrementarse aireando la mezcla de reacción, por ejemplo, burbujeando aire a través



de la misma o agitando el matraz que contiene la mezcla de reacción en un agitador de vaivén. Luego se ajusta la mezcla de reacción a un pH de 8,5-8,6 y se extrae varias veces con butanol. Los extractos de butanol reunidos se concentran hasta un pequeño volumen y la tetraciclina bruta se precipita añadiendo 10 volúmenes de éter de petróleo. La tetraciclina se libera de la mayor parte de sus impurezas por cromatografía de partición y cristalización subsiguiente. La tetraciclina cristalina que se obtiene se identifica por las técnicas de infrarrojo, ultravioleta, cromatografía sobre papel y actividad microbiológica.

Esta solicitud, que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, el 5 de Marzo de 1958, bajo el Número 719.191, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto Ley 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, son los siguientes:

1º. Un procedimiento para la preparación de miembros de la serie de la tetraciclina, caracterizado porque se efectúa la 12a-hidroxilación de una 12a-desoxitetraciclina sometiendo esta última a la acción de una o más cepas oxigenantes de microorganismos de la clase Fungi Imperfecti.

2º. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que un medio nutriente se fermenta, en condiciones aeróbicas con dicho microorganismo en contacto íntimo con la citada 12a-desoxitetraciclina.

3º. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que un medio nutriente se fermenta, en condiciones aeróbicas, con dicho microorganismo, después



de lo cual se filtra el medio fermentado, se agrega la citada 12a-desoxitetraciclina al filtrado exento de células, y se continúa la fermentación en condiciones aeróbicas.

4º. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por el hecho de que dicha 12a-desoxitetraciclina está presente en forma finamente dividida.

5º. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por el hecho de que se utiliza un microorganismo de un género seleccionado entre los del grupo constituido por Myrothecium, Hormodendrum, Curvularia y Botrytis.

6º. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por el hecho de que se utiliza un microorganismo de una especie seleccionada entre las del grupo constituido por Myrothecium roridum, Hormodendrum hordei, Hormodendrum pallidum, Curvularia lunata, Curvularia pallescens, y Botrytis cinerea.

7º. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por el hecho de que la 12a-desoxitetraciclina es 12a-desoxitetraciclina.

8º. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por el hecho de que la 12a-desoxitetraciclina es 12a-desoxidesdimetilaminotetraciclina.

9º. Un procedimiento para la preparación de miembros de la serie de la tetraciclina.

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

247689

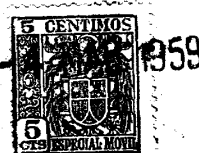


Esta Memoria consta de doce hojas y la presente, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid

21 MAR. 1959

P. A.



24-7689.
17-973

NOTA

1º.- Un procedimiento para la preparación de miembros de la serie de la tetraciclina, caracterizado por efectuar la 12a-hidroxiación de una 12a-desoxitetraciclina sometiendo esta última a la acción de una o más cepas oxigenantes de microorganismos de la clase Fungi Imperfecti.

2º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 1º, caracterizado porque se hace fermentar un medio nutritivo en condiciones aerobias con dicho microorganismo en contacto íntimo con dicha 12a-desoxitetraciclina.

3º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 1º, caracterizado porque se hace fermentar un medio nutritivo en condiciones aerobias con dicho microorganismos, después de lo cual el medio fermentado se filtra, dicha 12a-desoxitetraciclina se añade al filtrado libre de células y la fermentación se continua en condiciones aerobias.

4º.- Un procedimiento según se reivindica en los puntos 1º a 3º, caracterizado porque dicha 12a-desoxitetraciclina está presente en forma finamente dividida.

5º.- Un procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos 1º a 4º, caracterizado porque se utiliza un microorganismo de un género elegido del grupo consistente en *Myrothecium*, *Hormodendrum*, *Curvularia* y *Botrytis*.

6º.- Un procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos 1º a 4º, caracterizado porque se utiliza un microorganismo de una serie elegida del grupo consistente en *Myrothecium roridum*, *Hormodendrum Hordei*, *Hormodendrum pallidum*, *Curvularia lunata*, *Curvularia Pallesem* y *Botrytis cinerea*.



- 4 M

7º.- Un procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos 1º a 6º, caracterizado porque la 12a-desoxitetraciclina es 12a-desoxitetraciclina.

8º.- Un procedimiento según se reivindica en cualquiera de los puntos 1º a 6º, caracterizado porque la 12a-desoxitetraciclina es 12a-desoxidesdimetilaminotetraciclina.

Madrid, - 4 MAR. 1959

[Handwritten signature]
Antonio Elizalde

EV/BU