

256969

256969



P A T E N T E
D E
I N V E N C I O N

por "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE FENOXIMETILPENICILINATO DE N²(o 9, o 7)-4'-(BETA-HIDROXIETIL)-DIETILENDIAMINOMETILTETRACICLINA, DE ACCION ANTIBIOTICA", a favor de la firma francesa SOCIETE D'ETUDES, DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES ET MEDICALES E.R.A.S.M.E., domiciliada en 67 Avenue de Wagram, Paris (Francia).

= . =

-2-

256969



MEMORIA DESCRIPTIVA

El presente invento se refiere a un procedimiento para la obtención de un nuevo compuesto químico que presenta una acción antibiótica notable que lo relaciona a la vez con las series de las tetraciclinas y de las penicilinas.

5. Este nuevo compuesto presenta propiedades características, de una parte por el hecho de que es notablemente soluble en agua, y de otra parte por el hecho de que no presenta prácticamente ninguna sensibilidad a la penicilinasa, lo que asegura la actividad de porción de penicilina sobre estafilococos considerados hasta ahora como resistentes a las penicilinas conocidas, y más especialmente sobre el *Staphylococcus aureus*, productor de penicilinasa.

10. Se sabe que, cada una por su lado, las tetraciclinas y las penicilinas presentan sus ventajas y sus inconvenientes propios y que estos últimos limitan en gran escala el empleo de estos productos.

15. Así, se sabe que la tetraciclina y la mayoría de sus derivados son prácticamente insolubles en agua.

20. Por otra parte, las penicilinas conocidas carecen actualmente de acción sobre ciertos estafilococos productores de penicilinasa.

25. Por último, aunque se haya pensado ya en asociar la tetraciclina a ciertas penicilinas, el único compuesto de este tipo, el fenoximetilpenicilinato de tetraciclina, que presenta cierta actividad sobre algunos estafilococos resis-



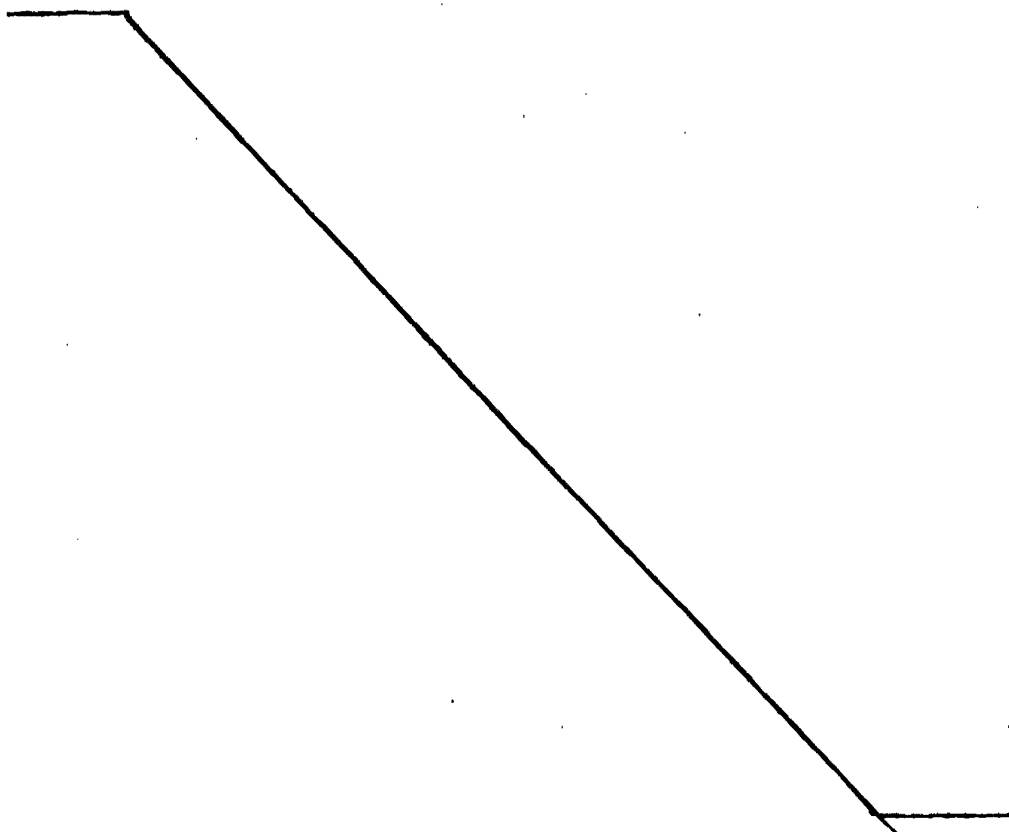
256969

tentes a la penicilina, es también prácticamente insoluble en agua, lo que lo vuelve difícilmente utilizable en el aspecto médico.

5. El producto a que se refiere este invento no presenta ni uno ni otro de estos inconvenientes, de manera que constituye el primer producto que resulta a la vez soluble en agua, o sea de utilización terapéutica ventajosa, y activo en presencia de penicilinasa, es decir activo sobre las cepas de estafilococos, incluso las productoras de penicilinaza.

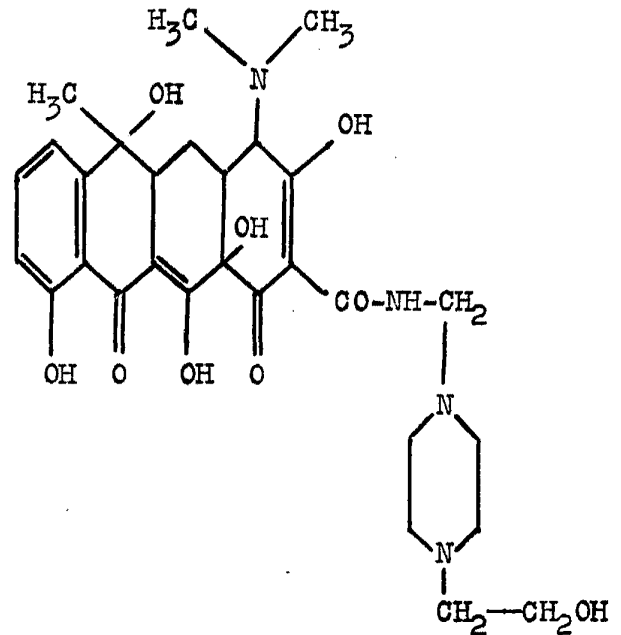
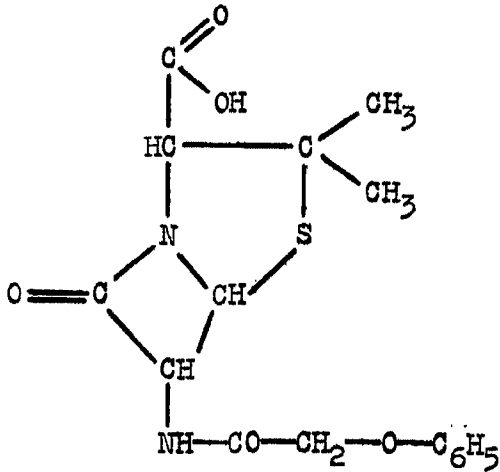
10.

El compuesto a que se refiere este invento es el fenoximetilpenicilinato de N² (o 9, o 7) - 4' (betahidroxietil) - dietilendiaminometiltetraciclina, del cual es una fórmula probable:





4-256969



5. Conviene observar que no ha podido determinarse todavía con certeza esta fórmula completa, en particular por lo que atañe al lugar de la sustitución en el anillo de tetraciclina, y que es solamente a título indicativo que se ilustra aquí arriba la fórmula con enlace en posición N.

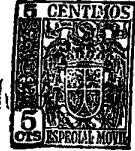
Más adelante se expondrán aquí en detalle las propiedades principales físicas, fisicoquímicas y biológicas de este nuevo compuesto.

10. El invento se refiere también a un procedimiento para la preparación de ese nuevo compuesto, procedimiento que se basa esencialmente en una reacción que provoca la combinación de las tres porciones fundamentales de la molécula compleja representada aquí arriba.

15. Con tal objeto, el procedimiento a que se refiere este invento consiste en hacer reaccionar, en un disolvente común, cantidades equimoleculares de fenoximetilpenicilina, tetraciclina base y N-hidroxietyl-N'-hidroximetildietilendiamina.

La reacción se desarrolla de preferencia en caliente,

256969 30



a una temperatura del orden de 40°C.

Según la naturaleza del disolvente utilizado, se aísla el producto mediante técnicas diferentes.

5. Así, cuando el disolvente común es el agua, se puede aislar el producto por liofilización, mientras que cuando el disolvente es un disolvente orgánico, como el metanol o el isopropanol se puede aislar el producto por precipitación mediante éter y filtración.

10. Cabe considerar diversas variantes de puesta en práctica de este procedimiento.

15. Según una primera variante, se pueden introducir en una solución caliente la N-hidroxietyl-N'-hidroximetildietilendiamina, el derivado de penicilina y la tetraciclina base, individualmente o en mezcla, en una sola vez o por porciones sucesivas.

20. Según una segunda variante, se puede preparar la N-hidroxietyl-N'-hidroximetildietilendiamina "in situ" por reacción de la N-beta-hidroxietyl-dietilendiamina con el formaldehído, introduciendo entonces, simultáneamente o no, los cuatro componentes reaccionales.

La elección de una u otra de estas variantes está regida por consideraciones de comodidad y de eficacia en el aislamiento y la purificación del producto final.

25. Seguidamente se ilustra el procedimiento a que se refiere este invento, mediante algunos ejemplos de puesta en práctica de las diversas variantes.

EJEMPLO 1.

30. En este ejemplo, que ilustra la variante preferida, la cual consiste en formar de antemano la N-hidroxietyl-N'-hidroximetildietilendiamina, se prepara primeramente una

- 6 - 256969

80



5. solución de 6,63 g de beta-hidroxi-etildietilendiamina y 3,8 g de formalina al 38% por calentamiento de estos reactivos hacia 60-70°C en 200 cc de metanol. Después de una hora de reposo, se agregan a esta solución, más o menos simultáneamente, 22,2 g de tetraciclina base anhidra y 17,5 g de fenoximetilpenicilina anhidra, y se calienta la mezcla reaccional en baño de aceite a 40°C durante 90 minutos. La disolución completa se obtiene en 30 minutos aproximadamente.

10. Se vierte entonces la mezcla reaccional en 600 cc de etanol al mismo tiempo que se agita. Se precipita un producto que se filtra, se lava por dos veces con éter y se seca en vacío a 40°C durante 5 horas. Este producto está constituido por 40 g de fenoximetilpenicilinato de N² (o 9, o 7)-4' (beta-hidroxi-etil)-dietilendiaminometil-tetraciclina, lo cual
15. significa un rendimiento de 85-90% aproximadamente; las propiedades de este producto se enumeran más adelante.

EJEMPLO 2.

Este ejemplo ilustra otra variante, que consiste en preparar en primer lugar el producto de la reacción de la tetra
20. ciclina con los componentes de la diamina, a saber, la N² (o 9, o 7)-4' (beta-hidroxi-etil) dietilendiaminometil-tetraciclina, por una reacción clásica del tipo de la Reacción de Mannich. Se hace reaccionar luego este nuevo derivado de tetraciclina con la fenoximetilpenicilina a fin de obtener el
25. producto a que se refiere el invento.

Se disuelven 58,6 g de N² (o 9, o 7)-4' (beta-hidroxi-etil) dietilendiaminometil-tetraciclina y 35 g de fenoximetilpenicilina en 300 cc de metanol, mientras se agita; se filtra esta solución en filtro Büchner y luego se recoge el filtrado
30. con 990 cc de éter anhidro mientras se agita fuertemente, se

256969



5. filtra de nuevo bajo presión y se lava la torta filtrada, por dos veces, con 50 cc de éter anhidro; se seca el producto en vacío y se obtienen 84 g de un polvo blanco amarillento que presenta también las características fisicoquímicas indicadas más adelante.

EJEMPLO 3.

10. Se disuelven las mismas cantidades de los mismos reactivos que en el Ejemplo 2, en 500 cc de agua destilada a 5°C; se filtra la solución sobre filtro Büchner y luego se somete el filtrado a una liofilización a -40°C; se obtiene un producto liofilizado que presenta las mismas características que el de los Ejemplos precedentes.

15. En los tres casos, el producto obtenido al final aparece en forma de un polvo blanco amarillento, inodoro, algo amargo, muy soluble en el agua (>1,5 g/cc), soluble en el metanol y el etanol, insoluble en el éter. El pH de una solución acuosa al 2% es de 5,6 ;
 Punto de fusión : 143-155°C (con descomposición, no corregido);
 $(\alpha)_D^{20} = -50,5 \pm 2$ (en solución al 2% en metanol).

20. Análisis: calculado para: $C_{45}H_{56}N_6O_{14}S$

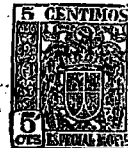
C = 57,67	H = 6,02	N = 8,96	S = 3,42
-----------	----------	----------	----------

hallado:

C = 56,41	H = 6,11	N = 6,11	S = 3,36
-----------	----------	----------	----------

Calculado para las porciones	Derivado de tetraciclina (I)	Derivado de penicilina (II)
	62,6%	37,4%
hallado:	61,7%	37,2%

8- 256969



La titulación de la porción (I) se efectúa por iodometría. La de la porción (II), por espectrofotometría, determinando E a 356 m μ de una solución a 10 γ /cc en el HCl N/10.

5. Esta notable solubilidad y el pH de la solución obtenida hacen posible la administración de este compuesto por vía intramuscular e incluso intravenosa.

10. El fenoximetilpenicilinato de N² (o 9, o 7) - 4' (beta-hidroxietyl) - dietilendiaminometiltetraciclina a que se refiere el invento, presenta excepcionales características antibióticas, netamente diferentes de las características de los antibióticos que lo componene.

15. La actividad más elevada se ejerce sobre los estafilococos resistentes a la penicilina. A pesar de la resistencia comprobada de esos gérmenes a la fenoximetilpenicilina, el producto del invento que aquí se expone ejerce una acción netamente superior a la N² (o 9, o 7) - 4' - (beta-hidroxietyl)-dietilendiaminometiltetraciclina y, naturalmente, a la de todos los derivados conocidos de la tetraciclina.

20. En efecto, es bactericida, mientras que la N² (o 9, o 7) - 4' (beta-hidroxietyl) - dietilendiaminometiltetraciclina es únicamente bacterioestática.

Sobre los gérmenes no resistentes a la penicilina, su acción es también netamente superior a la de la fracción básica sola.

25. La mortalidad, comprobada en lotes de ratones blancos infectados por estafilococos resistentes a la penicilina, es netamente más débil en los lotes tratados con el fenoximetilpenicilinato de N² (o 9, o 7) - 4' (betahidroxietyl) - dietilendiaminometiltetraciclina, que en los lotes tratados con la N² (o 9, o 7) - 4' - (beta-hidroxietyl) - dietilendiaminometiltetraciclina.

30.



256969

5. De los espectros antibacterianos que siguen se deduce que la dosis mínima inhibidora (D.M.I.) es notablemente débil; para evaluar esta dosis, conviene tener en cuenta el hecho de que, como el compuesto a que se refiere este invento lleva una porción "penicilina" y una porción "tetraciclina", la proporción de cada una de esas porciones en una cantidad dada del producto sometido a ensayo representa la mitad de la cantidad de la porción correspondiente sometida individualmente al ensayo comparativo.
10. De la misma manera, en la apreciación de los resultados conviene observar que la toxicidad del producto resulta únicamente de la proporción de la porción, "tetraciclina" en el producto, es decir, que la toxicidad del producto a que se refiere el invento es aproximadamente la mitad de la toxicidad del peso de tetraciclina igual al peso del compuesto sometido a ensayo.
15. En la tabla que sigue, la cual indica las dosis mínimas inhibidoras en microgramos por centímetro cúbico (γ cc o λ), se observará que se ha designado por P el producto de acuerdo con el invento, por T la porción "tetraciclina" solubilizada de este producto y por pmp la porción "fenoximetilpenicilina".
- 20.

10-256969

30 M



ESPECTRO ANTIBACTERIANO IN VITRO

D. M. I. γ /cc

<u>Cepa</u>	<u>T</u>	<u>pmp</u>	<u>P</u>
Staphylococcus aureus Ox	0,66	0,02	0,03
Sarcina lutea	0,40	0,04	0,06
Streptococcus viridans	0,40	0,05	0,08
Streptococcus Hem. A	0,40	0,02	0,03
Diplococcus pneum.	0,45	0,03	0,05
Nesseria gonorrea	0,30	0,01	0,01
B. Subtilis	1	0,08	0,13
E. Coli 0	0,65	=	1,00
E. Coli 12	0,4	=	0,38
E. Coli N	0,2	=	0,25
Staphylococcus aureus 209 P FDA	0,2	0,03	0,05
Staphylococcus aureus penicilino-resistente 62 γ /cc	0,35	62	0,25
Staphylococcus aureus penicilino resistente 60 γ /cc	0,48	60	0,48
Staphylococcus aureus Silver 2 penicilino resistente 6 γ /cc	0,16	6	0,16
B. Subtilis penicilino resistente 100 γ /cc	0,24	100	0,24

=====

256969



ACTIVIDAD IN VITRO DE P SOBRE DIFERENTES CEPAS

Se han empleado diversos métodos.

1) Método de las diluciones progresivas en medio líquido.

Los gérmenes utilizados se aíslan de los enfermos o bien pertenecen a la colección de cepas del Laboratorio.

5.

Producto examinado: P

Productos de comparación: T y fenoximetilpenicilina.

La lectura de los resultados se efectúa 18 horas después de la siembra.

10.

a) Primera serie de ensayos.

=====

D. M. I.

<u>Cepas bacterianas</u>	<u>T</u>	<u>Fenoximetilpenicilina</u>	<u>P.</u>
Staph. p. dorado penicilinoresistente 100 U.I. γ /cc	0,66 γ /cc	100 U.I. o 62 γ /cc	0,50 γ /cc
Staph. p. dorado penicilinoresistente 200 U.I. γ /cc	0,80 γ /cc	200 U.I. o 124 γ /cc	0,60 γ /cc
Staph. penicilino- resistente E.U.I. γ /cc tetraciclino- resistente 8 γ /cc	8 γ /cc	3 U.I. o 4 γ /cc	0,8 γ /cc

=====

b) Segunda serie de ensayos (C.M.I. = concentración mínima inhibidora).

Empleando este método se han obtenido los resultados que siguen con el estudio simultáneo de la Bacteriostasa y la Bactericidia.

15.

-12-256969



2) Método de las diluciones en cuadrados.

Bacteriostasa

Bactericida

Colibacilo III

- 1) Resistente a la penicilina
- 2) T C.M.I. = 0,93 γ /cc
o sea 0,70 γ /cc de tetraciclina base
- 3) P C.M.I. = 0,93 γ /cc
o sea 0,43 γ /cc de tetraciclina base

- 1) Resistente a la penicilina
- 2) T 1ª tasa 100% bactericida = 5, o sea 3,78 γ /cc de tetraciclina base
- 3) P 1ª tasa 100% bactericida = 5, o sea 2,36 γ /cc de tetraciclina base

Estafilococo Issoudun

- 1) Penicilina:
C.M.I. = 0,46 γ /cc
- 2) T : C.M.I. = 0,62 γ /cc,
o sea 0,46 γ /cc de tetraciclina base
- 3) P : C.M.I. = 0,23 γ /cc,
o sea 0,10 γ /cc de tetraciclina base y 0,09 γ /cc de penicilina

- 1) Penicilina:
1ª tasa 100% = 0,62 γ /cc
- 2) T: 1ª tasa 100% = 2,5 γ /cc, o sea 1,89 γ /cc de tetraciclina base
- 3) P: 1ª tasa 100% = 0,95 γ /cc o sea 0,4 γ /cc de tetraciclina base y 0,36 γ /cc de penicilina

=====
Resultados de las mediciones bacteriológicas en el aparato de Warburg

5. Asimismo, resulta muy claramente de los ensayos efectuados con el aparato de Warburg, o sea:

- de las curvas de consumo de oxígeno de las bacterias, que evidencian la actividad respiratoria de estas últimas, y del estudio simultáneo;

10. - de la proliferación de las bacterias, que, en comparación con la fenoximetilpenicilina, con la N² (o 9, o 7) - 4' (beta-hidroxietil)-dietilendiaminometil-tetraciclina, así como con un control que no está sometido a

256969

30 M 15



la acción de ningún antibiótico, el producto de acuerdo con este invento tiene una acción completamente diferente e incomparablemente superior.

5. Esta acción está ilustrada en las gráficas que se reproducen en las figuras 1 y 2 adjuntas.

La figura 1 ilustra la variación del consumo de oxígeno de las bacterias,

y la figura 2 ilustra la proliferación de los estafilococos dorados.

10. En los dos juegos de curvas representados en las figuras 1 y 2, se han designado por 1, 2, 3 y 4 los resultados observados en los cuatro casos siguientes, respectivamente:

Curva 1 : No se ha aplicado ningún antibiótico (control)

Curva 2 : Aplicación de fenoximetilpenicilina, a razón de 0,23 microgramos por cc.

15. Curva 3 : Aplicación de N² (o 9, o 7)- 4' -(beta-hidroxietil)-diethylendiaminoetiltetraciclina, a razón de 0,4 microgramos por cc.

Curva 4 : Aplicación del producto de acuerdo con este invento, a razón de 0,63 microgramos por cc.

20. Se observará que, aunque puede parecer que las dosis aplicadas para la obtención de las curvas 2, 3 y 4 son diferentes, no es así, pues la dosis de 0,63 γ /cc de la curva 4 equivale a la suma de las 0,23 γ /cc de la curva 2 y de las 0,4 γ /cc de la curva 3.

25. Las curvas de la figura 1 están expresadas en logaritmos de la cantidad, en milímetros cúbicos, de oxígeno consumido por las bacterias en función del tiempo en horas.

30. Las curvas de la figura 2 están expresadas en logaritmos del número de microorganismos vivos en función del tiempo en horas.

- 14 - 256969 30



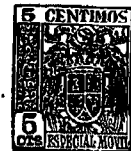
En la figura 1 se comprueban los resultados netamente mejores del producto a que se refiere este invento sobre la inhibición de la respiración del Staphylococcus Aureus.

5. Asimismo, la proliferación del Staphylococcus Aureus es afectada de manera espectacular por el producto a que se refiere el invento; en efecto, mientras las curvas 1 y 2 indican un crecimiento del número de microorganismos, la curva 3 indica solamente un número constante, es decir, solamente una bacteriostasa. Por el contrario, la curva 4 indica una disminución creciente de este número, es decir, una bactericidia. El compuesto de acuerdo con el invento es pues, como se indica más arriba, no solamente bacteriostático sino también bactericida, lo que no resulta sorprendente si se consideran las propiedades individuales de sus porciones constitutivas.
10. En efecto, es interesante observar, refiriéndose a la fórmula desarrollada que se ha indicado antes, que la porción de tetraciclina de esa fórmula corresponde a una substancia de acción puramente bacteriostática que la porción diaminoheterocíclica sola corresponde a una agrupación solubilizante y que la porción de penicilina substituída corresponde sola a una substancia bactericida; mientras que la molécula compleja del producto a que se refiere este invento es enteramente soluble y ejerce acción bactericida sobre todas las bacterias grampositivas productoras de penicilinaza, incluidos los estafilococos dorados.
15. 20. 25.

En esta propiedad esencial reside precisamente la originalidad y el interés del producto de este invento.

30. Parece, aunque el invento que aquí se expone no esté limitado por ninguna consideración teórica, que el comportamiento en el organismo del nuevo compuesto a que se refiere este invento puede explicarse por sus características físicas, que

256969



5. muestran que a diferencia de las sales de la porción de tetraciclina distintas del fenoximetilpenicilato, este nuevo compuesto no experimenta más que una ionización muy débil y muy progresiva, de modo que cada porción de la gran molécula compleja de acuerdo con el invento no interviene individualmente, sino que por el contrario es esta gran molécula la que actúa en su conjunto con sus propiedades propias.

10. Esta teoría puede justificarse, en primer lugar, por la comparación de los puntos crioscópicos y de los valores de las resistividades de soluciones de diferentes sales de la N² (o 7, o 9) - 4' (beta-hidroxietil)-dietilendiaminometilte-traciclina:

Sal del derivado T	Punto crioscópico (°C sobre solución acuosa 0,05 M)	Resistencia (10 ³ ohms/cm sobre solución acuosa 0,01 M)
cittrato	0,15	0,35
glutamato	0,14	0,51
succinato	0,13	0,39
fenoximetilpenicilato	0,09	0,74

15. De la misma manera, la aplicación de la fórmula clásica de Raoult, que refiere el descenso del punto crioscópico Δ a la constante de disociación K de una sal de masa molecular M en solución acuosa de concentración c,

$$\Delta = K \frac{c}{M}$$

dá en el caso presente

$$- 0,09 = K \times 0,05$$

de donde K = -18

18-

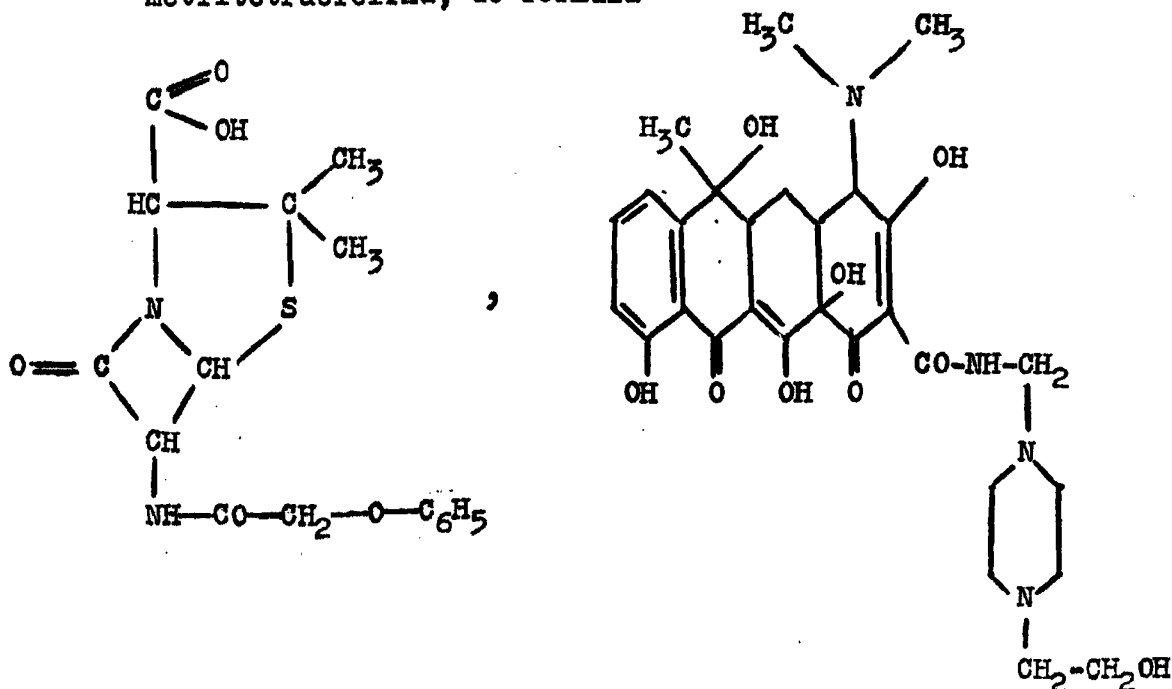
256969



N O T A

Descrito el invento, se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la patente inglesa nº 10887 del 31 de marzo de 1959.

1. Procedimiento para la obtención de fenoximetilpenicilinato de N²(o 9, o 7)-4⁺-(betahidroxietil)-dietilendiaminometiltetraciclina, de acción antibiotica, caracterizado por el hecho de hacer reaccionar en un disolvente común, cantidades sensiblemente equimoleculares de fenoximetilpenicilina, tetraciclina y N-hidroxietil-N⁺-hidroximetildietilendiamina, lo grándose un resultado constituido por el fenoximetilpenicilinato de N² (o 9, o 7)-4⁺-(beta-hidroxietil)-dietilendiaminometiltetraciclina, de fórmula



2. Procedimiento en conformidad con la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el disolvente común



utilizado es el agua y el producto obtenido se aísla por lio-
filización.

5. 3. Procedimiento en conformidad con la reivindicación
1, caracterizado por el hecho de que el disolvente común uti-
lizado es un disolvente orgánico tal como el metanol y de que
se aísla el producto por precipitación mediante éter y fil-
tración.

10. 4. Procedimiento para la obtención de fenoximetilpeni-
cilinato de N²(o 9, o 7)-4'-(beta-hidroxi-etil)-di-etilendiamino-
metiltetraciclina, de acción antibiótica.

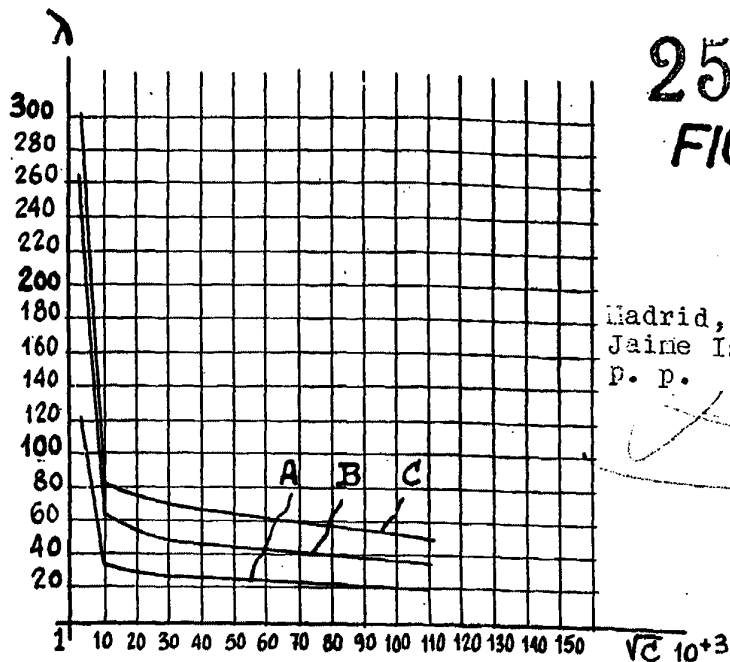
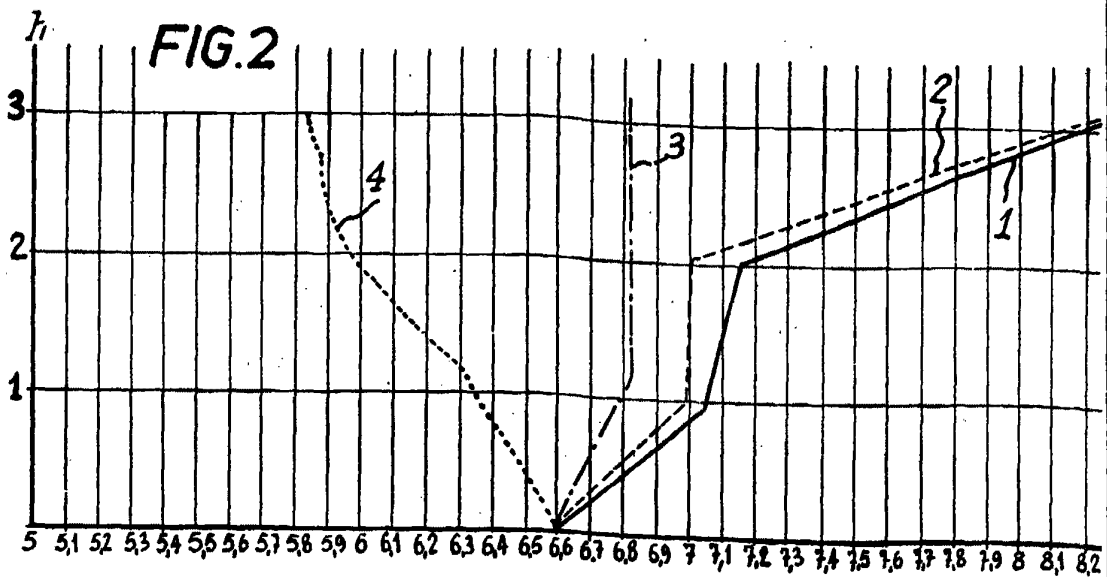
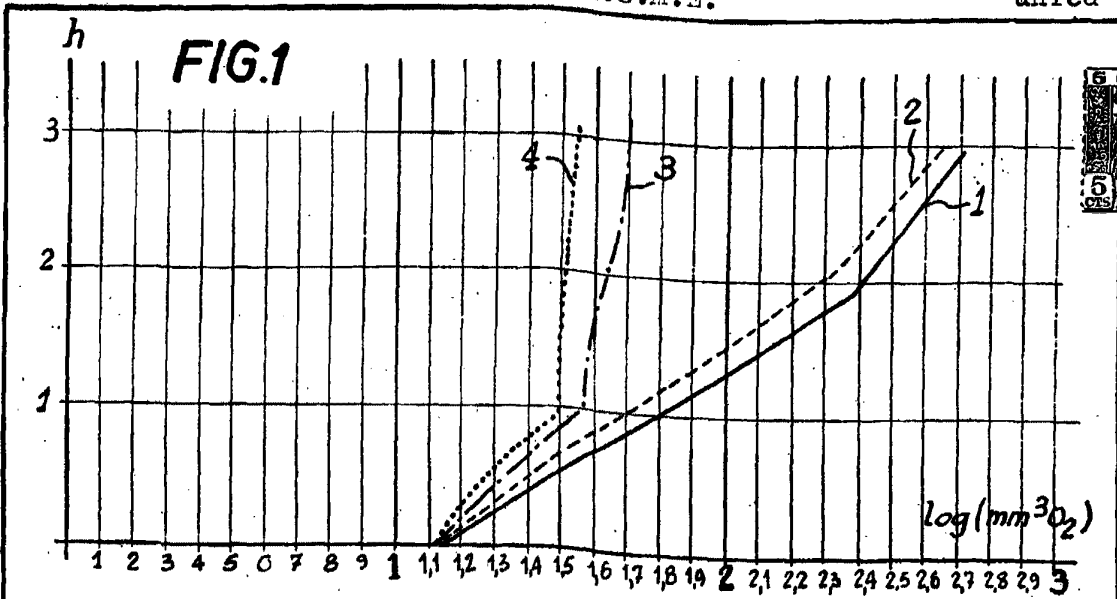
Según se describe y reivindica en la presente memoria
que consta de 19 páginas, foliadas y escritas a máquina por
una sola de sus caras, acompañadas de una lámina de dibujos.

Madrid, a 30 de marzo de 1960.

15. SOCIETE D'ETUDES, DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS
SCIENTIFIQUES ET MEDICALES E.R.A.S.M.E.

p. e.

IMPRESION ORIGINAL



Madrid, 30 marzo 1960
 Jaime Isern Miralles
 P. P.

[Handwritten signature]