

258.275.

RECEIVED

258275

P.- 19.388



nº 398 E

258275

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

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

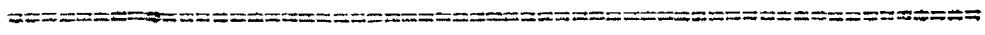
e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de U C L A F, entidad francesa, establecida en
23, Boulevard des Invalides, Paris, Francia, por:

"UN PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE NUEVOS DERIVA-
DOS DE LAS COLCHICINAS Y TIOCOLCHICINAS".

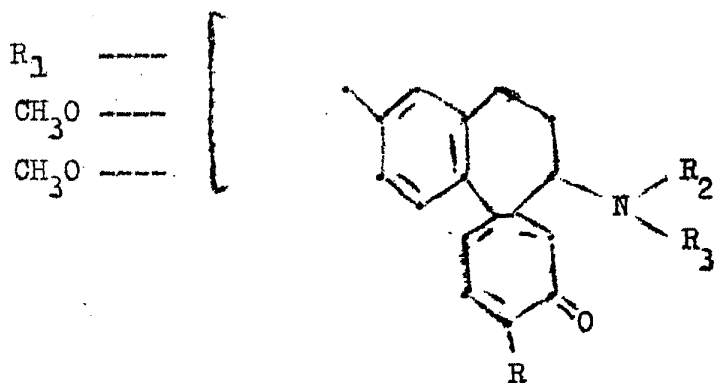


5 La presente invención tiene por objeto nuevas colchicinas y su procedimiento de obtención. Se refiere más particularmente a los productos obtenidos por la acción de los "fungi" -- (hongos, bacterias, levaduras, actinomicetos) sobre las diversas sustancias extraídas del cólchico, sobre los tio-análogos de estas sustancias, así como sobre los diversos productos de transformación química de las colchicinas, colchiceínas, tio-



colchinas y tiocolchiceínas. Por ejemplo, pueden citarse como materias primas: la colchicina, la colchiceína, el colchicósido, las sustancias C(2-desmetil colchicina), F (N-metildesacetilcolchicina) de SANTAVY, las tropanonas y los tioderivados correspondientes, los sulfóxidos de las tiocolchicinas, los derivados N-desacetilados, N-alcoholados, N-acilados correspondientes, respondiendo un gran número de las citadas materias primas de la fórmula general siguiente:

10



15

en la cual $R_1 = H, -OH, -O-acilo, O-alcoholo, O-aralcoholo, O-heterosilo,$

20

$R_2 = H, alcoholo,$

$R_3 = H, acilo, alcoholo, heterosilo,$

$R_4 = -O-alcoholo, -S-alcoholo, -S-alcoholo, N \begin{matrix} R_5 \\ R_6 \end{matrix}$
 \downarrow
 O

$(R_5 = R_6 = H, alcoholo, hidroxialcoholo)$

25

La invención se refiere igualmente a un procedimiento general de transformación de las sustancias de la familia de las colchicinas y tiocolchicinas por vía de fermentación microbiológica. Otros objetos de la invención resaltarán de la descripción que sigue:

30

Las sustancias nuevas obtenidas por la puesta en práctica del procedimiento de la invención se caracterizan



258275

5 por una mejora notable de la acción farmacéutica única, en
comparación con la de la materia prima de partida. Así,
por ejemplo, la acción antimitótica se acentúa y la toxicidad se reduce, permitiendo esto, además, su utilización
10 industrial en agricultura para las modificaciones de la
mitosis y la creación de poliploides, bien sea por espar-
cimiento de soluciones acuosas o de suspensiones de los
productos sobre suelos cultivados, o bien por tratamien-
to previo de las semillas con los productos puros o diluí-
dos en un disolvente o sobre un soporte.

15 Se sabía ya que ciertos microorganismos son capaces
de provocar diversos cambios sobre las moléculas de cier-
tas sustancias químicas bien determinadas. Así, por ejem-
plo, en serie esteroide, se han puesto a punto varios pro-
cedimientos que conducen a la introducción de agrupacio-
nes hidroxiladas o incluso a la creación de dobles enla-
ces. Nada de esto se había observado todavía en la serie
colchicina. El procedimiento de la presente invención -
permite por primera vez., llegar, de manera imprevisible
20 a nuevos compuestos de gran interés cuya preparación pa-
recía imposible hasta ahora. Como la síntesis química de
las colchicinas no ha podido realizarse todavía, las mo-
dificaciones moleculares de las sustancias de esta fami-
lia eran todavía muy pocas.

25 De acuerdo con el procedimiento de la invención, se
prepara, por los métodos conocidos, un cultivo bien evolu-
cionado de un microorganismo perteneciente al grupo de los
"fungi" (véase G. Smith. Industrial mycology), se añade
una colchicina o una tiocolchicina de la fórmula general
30 indicada anteriormente en la que R_1 , R_2 , R_3 y R_4 tienen



- 4 - 258275

las significaciones precitadas, se deja que prosiga la incubación (se sigue la evolución de la reacción con - ayuda del método cromatográfico sobre papel) y se aísla el nuevo derivado por extracción mediante un disolvente apropiado, no miscible con agua. cromatografía eventual y cristalización. El microorganismos utilizado se selecciona de las clases de "fungi" (Streptomyces, hongos, bacterias y levaduras); el cultivo bien evolucionado tiene una edad de 30 a 72 horas y su pH está comprendido entre 3 y 8, prosiguiéndose la incubación consecutiva durante 24 a 90 horas.

Como variante del procedimiento antes descrito, se puede preparar, de acuerdo con los procedimientos conocidos, un cultivo bien evolucionado de un microorganismo, filtrar el micelio, poner nuevamente a este último en - suspensión en un tampón acuoso a pH 5 a 8 y añadir la colchicina o la tiocolchicina, realizándose el resto de las operaciones como antes.

La Sociedad solicitante ha ensayado una serie de - microorganismos, todos los cuales han demostrado ser capaces de efectuar las transformaciones moleculares, objeto de la presente invención. Entre estos microorganismos, se pueden citar, a título de ejemplo:



no ATCC

- Saccharomyces ellipsoideus 4097
- Streptomyces griseus 10137
- Fusarium roseum 10914
- 5 - " oxysporum 7601
- " javanicum 12575
- " gladioli 11137
- " solani 11712
- Curvularia lunata 12017
- 10 - Corynebacterium simplex 6946
- Cunninghamella blakesleeana 8688
- Aspergillus niger 10548
- Streptococcus sp.

15 Los ejemplos siguientes ilustran la invención pero sin limitarla.

Ejemplo 1: Obtención de una nueva sustancia tropolónica por intervención microbiológica sobre la colchicina.

20 Se introducen 850 mgrs. de colchicina en 4 litros de un cultivo de Streptomyces griseus (ATCC 10.137) de 48 horas de edad. Se deja incubar la mezcla durante 48 horas a la temperatura ambiente. Se extrae por 5 veces 400 cc. de cloroformo. se reúnen los extractos. se secan sobre sulfato magnésico y se evapora a sequedad en vacío. Se recoge

25 el residuo en 100 cc. de la mezcla cloroformo-éter (1:2) y se cromatografía sobre 100 grs. de alúmina según Brockmann. La colchicina no transformada se eluye por la mezcla cloroformo-éter (1:2) en tanto que el producto de transformación. retenido más fuertemente sobre la columna, se eluye

30 a su vez por la mezcla cloroformo-metanol (99-1).



Las fracciones eluidas se reúnen y se evaporan a sequedad en vacío. Se recoge el residuo en cloroformo-éter (1:2) y se obtienen así 160 mgrs. de pequeños cristales hexagonales amarillos. p. de f. 176-178° (fusión lenta en tubo). $[\alpha]_D^{25} = -196^{\circ} \pm 2$ (c = 1 % metanol).

El producto nuevo es soluble en el agua, el alcohol, la acetona y el cloroformo. Es insoluble en éter y en benceno. Los eluatos cloroformo-éter (1:2) dan cuantitativamente la colchicina de partida cuya molécula no se ha modificado.

La nueva sustancia obtenida de acuerdo con el ejemplo presente ofrece las características siguientes:

$$\lambda_{\text{max}} = 237.5 \text{ m}\mu \text{ (log } \xi = 4.47)$$

$$\lambda_{\text{max}} = 353 \text{ m}\mu \text{ (log } \xi = 4.20)$$

El espectro infrarrojo pone en evidencia un hidroxilo libre; diferencia la sustancia nueva de las otras colchicinas conocidas.

Análisis:

Encontrado: C % 55.7 H% 5.1 Cl% 16.20 N% 2.8 OMe% 20.5.

Estos valores analíticos corresponden a la fórmula bruta $C_{21}H_{23}O_6N$, para un producto solvatado que contiene 0.7 moléculas de cloroformo de cristalización.

Ejemplo 2: Acción antimitótica de la nueva sustancia tropolónica obtenida por intervención microbiológica sobre la colchicina

Se prepara 1 cc. de una solución acuosa al 1 ‰ de la sustancia nueva obtenida según el ejemplo anterior, y -



- 7 - 258275

después 1 cc. de dilución a 0,2 y 0,05 ‰. Se sumergen en cada concentración, durante 3 horas, 5 a 10 semillas de lenteja, previamente remojadas en agua durante unas-
 5 ta de celulosa embebida de agua y se deja que progrese la germinación a 20-24° C. durante 4 días. Se comparan entonces las plántulas con las de testigos no tratados o tratados por concentraciones análogas de colchicina. Las diferencias de longitud de desarrollo de las plántulas y de
 10 las radículas permite situar la acción antimitótica de la nueva sustancia. Los resultados de la experiencia se indican en el cuadro que se da a continuación.

		longitud semillas germinadas	longitud de las plántulas	longitud de las radículas	tuberi- zación
15	Agua pura (testigos)	9/10	40	60	nada
	Colchicina 1 ‰	8/8	5	7	+++
	Sust. ncia nueva 1 ‰	8/8	5	9	+++
	Colchicina 0,2 ‰	8/8	4 a 5	7	+++
20	Sustancia nueva 0,2 ‰	8/8	5 a 12	8	++

20 La acción antimitótica es, pues, sensiblemente igual a la de la colchicina.

Ejemplo 3: Obtención de una nueva sustancia tropolónica por intervención microbiológica sobre la tiocolchicina

25 Ser introducen 920 mgrs de tiocolchicina en 37 litros de un cultivo de Streptomyces griseus (ATCC, 10.137) de 48 horas de edad. Se deja incubar la mezcla durante 48 horas a la temperatura ambiente. Se extrae por 5 veces 300 cc. de cloroformo, se reúnen los extractos, se lavan con agua y se
 30 extraen nuevamente por 4 veces 100 cc. de sosa N/10. Se reú



- 8 - 258275

nen los licores sódicos, se acidifican por ácido clorhídrico y se extraen por 4 veces 25 cc. de cloroformo.

La solución clorofórmica se seca sobre sulfato magnésico y se evapora a sequedad en vacío. El residuo se disuelve en cloroformo-éter (1:1) y se pasa rápidamente sobre 10 grs. de alúmina según Brockmann. Se eluye con cloroformo, se reúnen las soluciones cloroformo-éter y cloroformo, se evapora a sequedad en vacío y se cristaliza en benceno para obtener 175 mgrs. de pequeños cristales amarillos en rombos, insolubles en éter, poco solubles en acetona, benceno y agua, solubles en metanol, etanol, cloroformo y en los licores alcalinos, p. de f. 182-184° C. (fusión - lenta en tubo) $\alpha_D^{20} = -281^{\circ} \pm 2$ ($c = 0,5$ % metanol).

La nueva sustancia obtenida según el ejemplo presente ofrece las características siguientes:

1° En etanol:

λ max 257-258 $\mu\mu$.	$\xi = 20.400$	log. 4.30
λ max 290-292 $\mu\mu$	$\xi = 10.150$	" 4.00
λ max 385 $\mu\mu$	$\xi = 16.320$	" 4.20

2° En solución sódica:

λ max 254 $\mu\mu$.	$\xi = 27.100$	" 4.43
λ max 287 $\mu\mu$.	$\xi = 15.060$	" 4.17
λ max 375 $\mu\mu$	$\xi = 15.650$	" 4.19

Análisis:

Encontrado C % 64,1 H % 5,9 N % 3,3 S % 7,5 OMe % 15,0.

Estos valores analíticos corresponden a la fórmula bruta $C_{21}H_{23}O_5NS$, para un producto solvatado que contiene 0,25 moléculas de benceno de cristalización.

Sometido al ensayo descrito en el Ejemplo 2, sobre la semilla de lenteja, este nuevo producto derivado de la tioco



- 9 - 258275

chicina muestra una excelente actividad antimitótica.

Ejemplo 4: Determinación de los índices terapéuticos de sustancias nuevas obtenidas por intervención microbiológica sobre la colchicina y la tiocolchicina.

5 Las sustancias nuevas obtenidas según los ejemplos 1 y 3 se someten a los ensayos de la toxicidad aguda por vía intraperitoneal en el ratón y de la acción antimitótica según la técnica descrita por R. JEQUIER, D. BRANCENI y M. PETERFALVI (Archives Internationales de Pharmacodynamie et de thérapie 103, 243 (1955) en la rata. Se determina la 10 DL₅₀ (dosis letal 50 % de los animales tratados) y la DAM₁₀₀ (dosis antimitótica: células en mitosis/número total de células), y después el índice terapéutico (DL₅₀ dividido por DAM₁₀₀) y se comparan los resultados obtenidos con los de 15 La N-desacetil tiocolchicina, producto que, hasta la fecha, ha dado el mejor índice terapéutico. Los resultados figuran en el cuadro siguiente:

Productos	DL ₅₀ mgrs/Kgr	DAM 100 mgrs/Kgr	índice terapéutico
Colchicina	2	0.7	3
N-Desacetil tiocolchicina	210	10	21
Sustancia nueva del ejemplo 1	200	5	40
Sustancia nueva del ejemplo 3	120	5	24

25 Los productos de la invención presentan, por tanto, índices terapéuticos no igualados hasta la fecha.

Ejemplo 5: Obtención de un cultivo bien evolucionado de Streptomyces griseus (ATCC. 10.137).

Se prepara un medio de cultivo compuesto como sigue:

258275



- 10 -

	Glucosa	10 grs.
	Líquido de maceración del maíz	10 grs.
	Harina de soja	10 grs.
	Extracto de malta seco	5 grs.
5	Carbonato cálcico	1 grs.
	Cloruro sódico	5 grs.
	Agua	c.s.p.1000 cc.

Se esteriliza a 115° C. durante 20 minutos, se enfría a 25° C., se siembra por esporas recogidas sobre ge-
 10 losa y se incuba a 25° C. durante 48 horas.

Los ejemplos anteriores no son limitativos de la in-
 vención. Se pueden emplear otros microorganismos o bien uti-
 lizar como materias de partida otras colchicinas o tiocol-
 chicinas.

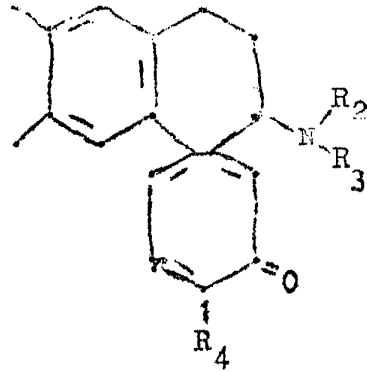
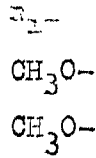
15 Esta solicitud que corresponde a la presentada en -
 Francia, el 22 de Mayo de 1.959, bajo el número PV. 795.321,
 se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Es-
 tatuto sobre Propiedad Industrial.

- N O T A -

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

25 1º.- Un procedimiento de obtención de nuevos deriva-
 dos de las colchicinas y tiocolchicinas, caracterizado por-
 que se prepara, de acuerdo con los procedimientos conocidos,
 un cultivo bien evolucionado de un microorganismo, se agre-
 ga una colchicina o una tiocolchicina de fórmula general:

258275



en la cual:

$R_1 = \text{H}, -\text{OH}, -\text{O-acilo}, -\text{O-alcoholo}, -\text{O-aralcoholo},$
 $- \text{O-heterosilo}.$

$R_2 = \text{H}, \text{ alcoholo}.$

$R_3 = \text{H}, \text{ acilo}, \text{ alcoholo}, \text{ heterosilo}.$

$R_4 = \text{O-alcoholo}, -\text{S-alcoholo}, -\text{S-alcoholo}, \text{N}$

$(R_5 = R_6 = \text{H}, \text{ alcoholo}, \text{ hidroxialcoholo})$

se deja que prosiga la incubación y se aísla el nuevo derivado por extracción con un disolvente apropiado, no miscible con el agua, cromatografía eventual y cristalización.

2º. - Un procedimiento según el punto 1, caracterizado porque el microorganismo utilizado se selecciona de las familias de los streptomyces, hongos, bacterias o levaduras.

3º. - Un procedimiento según los puntos anteriores, caracterizado porque el cultivo bien evolucionado tiene una edad de 30 a 72 horas y su pH está comprendido entre 3 y 8.

4º. - Un procedimiento según los puntos anteriores, caracterizado porque se deja que prosiga la incubación durante 24 a 90 horas.

5º. - Un procedimiento según los puntos anteriores, caracterizado porque se prepara, de acuerdo con los procedimientos conocidos, un cultivo bien evolucionado de un microorganismo, por ejemplo el *Streptomyces griseus*, se filtra el micelio, se pone de nuevo este - - -

258275



último en suspensión en un tampón acuoso a pH 5 a 8 y se añade la colchicina o la tiocolchicina, realizando el resto de las operaciones como se indica en a) y d).

5

6º. - Un procedimiento de obtención de nuevos derivados de las colchicinas y tiocolchicinas.

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

Esta Memoria consta de doce hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

10

Madrid, 1 JUN 1960

P. A.

Athanasia Elizabeta

Los Rios

MIG/.