

1. - 10.001

19501
Case 17,701-17 (JJP)



260211

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

PATENTE DE INVENCION

formulada el 6 de Agosto de 1950, con el núm. 200.211.

en

ESPAÑA

por VEINTIS años

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

"UN PROCEDIMIENTO DE PRODUCIR 7-CLORO-6-DESMETILTETRACI-
CLINA"

Este invento se refiere a la producción del antibiótico 7-cloro-6-desmetiltetraciclina por fermentación, y más particularmente, a un método mejorado para aumentar la producción de este antibiótico y disminuir la producción de 6-desmetiltetraciclina en dicha fermentación.

La 7-cloro-6-desmetiltetraciclina y la 6-desmetiltetraciclina son miembros de una nueva familia de antibióticos de tetraciclina. Las desmetiltetraciclinas se producen por ciertas cepas mutantes de S. aureofaciens derivadas del "aislado" del suelo S. aureofaciens A-377 produc-

260211



tor de clorotetraciclina, depositado en el Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, como NRR 1200. Las nuevas cepas productoras de desmetiltetraciclina se derivaron por tratamiento de A-377 con agentes mutagénicos. Cultivos de las nuevas cepas productoras de desmetiltetraciclina de S. aureofaciens están depositadas en la American Type Culture Collection, Washington, D.C. bajo los números de entrada ATCC 12551, 12552, 12553 y 12554.

En la producción de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina con las cepas mutagénicas, se ha encontrado que se producen también pequeñas cantidades de 6-desmetiltetraciclina, incluso cuando el medio contiene un nivel elevado de iones cloruro de modo que se favorece la producción de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina. La presencia de 6-desmetiltetraciclina implica difíciles problemas de separación. Por lo tanto, cualquier método que diera por resultado una mayor producción de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina y menor producción de 6-desmetiltetraciclina, sería de gran valor.

El presente invento se basa en el descubrimiento de que el cobre es esencial para la biosíntesis de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina. Por lo tanto, la adición de cobre a dichas fermentaciones en cantidades pequeñas, cuidadosamente controladas, tiende a aumentar la producción de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina y a disminuir la producción de 6-desmetiltetraciclina que suele producirse simultáneamente. Por la adición de cobre a la fermentación a ciertos niveles definidos, se ha encontrado que se produce solamente una cantidad de 6-desmetiltetraciclina relativamente pequeña; en realidad, tan pequeña que se hace innecesario efectuar una separación de este antibiótico del pro-



ducto principal de la fermentación.

Puede usarse cualquier fuente conveniente de cobre. Nosotros empleamos, preferiblemente, cualquier sal de cobre acuoso soluble, tal como sulfato de cobre, preferiblemente como hidrato $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Pueden emplearse análogamente otras sales de cobre, tales como nitrato, acetato, sulfato, cloruro, lactato, tartrato y citrato.

La cantidad de cobre que se añade a la fermentación es un factor de alguna importancia, ya que hay que añadir cobre suficiente para conseguir la disminución deseada en la producción de 6-desmetiltetraciclina, y sin embargo, - por encima de un cierto nivel, el cobre es decididamente tóxico para el microorganismo y la producción total de antibiótico disminuye. Se prefiere añadir al medio de fermentación como sal acuoso soluble una cantidad comprendida - entre, aproximadamente, 13 partes por millón y, aproximadamente, 250 partes por millón de cobre. A niveles de cobre por encima de 60 partes por millón, sin embargo, suele ser conveniente aumentar la concentración de nutrientes en el medio. No se conoce perfectamente la razón de esto, pero se cree que compensa de algún modo el efecto tóxico creciente que presentan los niveles incrementados de cobre.

Las condiciones de la fermentación son generalmente las mismas que para los métodos actualmente conocidos de producción de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina por fermentación. Es decir, el medio de fermentación contiene los nutrientes y sustancias minerales usuales. Entre las sustancias nutritivas adecuadas que pueden proporcionar dichas sustancias necesarias figuran: almidón, glucosa, sacarosa,



dextrosa, melazas, harina de soja, harina de cacahuete, -
lavadura, extractos de carne, peptona, sulfato amónico, y
rea, líquido de maceración del maíz, solubles de destile-
ría, harina de pescado y otras sustancias usuales. Entre
5 las sales inorgánicas figuran sustancias tales como carbo-
nato cálcico, sulfato amónico, cloruro amónico, y los di-
versos elementos traza, tales como manganeso, cobalto, -
cinc, cobre, hierro y análogos. En general, se prefiere -
usar un medio rico también en ión cloruro, ya que de este
10 modo se obtienen también mayores rendimientos de los anti-
bióticos clorados.

Las otras condiciones generales de la fermentación,
tales como concentración de ión hidrógeno, temperatura, -
tiempo, velocidad de aireación, preparación del inoculum,
15 esterilización, inoculación, y análogas, son corrientes y
pueden ser semejantes a las utilizadas para la producción
de 7-cloro-6-desmetil-tetraciclina.

En cuanto al tipo de microorganismos usados en la -
producción de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina, deben usar-
40 se cepas mutantes seleccionadas de una cepa productora de
7-cloro-6-desmetiltetraciclina de S. aureofaciens, tal co-
mo se describe en la Patente Nº 235.737.

Para recuperar la 7-cloro-6-desmetiltetraciclina --
del líquido de fermentación, se usan preferiblemente los
25 procedimientos de recuperación descritos en la patente an-
tes mencionada.

El invento se describirá con mayor detalle en rela-
ción con los ejemplos específicos siguientes.

EJEMPLO 1

30 Se preparó un medio de fermentación que contenía --

260211



Los siguientes ingredientes:

	Almidón	55	gramos	por	litro
	Líquido de maceración de maíz	25	"	"	"
	CaCO_3	8	"	"	"
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5	"	"	"
	MgSO_4	1	"	"	"
5	Harina de semilla de algodón	5	"	"	"

Sobre este medio se añadieron, en ensayos separados, cantidades variables de sulfato de cobre, hidrato, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Estos medios se distribuyeron en cantidades apropiadas en matraces, que contenían 2% (v/v) de aceite de manteca de cerdo, se esterilizaron, se inocularon con un inóculo vegetativo de una cepa productora de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina de S. aureofaciens (Cepa E-475) y se incubaron a 26,5° C. en un agitador rotatorio durante 144 horas. Después se analizó su contenido de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina. Los resultados obtenidos se dan en la tabla siguiente.

Tabla I

	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ppm.	7-Cloro-6-desmetiltetraciclina /ml.
20	0	1480
	10	1195
	50	1205
	100	1765
	150	1700

Se verá por la tabla anterior que la adición de cobre aumenta la producción de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina.

EJEMPLO 2

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 1, usando una cepa productora de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina de S. aureofaciens (Cepa E-1311) y se obtuvieron los siguientes

26 02 1 1



tes resultados:

Tabla 2

CuSO ₄ .5H ₂ O ppm.	7-cloro-6- desmetilte- traciclina γ/ml.	6-desmetilte- traciclina γ/ml.	6-desmetilte- traciclina
0	1000	560	36
10	1030	555	35
100	1445	485	25

5

EJEMPLO 3

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 2, a excep-
 ción de que la incubación se realizó a 26,5° C. durante -
 24 horas, y luego a 24° C. durante un período adicional -
 de 120 horas. Los resultados del ensayo fueron los siguien-
 tes:

10

Tabla 3

CuSO ₄ .5H ₂ O ppm.	7-Cloro-6- desmetilte- traciclina γ/ml.	6-Desmetilte- traciclina γ/ml.	6-desmetilte- traciclina
0	1710	610	26
10	1770	590	25
100	2050	500	20

15

20

EJEMPLO 4

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 3, a excep-
 ción de que la incubación se hizo a 25° C. durante 144 --
 horas. Los resultados del ensayo fueron los siguientes:

25

Tabla 4

CuSO ₄ .5H ₂ O ppm.	7-Cloro-6-desmetiltetraciclina γ/ml.
0	1740
100	1840

30

EJEMPLO 5

260211



Se preparó un medio de fermentación que contenía los siguientes ingredientes:

		gramos por litro
	Almidón	43,0
	Líquido de maceración de maíz	25,0
	CaCO ₃	7,5
	(NH ₄) ₂ SO ₄	5,6
	NH ₄ Cl	1,0
	Harina de semilla de algodón	5,0
	Harina de maíz	27,0
10	MnSO ₄	0,080
	CoCl ₂ .5H ₂ O	0,005

Sobre una porción de este medio de fermentación se añadieron 100 ppm. de CuSO₄.5H₂O, mientras que otra porción se conservó como control. Estos medios se distribuyeron en cantidades apropiadas en matraces que contenían 2% (v/v) de aceite de manteca de cerdo, se esterilizaron, se inocularon con un inóculo vegetativo de S. aureofaciens (Cepa B-1311), luego se incubaron a 26,5° C. durante 24 horas y después a 24° C. durante 120 horas, es decir, hasta la recolección. Los contenidos de los matraces se analizaron para determinar 7-cloro-6-desmetiltetraciclina y 6-desmetiltetraciclina. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 5

CuSO ₄ .5H ₂ O ppm.	7-Cloro-6-desmetiltetraciclina γ /ml.	6-Desmetiltetraciclina γ /ml.	% 6-desmetiltetraciclina
0	1975	800	29
100	2035	610	23

EXPERIMENTO 6

Se realizó una fermentación comparativa usando los



medios que se indican a continuación:

	A	B		
	55	35	gramos por litro	
Almidón				
Líquido de maceración de maíz	25	-	"	"
CaCO ₃	8	3,5	"	"
(NH ₄) ₂ SO ₄	5	-	"	"
Mg ₄ Cl	1	1	"	"
Harina de semilla de algodón	5	15	"	"
Levadura	-	5	"	"
10 Solubles de carne secos	-	10	"	"
PnCl ₂ ·4H ₂ O	-	0,005	"	"
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	-	0,050	"	"

15 Sobre porciones del medio A y el medio B se añadieron 100 ppm. de CuSO₄·5H₂O, mientras que otras porciones se conservaban como controles. Los medios se distribuyeron en - cantidades apropiadas en matraces que contenían 2% (v/v) de aceite de manteca de cerdo, se esterilizaron, se inocu-

20 laron con un inoculum vegetativo de S. aureofaciens (Cepa E-1311) y se incubaron en un agitador rotatorio a 26,5° C. durante las primeras 24 horas seguidas de incubación a - 24° C. durante un período adicional de 120 horas. Después de la recogida (144 horas) se analizaron los mostos de -- fermentación. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 6

CuSO ₄ ·5H ₂ O ppm.	A		B	
	7-Cloro-6-desmetilte traciiclina γ/ml.	6-Desmetilte traciiclina γ/ml.	7-Cloro-6-desmetilte traciiclina γ/ml.	6-Desmetilte traciiclina γ/ml.
0	2025	725	1900	470
30 100	2325	615	2625	200

260211



Ejemplo 7

Se preparó un medio de fermentación que contenía --
 Los siguientes ingredientes:

5	Almidón	45,0	gramos	por	litro
	CaCO ₃	10,5	"	"	"
	NH ₄ Cl	1,5	"	"	"
	Harina de semilla de algodón	45,0	"	"	"
	Levadura	1,5	"	"	"

Sobre este medio se añadieron, en ensayos separados, cantidades variables de CuSO₄·5H₂O. Estos medios se distribuyeron en cantidades apropiadas en matraces que contenían 3 % (v/v) de aceite de manteca de cerdo, se esterilizaron, se inocularon con un inoculum vegetativo de S. aureofaciens (Cepa MI-1723) y se incubaron en un agitador rotatorio a 25° C. durante 168 horas. Los análisis del mosto recogido dieron los resultados siguientes:

Tabla 7

CuSO ₄ ·5H ₂ O ppm.	7-Cloro-6-desmetilte-traciiclina	6-Desmetilte-traciiclina	6-Desmetilte-traciiclina
	γ/ml.	γ/ml.	
50	4340	1920	31
150	4635	1370	23
200	4510	1350	24
300	4090	1235	24

Ejemplo 8

Se preparó un medio de fermentación que contenía --
 Los siguientes ingredientes:

25	Almidón	51,0	gramos	por	litro
	CaCO ₃	11,9	"	"	"
	NH ₄ Cl	1,7	"	"	"
30	Harina de semilla de algodón	51,0	"	"	"



26

Levadura 1,7 gramos por litro

Sobre este medio se añadieron, en ensayos separados, cantidades variables de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. Estos medios se distribuyeron en cantidades apropiadas en matraces que contenían 3% (v/v) de aceite de manteca de cerdo, se esterilizaron, se inocularon con un inoculum vegetativo de S. aureofaciens (Cepa B-2047) y se incubaron en un agitador rotatorio a 25° C. durante 160 horas. Los análisis del mosto recogido dieron los resultados siguientes:

5

10

Tabla 8

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ppm.	7-Cloro-6-desmetilte-traciolina γ/ml.	6-Desmetilte-traciolina δ/ml.	6-Desmetilte-traciolina
100	4225	1845	31
150	4930	1830	28
200	4830	1750	27
300	4980	1550	24

15

EJEMPLO 9

Se preparó un medio de fermentación que contenía los siguientes ingredientes:

20

Almidón	30	gramos	por	litro
$CaCO_3$	7	"	"	"
NH_4Cl	1	"	"	"
Morina de aceite de soja	30	"	"	"
Levadura	1	"	"	"

25

Sobre este medio se añadieron, en ensayos separados, cantidades variables de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. Estos medios se distribuyeron en cantidades apropiadas en matraces que contenían

30



260211

3' (v/v) de aceite de manteca de cerdo, se esterilizaron, se inocularon con un inoculum vegetativo de S. aureofaciens (Cepa 30-2047) y se incubaron en un agitador rotatorio a 25° C. durante 180 horas. Los análisis del mosto recogido dieron los resultados siguientes:

Tabla 9

	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ppm.	7-Cloro-6-desmetilte-traciclina Y/ml.	6-Desmetilte-traciclina Y/ml.	5-Desmetilte-traciclina
10	50	2570	1415	35
	100	2955	1280	30
	200	3275	1130	26
	300	2560	765	23

EXPERIMENTO 10

Se prepararon dos medios de harina de semilla de algodón de concentración creciente, de la siguiente manera:

	<u>Medio A</u>	<u>Medio B</u>
20 Almidón	45,0 gramos por litro	60 gramos por litro
CaCO_3	10,5 " "	14 " "
NH_4Cl	1,5 " "	2 " "
Harina de semilla de algodón	45,0 " "	60 " "
Levadura	1,5 " "	2 " "

Sobre estos medios se añadieron, en ensayos separados, cantidades variables de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Estos medios se distribuyeron en cantidades apropiadas en matraces que contenían 3' (v/v) de aceite de manteca de cerdo, se esterilizaron, se inocularon con un inoculum vegetativo de S. aureofaciens



260211

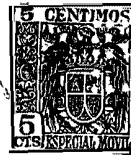
(Copa AB-2047) y se incubaron en un agitador rotativo a -
25° C. durante 160 horas. Los análisis del mosto recogido
dieron los resultados siguientes:

Table 1C

CuSO ₄ · 5H ₂ O mg/ml.	Medio A		Medio B	
	A-VIII (g) γ/ml.	A-IX (g) γ/ml.	A-VIII (g) γ/ml.	A-IX (g) γ/ml.
100	1135	615	3080	1510
200	-	-	3025	1585
300	-	-	4725	1705
400	-	-	5190	1650
500	-	-	5480	1540

3) 7-Chloro-5-deemetiltetraciclina

20) 5-Deemetiltetraciclina





26021 f

EXPERIMENTO 11

Se prepararon dos medios de Marina de aceite de soja de -
concentración creciente, de la siguiente manera:

	<u>Medio A</u>	<u>Medio B</u>
5 Almidón	40,0 gramos por litro	45,0 gramos por litro
CaCO ₃	9,0 " "	10,5 " "
NI ₄ Cl	1,3 " "	1,5 " "
10 <u>Marina</u> de aceite de so ja	40,0 " "	45,0 " "
Levadura	1,3 " "	1,5 " "

Sobre estos medios se añadieron, en ensayos separados, -
cantidades variables de CuSO₄.5H₂O. Estos medios se dis--
tribuyeron en cantidades apropiadas en matraces que conte
15 nían 3 % (v/v) de aceite de manteca de cerdo, se esterili
zaron, se inocularon con un inoculum vegetativo de S. au-
rofaciens (Cepa Md-2047) y se incubaron en un agitador
rotatorio a 25º C. durante 160 horas. Los análisis del --
mosto recogido dieron los resultados siguientes:

Tabla II

CuSO ₄ ·5H ₂ O ppm.	Medio A		Medio B	
	A-VIII (a) γ/ml.	A-IX (aa) γ/ml.	A-VIII (c) γ/ml.	A-IX (cc) γ/ml.
300	3520	1710	2470	1730
400	3695	1635	2970	1890
500	3090	1515	2900	1830
700	2635	1185	3180	1705

1 15 1

a) 7-Cloro-6-desmetiltetraciclina
 aa) 6-Desmetiltetraciclina

26 211

2602 1





260211

La presente solicitud que corresponde a la presenta
da en M.U.A., el 7 de Agosto de 1959, bajo el número ---
832.134, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vi
gente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

H O C E A

10 Los puntos de invención propia y nueva que se pro--
sentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente
de Invención en España por VEINTI años, son los siguien--
tes:

15 1ª.- Un procedimiento de producir 7-cloro-6-desmetil
-tetraciclina, por fermentación aeróbica de un medio de -
fermentación acuoso con una cepa de s-Aureofaciens produc
tora de 7-cloro-6-desmetil-tetraciclina, caracterizado --
por realizar la fermentación en presencia de cobre adicio
nal añadido al medio de fermentación de modo que se aumen
te la producción de 7-cloro-6-desmetil-tetraciclina en re
20 lación con la producción de 6-desmetil-tetraciclina.

2ª.- Un procedimiento según el punto 1ª, caracteri
zado porque hay aproximadamente de 13 a 250 partes por mi
llón de cobre adicional en el medio de fermentación.

25 3ª.- Un procedimiento según los puntos 1ª o 2ª, ca
racterizado porque hay aproximadamente de 13 a 60 partes
de cobre adicional en el medio de fermentación.

4ª.- Un procedimiento de producir 7-cloro-6-desme--
tiltetraciclina.

30 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antece--
de, y para los fines que se han especificado.

260211

70



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

Madrid, 7 OCT. 1911

Alberto de Cárdenas
Por Poder.

G.D.S. *pe*