



NOV. 1960

262241

262241

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

por «PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR NUEVOS DERIVADOS DE ANTIBIOTICOS DE TETRACICLINA», a favor de la firma italiana CARLO ERBA S.p.A., domiciliada en MILAN (Italia), Via Imbonati 24.

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a nuevos derivados de antibióticos de tetraciclina y a su preparación. Más particularmente se refiere a la preparación de nuevos derivados de antibióticos de tetraciclina que son fácilmente solubles en agua con un pH cercano a la neutralidad y eficaces cuando se administran oral, intravenosa o intramuscularmente.

5.

La expresión «antibióticos de tetraciclina», siempre que se emplea en esta memoria, se entiende que comprende la clorotetraciclina, la oxitetraciclina, la

10.

262241

719



tetraciclina, la desmetil-tetraciclina y los derivados de estos compuestos que poseen actividad antibiótica.

Es sabido que pueden obtenerse derivados de tetraciclina fácilmente solubles en agua haciendo reaccionar una tetraciclina con formaldehído y ciertos compuestos amino, como una dialkilamina, piperidina, morfolina o piperazina. El grupo aminometilo que así se introduce en la molécula de la tetraciclina puede enlazarse a un átomo de carbono del sistema cíclico tetraciclínico (memorias de las patentes alemanas Nº 1,044,806 y Nº 1,063,598) o al átomo de nitrógeno del grupo carbonamida de la molécula tetraciclínica (memoria de la patente inglesa Nº 809,585 y patente alemana Nº 1,088,481). Los derivados aminometilo así obtenidos son tan eficaces como la tetraciclina en la actividad antibacteriana, cuando se administran intravenosamente; sin embargo, son considerablemente inferiores cuando se administran oralmente (E.N. Ewald y G.S. Redin, Antibiotics and Chemotherapy, 1960, páginas 419-421).

La peticionaria ha hallado que muchos aminoácidos son incapaces de reaccionar con los antibióticos de tetraciclina y el formaldehído sin la formación de productos acuosolubles que posean estabilidad suficiente para la hidrólisis y puedan emplearse para fines parenterales. El producto obtenible, por ejemplo, haciendo reaccionar 1 mol de tetraciclina, 1 mol de formaldehído y 1 mol de glicocola es tan inestable en solución acuosa, que la tetraciclina, difícilmente soluble, precipita al cabo de breve tiempo. Cuando se emplean ornitina o arginina en lugar de glicocola, los productos obtenidos



poseen también escasa estabilidad respecto al agua.

Ahora hemos descubierto que pueden obtenerse nuevos derivados de los antibióticos de tetraciclina con buena estabilidad respecto al agua si se hace reaccionar 1 mol de un antibiótico de tetraciclina con aproximadamente 1-2 moles de formaldehído y aproximadamente 1 mol de una lisina. Estos productos son asimismo eficaces en aplicación parenteral y oral.

5.

10.

La reacción entre los tres componentes mencionados antes puede llevarse a cabo en un proceso de una sola etapa, mediante la reacción de los tres componentes entre sí. También se puede hacer reaccionar en primer lugar el formaldehído con uno de los otros dos componentes y luego añadir el componente restante.

15.

En calidad de antibióticos de tetraciclina usamos de preferencia tetraciclina en forma de base libre. El formaldehído se emplea de preferencia en forma de sus soluciones acuosa o alcohólica. En lugar de formaldehído, pueden emplearse compuestos que sean capaces de formar formaldehído en las condiciones de la reacción.

20.

La reacción se lleva a cabo de preferencia en presencia de disolventes o diluentes. Nosotros preferimos emplear disolventes orgánicos tales como el metanol o mezclas de agua y disolventes orgánicos. El agua sola no puede emplearse como disolvente.

25.

La reacción en una sola etapa se efectúa de preferencia a temperatura ligeramente elevada, por ejemplo 30 a 40°C, empleando metanol o mezclas de metanol y poca agua como disolvente.

30.

Cuando se procede en dos etapas, se puede hacer



262241

reaccionar lisina con 1 mol de formaldehído en solución acuosa o alcohólica, o con 2 moles de formaldehído en solución acuosa. El producto intermedio así formado puede aislarse de la solución, disolverse en metanol y un poco de agua y añadirse a la solución de tetraciclina en metanol a temperatura de 30-40°C aproximadamente.

5.

Cuando se hacen reaccionar tetraciclina y formaldehído en la primera etapa, la reacción se lleva a cabo de preferencia suspendiendo la tetraciclina en un diluyente apropiado tal como un butanol, añadiendo el formaldehído a temperatura normal y calentando la mezcla así obtenida hasta ebullición en reflujo durante unos 30 minutos. El producto de reacción se precipita por enfriamiento y se aísla. El producto aislado y la cantidad equivalente de lisina se disuelven en un disolvente adecuado, tal como el metanol, y la solución se calienta a temperatura ligeramente elevada, como se ha dicho antes.

10.

La constitución química de los productos de reacción no se ha concretado todavía. Lo más probable es que el producto de la reacción sea una tetraciclina/metileno/lisina de la fórmula general

15.

A - CH<sub>2</sub> - B

20.

en la que A representa el radical de un antibiótico de tetraciclina y B representa el radical de una lisina. El análisis prueba la corrección de este supuesto. La rotación óptica de los productos de reacción es diferente de los valores de la tetraciclina y la lisina. El producto de reacción es relativamente estable respecto al agua. Las soluciones acuosas de los productos de reacción se mantienen límpidas a temperatura ambiente durante unas 24 horas. Esto

25.



permite aislar los productos de la reacción liofilizando sus soluciones acuosas.

Respecto a las propiedades terapéuticas de nuestro nuevo producto, se han determinado los hechos siguientes; que se determinan en las adjuntas hojas de dibujos.

5.

Los niveles sanguíneos de pacientes que se sometieron a tratamiento en parte con tetraciclina-metilen-L lisina (o sea un producto en conformidad con este invento),

10.

en parte con pirrolidina-metil-tetraciclina (o sea un producto conforme a la patente alemana No. 1.044.806) y en parte con clorhidrato de tetraciclina, figuran en la tabla 1

de la figura 1. Los productos en cuestión se administraron intramuscularmente. Por la tabla 1 de la figura 1 puede verse que el producto de este invento origina niveles san-

15.

guíneos más elevados que los otros dos productos. Cada paciente recibió 100 mg (calculado a base de tetraciclina).

Esta dosis se administró una sola vez en cada caso. Por la tabla 2 de la figura 2 puede verse que el producto del invento origina niveles sanguíneos superiores a los de la

20.

pirrolidina-metil-tetraciclina (o sea un producto en conformidad con la patente alemana 1,044,806). Los productos

en cuestión se administraron intramuscularmente. Cada paciente recibió 250 mg (calculado a base de tetraciclina).

Esta dosis se administró una sola vez en cada caso.

25.

La tabla 3 de la figura 3 muestra los niveles sanguíneos que se obtuvieron con tetraciclín-metilen-L lisina (o sea un producto en conformidad con el invento) y el clor-

hidrato de tetraciclina. Los antibióticos se administraron per os. Cada paciente recibió 150 mg (calculado a base de

30.

tetraciclina) cada 6 horas. La tabla 3 de la figura 3 muestra



262241

los niveles sanguíneos que se obtuvieron con el producto en conformidad con el invento son superiores a los niveles sanguíneos obtenidos con el clorhidrato de tetraciclina.

5. La tabla 1 de la figura 1, manifiesta que; 2 es tetraciclín-metilen-L lisina, representada en línea continua; 3 es pirrolidín-metil-tetraciclina, representada en línea de trazos; 4 es clorhidrato de tetraciclina, representada en línea de trazo y punto. Dicha figura es la determinación microbiológica sobre placa de agar con B. cereus var. myccides.  
10. En la que la línea de ordenadas corresponde a los  $\mu\text{g/ml}$  y la línea de abcisas representa las horas.

15. La tabla 2 de la figura 2, manifiesta que; 2 es tetraciclín-metilen-L lisina, representada en línea continua; 3 es pirrolidín-metil-tetraciclina, representada en línea de trazos. Dicha figura es la determinación microbiológica sobre placa de agar con B. cereus var. myccides. En la que la línea de ordenadas corresponde a los  $\mu\text{g/ml}$ . y la línea de abcisas representa las horas.

20. La tabla 3 de la figura 3, manifiesta que; 2 es tetraciclín-metilen-L lisina, representada en línea continua; 3 es clorhidrato de tetraciclina, representada en línea de trazos. Dicha figura es la determinación microbiológica sobre placa de agar con B. cereus var. myccides. En la que la línea de ordenadas corresponde a los  $\mu\text{g/ml}$ . y la línea de abcisas representa las horas.  
25.

30. La tabla 4 muestra la toxicidad en los ratones del clorhidrato de tetraciclina, la pirrolidín-metil-tetraciclina (o sea un producto en conformidad con la patente alemana No. 1.044,806) y la tetraciclín-metilen-L lisina (o sea un producto en conformidad con el invento).La



expresión DL<sub>50</sub> significa la toxicidad aguda en mg/kg.

Los productos se administraron intravenosamente. El volumen de cada dosis ascendió a 0,4-0,6 ml/20 g. Las dosis se administraron con una rapidez de 1 ml/min. Por la tabla 4 puede verse que la toxicidad del producto conforme a este invento es considerablemente menor que la toxicidad de los otros dos productos.

5.

T A B L A 4.

	Clorhidrato de tetraciclina	Pirrolidin-metil-tetraciclina	Tetraciclín-metilén-L lisina
DL 50 del producto	220	125	320
DL 50 del clorhidrato de tetraciclina	220	115	253

De las curvas se desprende la posibilidad de reducir la dosis de tetraciclín-metilén-L lisina (o sea un producto en conformidad con el invento) para obtener los mismos niveles sanguíneos y el mismo efecto terapéutico causados por la pirrolidin-metil-tetraciclina y el clorhidrato de tetraciclina.

10.

EJEMPLO 1.

15.

5 gramos de tetraciclina base se disuelven en 100 ml de metanol. A esta solución se añaden 2,25 gramos de clorhidrato de L-lisina en 7 ml de agua y 1 ml de formaldehído al 38%.

20.

Se deja reposar la solución a temperatura ambiente durante 3 horas y se la concentra en vacío a baja temperatura hasta estado de sequedad casi completa. El residuo se disuelve con 25 ml de agua destilada y se liofiliza. Por último, se le seca en vacío sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

262241



La substancia ligeramente amarillenta que así se obtiene funde a 190 - 195°C.

Análisis: Calculado para HCl de  $C_{29}H_{38}N_4O_{10}$  : C, 54,49;  
H, 5,99;  
N, 8,76.

Hallado: C, 55,18;  
H, 6,71;  
N, 8,58.

Humedad, 7,78 (determinada por el método de Karl Fischer).

EJEMPLO 2.

5. 1 ml de formaldehído acuoso al 38% se disuelve en una solución de 5 gramos de tetraciclina base en 160 ml de metanol; mientras se agita a 30°C, se añaden 1,75 gramos de DL-lisina en 3 ml de agua y 10 ml de metanol. Al cabo de unos minutos se inicia precipitación. Se prosigue la agitación durante unas dos horas. Luego se separa por
10. filtración el precipitado y se le lava con una pequeña cantidad de metanol y éter. Después de secar en vacío a 60°C, se obtiene un polvo amarillo, muy soluble en agua, que funde por encima de 200°C con descomposición lenta.

Análisis: Calculado para  $C_{29}H_{38}N_4O_{10}$  : C, 57,79;  
H, 6,35;  
N, 9,25.

Hallado: C, 57,59;  
H, 6,82;  
N, 8,52.

15. El producto puede convertirse en una sal de adición de ácido (por ejemplo: Inorgánico: clorhídrico, sulfúrico; Orgánico: fórmico, acético, oxálico, cítrico,

-9-

26224 1 7 110



ascórbico) por solución en agua seguida por la adición de una equivalencia de ácido.

EJEMPLO 3.

5. A una solución de 6 gramos de tetraciclina en 200 ml de metanol se añaden, a temperatura de 30°C, 2,4 ml de formaldehído acuoso al 38%. Luego se añaden 2 gramos de L-lisina disueltos en una mezcla de 3,4 ml de agua y 12 ml de metanol.

10. A continuación se sigue un procedimiento semejante al descrito en el ejemplo 2. El producto es un polvo amarillo, soluble en agua y que empieza a descomponerse lentamente por encima de 190°C.

$[\alpha]_D^{25} \sim -195^\circ (0,5\% \text{ de agua}).$

EJEMPLO 4.

15. A una solución de 5 gramos de tetraciclina base en 200 ml de metanol se añaden lentamente, mientras se agita a temperatura ambiente, 1.78 gramos de L-"metilenu"-lisina disueltos en 1,5 ml de agua y 2 ml de metanol.

20. El producto precipitado se filtra al cabo de 90 minutos, luego se lava con éter y se seca en vacío a 50°C.

El producto así obtenido es un polvo amarillo que se descompone lentamente por encima de 200°C.

Análisis: Calculado para  $C_{29}H_{38}N_4O_{10}$  : C, 57,79;

H, 6,35;

N, 9,25.

Hallado

C, 57,12;

H, 6,33;

N, 9,44.



262241

Humedad, 6,7.

La L-"metilen"-lisina puede obtenerse de la manera siguiente:

5. 1 mol de L-lisina se disuelve en una pequeña cantidad de metanol acuoso. A la solución así obtenida se añade una solución de 1 mol de formaldehído en metanol. Se precipita el producto de la reacción, se le separa por filtración y se le lava con una pequeña cantidad de metanol.

10. EJEMPLO 5.

15. A una solución de 5 gramos de tetraciclina en 160 ml de metanol se añade 1 ml de formaldehído acuoso al 38%, mientras se agita a temperatura de 30°C. Luego se añaden 1,75 gramos de L-lisina base en 3 ml de agua y 10 ml de metanol. Al cabo de pocos minutos se inicia la precipitación. Se prosigue la agitación durante unas dos horas. Se separa por filtración el precipitado y se le lava con una pequeña cantidad de metanol y éter. Después de secar en vacío a 60°C, se obtiene un polvo amarillo, muy soluble en agua, que funde por encima de 200°C con descomposición lenta.

20. El rendimiento asciende al 82%;  $[\alpha]_D^{25} \sim -200^\circ$  (0,5% de agua).

25. Análisis: Calculado para  $C_{29}H_{38}N_4O_{10}$  : C, 57,79;

H, 6,35;

N, 9,25;

Hallado: C, 57,30;

H, 5,95;

N, 9,02.

Humedad, 10,49.



7 No

- 11 -

262241

EJEMPLO 6.

5. A una solución de 5 gramos de tetraciclina en 200 ml de metanol se añaden 1,1 ml de formaldehído alcohólico al 35%. Mientras se agita a 35°C, se añaden a la solución 1,65 gramos de L-lisina disueltos en una mezcla de 5 ml de agua y 7 ml de metanol. Se agita la suspensión durante 90 minutos y luego se la filtra. El precipitado se lava con una pequeña cantidad de éter. El rendimiento asciende a 5,2 gramos de un polvo amarillo que empieza a descomponerse por encima de 200°C.

10. Se prepararon productos correspondientes empleando oxitetraciclina, desmetil-clorotetraciclina o desmetil-tetraciclina en lugar de la tetraciclina como en el ejemplo 6.

15. EJEMPLO 7.

10,5 gramos de tetraciclina base se suspenden en 160 ml de butanol terciario; a la mezcla así obtenida se añaden 4,1 ml de formaldehído acuoso al 38% y unos pocos cristales de carbonato sódico, mientras se agita.

20. Se prosigue la agitación de la mezcla durante 15 minutos, a temperatura ambiente, luego se calienta hasta ebullición y se refluje durante un período de 30 minutos. Se filtra la solución mientras está caliente, para eliminar los vestigios de material insoluble. El filtrado se enfría a temperatura ambiente y el precipitado así obtenido se separa por filtración y se seca en vacío a 50°C.

25. El producto es un polvo ligeramente amarillo, muy soluble en agua y que empieza a descomponerse por encima de 190°C.

30.

26224



A 2 gramos de esta substancia, disueltos en 60 ml de metanol, se añade una solución de 0,618 gramos de L-lisina en 1 ml de agua y 4 ml de metanol.

Pronto se inicia la precipitación, y se prosigue la agitación durante 1 hora. El precipitado se filtra y se seca en vacío a 50°C. El producto es un polvo amarillo, muy soluble en agua y que presenta las mismas características que el descrito en el ejemplo 5.

$[\alpha]_D^{25} \sim -200^\circ$  (0,5% de agua).

10. Análisis: Calculado para  $C_{29}H_{38}N_4O_{10}$  :
- |    |        |
|----|--------|
| C, | 57,79; |
| H, | 6,35;  |
| N, | 9,25.  |
- Hallado:
- |    |        |
|----|--------|
| C, | 57,42; |
| H, | 6,67;  |
| N, | 9,47.  |

15. Humedad, 5,47.

EJEMPLO 8.

20. A una solución de 3 gramos de clorotetraciclina en 150 ml de metanol se añaden, a temperatura ambiente, 0,55 ml de formaldehído acuoso al 38% y una solución de 1,15 gramos de clorhidrato de L-lisina en 3 ml de agua. Se agita la mezcla durante un período de 4 horas a temperatura ambiente. El precipitado se separa por filtración y se lava con metanol y éter.

25. El producto así obtenido, después de secado en vacío a 60°C, es un polvo amarillo que empieza a descomponerse por encima de 190°C.

- 13 -

26224



Análisis: Calculado para HCl de  $C_{29}H_{37}ClN_4O_{10}$ : C, 51,70;  
 H, 5,68;  
 N, 8,31.

Hallado: C, 52,04;  
 H, 6,07;  
 N, 7,58.

5.

Humedad, 0,99.

La invención, dentro de su esencialidad, puede ser desarrollada en otras formas de realización que difieran en detalle de la indicada a título de ejemplo, a las cuales alcanzará igualmente la protección que se recaba. Podrá, pues, realizarse con los medios y aparatos más adecuados por quedar todo ello comprendido dentro del espíritu de las reivindicaciones.

10.

= . =

N O T A

15.

Descrito el invento se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la patente italiana No. A 23073 del 23 de noviembre de 1.959.

20.

1. Procedimiento para preparar nuevos derivados de antibióticos de tetraciclina, que comprende el hacer reaccionar 1 mol de un antibiótico de tetraciclina con aproximadamente 1-2 moles de formaldehído y aproximadamente 1 mol de una lisina.

25.

2. Procedimiento para preparar nuevos derivados de tetraciclina que comprende el hacer reaccionar 1 mol de tetraciclina con aproximadamente 1-2 moles de formaldehído



262241

y aproximadamente 1 mol de lisina en presencia de metanol o mezclas de metanol con un poco de agua a temperatura entre 30 y 40°C aproximadamente.

5. 3. Procedimiento para preparar nuevos derivados de tetraciclina que comprende el hacer reaccionar 1 mol de tetraciclina con 1-2 moles aproximadamente de formaldehído y 1 mol aproximadamente de L-lisina en presencia de metanol o mezclas de metanol con un poco de agua y a temperatura entre 30 y 40°C aproximadamente.
10. 4. Procedimiento para preparar nuevos derivados de tetraciclina que comprende el hacer reaccionar 1 mol de lisina con 1-2 moles de formaldehído, el aislar el producto de la reacción y el hacer reaccionar 1 mol del producto de la reacción, en presencia de metanol o mezclas de metanol con un poco de agua, con 1 mol aproximadamente de tetraciclina a temperatura de 30 a 40°C aproximadamente.
15. 5. Procedimiento para preparar nuevos derivados de tetraciclina que comprende el hacer reaccionar 1 mol de tetraciclina y 2 moles de formaldehído en presencia de un diluyente, el aislar el producto de la reacción y el hacer reaccionar el producto aislado con la cantidad equivalente de lisina en presencia de metanol o mezclas de metanol con un poco de agua.
20. 6. Procedimiento para preparar nuevos derivados de antibióticos de tetraciclina.
- 25.

Según se describe y reivindica en la presente memoria que consta de catorce páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras, acompañadas de 2 láminas de dibujos.

Madrid, a 7 de noviembre de 1.960.

30. CARLO ERBA S.p.A.

p. a.

R/pp.  
tr:sb.

262241



Fig. 1

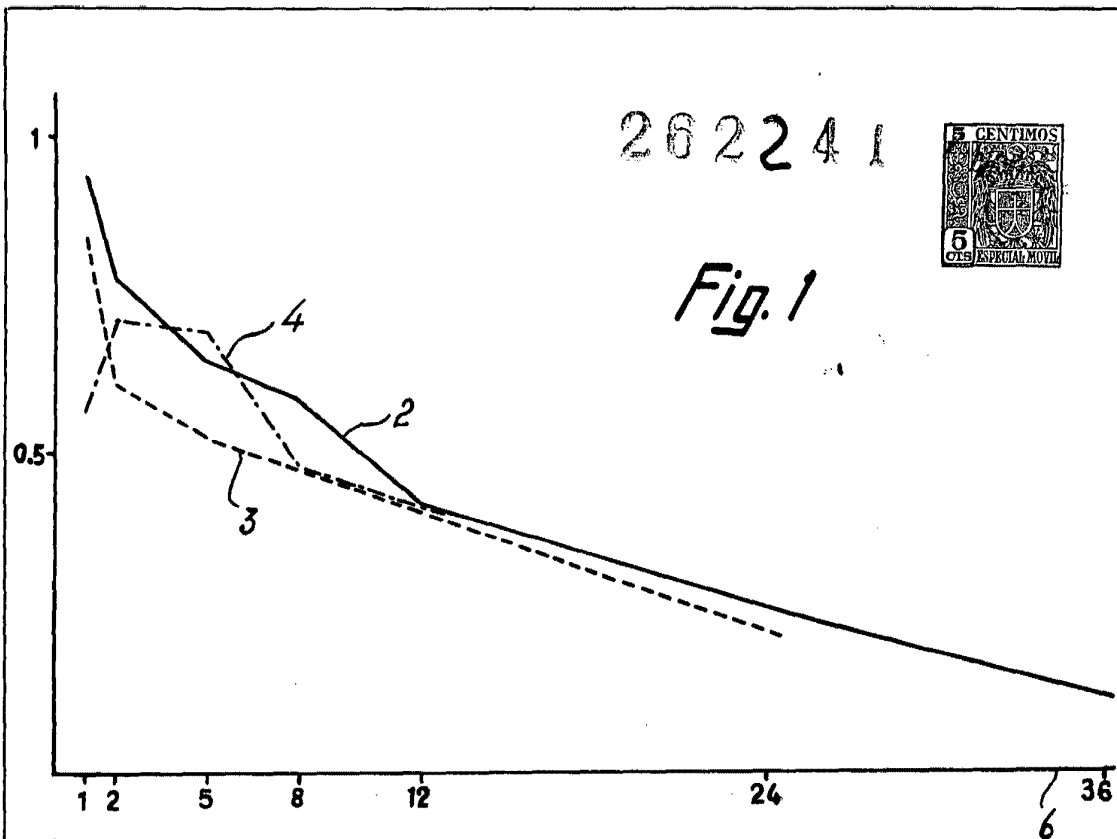
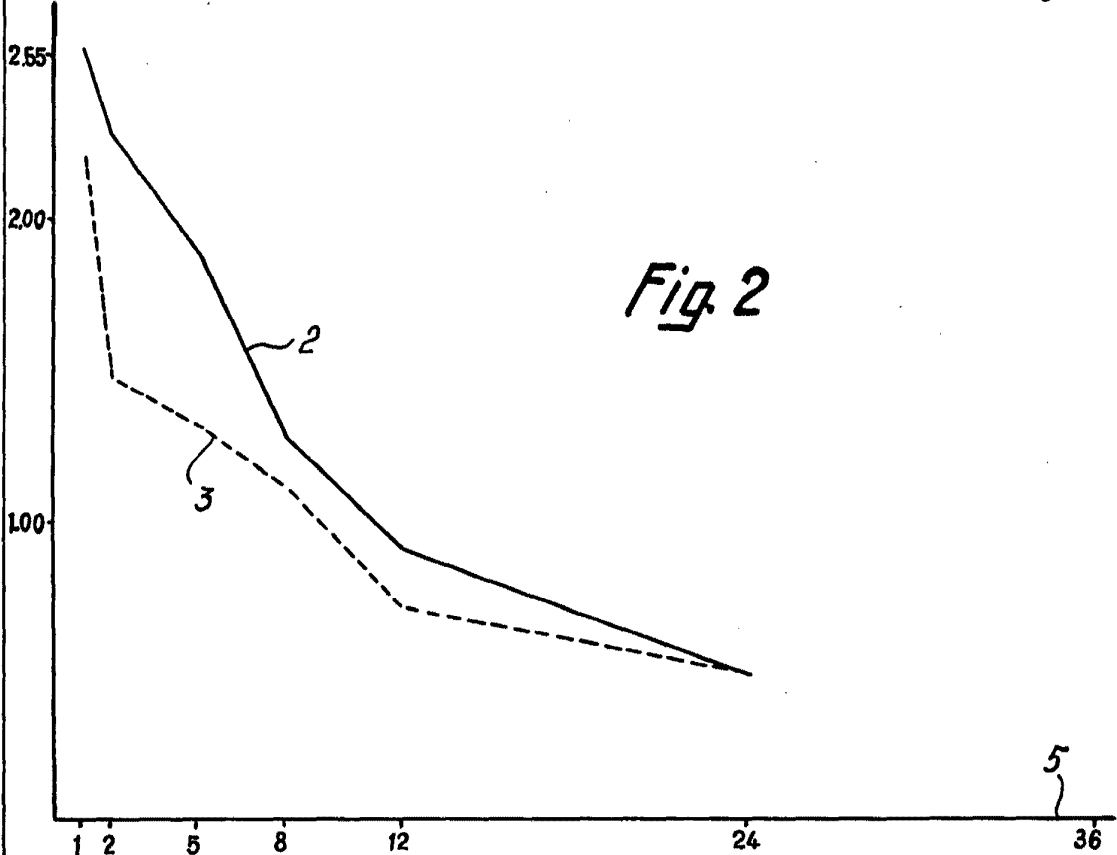
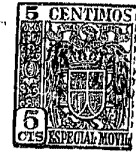


Fig. 2

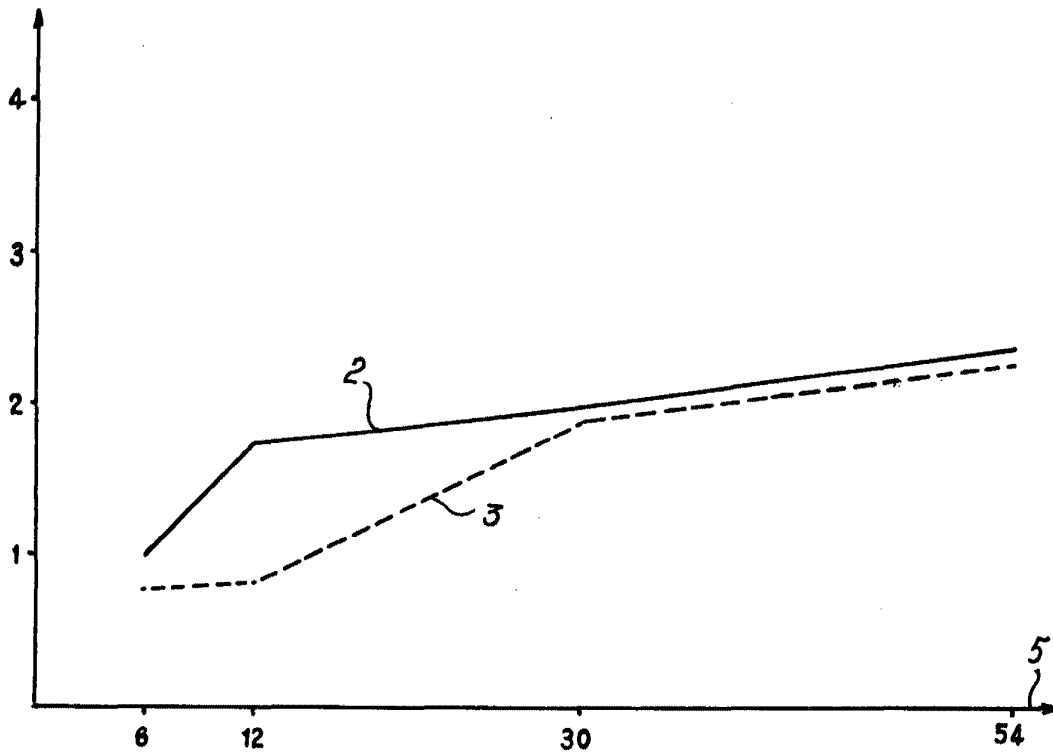


Madrid, 7 Noviembre 1960  
Jaime Isern  
p.p.



262241

Fig. 3



Madrid, 7 Noviembre 1960  
Jaime Isern

p.p.