

P.-20.657

A 52.026  
Case 17820 - LJR (LJR)



264293

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

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

formulada el 24 de Enero de 1961, con el Núm. 264.293

en

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 PRODUCIR 7-CLORO-6-DESMETIL-  
TETRACICLINA"

Este invento se refiere a un nuevo procedimiento de preparación de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina.

La 7-cloro-6-desmetiltetraciclina es un término de una nueva familia de antibióticos de tetraciclina y, hasta ahora, ha sido producido mediante determinadas cepas mutantes de S. aureofaciens, derivadas de cepas de S. aureofaciens productoras de 7-clorotetraciclina.

De acuerdo con el presente invento, se consigue un procedimiento de producción de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina, que

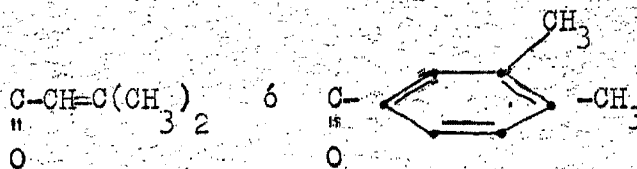
264293



comprende la fermentación de un microorganismo productor de tetraciclina o de 7-clorotetraciclina, del género *Streptomyces*, en un medio nutritivo acuoso, en presencia de una cantidad eficaz de un inhibidor de metilación, que tenga la fórmula:



o una sal básica del mismo, en donde  $R_1$  es H ó  $\text{NH}_2$ , y  $R_2$  es fenilo, piridinilo, triazinilo, piridazinilo, pirimidinilo,



El mecanismo mediante el cual se produce 7-cloro-6-desmetiltetraciclina, en un medio en el que se hayan añadido estos inhibidores de metilación y que fermenta con cepas usuales de *S. aureofaciens* que ordinariamente producen 7-clorotetraciclina o tetraciclina, no se comprende completamente y no se anticipa ninguna teoría en relación con ello. Es un hecho demostrable, sin embargo, que, mediante el empleo de los inhibidores de metilación del presente invento, se produce, con buen rendimiento, la 7-cloro-6-desmetiltetraciclina.

El presente invento no está relacionado, en particular, con ningún microorganismo específico, excepto en la extensión que se refiere a aquellos microorganismos que producen 7-clorotetraciclina y tetraciclina por biosíntesis fermentativa. Según nuestro conocimiento actual, todos estos microorganismos son del género *Streptomyces*. La especie *S. aureofaciens* que

264293



5 produce 7-clorotetraciclina en medios de fermentación en los que se hallen presentes iones cloruro, así como numerosos mu-  
tantes naturales e inducidos, se utiliza, desde luego, de pre-  
ferencia, y dichos microorganismos producirán, sin duda, te-  
traciclina cuando se eliminen los iones cloruro. En la biblio-  
10 grafía de patentes se ha citado una serie de otros microorga-  
nismos productores de 7-clorotetraciclina y tetraciclina, que  
se sostiene que son especies distintas de Streptomyces, como,  
por ejemplo, S. viridifaciens, S. sayamaensis, S. feofaciens e,  
15 incluso, otros. Los datos morfológicos publicados sobre estos  
microorganismos son insuficientes para determinar inequívoca-  
mente si son o no nuevas especies o simplemente cepas de S.  
sauereofaciens. Sin embargo, aparte de esto, el presente invento  
no se refiere a la selección de una especie particular de microor-  
ganismos, siempre que el microorganismo produzca tanto 7-cloro-  
tetraciclina como tetraciclina.

20 Las condiciones de la fermentación son, en general, las  
mismas de los métodos actualmente conocidos de producción de  
tetraciclina ó 7-clorotetraciclina por fermentación. Así, el  
medio de fermentación contiene las sustancias nutricias y mi-  
nerales usuales. Entre las sustancias nutricias apropiadas se  
incluyen el almidón, dextrosa, azúcar de caña, glucosa, mela-  
zas, harina de soja, harina de cacahuete, levadura, extractos  
de carne, peptona, sulfato amónico, urea, líquidos de macera-  
25 ción de maíz, productos solubles de destilería, sales inorgá-  
nicas y otras sustancias usuales. Las sales inorgánicas inclu-  
yen productos, como el carbonato cálcico, sulfato amónico, clo-  
ruro amónico, y los diversos elementos traza, como el manganeso,  
cobalto, cinc, cobre, hierro y análogos.

30 Las otras condiciones generales de la fermentación, como

264293



la concentración de iones hidrógeno, temperatura, tiempo, velocidad de aireación, preparación del inóculo, esterilización, inoculación y similares, son las usuales y pueden ser análogas a las empleadas para la producción de 7-clorotetraciclina.

5. La cantidad de inhibidor que puede utilizarse, es un factor de cierta importancia. En general, hemos descubierto que, un intervalo adecuado, varía desde 10 mg por litro a 1000 mg por litro, aproximadamente. Los inhibidores puede utilizarse, asimismo, en forma de sales básicas, como, por ejemplo, sus sales de metal alcalino y/o de metal alcalinotérreo, si se desea.

15. Se ha observado, asimismo, que la acción de los inhibidores de metilación del presente invento puede invertirse y con ello controlarse mediante la adición de ácido p-aminobenzoico y/o ácido fólico. Así, si se añade ácido p-aminobenzoico o ácido fólico al medio de fermentación, junto con un inhibidor de metilación como la sulfadiazina, no se observa inhibición de la metilación en 6 de la estructura ciclica de nafceno.

20. El invento se describirá, con más detalle, en relación con los siguientes ejemplos específicos.

#### EJEMPLO 1

25. Se preparó un medio de inoculación, de acuerdo con la fórmula siguiente:

Sacarosa	30 gramos
Líquidos de maceración de maíz	20 gramos
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 gramos
$\text{CaCO}_3$	7 gramos



284293

Agua hasta 1000 mililitros

Una parte alícuota de 100 ml de este inóculo se colocó en cada uno de los matraces de una serie de ellos de 500 ml.

5 Los matraces y su contenido se esterilizaron en un autoclave durante 20 minutos, a una presión de 1 kg por  $\text{cm}^2$ , enfriándose, a continuación, a  $25^\circ \pm 5^\circ \text{C}$ . Esporas de Streptomyces aureofaciens cepa S-77 se separaron por lavado de una muestra de agar nutricio con agua destilada estéril, formando una suspensión que contenía, aproximadamente,  $1 \times 10^8$  esporas por mililitro.

10 Una parte alícuota de 1,0 ml de esta suspensión se añadió a un matraz de 500 ml, que contenía 100 ml de medio estéril enfriado. El matraz que contenía el medio sembrado se incubó a  $28^\circ \text{C}$  durante 24 horas, en un agitador de vaivén que actuaba a razón de 116 oscilaciones por minuto.

15 Se preparó un medio de fermentación de acuerdo con la fórmula siguiente:

	Almidón	55,0 gramos
	Líquidos de maceración de maíz	25 gramos
20	$\text{CaCO}_3$	9 gramos
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 gramos
	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2 gramos
	$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,5 gramos
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,060 gramos
25	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,100 gramos
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,050 gramos
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,005 gramos
	Agua hasta	1000 mililitros

30 Porciones de 25 ml de este medio se colocaron en cada uno de

264293



los matraces de una serie de erlenmeyer de 250 ml y se añadieron, a cada matraz, 0,5 ml de aceite de manteca de cerdo. A uno de los dos matraces (A), elegido en esta serie, se le añadieron 1,25 mg de sulfadiazina sódica, conservándose el otro matraz (B) como control. El contenido de los matraces (A) y (B) se esterilizó durante 20 minutos en un autoclave, a una presión de 1,05 kg/cm<sup>2</sup>, enfriándose después a 25° ± 5° C. Al final del periodo de incubación del inóculo de 24 horas, se añadieron a los matraces (A) y (B) partes alícuotas de 1,0 ml del inóculo vegetativo. El medio inoculado se incubó a 25° C durante 144 horas, en un agitador rotatorio que actuaba a 185 revoluciones por minuto. Terminado el periodo de fermentación, se ensayó en la masa fermentada la 7-clorotetraciclina y tetraciclina. Se determinó la presencia y la cantidad de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina por cromatografía de papel.

El matraz (A), que no contenía sulfadiazina sódica, dió un ensayo de 3600 mcg/ml de 7-clorotetraciclina, 480 mcg/ml de tetraciclina, 280 mcg/ml de 5a (11a)-dehidroclorotetraciclina. No existe evidencia de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina. El matraz (B), que contiene 50 mg/litro de sulfadiazina sódica, dió un ensayo de 2400 mcg/ml de 7-clorotetraciclina, 80 mcg/ml de tetraciclina, 130 mcg/ml de 5a (11a)-dehidroclorotetraciclina y 155 mcg/ml de 7-cloro-6-desmetiltetraciclina.

#### EJEMPLO 2

Se repitió el procedimiento del ejemplo precedente, excepto que se empleó una serie gradual de cantidades de sulfadiazina sódica. Se ensayaron las masas de fermentación, después de la recogida, mediante técnica de cromatografía de papel y se obtuvieron los siguientes resultados:



264293

Sulfadiazina            CTC  
    mg/l.                (Fluoro.)  
                             mcg.

---

		A-X <sup>4</sup>
0	7350	187
10	6900	158
30	3325	140
50	510	+ 20
70	180	+ 15

(A) Acetato de etilo  
(B) Acetato de butilo

1-CTC (Fluoro.) = 7-cloro-5a(II)

2-TC = Tetraciclina

3-A-VIII = 7-cloro-6-cloro-5a(II)

4-A-I = 7-cloro-5a(II)

5-A-IX = 6-desmetilte

x significa que esta

# significa que el



264293

EJEMPLO 3

Se repitió el procedimiento del ejemplo 2, excepto que se emplearon las cantidades indicadas de los inhibidores de metilación, aquí especificados, en lugar de sulfadiazina sódica. Los mostos de fermentación se ensayaron, después de realizada ésta, mediante técnica de cromatografía de papel. Los resultados de los ensayos se indican, a continuación, en la tabla 2:

10 TABLA 2

Ensayo cromatográfico con tiras de papel

Cualitativo	Semicuantitativo	
7-cloro-6-des- metiltetraci- clina	7-cloro-des- metiltetraci- clina mcg/ml	7-clorote- traciclina mcg/ml

15

Compuesto ppm

N'-( $\beta$ , $\beta'$ -dimetil- acroil)sulfanilamida	50	x
N'-( $\beta$ , $\beta'$ -dimetilacroil sulfanilamida	100	x
20 2-sulfanilamido-4,6-di- metil-s-triazina	100	x
3-sulfanilamido-6-metil- piridazina	100	x
3-sulfanilamido-4,6-di- metilpiridazina	100	x
3-sulfanilamido-6-meto- xipiridazina	50	x
25 3-sulfanilamido-6-meto- xipiridazina	100	x
3-sulfanilamido-6-metil- tiopiridazina	100	x
2-sulfanilamido-4-metil- pirimidina	100	x

30

264293



TABLA 2 (continuación)

Ensayo cromatográfico con tiras de papel

	Compuesto	ppm	Cualitativo		Semicuantitativo	
			7-cloro-6-des- metiltetraciclina	7-cloro-des- metiltetra- ciclina	7-cloro- traciclina	7-cloro- traciclina
				mcg/ml	mcg/ml	mcg/ml
5	2-sulfanilamido-4,6-dimetilpirimidina	100	x			
10	N'-(3,4-dimetilbenzoil)-sulfanilamida	50	x			
	N'-(3,4-dimetilbenzoil)-sulfanilamida	100	x			
	N'-(3,5-diclorofenil)-sulfanilamida	100	x	50		
15	2-sulfanilamido-6-cloropirazina	30	x	242		
	2-sulfanilamido-6-cloropirazina	40	x	125		
	2-sulfanilamido-6-cloropirazina	50	x	50		
	p,p'-diamino-difenilsulfona	50	x	375	210	
20	N'-fenilsulfanilamida	10	x	45	365	
	2-sulfanilamido-piridina	500	x	88	172	
	3-sulfanilamido-piridazina	50	x	365	405	
	3-sulfanilamido-piridazina	100	x	45	25	
25	3-sulfanilamido-4,5-dimetilpiridazina	1000	x	169	60	
	2-bencenosulfonamido-pirimidina	100	x	27	368	
	2-sulfanilamido-5-cloropirimidina	50	x	95	80	
30	4-sulfanilamido-pirimidina	50	x	234	566	
	4-sulfanilamido-pirimidina	100	x	130	52	

264293



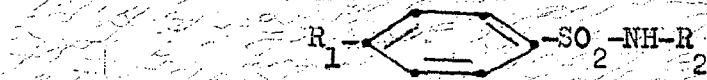
Esta solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América el 14 de Marzo de 1960, bajo el Número 14503, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto de Propiedad Industrial.

5

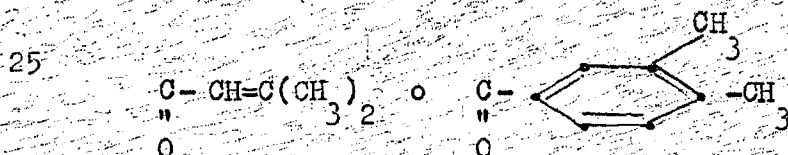
- N O T A -

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

1º.- Un procedimiento para producir 7-cloro-6-desmetil-tetraciclina, caracterizado por fermentar un microorganismo productor de tetraciclina o uno productor de 7-clorotetraciclina del genero Streptomyces en un medio nutritivo acuoso, en presencia de una cantidad efectiva de un inhibidor de la metilación que tiene la fórmula



o una sal básica del mismo, donde  $R_1$  es H o  $\text{NH}_2$  y  $R_2$  es fenilo, piridinilo, triazinilo, piridazinilo, pirimidinilo



2º.- Un procedimiento según el punto 1º, caracterizado porque dicho inhibidor de la metilación se usa en cantidades entre 10 mg por litro y 1000 mg por litro.



264293

3º.- Un procedimiento según los puntos 1º o 2º, caracterizado porque dicho microorganismo es una cepa de Streptomyces Aureofaciens.

5 4º.- Un procedimiento según cualquiera de los puntos 1º a 3º, caracterizado porque la acción del inhibidor de la metilación es controlada añadiendo ácido p-aminobenzoico y/o ácido fólico.

5º.- Un procedimiento para producir 7-cloro-6-desmetil-tetraciclina.

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

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

Madrid, 13 ABR. 1961

P.A. *[Handwritten signature]*