

P.- 23.658



-5

-5 NOV. 1962

282 166

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 AMERICAN CYANAMID COMPANY, entidad norteamericana, establecida en Berdan Avenue, Township of Wayne, Nueva Jersey, Estados Unidos de América, por:

"UN METODO DE CONVERTIR DERIVADOS NAFTACÉNICOS"



Bl. Case 19217/19451

Spain

Este invento se refiere a un nuevo procedimiento para producir tetraciclinas y a nuevos productos que se utilizan en este procedimiento.

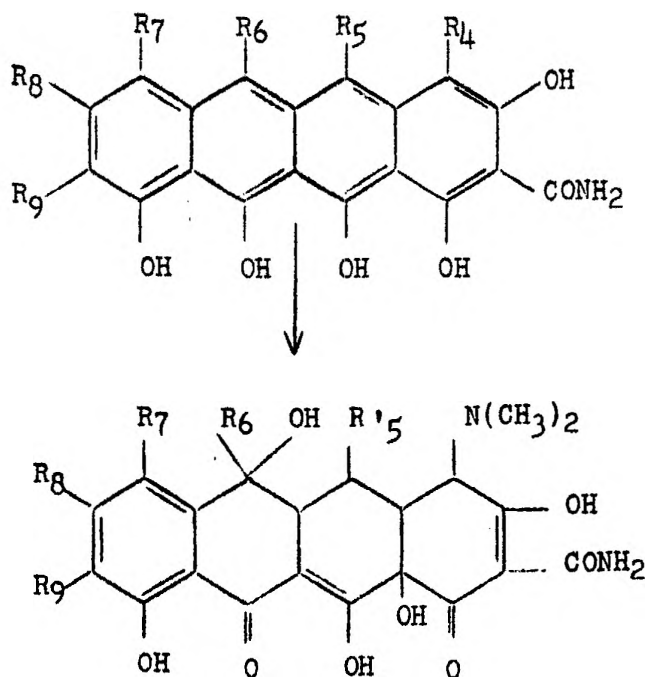
Según este invento se proporciona un procedimiento ⁵ que, mediante recursos biológicos, permite convertir derivados del naftaceno en compuestos de actividad antibiótica pertenecientes a la serie de la tetraciclina, procedimiento que se caracteriza por ponerse en contacto un derivado del naftaceno que está por lo menos sustituido ₁₀ por un grupo hidroxilo en las posiciones 1, 3, 10, 11 y 12 del anillo naftacénico y un grupo carboxamido o un grupo carboxamido con sustitución N-alcoholo en la posición



2 del anillo naftacénico en presencia de una cepa de Streptomyces que sea capaz de utilizar biológicamente tal derivado del naftaceno, con lo cual se introduce un grupo hidroxilo en las posiciones 6 y 12a del anillo del derivado naftacénico, que sirve de punto de partida y en el que, cuando la posición 4 del anillo naftacénico reaccionante no está sustituida, se introduce también un grupo dimetilamino en dicha posición 4 y, si se desea, se escoge la cepa de manera que se introduzca en el anillo del naftaceno, además de los grupos antes mencionados, un grupo 7-halo y (o) un grupo 5-hidroxi cuando las posiciones 7 y (o) 5 de los anillos del derivado naftacénico que sirve de punto de partida están ocupadas por átomos de hidrógeno.

15 Este invento se refiere más especialmente a un procedimiento novedoso destinado a transformar biológicamente las 1,3,10,11,12-pentahidroxi-naftaceno-2-carboxamidas en tetraciclinas, según puede verse en el siguiente esquema de reacción:

282166



en donde R₄ corresponde a hidrógeno o a un grupo dimetil-
amino, R₅ representa hidrógeno, un grupo alcoxi inferior
o alcoholo inferior, R'₅ representa hidrógeno, o un grupo
alcoholo inferior, y cada uno de los símbolos R₇, R₈ y R₉
5 se escoge de entre el grupo que abarca hidrógeno, un haló-
geno, un grupo hidroxil, alcoxi inferior, alcoholo infe-
rior, amino, mono(alcoholo inferior)amino, di(alcoholo
inferior)amino, nitro, nitroso, tiociano y mercapto. Los
grupos alcoholo inferior y alcoxi inferior que se tienen
10 en mira en el presente invento son los que contienen de
uno a seis átomos de carbono. Ejemplos del halógeno son
el cloro, bromo, yodo y flúor.

282166



Para mayor comodidad la 1,3,10,11,12-pentahidroxi-naftaceno-2-carboxamida se ha designado con el nombre de "pretetramida". Así, por ejemplo, las 1,3,10,11,12-pentahidroxinaftaceno-2-carboxamidas, las sustancias utilizadas
5 como punto de partida para el nuevo procedimiento del invento, pueden llamarse cómodamente derivados de "pretetramida". Por ejemplo, la 6-metil-1,3,10,11,12-pentahidroxi-naftaceno-2-carboxamida, 7-cloro-1,3,10,11,12-pentahidroxinaftaceno-2-carboxamida y 4-dimetilamino-1,3,10,11,12-
10 pentahidroxinaftaceno-2-carboxamida puede designarse más cómodamente 6-metilpretetramida, 7-cloropretetramida y 4-dimetilaminopretetramida, respectivamente.

Este invento se basa en el descubrimiento de que es posible efectuar la transformación biológica de las prete-
15 tramidas en tetraciclinas. El método del presente invento, en sus aspectos más amplios, abarca la hidratación biológica en las posiciones 5a,6- y 4a,12a- de las prete-
tramidas. Otra manera de expresar el resultado del procedimiento del presente invento es diciendo que consiste en
20 la adición neta de dos moles de agua, una mol en la posición 5a,6 y otra en la posición 4a,12a. Esta transformación se logra agregando una pretetramida sustituida o la pretetramida misma a un medio de fermentación inoculado
con una cepa de una especie del género Streptomyces, espe-
25 cie que sea capaz de producir una de las tetraciclinas.



Pueden realizarse algunas otras transformaciones biológicas simultáneamente con la deshidratación 5a,6 y 4a,12 de las pretetramidas. Por ejemplo, cuando en el esquema de reacción antes expuesto el símbolo R_4 representa hidrógeno, entonces cualquiera de los Streptomyces arriba indicados introduce un grupo metilamino en la posición 4 de la pretetramida. Cuando R_4 corresponde a un grupo dimetilamino, entonces se retiene este sustituyente en la posición 4, independientemente de las transformaciones biológicas que ocurran en el resto de la molécula de pretetramida. Cuando R_5 del esquema de reacción mencionado corresponde a hidrógeno y se utiliza una especie hidroxilante del género Streptomyces, entonces se introduce un grupo hidroxilo en la posición 5. Cuando R_5 representa un alcohol inferior o cuando R_5 corresponde a hidrógeno y se emplea una especie no 5-hidroxilante del género Streptomyces, entonces R'_5 representa un grupo alcohol inferior o hidrógeno, respectivamente. Cuando R_7 del esquema de reacción antes indicado es un sustituyente que no es hidrógeno, entonces se retiene este sustituyente en la posición 7, independientemente de las transformaciones biológicas que ocurren en el resto de la molécula de pretetramida. Cuando R_7 representa hidrógeno y se utiliza una cepa no halogenante de Streptomyces, entonces R_7 representa también hidrógeno en el producto. Cuando R_7 en



la molécula de pretetramida corresponde a hidrógeno, y se utiliza una cepa 7-halogenante del género Streptomyces entonces R₇ en el producto corresponde a cloro o bromo, según las condiciones de fermentación. Entre las cepas de S. aureofaciens que introducen cloro o bromo en la posición 7 de la molécula de pretetramida y que a la vez realizan la deshidratación 5a,6 y 4a,12 y la introducción del grupo dimetilamino cuando R₄ corresponde a hidrógeno, están las siguientes:

<u>S. aureofaciens</u>	ATCC 10762a
"	ATCC 10762b
"	ATCC 10762g
"	ATCC 10762i
"	ATCC 11989
"	ATCC 12416b
"	ATCC 12416c
"	ATCC 12416d
"	ATCC 12551
"	ATCC 12552
"	ATCC 12553
"	ATCC 12554
"	ATCC 13189
"	ATCC 13899
"	ATCC 13900
"	NRRL B-1286



<u>S. aureofaciens</u>	NRRL B-1287
"	NRRL B-1288
"	NRRL 2209
"	NRRL B-2406
"	NRRL B-2407
"	NRRL 3013

Una cepa representativa del género Streptomyces que es una cepa no halogenante, es decir, que no introduce un halógeno en la posición 7 de la molécula de pretetramida, pero que realiza la deshidratación 5a,6 y 4a,12 y la introducción del grupo dimetilamino cuando R₄ representa hidrógeno, es la S. aureofaciens NRRL 3014. Cepas representativas del género Streptomyces que no son cepas halogenantes, pero que introducen un grupo hidroxí en la posición 5 de la molécula de pretetramida, fuera de realizar la hidratación 5a,6 y 4a,12a y la introducción del grupo 4-dimetilamino cuando R₄ corresponde a hidrógeno, son: S. rimosus NRRL 2234, S. platensis NRRL 2364 y S. hygrosopicus NRRL 3015.

Los microorganismos que pueden utilizarse en el procedimiento de este invento son todos de la especie del género Streptomyces que producen tetraciclinas. Sin embargo, es preferible utilizar cepas de estas especies del género Streptomyces que no producen tetraciclinas, excepto cuando el derivado naftacénico de pretetramida que está



sustituido por lo menos por un grupo hidroxilo en la posición 1, 3, 10, 11 y 12 del anillo y hay un grupo carboxamido presente en la posición 2 del anillo en el medio de fermentación. Si se utilizan cepas de la especie del género Streptomyces que producen tetraciclinas en ausencia de las pretetramidas, se producen tetraciclinas del medio nutriente de fermentación, lo mismo que de las pretetramidas, y ello exige en algunos casos la separación de los diversos tipos de tetraciclinas. En algunos casos, puede resultar conveniente agregar la pretetramida especial a las cepas fermentantes de la especie Streptomyces que producen tetraciclinas, a fin de aumentar la producción de determinada tetraciclina.

Son pretetramidas representativas, capaces de transformarse biológicamente por el método del presente invento, utilizando una cepa no halogenante del género Streptomyces, por ejemplo: (1) la pretetramida, (2) 4-dimetilaminopretetramida y (3) 6-metil-4-dimetilaminopretetramida, que permiten obtener, respectivamente, (1) la 6-demetiltetraciclina, (2) 6-demetiltetraciclina y (3) tetraciclina. Las pretetramidas que pueden transformarse biológicamente por el método del presente invento, utilizando una cepa 7-halogenante del género Streptomyces son, por ejemplo: (1) la pretetramida, (2) 6-metilpretetramida, (3) 4-dimetilaminopretetramida y (4) 6-metil-4-dimetilamino-



pretetramida, que permiten obtener: (1) la 7-cloro-6-demetiltetraciclina, (2) 7-clorotetraciclina, (3) 7-cloro-6-demetiltetraciclina y (4) 7-clorotetraciclina, respectivamente. Una pretetramida representativa, que puede transformarse biológicamente por el método del presente invento, utilizando una cepa 5-hidroxilante del género Streptomyces es la 6-metilpretetramida, que permite obtener la 5-hidroxitetraciclina.

Es hecho muy sorprendente el que las pretetramidas puedan servir de substratos sobre los cuales puede actuar el microorganismo, de manera que se transformen las pretetramidas en tetraciclinas. En la fermentación normal, los ingredientes del medio nutriente sirven de substrato del cual se sintetiza el antibiótico. Ha sido un descubrimiento inesperado el de que compuestos químicos de tanta estabilidad estructural como las pretetramidas puedan servir de substratos para la producción de diversas tetraciclinas.

Las condiciones de la fermentación para la conversión biológica de las pretetramidas en tetraciclinas son en general las mismas que se exponen en la patente estadounidense 2.482.055, concedida a Duggar, la patente estadounidense 2.734.018, concedida a Minieri y otros, y la patente estadounidense 2.878.289, concedida a McCormick y otros y que, a su vez son en general las mismas que se



utilizan para los métodos actualmente conocidos de producir diversas tetraciclinas mediante fermentación. Es decir, el medio de fermentación contiene los nutrientes y sustancias minerales usuales. Entre los nutrientes adecuados está comprendida cualquier fuente de carbono asimilable, como los polisacáridos o los almidones, pudiendo emplearse también polialcoholes, como el glicerol. Puede proporcionarse una fuente asimilable de nitrógeno mediante el empleo de proteínas, productos de hidrólisis de las proteínas, urea, líquido de maceración de maíz, extractos de carne, peptona, productos solubles de destilerías, harina de pescado y otras sustancias corrientes. Los aniones y cationes comunes se suministran en forma de sales atóxicas de los mismos. Oligoelementos, como el manganeso, el cobalto, zinc, cobre, etc., se obtienen ya sea como impurezas en los compuestos antes indicados o mediante el uso de agua de la cañería o bien agregando específicamente soluciones enriquecidas especialmente con estos oligoelementos.

Las otras condiciones generales de la fermentación, como la concentración hidrogeniónica, la temperatura, la tasa de aireación en función del tiempo, la preparación del inóculo, la esterilización, inoculación y otras por el estilo son corrientes y semejantes a las que se utilizan para la producción de otras tetraciclinas, según se expo-



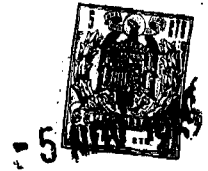
75 MIN

nen en las susodichas patentes estadounidenses concedidas a Duggar, a Minieri y otros y a McCormick y otros.

5 Cuando se utiliza una cepa 7-halogenante del género Streptomyces con una pretetramida en la que R₇ representa hidrógeno, sólo se necesita modificar el medio de fermentación, de modo que contenga por lo menos 10 partes por millón y, de preferencia, de 1000 a 1500 partes por millón de iones clorúricos cuando se desea el sustituyente 7-cloro, o una proporción análoga de iones bromúricos cuando /10 se desea el sustituyente 7-bromo.

Después que la fermentación ha continuado durante un tiempo adecuado, por ejemplo, de 12 a 96 horas, y la transformación del compuesto pretetramida en la tetraciclina que se desea ha quedado virtualmente completa, el /15 producto tetraciclina puede aislarse del mosto de fermentación de cualquier manera adecuada. El método de aislamiento puede escogerse de entre las numerosas técnicas de aislamiento que ahora se conocen bien en el arte.

La pretetramida que sirve de sustancia inicial puede /20 agregarse en cualquier concentración deseada, si bien por razones de orden práctico resulta satisfactorio un substrato de pretetramida a una concentración de hasta como 10 gramos por litro de medio de fermentación, aunque pueden utilizarse concentraciones más altas, con algún sacrificio /25 cio del rendimiento. La adición de la pretetramida que



5 sirve de sustancia inicial puede realizarse de una manera adecuada cualquiera, siempre que se obtenga el contacto de la pretetramida con el medio biológico. A este fin se prefiere agregar la pretetramida inicial en un disolvente, por ejemplo, dimetilformamida, dimetilacetamida, dimetilsulfóxido, tetrametilenosulfóxido y N-metilpirrolidona. Se prefiere, sin embargo, el dimetilsulfóxido y una solución de acetato de magnesio en dimetilsulfóxido es el disolvente que más se prefiere para la pretetramida inicial.

10 Las soluciones de pretetramidas deben protegerse contra el aire, pues estos compuestos se oxidan fácilmente en solución.

EJEMPLO 1

Conversión biológica de la pretetramida (1,3,10,11,12-pentahidroxinaftaceno-2-carboxamida) en 6-demetiltetraciclina, utilizando S. aureofaciens NRRL 3014

15 Se lavaron esporos de S. aureofaciens NRRL 3014, no clorantes, procedentes de un cultivo inclinado de agar con agua destilada estéril, a fin de formar una suspensión que contenía 60-80 x 10⁶ esporos por mililitro. Se empleó una porción de 0,33 ml. de esta suspensión para inocular un tubo de ensaye de 8 pulgadas (30,32 centímetros) que contenía 8 ml. de un medio de fermentación preparado con

20 arreglo a la siguiente fórmula:

200130



Sacarosa	30 gramos
Sulfato de amonio	2 gramos
Carbonato de calcio	7 gramos
Líquido de maceración de maíz	20 gramos
Agua de cañería en cantidad suficiente para completar	1000 mililitros

5

10

15

Antes de la inoculación se esterilizó el medio de fermentación, poniéndolo en una autoclave durante 20 minutos, a una presión de 15 libras por pulgada cuadrada (1,0545 kilogramos por centímetro cuadrado). El tubo inoculado se incubó luego por espacio de 24 horas a una temperatura de 28° C. en un agitador oscilante, que funcionaba a razón de 116 oscilaciones por minuto, obteniéndose así un inóculo de S. aureofaciens. Se preparó un medio de fermentación de la siguiente composición:

$(NH_4)_2SO_4$	6,7 gramos
$CaCO_3$	9,0 gramos
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	5,0 miligramos
NH_4Cl	2,0 gramos
$MnSO_4$ (calidad técnica, al 70 %)	0,10 gramos
Líquido de maceración de maíz	25,0 gramos
Almidón	52,5 gramos
Harina de maíz	14,5 gramos
Agua de la cañería, en cantidad suficiente para completar	1000 mililitros.

20

25

130



Después de la esterilización de este medio en una auto-clave durante 20 minutos, a una presión de 1,0545 kilogramos por centímetro cuadrado, se inoculó una porción de 25 ml. en matraces de Erlenmeyer de 250 ml. con porciones de 5 1,0 ml. de inóculo de S. aureofaciens. La fermentación se llevó a cabo a una temperatura de 25° C., durante 24 horas, en un agitador giratorio que funcionaba a 180 revoluciones por minuto. En este punto se trasladó cada una de las porciones de mosto a un matraz individual que contenía una 10 solución de 10 mg. de pretetramida en 1 ml. de dimetilsulfóxido. Se continuó luego la fermentación en el agitador giratorio durante 96 horas más a la temperatura de 25° C. En este momento el análisis del mosto acusó la presencia de 15 microgramos por ml. de 6-demetil-tetraciclina. Se efectuó otra operación, con fines comparativos, en un matraz en idénticas circunstancias, pero omitiendo la prete- 15 tramida, no acusando presencia de ninguna 6-demetil-tetraciclina.

EJEMPLO 2

20 Conversión biológica de la pretetramida (1,3,10,11,12-pentahidroxi-naftaceno-2-carboxamida) en 7-cloro-6-demetil-tetraciclina, utilizando el S. aureofaciens NRRL 3013.

25 Se siguió el procedimiento del Ejemplo 1 con las siguientes excepciones: Se trasladó un mosto de S. aureofaciens NRRL 3013, fermentado en parte, a matraces individuales que contenían una solución de 11,4 mg. de prete-

31166



mida en una mezcla de 10 mg. de acetato de magnesio y 1 ml. de dimetilsulfóxido. Se continuó luego la fermentación en el agitador giratorio durante 96 horas más, a la temperatura de 28° C. Por este tiempo el análisis del mosto acusó la presencia de 85 microgramos por ml. de 7-cloro-6-demethyltetraciclina. Se efectuó una operación en un matraz, con fines comparativos, exactamente de la misma manera, pero omitiendo la pretetramida, no encontrándose ninguna 7-cloro-6-demethyltetraciclina presente.

EJEMPLO 3

10 Conversión biológica de la 6-metilpretetramida en 7-cloro-tetraciclina, utilizando S. aureofaciens NRRL 3013

Se lavaron esporos de S. aureofaciens NRRL 3013, procedentes de un cultivo inclinado de agar con agua destilada, a fin de formar una suspensión que contenía 15 60-80 x 10⁶ esporos por ml. Se empleó una porción de 0,33 ml. de esta suspensión para inocular un tubo de ensaye de 8 pulgadas (20,32 centímetros) que contenía 8 ml. de un medio de inóculo preparado e incubado exactamente como se describe en el Ejemplo 1, con lo que se obtuvo un inóculo 20 del cultivo de S. aureofaciens. Se preparó un medio de fermentación tal como se describe en el Ejemplo 1. Después de esterilizarse este medio, se inocularon porciones de 25 ml. en matraces de Erlenmeyer de 250 ml., con porciones de 1 ml. del inóculo de S. aureofaciens. La fer-



- 5

mentación se llevó a cabo a la temperatura de 25° C. durante 24 horas en un agitador giratorio, que funcionaba a razón de 180 revoluciones por minuto. En este punto se trasladó cada una de las porciones de mosto a matraces individuales que contenían una solución de 10 miligramos de 6-metilpretetramida en 1 ml. de dimetilsulfóxido que se había alcalinizado con hidróxido de amonio. Se continuó la fermentación en el agitador giratorio durante 96 horas más, a la temperatura de 25° C. Por este tiempo los análisis biológicos del mosto indicaban la presencia de actividad antibacteriana correspondiente a 180 microgramos por ml. de 7-clorotetraciclina. La identidad del producto como 7-clorotetraciclina se confirmó mediante cromatografía al papel en un sistema amortiguador de butanol y fosfato de pH 3. Una operación efectuada en otro matraz, con fines comparativos, de manera idéntica, pero con adición de sólo dimetilsulfóxido sin ninguna 6-metilpretetramida no acusó presencia de 7-clorotetraciclina.

EJEMPLO 4

20 Conversión biológica de 6-metilpretetramida en 7-clorotetraciclina, utilizando el S. aureofaciens ATCC 10762a

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 3 con las siguientes excepciones: Se utilizaron esporos del S. aureofaciens ATCC 10762a, en vez de NRRL 3013. El mosto fermentado en parte se trasladó a matraces individuales que



5 contenían una solución de 11 mg. de 6-metilpretetramida en una mezcla de 10 mg. de acetato de magnesio y 1 ml. de dimetilsulfóxido. Se continuó luego la fermentación en un agitador giratorio durante 96 horas más, a la temperatura de 28° C. Por este tiempo el análisis de mosto indicó la presencia de 265 microgramos por ml. de 7-clorotetraciclina. Una operación en otro frasco, efectuada con fines comparativos, de la misma manera, pero omitiendo la 6-metilpretetramida no acusó ninguna presencia de 7-clorotetraciclina.

EJEMPLO 5

Conversión biológica de 6-metilpretetramida en tetraciclina, utilizando el *S. aureofaciens* NRRL 3014

15 Se siguió el procedimiento del Ejemplo 4, con las siguientes excepciones: se utilizaron esporos de *S. aureofaciens* NRRL 3014, no clorante, en vez del ATCC 10762a. El mosto fermentado en parte se trasladó a matraces que contenían una solución de 11 mg. de 6-metilpretetramida en una mezcla de 10 mg. de acetato de magnesio y 1 ml. de dimetilsulfóxido. La fermentación se continuó luego en el 20 agitador giratorio durante 96 horas más a la temperatura de 28° C. Por este tiempo el análisis del mosto indicó la presencia de 108 microgramos por ml. de tetraciclina. Una operación en otro matraz, con fines comparativos, efectuada exactamente de la misma manera, pero omitiendo



la 6-metilpretetramida no acusó la presencia de ninguna tetraciclina.

EJEMPLO 6

Conversión biológica de 6-metilpretetramida en oxitetraciclina, utilizando el *S. hygroscopicus* NRRL 3015.

5 Se empleó el procedimiento del Ejemplo 3, con las siguientes excepciones: se emplearon esporos de un cultivo que se aisló del suelo y se identificó como *S. hygroscopicus* NRRL 3015, en vez del NRRL 3013. El mosto fermentado en parte (fermentado a la temperatura de 28° C.)
10 se trasladó a matraces que contenían una solución de 10 mg. de 6-metilpretetramida en una mezcla de 10 mg. de acetato de magnesio y 1 ml. de dimetilsulfóxido. Se continuó luego la fermentación en el agitador giratorio durante 96 horas más, a la temperatura de 34° C. Por este
15 tiempo el análisis del mosto acusó un aumento en la cantidad de oxitetraciclina respecto del mosto fermentado en otro matraz, con fines comparativos, de la misma manera, pero omitiendo la 6-metilpretetramida.

EJEMPLO 7

20 Conversión biológica de 6-metilpretetramida en oxitetraciclina, utilizando el *S. rimosus* NRRL 2234

Se utilizó el procedimiento del Ejemplo 6, con la única excepción de que se emplearon esporos de *S. rimosus* NRRL 2234, en vez de *S. hygroscopicus* NRRL 3015. El análisis final de mosto acusó un aumento en la cantidad de



oxitetraciclina respecto de la fermentación que se efectuó en otro matraz, con fines comparativos, de idéntica manera, pero con omisión de la 6-metilpretetramida.

EJEMPLO 8

5 Conversión biológica de 4-dimetilamino-6-metilpretetramida en tetraciclina, utilizando el S. aureofaciens NRRL 3014

Se lavaron esporos de S. aureofaciens NRRL 3014, procedentes de un cultivo inclinado de agar con agua destilada estéril, a fin de formar una suspensión que contenía 60-80 x 10⁶ esporos por ml. Se utilizó una porción de 10 0,33 ml. de esta suspensión para inocular un tubo de ensaye de 8 pulgadas (20,32 centímetros), que contenía 8 ml. de un medio de inóculo preparado e incubado tal como se describe en el Ejemplo 1, con lo cual se obtuvo un inóculo del cultivo de S. aureofaciens. Se preparó un medio 15 de fermentación exactamente como se describe en el Ejemplo 1. Después de esterilizarse este medio, se inocularon porciones de 25 ml. ^{en} /matraces de Erlenmeyer de 250 ml. con porciones de 1 ml. de inóculo de S. aureofaciens. La fermentación se llevó a cabo a la temperatura de 25° C. durante 20 24 horas en un agitador giratorio que funcionaba a razón de 180 revoluciones por minuto. En este punto cada una de las porciones de mosto se trasladó a matraces individuales que contenían una solución de 10 mg. de 4-dimetilamino-6-metilpretetramida en 1 ml. de dimetilsulfóxido.



Se continuó la fermentación en el agitador giratorio durante 96 horas más, a la temperatura de 25° C. Por este tiempo los análisis biológicos del mosto indicaron la presencia de 25 microgramos por ml. de tetraciclina. Otra
5 operación, efectuada exactamente de la misma manera, con fines comparativos, pero omitiendo la 4-dimetilamino-6-metilpretetramida no acusó presencia de tetraciclina.

EJEMPLO 9

10 Conversión biológica de 4-dimetilamino-6-metilpretetramida en 7-clorotetraciclina, utilizando el S. aureofaciens NRRL 3013

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 3, con las siguientes excepciones: el mosto fermentado en parte se trasladó a matraces individuales que contenían una solución de 10,6 mg. de 4-dimetilamino-6-metilpretetramida en
15 una mezcla de 10 mg. de acetato de magnesio y 1 ml. de dimetilsulfóxido. Se continuó luego la fermentación en el agitador giratorio durante 96 horas más, a la temperatura de 28° C. Por este tiempo el análisis del mosto indicó la presencia de 58 microgramos por ml. de 7-clorotetraci-
20 clina. Una operación en un matraz, efectuada con fines comparativos, de la misma manera, pero omitiendo la 4-dimetilamino-6-metilpretetramida no acusó la presencia de 7-clorotetraciclina.

1166



- 5 NO

EJEMPLO 10

Conversión biológica de 7-cloro-4-dimetilaminopretetramida en 7-cloro-6-demetil-tetraciclina, utilizando el S. aureofaciens NRRL 3013

Se lavaron esporos de S. aureofaciens NRRL 3013, 5
procedentes de un cultivo inclinado de agar, con agua des-
tilada estéril, a fin de formar una suspensión que conte-
nía 60-80 x 10⁶ esporos por ml. Se empleó una porción de
0,33 ml. de esta suspensión para inocular un tubo de ensa-
ye de 8 pulgadas (20,32 centímetros) que contenía 8 ml. de
10 un inóculo preparado e incubado de idéntica manera a la
descrita en el Ejemplo 1, con lo que se obtuvo un inóculo
de cultivo de S. aureofaciens. Se preparó un medio de
fermentación exactamente como se describe en el Ejemplo 1.
Después de esterilizarse este medio, se inocularon porcio-
15 nes de 25 ml. en matraces de Erlenmeyer de 250 ml. con
porciones de 1 ml. del inóculo de S. aureofaciens. La fer-
mentación se llevó a cabo a la temperatura de 25° C. du-
rante 24 horas en un agitador giratorio que funcionaba a
razón de 180 revoluciones por minuto. En este punto se
20 trasladó cada una de las porciones de mosto a un matraz
individual que contenía una solución de 10 mg. de 7-cloro-
4-dimetilaminopretetramida en 1 ml. de dimetilsulfóxido.
Se continuó la fermentación en el agitador giratorio duran-
te 96 horas más, a la temperatura de 25° C. Por este tiem-
25 po los análisis biológicos del mosto indicaron la presen-

1956

- 5 N



5 cia de 28 microgramos por ml. de 7-cloro-6-demethyltetraciclina. Una operación comparativa efectuada en un matraz, en idénticas condiciones, pero omitiendo la 7-cloro-4-dimetilaminopretetramida no acusó presencia de 7-cloro-6-demethyltetraciclina.

EJEMPLO 11

Conversión biológica de 7-cloro-4-dimetilaminopretetramida en 7-cloro-6-demethyltetraciclina, utilizando S. aureofaciens NRRL 3014

10 Se siguió el procedimiento del Ejemplo 10 con las siguientes excepciones: se utilizaron esporos no clorantes de S. aureofaciens NRRL 3014, en vez de NRRL 3013. El mosto fermentado en parte se trasladó a matraces que tenían una solución de 10 mg. de 7-cloro-4-dimetilaminopretetramida en una mezcla de 10 mg. de acetato de magnesio y 1 ml. de dimetilsulfóxido. Se continuó luego la fermentación en el agitador giratorio durante 96 horas más, a la temperatura de 28° C. En este punto del análisis del mosto indicó la presencia de 31 microgramos por ml. de 7-cloro-6-demethyltetraciclina. Una operación comparativa en un matraz, efectuada en idénticas condiciones, pero omitiendo la 7-cloro-4-dimetilaminopretetramida no acusó presencia de 7-cloro-6-demethyltetraciclina.

52166



-5 N

EJEMPLO 12

Conversión biológica de 7-cloro-4-dimetilaminopretetramida en 7-cloro-6-demetil-tetraciclina, utilizando S. aureofaciens NRRL B-2407

5 Se siguió el procedimiento del Ejemplo 10, con las siguientes excepciones: se emplearon esporos de S. aureofaciens NRRL B-2407, en vez de NRRL 3013. El mosto fermentado en parte se trasladó a matraces individuales que
10 contenían una solución de 10,1 mg. de 7-cloro-4-dimetilaminopretetramida en una mezcla de 10 mg. de acetato de magnesio y 1 ml. de dimetilsulfóxido. La fermentación se continuó luego en el agitador giratorio durante 96 horas más, a la temperatura de 28° C. En este tiempo el análisis del mosto indicó la presencia de 99 microgramos por
15 ml. de actividad antibiótica calculada a base de 7-cloro-tetraciclina. Una cromatografía de tira de papel indicó la presencia de 7-cloro-6-demetil-tetraciclina. Una operación comparativa efectuada en un matraz, en idénticas condiciones, pero omitiendo la 7-cloro-4-dimetilaminopretetramida no indicó presencia alguna de 7-cloro-6-demetil-
20 tetraciclina.

EJEMPLO 13

Conversión biológica de 7-cloro-4-dimetilamino-6-metilpretetramida en 7-clorotetraciclina, utilizando el S. aureofaciens NRRL 3013

25 Se lavaron esporos de S. aureofaciens NRRL 3013 procedentes de un cultivo inclinado de agar con agua destilada

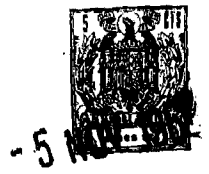


da estéril, a fin de formar una suspensión que contenía 60-80 x 10⁶ esporos por mililitro. Se utilizó una porción de 0,33 ml. de esta suspensión para inocular un tubo de ensaye de 8 pulgadas (20,32 centímetros) que contenía 8 ml. de un medio de fermentación preparado de acuerdo con la siguiente fórmula:

	Sacarosa	30 gramos
	Sulfato de amonio	2 gramos
	Carbonato de calcio	7 gramos
10	Líquido de maceración de maíz	20 gramos
	Agua de cañería, en cantidad suficiente para completar	1000 mililitros.

Con anterioridad a la inoculación se esterilizó el medio, poniéndolo en una autoclave durante 20 minutos, a una presión de 15 libras por pulgada cuadrada (1,0545 kilogramos por centímetro cuadrado). El tubo inoculado se incubó luego por espacio de 24 horas a la temperatura de 28° C. en un agitador oscilante, que funcionaba a razón de 116 oscilaciones por minuto, con lo cual se obtuvo un inóculo del S. aureofaciens. Se preparó un medio de fermentación de la siguiente composición:

	(NH ₄) ₂ SO ₄	6,7 gramos
	CaCO ₃	9,0 gramos
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	5,0 miligramos
25	NH ₄ Cl	2,0 gramos
	MnSO ₄ (calidad técnica, al 70 %)	0,10 gramos



	Líquido de maceración de maíz	25,0 gramos
	Almidón	52,5 gramos
	Harina de maíz	14,5 gramos
5	Agua de cañería en cantidad suficiente para completar	1000 mililitros.

Después de esterilizarse este medio en una autoclave durante 20 minutos, a una presión de 15 libras (1,0545 kilogramos por centímetro cuadrado), se inocularon porciones de 25 ml. en matraces de Erlenmeyer de 250 ml. con porciones de 1,0 ml. del inóculo de S. aureofaciens. La fermentación se llevó a cabo a la temperatura de 28° C. durante 24 horas en un agitador giratorio, que funcionaba a razón de 180 revoluciones por minuto. En este punto se trasladó cada una de las porciones de mosto a matraces individuales que contenían una solución de 9,5 mg. de 7-cloro-4-dimetilamino-6-metilpretetramida en una mezcla de 10 mg. de acetato de magnesio y 1 ml. de dimetilsulfóxido. La fermentación se continuó luego en un agitador giratorio durante 96 horas más, a la temperatura de 28° C. Por este tiempo el análisis del mosto indicó la presencia de 20 microgramos por ml. de 7-clorotetraciclina. Una operación comparativa, efectuada en un matraz, en las mismas condiciones, pero omitiendo la 7-cloro-4-dimetilamino-6-metilpretetramida no acusó presencia de 7-clorotetraciclina.



-5

EJEMPLO 14

Conversión biológica de 7-hidroxi-pretetramida en 7-hidroxi-6-demetil-tetraciclina, utilizando S. aureofaciens NRRL 3013

5 Se siguió el procedimiento del Ejemplo 13 con las siguientes excepciones: el mosto fermentado en parte se trasladó a matraces individuales que contenían una solución de 3,95 mg. de 7-hidroxi-pretetramida en una mezcla de 10 mg. de acetato de magnesio y 1 ml. de dimetilsulfóxido. La fermentación se continuó luego en el agitador
10 giratorio durante 96 horas más, a la temperatura de 28° C. Por este tiempo, el análisis del mosto indicó la presencia de 2,8 microgramos por ml. de actividad antibiótica calculada a base de 7-clorotetraciclina. Una operación comparativa efectuada en un matraz, en idénticas condi-
15 ciones, pero omitiendo la 7-hidroxi-pretetramida no acusó actividad antibiótica.

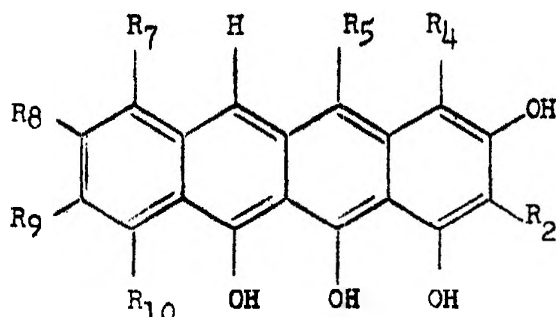
Este invento se refiere también a nuevos 2-carboxamido-1,3,10,11,12-pentahidroxi-naftacenos, que se utilizan en métodos destinados a preparar compuestos de tetraciclina.
20 Según este invento se proporciona un método de preparar derivados naftacénicos que están sustituidos por lo menos por un grupo hidroxilo en las posiciones 1, 3, 10, 11 y 12 del naftaceno y un grupo carboxamido en la posición 2, caracterizado por reducirse la correspondiente
25 5,12- ó 6,11-naftacenoquinona que lleva un grupo carboxa-

282166



mido o un grupo capaz de convertirse en tal grupo en la posición 2, a fin de convertir el grupo 11 ó 12 ceto en un grupo hidroxilo y quitar el grupo hidroxilo formado del grupo 5 ó 6 ceto, y, si es necesario, formar el grupo carboxamido en la posición 2.

Estos nuevos 1,3,10,11,12-pentahidroxinaftacenos sustituidos pueden representarse por medio de la siguiente fórmula general:



en donde R_2 representa hidrógeno, un grupo carboxamido o N-(alcoholo inferior)carboxamido, R_4 representa hidrógeno o un grupo dimetilamino, R_5 corresponde a hidrógeno, un grupo alcoxi inferior o alcoholo inferior, y cada uno de los símbolos R_7 , R_8 , R_9 y R_{10} se escoge de entre el grupo que abarca hidrógeno, un halógeno, un grupo hidroxí, alcoxi inferior, alcoholo inferior, amino, mono(alcoholo inferior)amino, di(alcoholo inferior)amino, nitro, nitroso, tiociano y mercapto. Los grupos alcoholo inferior y alcoxi inferior que se tienen en mira en el presente invento son los que contienen de 1 a 6 átomos de carbono. Son

130

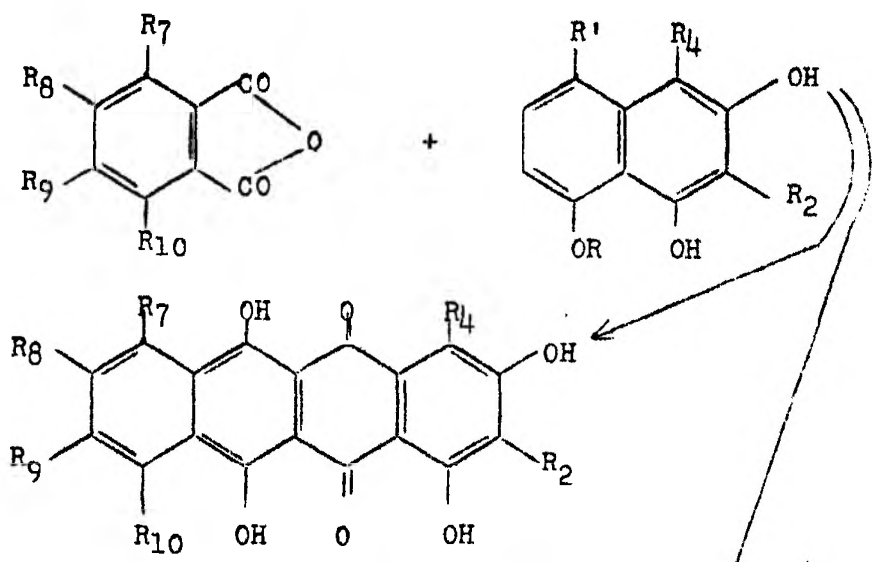


ejemplos del halógeno el cloro, bromo, yodo y flúor.

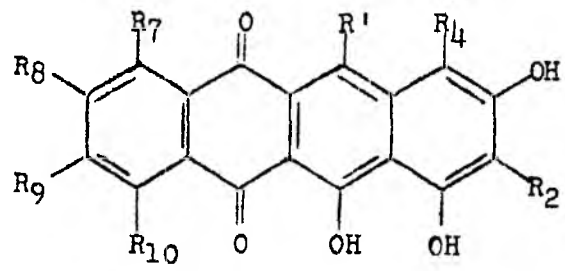
Para mayor comodidad hemos designado la 1,3,10,11,12-pentahidroxinaftaceno-2-carboxamida "pretetramida". Así, pues, los nuevos compuestos del presente invento pueden
5 designarse cómodamente derivados de "pretetramida". Por ejemplo, los compuestos 6-metil-1,3,10,11,12-pentahidroxinaftaceno-2-carboxamida, 7-cloro-1,3,10,11,12-pentahidroxinaftaceno-2-carboxamida, 4-dimetilamino-1,3,10,11,12-pentahidroxinaftaceno-2-carboxamida y 1,3,11,12-tetrahidroxinaftaceno-2-carboxamida pueden designarse más cómodamente
10 6-metilpretetramida, 7-cloropretetramida, 4-dimetilamino-pretetramida y 10-deoxipretetramida, respectivamente.

Las novedosas pretetramidas del presente invento pueden obtenerse en forma de sustancias cristalinas que
15 tienen espectros de absorción y altos puntos de fusión característicos. Son generalmente insolubles en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos.

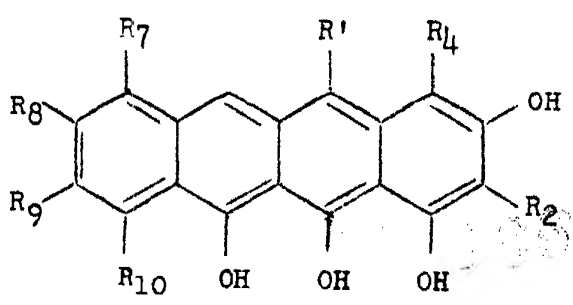
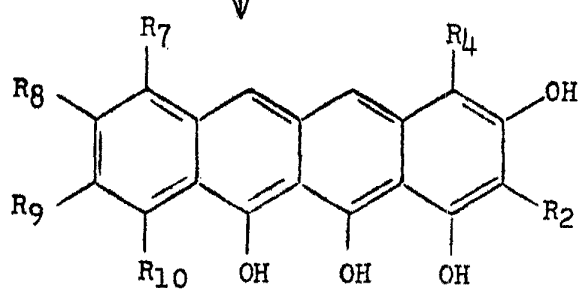
Los novedosos compuestos del tipo pretetramida del presente invento pueden prepararse, por ejemplo, por condensación de un anhídrido ftálico adecuadamente sustituido
20 con un 1,3-dihidroxinaftaleno adecuadamente sustituido, dando ello origen ya sea a una 6-hidroxinaftaceno-5,12-quinona intermedia o a una naftaceno-6,11-quinona intermedia, como puede verse por el siguiente esquema de reacción.
25 ción.



una 6-hidroxi-naftaceno-5,12-quinona



una naftaceno-6,11-quinona





en donde R_2 , R_4 , R_7 , R_8 , R_9 y R_{10} tienen los valores antes definidos y R corresponde a hidrógeno o a un grupo alcoholo inferior. Cuando R' representa un grupo hidroxilo o alcoxi inferior, entonces se obtiene la 6-hidroxinaftaceno-5,12-quinona intermedia. Cuando R' representa hidrógeno o un grupo alcoholo inferior, entonces el producto es una naftaceno-6,11-quinona. Esta condensación se lleva a cabo en las condiciones generales de reacción Friedel-Crafts, empleándose, por ejemplo, anhídrido bórico, ácido sulfúrico, cloruro de aluminio anhidro o cloruro anhidro, como catalizadores. La condensación puede llevarse cabo en un disolvente inerte, de alto punto de ebullición, o en un producto fundido, como, por ejemplo, anhídrido bórico o el eutéctico de cloruro de sodio y cloruro de aluminio, a temperatura superiores a 100° C. La reducción de las naftacenoquinonas resultantes a los derivados 5,6-deoxigenados correspondientes puede realizarse mediante uno cualquiera de varios procedimientos bien conocidos, descritos en la literatura química para la reducción de 1-hidroxiantraquinonas a las 9-antronas correspondientes. La reducción de las naftacenoquinonas a pretetramidas puede lograrse por reducción mediante combinaciones de un metal y ácido, por ejemplo, estaño y HCl, estaño y H_2SO_4 , estaño y HBr, aluminio y H_2SO_4 , zinc y HCl, zinc y HI, hierro y HI. Puede emplearse el ácido yodhídrico solo, o puede emplear-



se HI en presencia de un disolvente resistente a la reducción, como en los Ejemplos A y B. Pueden emplearse agentes con un potencial reductor más alto que el HI, en presencia de una cantidad catalítica de HI, por ejemplo, el
5 ácido fosforoso, el ácido hipofosforoso o el azufre. La hidrogenación catalítica mediante el empleo de metales de la familia del hierro o de metales nobles resulta útil, siendo a veces esencial ejercer cuidado a fin de impedir la reducción excesiva. Los catalizadores de rodio, los
10 catalizadores de níquel y los catalizadores de paladio son especialmente útiles. Pueden aplicarse presiones de hidrógeno de una a cien atmósferas.

Pueden utilizarse combinaciones metálicas alcalinas, tales como la aleación de Raney (Ni-Al) + NaOH, Zn +
15 NH_4OH .

Las sales reductoras, como SnCl_2 + ácido son eficaces, pudiendo utilizarse también los iones titanósico y cromósico.

Ciertos pares de metales, como, por ejemplo, Zn-Cu y
20 Zn-Hg son a veces útiles en casos específicos: el agente reductor puede generarse electrolíticamente, por ejemplo, mediante electrólisis de una solución de la quinona en ácido acético glacial que contenga iones de yodo o estannicos en el cátodo de una pila electrolítica.

25 Pueden emplearse otras fuentes de hidrógeno para re-

12166



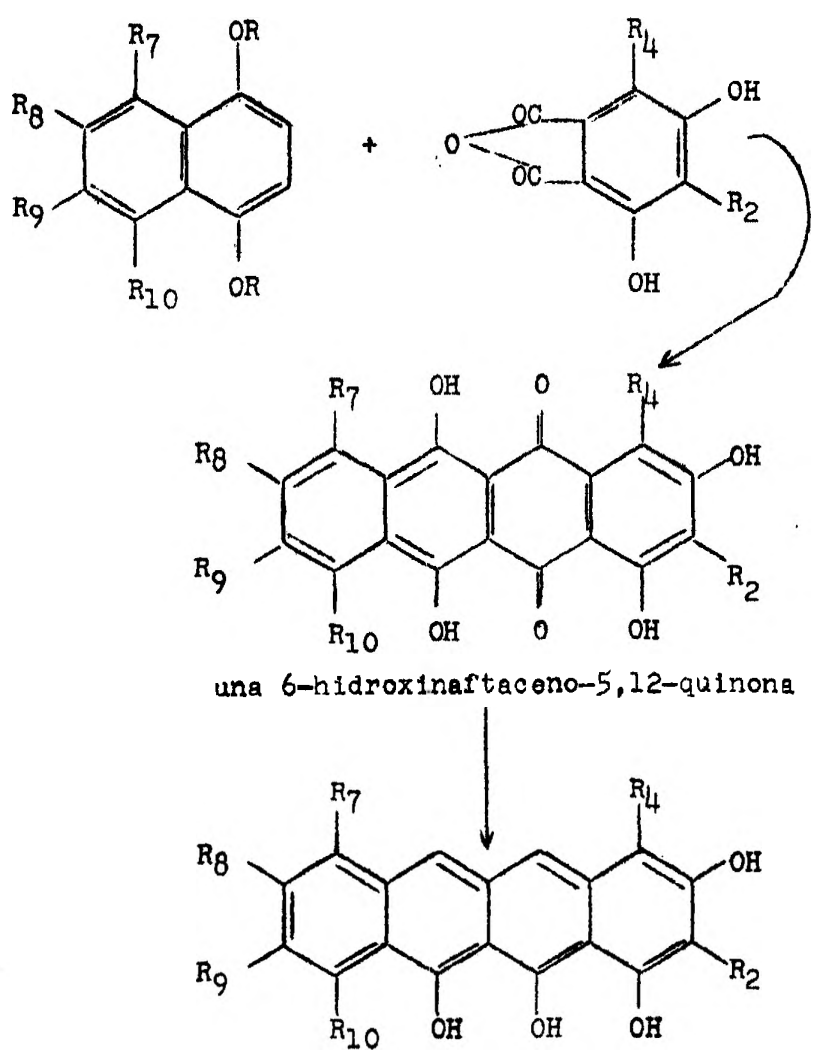
- 5 NO

generar el agente reductor o el catalizador, como, por ejemplo, NaBH_4 con catalizadores de metales nobles, hidrazina con catalizador de níquel o amalgama de sodio con una cantidad catalítica del ión yodúrico, o amoniaco con un agente de disociación del amoniaco.

El grupo carbonilo en C_5 ó C_6 podría quitarse por medio de otras secuencias de reducción, como, por ejemplo, por el procedimiento de Wolf-Kishner, empleándose hidrazona.

Les compuestos novedosos del presente invento pueden prepararse también por condensación de un naftaleno adecuadamente sustituido con un anhídrido 3,5-dihidroxiftálico, según puede verse en el siguiente esquema de reacción:

2 821 66



en donde R_2 , R_4 , R_7 , R_8 , R_9 y R_{10} tienen el valor antes
definido y R corresponde a hidrógeno o a un alcoholo in-
ferior. Esta condensación puede también llevarse a cabo
en las condiciones generales de la reacción de Friedel-
5 Crafts antes descrita, y la reducción de las 6-hidroxinaf-
taceno-5,12-quinonas intermedias puede lograrse en la for-

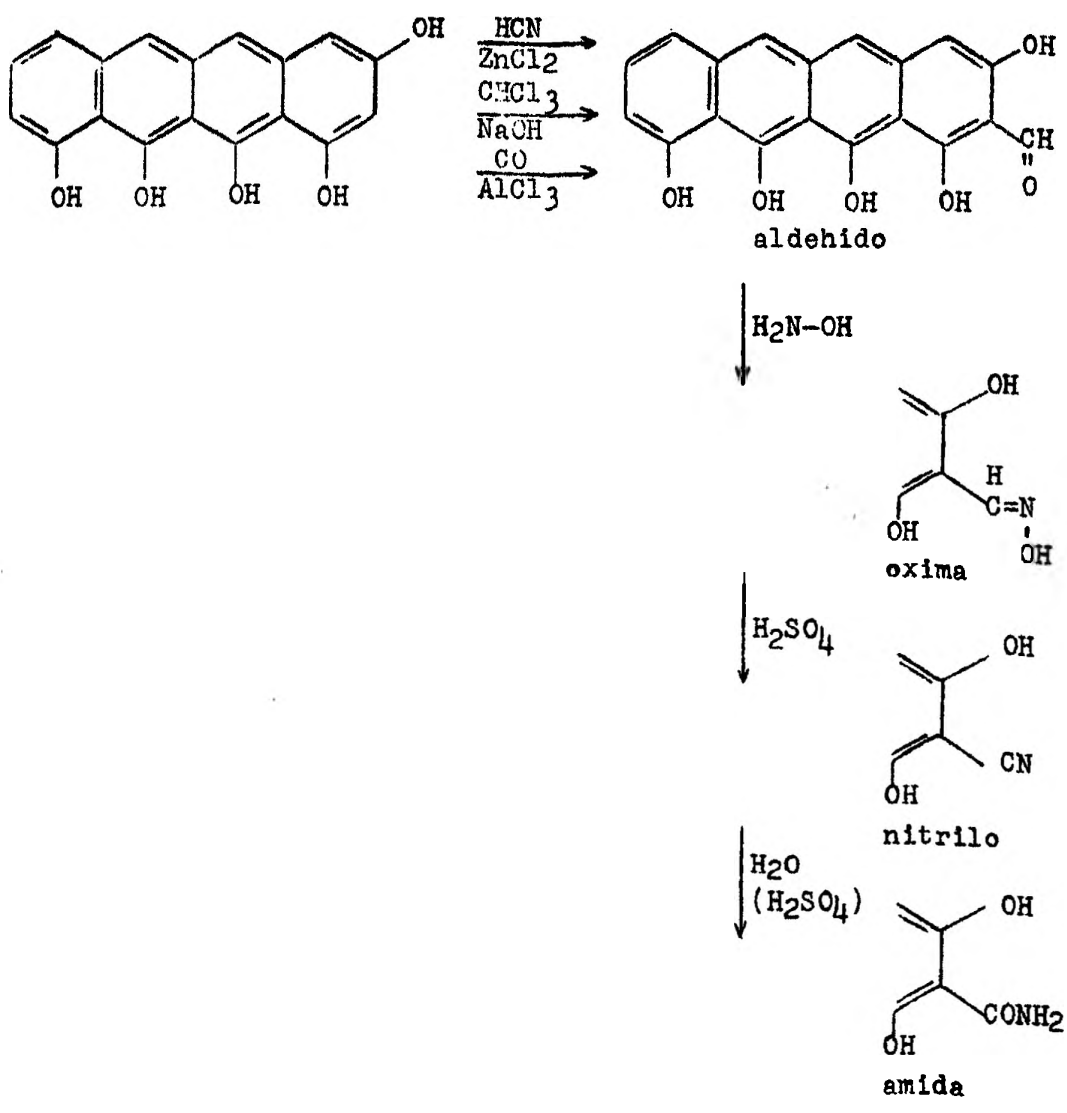


ma arriba expuesta. Al preparar los compuestos novedosos del presente invento mediante las reacciones de condensación antes expuestas, ha de entenderse que los ácidos ftálicos sustituidos, los ésteres y haluros ácidos son equivalentes a los anhídridos ftálicos sustituidos correspondientes.

Si falta el grupo 2-carboxamida entonces puede introducirse la 2-carboxamida después que la mitad quinona se ha reducido a la etapa de hidroquinona o de antrona.

10 Por ejemplo, podrían emplearse los procedimientos de Gatterman-Koch o de Reimer-Tiemann para preparar el 2-aldehído de la 2-dicarboxamidopretetramida (I) y el aldehído podría convertirse fácilmente en la amida por medio de la oxima y el nitrilo:

2 821 66



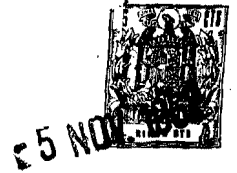
o bien podría degradarse el análogo 2-acetilo de la prete-tramida mediante oxidación o por medio de la reacción de yodoformo, formándose el ácido carboxílico, y convertirse éste en la amida, o también podría formarse el éster 2-carboxílico y amonolizarse, convirtiéndose en la amida.



EJEMPLO A

Síntesis de la 10-deoxipretetramida

Se agregaron a 263 mg. de 1,3-dihidroxi-5,8-dimetoxi-naftaleno-2-carboxamida 296 mg. de anhídrido ftálico, 2 g. de cloruro de sodio y 10 g. de cloruro de aluminio anhidro. Se mezclaron muy bien los sólidos en un mortero y se echaron en un matraz que se colocó en baño de aceite, precalentándose a la temperatura de 200° C. Se dejó que la reacción prosiguiera durante 2 horas. Se dejó enfriar el producto fundido y luego se digirió cuidadosamente con 50 ml. de una solución de HCl 6 N en baño de vapor. La 1,3,6,11-tetrahidroxinaftaceno-5,12-quinona-2-carboxamida cruda se recogió por filtración, se lavó y luego se desecó al vacío. El rendimiento fué de como 440 mg. Esta quinona cruda se purificó luego por extracción mediante cloroformo, previa solución en una mezcla de dimetilformamida, agua y trietilamina. El rendimiento fué de 150 mg., que se disolvieron en 5 ml. de paraclorofenol. A esto se agregaron 2 ml. de ácido yodhídrico en constante ebullición y 200 mg. de hipofosfito potásico dibásico. Esta mezcla se sometió a reflujo durante 5 horas. Se dejó enfriar la mezcla y luego se filtró. La 10-deoxipretetramida cristalina se lavó con agua, acetona y luego con éter y se desecó al vacío. En rendimiento fué de 97 mg.



EJEMPLO B

Síntesis de la pretetramida

Se agregaron a 615 mg. de 1,3-dihidroxi-5,8-dime-
toxinaftaleno-2-carboxamida 385 mg. de anhídrido 3-hidroxi-
ftálico, 2 gramos de cloruro de sodio y 10 gramos de clo-
5 ruro de aluminio anhidro. Se mezclaron muy bien los sólidos en un mortero y se echaron en un matraz que se había colocado en baño de aceite, precalentando a la temperatura de 200° C. Se dejó que la reacción prosiguiera durante 2 horas. Se dejó enfriar el producto fundido y luego
10 se digirió cuidadosamente con 50 ml. de solución de HCl 6N en baño de vapor. La 1,3,6,10,11-pentahidroxiftaceno-5,12-quinona-2-carboxamida cruda se recogió por filtración, se lavó y luego se desecó al vacío. Esta quinona cruda se purificó luego por extracción mediante cloroformo, previa
15 solución en una mezcla de dimetilformamida, agua y trietilamina. El rendimiento fué de como 172 mg. de 1,3,6,10,11-pentahidroxinaftaceno-5,12-quinona-2-carboxamida. Esta quinona purificada se disolvió en 5 ml. de paraclorofenol. A este se agregaron 2 ml. de ácido yodhídrico en constante
20 ebullición y 200 mg. de hipofosfito potásico. Esta mezcla se sometió a reflujo por espacio de 5 horas, se dejó enfriar y luego se filtró. La pretetramida cristalina se lavó con agua, acetona y luego con éter y se desecó al vacío. Se obtuvo un rendimiento de pretetramida de 97 mg.



EJEMPLO C

Síntesis de la 10-deoxi-N-metilpretetramida

Se agregaron a 277 mg. de N-metil-1,3-dihidroxi-5,8-dimetoxinaftaleno-2-carboxamida 296 mg. de anhídrido ftálico, 2 gramos de cloruro de sodio y 10 gramos de cloruro de aluminio anhidro. El procedimiento fué exactamente igual al descrito en el Ejemplo 1, y dió por resultado un rendimiento de 272 mg. de N-metil-1,3,6,11-tetrahidroxinaftaceno-5,12-quinona-2-carboxamida. Se hizo la reducción de 150 miligramos de esta quinona purificada exactamente como se describió en el Ejemplo A, obteniéndose un rendimiento de 99 mg. del producto reducido, 10-deoxi-N-metilpretetramida.

EJEMPLO D

Síntesis de la N-metilpretetramida

Se agregaron a 277 mg. de N-metil-1,3-dihidroxi-5,8-dimetoxinaftaleno-2-carboxamida 164 mg. de anhídrido 3-hidroxiftálico, 2 gramos de cloruro de sodio y 10 gramos de cloruro de aluminio anhidro. El procedimiento fué exactamente igual al descrito en el Ejemplo 1, obteniéndose un rendimiento de 100 mg. de N-metil-1,3,6,10,11-pentahidroxinaftaceno-5,12-quinona-2-carboxamida y 56 mg. del producto de reducción, N-metilpretetramida.



EJEMPLO E

Síntesis de la 10-deoxi-2-decarboxamidopetetráida

Se agregaron a 292 mg. del éster etílico del ácido 1,3-dihidroxi-5,8-dimetoxinaftaleno-2-carboxílico 296 mg. de anhídrido ftálico, 2 gramos de cloruro de sodio y 10 gramos de cloruro de aluminio anhidro. El procedimiento fué exactamente igual al descrito en el Ejemplo A. La disociación del éster etílico y la descarboxilación ocurrieron durante los pasos de condensación y reducción, obteniéndose un rendimiento de 68 mg. del producto de reducción, 2-decarboxamido-10-deoxipetetráida.

EJEMPLO F

Síntesis de la 2-decarboxamidopretetráida

Se agregaron a 292 mg. del éster etílico del ácido 1,3-dihidroxi-5,8-dimetoxinaftaleno-2-carboxílico 328 mg. de anhídrido 3-hidroxiftálico, 2 gramos de cloruro de sodio y 10 gramos de cloruro de aluminio anhidro. El procedimiento fué idéntico al descrito en el Ejemplo A. También en este caso la disociación del éster y la descarboxilación ocurrieron durante las reacciones preparativas, obteniéndose un rendimiento de 93 mg. del producto de reducción, 2-decarboxamidopretetráida.

EJEMPLO G

Síntesis de la 7-hidroxi-pretetráida

Se agregaron a 264 mg. de 1,3-dihidroxi-5,8-dime-



toxinaftaleno-2-carboxamida 402 mg. de ácido 3,6-dihidroxi-ftálico, 2 g. de cloruro de sodio y 10 g. de cloruro de aluminio anhidro. Se mezclaron muy bien los sólidos en un mortero y se echaron en un matraz que se colocó en baño de aceite, precalentado a la temperatura de 200° C. La reacción se dejó proseguir durante 30 minutos. Se dejó enfriar el producto fundido y luego se digirió cuidadosamente con 50 ml. de solución de HCl 6N en baño de vapor. La 1,3,6,7,10,11-hexahidroxinaftaceno-5,12-quinona-2-carboxamida cruda se recogió por filtración, se lavó y luego se desecó al vacío. La quinona cruda se purificó luego mediante extracción con una solución de 1 % de trietilamina en tetrahidrofurano. El rendimiento fué de como 358 mg. Esta quinona purificada se disolvió en 5 ml. de paraclorofenol. A este se agregaron 2 ml. de ácido yodhídrico en constante ebullición y 200 mg. de hipofosfito potásico dibásico. Esta mezcla se sometió a reflujo por espacio de 5 horas, se dejó enfriar y se filtró luego. La 7-hidroxipretetramida cristalina se lavó con agua, acetona y luego con éter y se desecó al vacío. Se obtuvo un rendimiento de 147 mg.

EJEMPLO H

Síntesis de la 7-hidroxipretetramida

Se agregaron a 296 mg. de 1,3-dihidroxi-5,8-dimetoxinaftaleno-2-carboxamida 149 mg. de anhídrido 3,6-diacetoxi-



-5 N

ftálico, 2 g. de cloruro de sodio y 10 g. de cloruro de aluminio anhidro. Se siguió el mismo procedimiento del Ejemplo 7, obteniéndose un rendimiento de 20 mg. de la quinona cruda, que luego se redujo a 7-hidroxi-pretetramida.

EJEMPLO I

Síntesis de la 8-hidroxi-pretetramida

Se agregaron a 263 mg. de 1,3-dihidroxi-5,8-dimetoxinaftaleno-2-carboxamida 400 mg. de ácido 3,5-dimetoxinaftálico, 2 g. de cloruro de sodio y 10 g. de cloruro de aluminio anhidro. Se siguió el procedimiento del Ejemplo 7, obteniéndose un rendimiento de 425 mg. de 1,3,6,8,10,11-hexahidroxi-5,12-quinona-2-carboxamida y un rendimiento de 180 mg. de la quinona purificada, que luego se redujo a 8-hidroxi-pretetramida.

EJEMPLO J

Síntesis de la 9-hidroxi-pretetramida

Se agregaron a 263 mg. de 1,3-dihidroxi-5,8-dimetoxinaftaleno-2-carboxamida 384 mg. de ácido 3,4-dimetoxinaftálico, 2 g. de cloruro de sodio y 10 g. de cloruro de aluminio anhidro. Se siguió el procedimiento del Ejemplo 7, obteniéndose un rendimiento de 243 mg. de 1,3,6,9,10,11-hexahidronaftaleno-5,12-quinona-carboxamida y un rendimiento de 91 mg. de 9-hidroxi-pretetramida.

2 821 66



EJEMPLO K

Síntesis de la 9-hidroxipretetramida

Se agregaron a 266 mg. de 1,3-dihidroxi-5,8-dimetoxinaftaleno-2-carboxamida 400 mg. de anhídrido 3,4-dimetoxiftálico, 2 g. de cloruro de sodio y 10 g. de cloruro de aluminio anhidro. Se siguió el procedimiento del Ejemplo B, obteniéndose un rendimiento de 452 mg. de la quinona cruda y 122 mg. de la quinona purificada, que se redujo luego a 9-hidroxipretetramida.

EJEMPLO L

Conversión de la 6-demethyltetraciclina en 4-dimetilamino-pretetramida

10 Se disolvió 1 gramo de 6-demethyltetraciclina en 10 ml. de piridina. Se agregaron a esta solución 3 ml. de un reactivo formado por anhídrido acético y ácido fórmico $\sqrt{1}$ volumen de anhídrido acético y 0,5 volumen de ácido fórmico (98 + %), calentando ligeramente y enfriado luego a la 15 temperatura ambiente, antes de usarse $\sqrt{7}$. Se dejó la mezcla en reposo a la temperatura ambiente durante 15 minutos y se quitaron luego los disolventes al vacío, en un evaporador giratorio. Se agregaron al residuo (6-demethyl-12a-oxoformiltetraciclina) 700 ml. de xileno. Esta mezcla se 20 destiló lentamente en el curso de 2 horas, durante las cuales se habían retirado 200 ml. de destilado. Se filtró la solución al xileno caliente. El filtrado se desecó mediante destilación al vacío hasta obtenerse un residuo.



- 5 N

El residuo (6-demetil-4a,12a-anhidrotetraciclina) se disolvió en 100 ml. de n-butanol, que contenía 3 ml. de ácido clorhídrico concentrado y la mezcla se calentó en baño de vapor, en una atmósfera de nitrógeno, durante 2 horas. 5 La mezcla se enfrió y se filtró. El producto cristalino, 4-dimetilaminopretetramida, se lavó con n-butanol y éter y se desecó al vacío a la temperatura de 40° C. Se obtuvo un rendimiento de 300 mg.

EJEMPLO M

Conversión de la 7-cloro-6-demetiltetraciclina en 7-cloro-4-dimetilaminopretetramida

10

Se disolvió 1 gramo de 7-cloro-6-demetiltetraciclina en 10 ml. de piridina. Se trató la solución de la misma manera que en el Ejemplo L, lo que dió lugar a la formación sucesiva de 7-cloro-6-demetil-12a-o-formiltetraciclina, 7-cloro-6-demetil-4a,12a-anhidrotetraciclina, y, 15 finalmente, el producto cristalino, 7-cloro-4-dimetilaminopretetramida. El rendimiento fué de 300 mg., aproximadamente.

EJEMPLO N

Conversión de la tetraciclina en 4-dimetilamino-6-metilpretetramida

20

Se disolvió 1 gramo de tetraciclina en 10 ml. de piridina. Se trató la solución de manera idéntica a la del Ejemplo L, lo que dió por resultado la sucesiva formación



de 12a-o-formiltetraciclina, 4a,12a-anhidrotetraciclina, y, finalmente, el producto cristalino, 4-dimetilamino-6-metilpretetramida. El rendimiento fué de 500 mg., aproximadamente.

EJEMPLO O

5 Conversión de la 7-cloro-6-demetiltetraciclina en 7-cloro-4-dimetilaminopretetramida, seguida de la reducción catalítica a 4-dimetilaminopretetramida y la conversión, por fermentación, en 6-demetiltetraciclina

Se disolvió 1 gramo de 7-cloro-6-demetiltetraciclina neutra en 10 ml. de piridina. Se agregaron a esta solución 3 ml. de reactivo formado por anhídrido acético y ácido fórmico. Se dejó la mezcla en reposo a la temperatura ambiente por espacio de 15 minutos y luego se quitaron los disolventes al vacío. Se agregaron al residuo
10 (7-cloro-6-demetil-12a-o-formiltetraciclina) 700 ml. de xileno. La mezcla se destiló lentamente en el curso de 2 horas, durante las cuales se habían retirado 200 ml. de destilado. Se filtró la solución al xileno caliente. Se desecó el filtrado mediante destilación al vacío hasta de-
15 jar un residuo. El residuo (7-cloro-6-demetil-4a,12a-anhidrotetraciclina) se disolvió en 100 ml. de n-butanol, que contenía 3 ml. de ácido clorhídrico concentrado y la mezcla se calentó en baño de vapor en una atmósfera de nitrógeno durante 2 horas. La mezcla se enfrió y se filtró.
20 El producto cristalino - 7-cloro-4-dimetilaminopretetramida - se lavó con butanol y éter y se desecó al vacío a

382166



la temperatura de 40° C. Este producto se disolvió luego en 10 volúmenes de "Cellosolve" en una atmósfera de nitrógeno con dos moles de trietilamino. Esta solución se redujo luego en presencia de paladio sobre carbón, a una presión de hidrógeno de 40 libras (2,812 kg. por cm²) hasta que se hubo absorbido 1 mol de hidrógeno, dando por resultado la formación de 4-dimetilaminopretetramida. Se efectuó luego la siguiente fermentación. Se lavaron esporos no clorantes de S. aurefaciens ATCC (F-198-1), procedentes de un cultivo inclinado de agar con agua destilada estéril, a fin de formar una suspensión que contenía 60-80 x 10⁶ esporos por mililitro. Se utilizó una porción de 0,33 ml. de esta suspensión para inocular un tubo de ensaye de 20,32 cm. de contenía 8 ml. de un medio de fermentación preparado de acuerdo con la siguiente fórmula:

Sacarosa	30 gramos
Sulfato de amonio	2 gramos
Carbonato de calcio	7 gramos
Líquido de maceración de maíz	20 gramos
20 Agua del tubo, en cantidad suficiente para completar	1000 gramos

El medio se esterilizó con anterioridad a la inoculación, poniéndolo en una autoclave durante 20 minutos, a una presión de 1,0545 kg. por cm². El tubo inoculado se incubó luego por espacio de 24 horas a la temperatura de 28° C.,



obteniéndose así el inóculo S. aureofaciens.

Se preparó un medio de fermentación de la siguiente composición:

	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6,7 gramos
5	CaCO_3	9,0 gramos
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5,0 miligramos
	NH_4Cl	2,0 gramos
	MnSO_4 (calidad técnica, al 70 %)	0,10 gramos
	Líquido de maceración de maíz	25,0 gramos
10	Almidón	52,5 gramos
	Harina de maíz	14,5 gramos
	Agua del tubo, en cantidad suficiente para completar	1000 mililitros

Después de esterilizarse este medio de fermentación en una autoclave durante 20 minutos, a una presión de 15 libras por pulgada cuadrada (1,0545 kg. por cm^2), se inocularon porciones de 25 ml. en matraces de Erlenmeyer de 250 ml., con porciones de 1,0 ml. del inóculo de S. aureofaciens. La fermentación se llevó a cabo a la temperatura de 28° C. durante 24 horas en un agitador giratorio. Luego se trasladó cada una de las porciones de mosto a un matraz individual que contenía una solución de 10 mg. de 4-dimetilaminopretetramida en una mezcla de 10 mg. de acetato de magnesio y 1 ml. de dimetilsulfóxido. Luego se continuó la fermentación en el agitador giratorio durante 96 horas



más a la temperatura de 28° C. Por este tiempo el análisis del mosto indicó la presencia de 6-demetil-tetraciclina. Una fermentación efectuada en un matraz con fines comparativos, de idéntica manera, pero omitiendo la 4-dimetilaminopretetramida, no acusó presencia de 6-demetil-tetraciclina.

EJEMPLO P

10 Conversión de la 7-clorotetraciclina en 7-cloro-6-metil-4-dimetilaminopretetramida, seguida de reducción catalítica a 6-metil-4-dimetilaminopretetramida y conversión en tetraciclina mediante fermentación

Se disolvió 1 gramo de 7-clorotetraciclina neutra en 10 ml. de piridina. Se agregaron a esta solución 3 ml. de reactivo de anhídrido acético y ácido fórmico. La mezcla se dejó en reposo a la temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se quitaron al vacío los disolventes. Se agregaron 700 ml. de xileno al residuo (7-cloro-12a-o-formiltetraciclina). Esta mezcla se destiló lentamente por espacio de 2 horas. La solución al xileno caliente se filtró y el filtrado se desecó, reduciéndose a un residuo.

20 El residuo (7-cloro-4a,12a-anhidrotetraciclina) se disolvió en 100 ml. de n-butanol, que contenían 3 ml. de ácido clorhídrico concentrado y la mezcla se calentó a baño de vapor, en una atmósfera de nitrógeno, durante 2 horas. La mezcla se enfrió y se filtró. El producto cristalino,

25 7-cloro-6-metil-4-dimetilaminopretetramida, se lavó con

282166



butanol y éter y se desecó al vacío a la temperatura de 40° C. Este producto se disolvió luego en 10 volúmenes de "Cellosolve", en una atmósfera de nitrógeno, con dos moles de trietilamina. Esta solución se redujo luego en presencia de paladio sobre carbón, a una presión de 40 libras (2,812 kg. por cm²) de hidrógeno, hasta que se hubo absorbido 1 mol de hidrógeno, dando ello por resultado la formación de la 6-metil-4-dimetilaminopretetramida. Se empleó luego la fermentación del Ejemplo 0 con la siguiente excepción: el mosto, fermentado en parte, se trasladó a matraces que contenían una solución de 10 mg. de 6-metil-4-dimetilaminopretetramida en una mezcla de 10 mg. de acetato de magnesio y 1 ml. de dimetilsulfóxido. Luego se continuó la fermentación como en el Ejemplo 0. El análisis del mosto indicó la presencia de tetraciclina. Una fermentación efectuada en un matraz, con fines comparativos, de idéntica manera, pero omitiendo la 6-metil-4-dimetilaminopretetramida, no acusó presencia de tetraciclina.

282166



1. Un método de convertir derivados naftacénicos, biológicamente, en compuestos de la serie tetraciclina, dotados de actividad antibiótica, caracterizado por el hecho de ponerse en contacto un derivado naftacénico que está por lo menos sustituido por un grupo hidroxilo en las posiciones 1, 3, 10, 11 y 12 del anillo naftacénico y por un grupo carboxamido en la posición 2 del anillo naftacénico, en presencia de una cepa fermentante de Streptomyces, capaz de utilizar biológicamente tal derivado naftacénico, con lo cual se introduce un grupo hidroxilo en las posiciones 6 y 12a del anillo del derivado naftacénico que sirve de punto de partida y en el que, cuando la posición 4 del anillo del naftaceno reaccionante está sin sustituir, se introduce también un grupo dimetilamino en dicha posición 4 y, si se desea, la cepa se escoge de manera que se introduzca en el anillo naftacénico, fuera de los grupos antes mencionados, un grupo 7-halo y (o) un grupo 5-hidroxilo cuando las posiciones 7 y (o) 5 de los anillos del derivado naftacénico inicial está ocupadas por átomos de hidrógeno.

2. Un método, según la reivindicación 1, destinado



a efectuar la 6,12a-dihidroxiación de una 1,3,10,11,12-pentahidroxi-naftaceno-2-carboxamida, caracterizado por el hecho de agregar la 1,3,10,11,12-pentahidroxi-naftaceno-2-carboxamida a un medio acuoso nutriente, fermentar el medio acuoso nutriente, en condiciones aerobias, con una cepa de una especie del género Streptomyces, que produce tetraciclinas, y continuar la fermentación hasta que la 1,3,10,11,12-pentahidroxi-naftaceno-2-carboxamida se convierte virtualmente en la tetraciclina correspondiente.

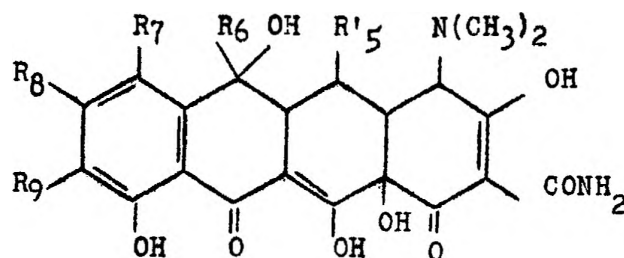
3. Un método, según la reivindicación 1, destinado a efectuar simultáneamente la 6,12-dihidroxiación de 1,3,10,11,12-pentahidroxi-naftaceno-2-carboxamida 4-insustituida y la introducción en la misma de un grupo 4-dimetilamino, caracterizado por el hecho de agregar la 1,3,10,11,12-pentahidroxi-naftaceno-2-carboxamida 4-insustituida, a un medio acuoso nutriente, fermentar el medio acuoso nutriente, en condiciones aerobias, con una cepa de una especie del género Streptomyces, que forma tetraciclinas, y continuar la fermentación hasta que la 1,3,10,11,12-pentahidroxi-naftaceno-2-carboxamida 4-insustituida se convierte virtualmente en la tetraciclina correspondiente.

4. Un método destinado a efectuar simultáneamente la 6,12a-dihidroxiación de una 1,3,10,11,12-pentahidroxi-naftaceno-2-carboxamida 4,7-di-insustituida y la introducción en la misma de un grupo 7-halo y un grupo 4-dimetila-



mino, caracterizado por el hecho de agregar la
1,3,10,11,12-pentahidroxinaftaceno-2-carboxamida 4,7-di-
insustituida a un medio acuoso nutriente, fermentar el me-
dio acuoso nutriente, en condiciones aerobias, con una
5 cepa de una especie del género Streptomyces, que produce
tetraciclinas, y continuar la fermentación hasta que la
1,3,10,11,12-pentahidroxinaftaceno-2-carboxamida 4,7-di-
insustituida se convierte virtualmente en la tetraciclina
correspondiente.

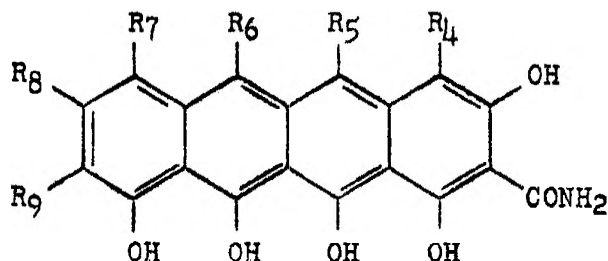
10 5. Un método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, de preparar una tetraciclina dotada de actividad antibiótica, de la fórmula:



en la cual R'5 se escoge de entre el grupo que abarca hi-
drógeno, el grupo hidroxilo, alcoxi inferior y alcoholo in-
15 ferior, R6 se escoge de entre el grupo que consta de hi-
drógeno y un grupo alcoholo inferior, y cada uno de los
símbos R7, R8 y R9 se escoge de entre el grupo que consis-
te en hidrógeno, un halógeno, un grupo hidroxilo, alcoxi in-
ferior, alcoholo inferior, nitroso, nitro, amino, mono(al-
20coholo inferior)amino, di(alcoholo inferior)amino, tiocia-



no y mercapto; caracterizado por el hecho de agregar una pretetramida de la fórmula:

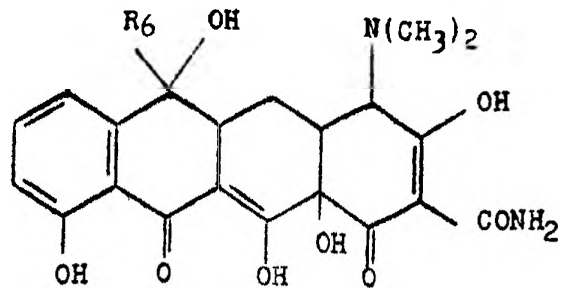


en la cual R_4 representa hidrógeno o un grupo dimetilamino, R_5 representa hidrógeno, un grupo alcoxi inferior o alcoholo inferior, R_6 representa hidrógeno o un grupo alcoholo inferior, y cada uno de los símbolos R_7 , R_8 y R_9 representa hidrógeno, un halógeno, un grupo hidroxilo, alcoxi inferior, alcoholo inferior, nitroso, nitro, amino, mono(alcoholo inferior)amino, di(alcoholo inferior)amino, tiociano
10 no o mercapto; a un medio acuoso nutriente, fermentar el medio acuoso nutriente, en condiciones aerobias, con una cepa de una especie del género Streptomyces, que produce tetraciclinas, y continuar la fermentación hasta que la pretetramida se convierte virtualmente en la tetraciclina
15 correspondiente.

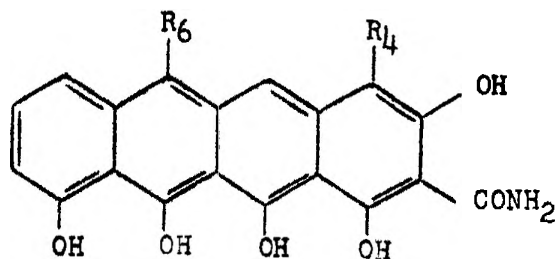
6. Un método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para la preparación de tetraciclinas de la fórmula:



- 5 N

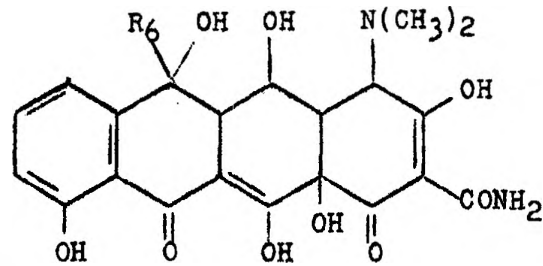


en la cual R_6 representa hidrógeno o un grupo alcoholo inferior; caracterizado por agregar una pretetramida de la fórmula:

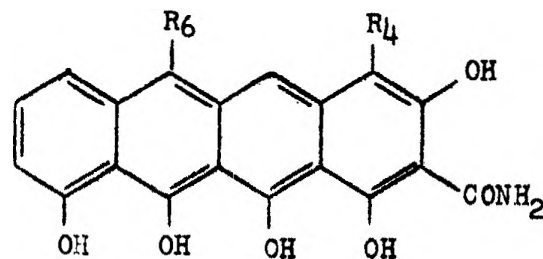


en la cual R_4 representa hidrógeno o un grupo dimetilamino
5 y R_6 representa hidrógeno o un grupo alcoholo inferior; a un medio acuoso nutriente, fermentar el medio acuoso nutriente, en condiciones aerobias, con una cepa no 7-halogenante de una especie del género Streptomyces, que produce tetraciclinas, y continuar la fermentación hasta que la
10 pretetramida se convierte virtualmente en la tetraciclina correspondiente.

7. Un método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, 1 a 5, de preparar tetraciclinas de la fórmula:

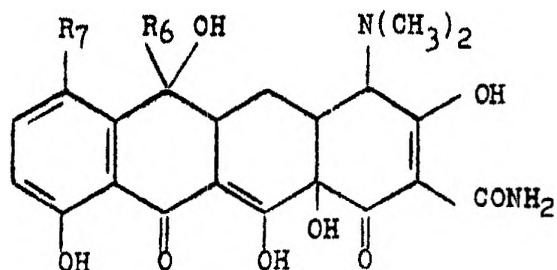


en la que R_6 representa hidrógeno o un grupo alcoholo inferior; caracterizado por el hecho de agregar una pretramida de la fórmula:

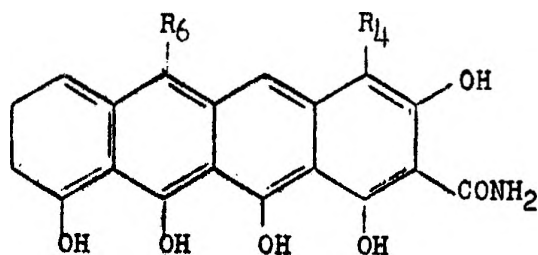


en la cual R_4 representa hidrógeno o un grupo dimetilamino y R_6 representa hidrógeno o un grupo alcoholo inferior, a un medio acuoso nutriente, fermentar el medio acuoso nutriente, en condiciones aerobias, con una cepa 5-hiroxilante de una especie del género Streptomyces, que produce tetraciclinas, y continuar la fermentación hasta que la pretetramida se convierte virtualmente en la tetraciclina correspondiente.

8. Un método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, 1 a 5, de preparar tetraciclinas de la fórmula:



en la cual R6 representa hidrógeno o un grupo alcoholo inferior y R7 representa un halógeno; caracterizado por el hecho de agregar una pretetramida de la fórmula:



en la cual R4 representa hidrógeno o un grupo dimetilamino y R6 representa hidrógeno o un grupo alcoholo inferior; a un medio acuoso nutriente, fermentar el medio acuoso nutriente, en condiciones aerobias, con una cepa 7-halogenante de la especie del género Streptomyces, que produce tetraciclinas, y continuar la fermentación hasta que la pretetramida se convierte virtualmente en la tetraciclina correspondiente.

9. Un método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, de preparar la 6-demetil tetraciclina, caracterizada por el hecho de agregar 1,3,10,11,12-pentahidroxi-



naftaceno-2-carboxamida a un medio acuoso nutriente, fermentar el medio acuoso nutriente, en condiciones aerobias, con una cepa no 7-halogenante de una especie del género Streptomyces, que produce tetraciclinas, y continuar la fermentación hasta que la 1,3,10,11,12-pentahidroxi-naftaceno-2-carboxamida se convierte virtualmente en la 6-demetiltetraciclina.

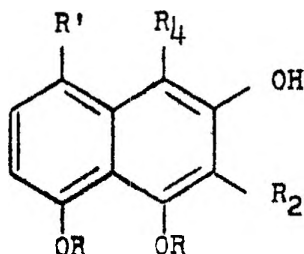
10. Un método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, de preparar 7-cloro-6-demetiltetraciclina, caracterizado por el hecho de agregar la 1,3,10,11,12-pentahidroxi-naftaceno-2-carboxamida a un medio acuoso nutriente, fermentar el medio acuoso nutriente, en condiciones aerobias, con una cepa 7-halogenante de una especie del género Streptomyces, que produce tetraciclinas, y continuar la fermentación hasta que la 1,3,10,11,12-pentahidroxi-naftaceno-2-carboxamina se convierte virtualmente en la 7-cloro-6-demetiltetraciclina.

11. Un método de preparar derivados naftacénicos que están por lo menos sustituidos por un grupo hidroxilo en las posiciones 1, 3, 10, 11 y 12 del naftaceno y por un grupo carboxamido en la posición 2, caracterizado por el hecho de reducir la 5,12- ó 6,11-naftacenoquinona que contiene un grupo carboxamido o un grupo capaz de convertirse en tal grupo carboxamido en la posición 2, a fin de convertir el grupo 11- ó 12-ceto en un grupo hidroxilo y

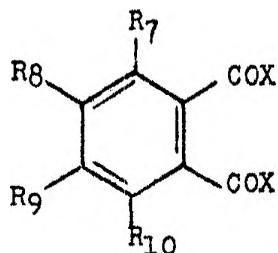


quitar el grupo hidroxilo procedente del grupo 5- ó 6-ceto y, si es necesario, formar el grupo carboxamido en la posición 2.

12. Un método, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de poner en contacto un compuesto de la fórmula:



en la cual R representa hidrógeno o un grupo alcoholo inferior, R₂ representa hidrógeno, un grupo carboxamido o N-(alcoholo inferior)carboxamido, R₄ representa hidrógeno o un grupo dimetilamino, y R' representa hidrógeno o un grupo alcoxi inferior, con un compuesto de la fórmula:

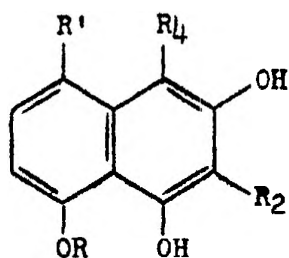


en la cual X representa un grupo hidroxilo, un halógeno, un grupo alcoxi inferior o bien ambas X se combinan entre sí como un átomo de oxígeno entrando a formar parte de un anhídrido, y cada uno de los símbolos R₇, R₈, R₉ y R₁₀

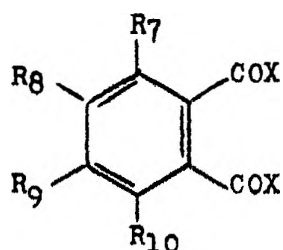


representa hidrógeno, un halógeno, un grupo hidroxilo, alcoxilo inferior, alcoholilo inferior, amino, mono(alcoholilo inferior)amino, di(alcoholilo inferior)amino, nitro, nitroso, tiociano o mercapto, en presencia de un agente ácido de condensación, y poner la 6-hidroxinaftaceno-5,12-quinona así obtenida en contacto con un agente reductor.

13. Un método, según la reivindicación 11, caracterizado por el hecho de poner en contacto un compuesto de la fórmula:



15 en la cual R representa hidrógeno o un grupo alcoholilo inferior, R₂ representa hidrógeno, un grupo carboxamido o N-(alcoholilo inferior)carboxamido, R₄ representa hidrógeno o un grupo dimetilamino, y R' representa hidrógeno o un grupo alcoholilo inferior, con un compuesto de la fórmula:



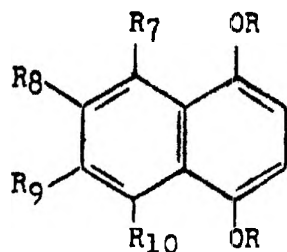
15 en la cual X representa un grupo hidroxilo, un halógeno, un

242180



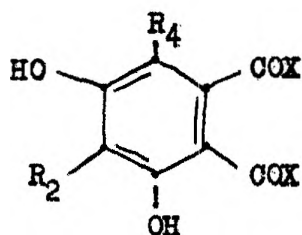
un grupo alcoxi inferior o bien ambas X se combinan entre sí como un átomo de oxígeno entrando a formar parte de un anhídrido, y cada uno de los símbolos R₇, R₈, R₉ y R₁₀ representa hidrógeno, un halógeno, un grupo hidroxilo, alcoxi inferior, alcoholo inferior, amino, mono(alcoholo inferior)amino, nitro, nitroso, tiociano o mercapto, en presencia de un agente ácido de condensación, y poner en contacto la naftaceno-6,11-quinona así obtenida con un agente reductor.

10 14. Un método, según la reivindicación 11, caracterizado por el hecho de poner en contacto un compuesto de la fórmula:



en la cual R representa hidrógeno o un grupo alcoholo inferior y cada uno de los símbolos R₇, R₈, R₉ y R₁₀ representa hidrógeno, un halógeno, un grupo hidroxilo, alcoxi inferior, amino, mono(alcoholo inferior)amino, di(alcoholo inferior)amino, nitro, nitroso, tiociano o mercapto, con un compuesto de la fórmula:

232166



5 en la cual X representa un grupo hidroxilo, un halógeno o un grupo alcoxi inferior o bien ambas X se combinan entre sí como un átomo de oxígeno entrando a formar parte de un anhídrido, R₂ representa hidrógeno, un grupo carboxamido o N-(alcohilo inferior)carboxamido y R₄ representa hidrógeno o un grupo dimetilamino, en presencia de un agente ácido de condensación, y poner en contacto la 6-hidroxi-naftaceno-5,12-quinona así obtenida con un agente reductor.

15 152. - Un método de convertir derivados naftacénicos".

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

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

20

Madrid, 5 NOV. 1962
 P.A.
 Alberto de Ezabur
 Puz Puz

282166