

24 AGO. 1963

P.- 24.889

289331



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 25 de Junio de 1963, con el Núm. 289.331

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de OLIN MATHIESON CHEMICAL CORPORATION, entidad norteamericana, establecida en 460 Park Avenue, Nueva York, N.Y., Estados Unidos de América, por:

"PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR 4-N-DEMETIL-4-N-ETIL
OXITETRACILINA"

La presente invención se refiere a la producción de 4-N-demetil-4-N-etil oxi tetraciclina. Más en particular, la invención se refiere al nuevo antibiótico 4-N-demetil-4-N-etil oxi tetraciclina y a un método para fabricar este compuesto por medios microbiológicos.

La 4-N-demetil-4-N-etil oxi tetraciclina se produce poniendo en cultivo una cepa del microorganismo Streptomyces rimosus (NRRL 2234) en un medio de fermentación en condiciones aerobias, en presencia de etionina.

Las condiciones de fermentación son en general las mis-



mas que en los métodos usuales de producir tetraciclinas por fermentación. El medio de fermentación contiene los usuales nutrientes, y fuentes minerales que suministran carbono, nitrógeno y energía al cultivo de desarrollo. Entre los nutrientes adecuados se incluyen, por ejemplo, los carbohidratos tales como fécula, dextrosa, sacarosa, glucosa, melaza, y fuentes de nitrógeno tales como la pulpa o harina de soja, levadura, extractos de carne, líquido de maceración del maíz, materia soluble de destilería, sales inorgánicas tales como el carbonato cálcico, sulfato amónico, así como elementos traza y otras sustancias usuales.

Además es esencial añadir al cultivo etionina, pudiendo usarse etionina DL, D o L. La proporción de etionina a añadir al cultivo se halla comprendida entre unos 50 mg y alrededor de 1000 mg por litro, y preferiblemente de unos 100 a 200 mg/l, aproximadamente. La etionina, de preferencia, se añade o echa en el cultivo en desarrollo.

El medio (A) empleado para preparaciones iniciales de inóculo en tubos oblicuos tiene la composición siguiente:

Alimento de avena, infantil (Heinz)	20,0 gramos
Pasta de tomate (Contadina)	20,0 gramos
Agar (Difco)	15,0 gramos
Agua corriente (del grifo), hasta un litro.	

De este medio se distribuyen 20 ml en tubos de ensayo de 2 1/2 x 15 cm taponados con algodón, que se esterilizan en autoclave a 121°C durante 30 minutos y se dejan enfriar luego en posición oblicua a 25°C. En los tubos oblicuos se inocula un cultivo de S. rimosus, que se pone en incubación



a 30°C durante 4-5 días.

El inóculo para fermentaciones en frasco o botella se prepara poniendo en suspensión en agua parte del desarrollo de cultivo obtenido en uno de estos tubos oblicuos. Dicha suspensión en agua se añade luego a un medio estéril de la composición (B) que se indica a continuación, puesto en frascos o botellas:

Harina de soja (proceso de extracción)	30 g/litro
Carbonato cálcico (en polvo)	7 g/litro
Glucosa	50 g/litro
Inhibidor de espuma (Ucon LB625) [■]	0,005 g/litro
Agua destilada, hasta componer un litro.	

[■] Producto de la Unión Carbide Corporation.

El desarrollo del inóculo en 1 litro del medio B, en un frasco de cuatro litros, se realiza a unos 25°C en un agitador rotatorio (280 rpm, 5 cm de carrera), durante unas 72 horas.

Para la etapa de germinación en depósito, el inóculo anteriormente citado se introduce en unos 30 litros del mismo medio B, en depósitos de acero inoxidable de 37,85 litros provistos de aireación y agitación constantes. En el depósito se produce una agitación de 0,053 - 0,08 CV/100 litros, aireando con 60 cm/min. de V.S.A. (velocidad superficial del aire), a una presión de 0,7 kg/cm² y una temperatura de 25°C, durante 36 a 48 horas.

Para fermentación en depósito de acero inoxidable de 37,85 litros de capacidad, se utilizan unos 30 litros del medio (C) siguiente:

Harina de soja	50 g/l
----------------	--------



Cereulosa (monohidrato de glucosa)	55 g/l
Carbonato cálcico (en polvo)	7 g/l
Inhibidor de espuma (Ucon LB625)	0,5 g/l

5 El medio se esteriliza mediante inyección directa de vapor de agua y manteniendo una temperatura de 121°C durante 30 minutos. Se añade de 3% a 6% de inóculo procedente de la etapa de germinación en depósito. Al inocular se añaden por cada litro de medio 100 mg de etionina en solución acuosa estéril. El medio se pone en agitación a razón de 10 unos 0,08 CV/100 litros, se airea a razón de unos 30 a 60 cm/min. de V.S.A. a la presión de 0,7 kg/cm² y a una temperatura de 25°C durante 120 a 144 horas.

15 La 4-N-demetil-4-N-etil oxitetraciclina se separa del caldo de cultivo por extracción con disolventes orgánicos tales como acetato de etilo, n-butanol, metil-isobutilcetona y similares, y luego se concentra el extracto rico hasta desecarlo por evaporación o liofilización. El producto puede purificarse aún más por cromatografía en columna de celulosa.

20 La 4-N-demetil-4-N-etil oxitetraciclina se pone de manifiesto y distingue de otras tetraciclinas por cromatografía en papel, empleando los métodos de Bohonos y otros, Antibiotics Annual 1953-4, pág. 49, o Selzer y Wright, Antibiotics and Chemotherapy, 6, 292 (1956). La estructura de 4-N-demetil-4-N-etilamina se pone de manifiesto mediante el uso de etionina DL marcada CH₃C¹⁴H₂-S, así como de metionina L marcada C¹⁴H₃-S, en presencia de etionina DL sin marcar. Se aísla la amina, viéndose que contiene radiactividad procedente tanto de la etionina como de la metionina, y que es cromatográficamente idéntica a la metil-

25
30

289331



etilamina.

La 4-N-demetil-4-N-etil oxitetraciclina presenta máximos de absorción a las siguientes longitudes de onda, en la región ultravioleta del espectro (con papel Whatman nº. 1 tamponada a pH 4,6 según MacIlvaine): 248, 277, 354 μ (milimicras), saliente a 320 μ ; y mínimos de absorción a 258 y 310 milimicras.

La 4-N-demetil-4-N-etil oxitetraciclina es un agente antibacteriano útil para combatir infecciones debidas a bacilos o cocos gram-positivos y gram-negativos, tales como los neumococos, estreptococos, estafilococos y similares. La sustancia puede ser administrada por vía oral o por vía parenteral en las formas de dosificación usuales, ajustada la posología a las necesidades individuales del paciente tratado, de igual manera que la tetraciclina.

Los ejemplos que siguen son ilustrativos, mas no limitativos, de la invención. Todas las temperaturas se expresan en grados centígrados.

Ejemplo 1:

Se prepara un inóculo de Streptomyces rimosus (NRRL 2234) poniendo en cultivo el Streptomyces rimosus durante 4 a 5 días en el medio A a 30-37°C, seguidos de almacenamiento a 4°C.

A un tubo que contiene 10 ml del medio B estéril se le añade 1 ml de etionina procedente de una solución estéril que contiene 1 mg de etionina por mililitro. Al tubo se le añade 1 ml del inóculo de Streptomyces rimosus, y se coloca el tubo en un agitador rotatorio (280 ciclos por minuto) a 25°C durante 7 días. El contenido del tubo se acidifica a un pH de 2 con ácido sulfúrico, se agita durante 10 minutos y se centrifuga. El examen del líquido sobrena-



dante, empleando los métodos de Bohonos y otros que arriba se citan, pone de manifiesto la presencia de la 4-N-dimetil-4-N-etil oxitetraciclina.

Ejemplo 2:

5

Se repite el procedimiento del ejemplo 1 a mayor escala, como sigue:

10

En un frasco de Erlenmeyer de 250 ml se ponen 50 ml del medio B, que se esterilizan en autoclave durante 30 minutos a 121°C y se les inocula un cultivo tomado de un tubo oblicuo del medio A con agar. El medio se pone en incubación a 25°C durante 72 horas en un agitador rotatorio (280 rpm, 5 cm de carrera).

15

El contenido entero del frasco se traslada luego a un frasco de cuatro litros que contiene un litro del mismo medio, esterilizado en autoclave durante 60 minutos a 121°C. El cultivo se pone luego en incubación durante 48 horas a 25°C en un agitador de vaivén (120 rpm, 5 cm de carrera).

20

Al terminar este período de incubación, el contenido entero del frasco de cuatro litros se introduce en depósitos de 37,85 litros que contienen 30 litros del medio B, esterilizado por inyección directa de vapor de agua, a 121°C durante 30 minutos. El cultivo es aireado a razón de 60 cm/min. de V.S.A. a una presión de 0,7 kg/cm² y una temperatura de 25°C durante 36 horas, y agitado a razón de 0,05- 0,08 CV/100 litros.

25

30

Al terminar este período de incubación, se toma un 3% (en volumen) del desarrollo micélico procedente de la etapa anterior, y se introduce en depósitos de acero ino-

289331



5
7
C
xidable de 37,85 litros, que contienen el siguiente medio estéril:

	Harina de soja (proceso de extracción)	50 g/l
	Cereposa (monohidrato de glucosa)	55 g/l
5	Carbonato cálcico	7 g/l
	Inhibidor de espuma (Ucon IB625)	0,5 g/l

añadiéndose 100 mg de una solución estéril de etionina DL en agua por cada litro del medio, en el momento de la inoculación en éste. El cultivo se pone en incubación durante 10
120 horas a una temperatura de 25°C y una presión positiva de 0,7 kg/cm². La mezcla de fermentación se agita a razón de 0,08 CV por cada 100 litros, y se airea a razón de 30 cm/min. de V.S.A. durante las primeras 24 horas, y a 60 cm/min. de V.S.A. hasta la recogida.

15
Ejemplo 3:

4,05 litros del caldo de fermentación procedente del ejemplo 2 se acidifica a un pH de 2,0 con ácido sulfúrico 12N, se mezclan durante 10 minutos y se filtran con Celite
20 lavada en ácido. El producto de filtración se somete a extracción con un litro de acetato de etilo, separándose las dos capas que se forman. La fase acuosa se satura con sulfato amónico y se somete a extracción con un litro de acetato de etilo. Esta solución en acetato de etilo se lleva
25 casi a desecación, por destilación a la temperatura ambiente y con presión reducida. La materia sólida parda glutinosa se pone en extracción con 25 ml de éter, y el residuo se disuelve en 20 ml de metanol. La solución en metanol se pone en evaporación hasta que queda seca, dando 1,05 gramos de
30 un producto sólido amarillo.



De este producto sólido así obtenido se toman 100 mg y se disuelven en 500 ml de ácido clorhídrico 0,01N. A esta solución se le añaden 100 ml de cloroformo, y la mezcla se satura con sulfato amónico. Después de agitar durante 5 minutos, se filtra la mezcla y se separan las capas acuosas y de cloroformo. La solución en cloroformo se somete a extracción con cuatro partes alícuotas de 100 ml de HCl 0,01N. La solución de HCl es recogida, saturada con sulfato amónico y sometida a extracción con 50 ml de acetato de etilo.

La solución en acetato de etilo se seca con sulfato sódico anhidro y luego se pone en evaporación hasta desecarla a la temperatura ambiente y con presión reducida. La sustancia sólida glutinosa obtenida se disuelve en 10 ml de HCl 0,01N, al cual se añaden 10 ml de cloroformo. Cada fase se satura previamente con la otra. La mezcla se satura con sulfato amónico, se agita durante 5 minutos y se filtra. Se efectúan nueve transferencias a contracorriente, utilizando en cada una 10 ml de cloroformo como fase estacionaria y 10 ml de HCl 0,01N saturado con sulfato amónico como fase móvil, saturando cada fase con la otra. Las capas de cloroformo de los tubos 1 a 3, que contienen 4-N-etil-4-N-etil oxitetraciclina, se combinan y ponen en extracción con 10 ml de HCl 0,01N.

Se toman 8 gramos de celulosa Whatman en polvo (calidad normal) y se ponen en suspensión con una solución tampón (pH = 3,0) de fosfato, 0,3 molar, filtrando luego. El polvo húmedo es prensado entre toallas de papel, para quitar el excedente de solución tampón, y puesto en suspensión en acetato de etilo saturado con solución tampón de

289331



fosfato 0,3 molar (pH = 3,0, echándolo luego en una columna de 1,0 x 21,5 cm, atacándolo fuertemente y con extracción de vacío. La columna se lava con 20 ml de acetato de etilo saturado con solución tampón de fosfato 0,3 molar (pH = 3,0) utilizando presión positiva para obligar al disolvente a pasar a través.

El extracto de HCl 0,01N arriba obtenido se satura con sulfato amónico y se pone en extracción con 10 ml de acetato de etilo. El volumen de acetato de etilo se reduce a 1 ml a la temperatura ambiente, y con presión reducida. El concentrado de acetato de etilo se coloca en la columna, efectuándose la elución con acetato de etilo saturado con solución tampón de fosfato 0,3 molar (pH = 3,0) a un caudal de 0,5 ml/min., utilizando presión positiva. Cuando en el eluato aparece pigmento, se recogen treinta y seis muestras de 2 ml. El análisis cromatográfico con acetato de etilo tamponado a pH de 4,6 según MacIlvain da 4-N-demetil-4-N-etil oxitetraclina en las muestras 5 a 18. Las fracciones que contienen el producto son combinadas y evaporadas a sequedad.

Ejemplo 4:

Se toman 500 ml del caldo de fermentación producido como en el ejemplo 2, se acidifica a un pH de 1,6 con ácido clorhídrico y se le agregan 12,5 gramos de oxalato amónico. Se agita la mezcla durante una hora, y luego se le añaden 10 ml de detergente (Arquad 16-50, de la Armour Industrial Chemical Co.). Se ajusta la mezcla a un pH de 8,5 con hidróxido potásico, y se añaden 200 ml de metil-iso-butyl-cetona. Se agita la mezcla durante 20 minutos, segui-

289331



dos de filtración después de añadir 40 gramos de Celite lavada con ácido. Se separan las capas orgánicas y acuosa, y se lava la torta de filtro con partes alícuotas de 200 ml de metil-isobutilcetona. Se combinan el extracto orgánico y los productos de lavado. La solución de metil-isobutilcetona (300 ml) es lavada con dos partes alícuotas de 15 ml de agua, ajustándose la mezcla a un pH de 2,0 con HCl. La solución acuosa se recoge y liofiliza, y los 0,25 gramos de materia sólida que contiene la 4-N-demetil-4-N-etil oxitetraciclina, así obtenidos, se siguen purificando como en el ejemplo 3.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América el 5 de Julio de 1962, bajo el número 207.769, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

- 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 4-N-demetil-4-N-etil oxitetraciclina, caracterizado por cultivar Streptomyces rimosus en un medio nutritivo acuoso que contiene una fuente asimilable de carbono y nitrógeno en presencia de etionina.

2º.- Un procedimiento de acuerdo con el punto 1, caracterizado porque la cantidad de etionina es de 50 a 1.000



mg/litro aproximadamente.

3º.- Un procedimiento de acuerdo con el punto 1, caracterizado porque la cantidad de etionina es de 100 a 200 mg/litro aproximadamente.

5

4º.- Procedimiento para producir 4-N-demetil-4-N-etil oxitetraciclina.

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

10

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

Madrid,

24 AGO. 1953

P.A.

Alberto de Elzatic
Por Poder

289331

AVS.