

P - 45.049

U.S. Ser.
Nº 832,681
File 20548-Spain

380657

SECCION TECNICA
CLASIFICACION
C-07 A-61
C K



Memoria descriptiva

para solicitar PATENTE DE INVENCION

por 20 años

a nombre de RESEARCH CORPORATION

entidad / ~~denacionalidad~~ norteamericana

con domicilio en 405 Lexington Avenue, Nueva York, N.Y.,
Estados Unidos de América.

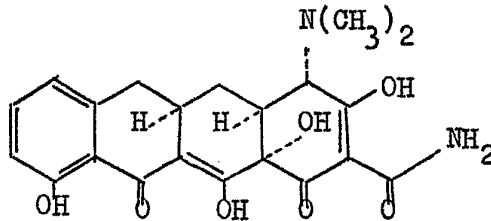
por: "UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR NUEVOS COMPUESTOS
DE TETRACICLINA" (Clase Internacional C07c)



Nuevas tetraciclinas

La presente invención se refiere a un nuevo grupo de tetraciclinas.

Se ha conocido desde hace un cierto número de años un grupo de importantes antibióticos que tienen la estructura básica:



(1)

Este compuesto básico (1), 6-desoxi-6-desmetiltetraciclina, es el más simple de los compuestos de tetraciclina que conserva totalmente su actividad biológica contra bacterias tanto gram-negativas como gram-positivas.

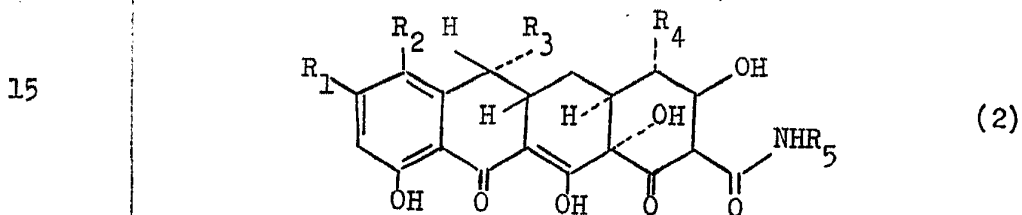
El estudio de este compuesto y otros relacionados ha conducido a los investigadores a la creencia de que la relación estérica entre los diversos grupos sustituyentes del anillo de tetraciclina juega un papel importante para determinar la actividad biológica. Las relaciones estéricas, como se ha indicado en la fórmula estructural anterior, ponen al grupo hidroxilo 12a, al grupo 4-dimetilamino, al hidrógeno 4a y al hidrógeno 5a, todos, en el mismo lado del sistema de anillo. (Se entenderá que con la fórmula estructural antes indicada, así como con las descritas más adelante, no se pretende implicar conocimiento de la configuración absoluta de la forma biológicamente activa de las tetraciclinas, sino solo la relación estérica relativa de los grupos sustituyentes importantes).

380657



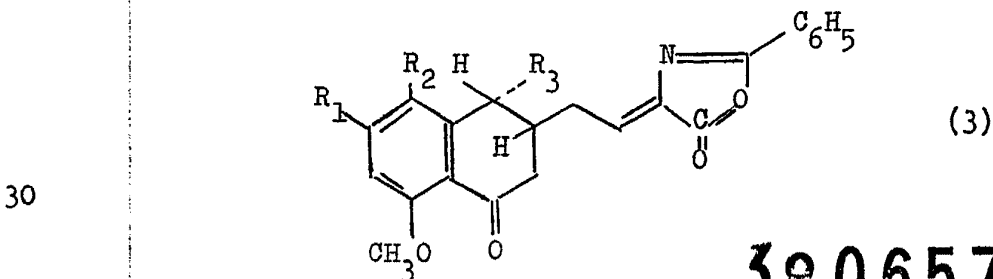
Muy sorprendentemente, en vista de lo que antecede, se ha descubierto un nuevo grupo de tetraciclinas biológicamente activas en las que el hidrógeno 5a está en posición anti respecto al hidrógeno 4a, en contraste con la posición sin, que hasta ahora se creía esencial para los compuestos de tetraciclina biológicamente activos. Desde luego, se halla que un cierto número de las nuevas tetraciclinas que han sido descubiertas ahora presentan un espectro de actividad biológica significativamente diferente del de sus isómeros estéricos "naturales".

Los compuestos dentro del ámbito de la presente invención pueden ser representados por la fórmula:

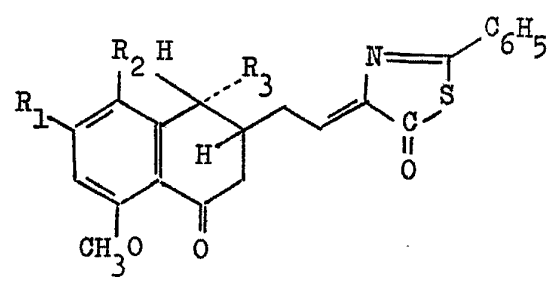


20 donde R_1 es H u OH, R_2 es H o halógeno, R_3 es H o CH_3 , R_4 es dimetilamino o benzamido, y R_5 es H o un alcoholo C_1-C_4 . Los compuestos preferidos son aquellos en los que R_1 es hidrógeno, R_4 es dimetilamino y R_5 es hidrógeno. También se prefiere que R_2 sea hidrógeno o cloro.

25 Los compuestos de la presente invención son accesibles por condensación de una azlactona o tiazolona de estructura:



380657



(4)

5

con un metil-3-oxoglutamato apropiado. El condensado resultante es un compuesto tetracíclico que puede ser manipulado adecuadamente para eliminar grupos protectores y derivar así los productos finales deseados. La preparación de estos compuestos está expuesta en más detalle en los ejemplos, y se ilustra en los dibujos.

10

Ejemplo 1

Preparación de la azlactona

15

1 (a). Esterificación de (5)[¶]

Se disolvieron 25 g de (5) en 300 ml de metanol que contenía 5% en volumen de ácido sulfúrico concentrado. La solución fue tratada a reflujo durante 2 horas, y vertida luego en 800 ml de agua de hielo. El precipitado blanco fué filtrado, lavado con agua y cristalizado con metanol. Se obtuvieron 23,5 g (rendimiento del 89%) de éster metílico cristalino. La identidad del producto fué confirmada por análisis elemental.

20

1 (b). Cetalización del éster metílico a (6)[¶]

Se disolvieron 132 g del éster preparado en el ejemplo 1 (a) en 1500 ml de benceno, con agitación y calentamiento. Tras añadir 0,5 g de ácido p-toluensulfónico y 10 ml de etilenglicol, la solución fué llevada a reflujo mien

25

[¶] Esta preparación, así como las que siguen, está indicada en la tesis doctoral de Jeffrey Michael, sometida a la Universidad de Wisconsin.

30



5 tras se mantenía una agitación enérgica, y se separó el agua
aceotrópica. Se añadieron porciones de 10 ml de glicol tras
1, 3, 6 y 8 horas, hasta que se hubo añadido un total de
50 ml. Tras tratar a reflujo durante 20 horas, la solución
10 fué enfriada, diluída con cloroformo y lavada cuatro veces
con agua. La capa orgánica fué secada con sulfato sódico,
y evaporada. El aceite residual fué cristalizado con un pe
queño volumen de éter, produciendo 123 g (rendimiento del
81%) de (6). La identidad del producto fué verificada por
análisis elemental.

1 (c). Reducción de (6) a alcohol (7)

15 Se preparó una solución de hidruro de litio alu-
minio tratando a reflujo 100 g de hidruro de litio aluminio
en 1500 ml de éter anhidro, durante 10 horas. Tras sedimen
tar durante la noche, el líquido transparente que sobrenada
ba fué separado haciendo sifón y almacenado en una botella
de vidrio de pared gruesa. Se añadieron gota a gota 250 ml
de esta solución (aproximadamente 1,1 molar) a una solución
agitada de 114 g de (6) en 300 ml de éter y 300 ml de bence
20 no (ambos destilados de LiAlH_4). Tras agitar durante 4 ho-
ras a temperatura ambiente, el exceso de hidruro fué des-
truído con acetato de etilo, la solución fué diluída con
cloroformo y agitada con cloruro amónico acuoso. La capa or
gánica fué lavada tres veces con agua, secada sobre sulfato
25 sódico, y evaporada a sequedad. El residuo fué recristaliza
do a partir de metanol, dando 96 g (rendimiento del 93%) de
(7). La identidad del producto fué confirmada por análisis
infrarrojo y elemental.

30 1 (d). Ester metanosulfonato de (7)

Se disolvieron 95 g del alcohol (7) en 500 ml de

380657

11 JUL



piridina, y la solución fué enfriada hasta 0°C en un baño de hielo. Se añadieron 40 ml de cloruro de metanosulfonilo a la solución agitada, a la que luego se dejó llegar a temperatura ambiente. Tras 2 horas, la reacción fué vertida en agua de hielo, y el producto fué filtrado, disuelto en acetato de etilo y secado sobre sulfato sódico. El aceite que quedaba tras la evaporación del acetato de etilo fué cristalizado a partir de un volumen grande de éter, dando 113 g (rendimiento del 94%) de producto. La identidad del producto fué verificada por análisis elemental.

1 (e). Nitrilo (8)

Se disolvieron 112 g del éster metanosulfonato, preparado en el ejemplo 1 (d), en 1500 ml de sulfóxido de dimetilo que contenían 75 g de cianuro potásico. Esta solución fué agitada a 60°C durante 3 horas, y luego fué enfriada y vertida en 4 litros de agua de hielo. El precipitado fué filtrado, lavado con agua, disuelto en cloroformo y secado sobre sulfato sódico. El aceite que quedaba tras la evaporación del disolvente fué cristalizado a partir de metanol, dando 89 g (rendimiento del 97%) de nitrilo cristalino (8). La identidad del producto fué confirmada por análisis espectral y elemental.

1 (f). Reducción con níquel Raney de (8) a aldehído (9)

Se disolvieron 50 g de nitrilo (8) en 400 ml de piridina y una solución tampón compuesta por 200 g de fosfato trisódico, 1000 ml de ácido acético glacial y 400 ml de agua. La mezcla transparente fué calentada hasta 55°C, y se añadieron aproximadamente 30 ml de níquel Raney. La reacción fué agitada enérgicamente durante 3 horas, y luego

380657



fué enfriada, filtrada y acidificada hasta pH 1, con ácido clorhídrico concentrado. Después fué sometida a extracción con cloroformo. El extracto fué lavado tres veces con agua, secado sobre sulfato sódico, y evaporado. El residuo fué
5 cristalizado a partir de alcohol metílico, dando 31 g (rendimiento del 72%) de aldehído (9). La identidad del producto fué confirmada por análisis espectral.

1 (g). Az lactona (10)

A una solución de 15 g de (9) cristalino, en 400
10 ml de tetrahidrofurano (destilado de hidruro de litio aluminio), se añadieron 10,5 g de ácido hipúrico, 18,5 ml de anhídrido acético y 11,5 g de acetato de plomo (polvo anhidro). Tras tratar a reflujo, con agitación, durante 2,5 horas, la solución fué enfriada, diluída con cloroformo y la
15 vada cinco veces con agua. Después fué secada sobre sulfato sódico y evaporada hasta espuma marrón, que fué cristalizada a partir de benceno. El rendimiento fué 12,5 g (rendimiento del 53%) de la az lactona (10), punto de fusión de 154 a 160°C. La identidad del producto fué verificada por
20 análisis espectral.

Ejemplo 2

Condensación de az lactona (10) con N-terc-butil-3-oxoglutamato de metilo (11)

Se disolvieron 5 g de (10) y 3 g de (11) en 75 ml
25 de tetrahidrofurano y 25 ml de éter (ambos destilados de hidruro de litio aluminio bajo nitrógeno). El matraz de reacción había sido previamente secado y barrido con nitrógeno, y estaba provisto de entrada de gas para proporcionar una atmósfera de nitrógeno constante en el recipiente, durante
30 toda la reacción. Se añadió lentamente hidruro sódico (1,20



g) en dispersión en aceite mineral, a la solución agitada, a temperatura ambiente. Tras agitar durante 1 hora, la solución fué llevada a reflujo a 70°C en un baño de aceite, y fué mantenida durante 30 horas. Al final de ese tiempo, la solución fué enfriada, acidificada con ácido acético, diluída con cloroformo, lavada cuatro veces con agua, secada sobre sulfato sódico y evaporada hasta espuma marrón.

Este residuo fué recogido en un pequeño volumen de cloroformo, y puesto en la parte superior de una columna cromatográfica rellena con aproximadamente 800 g de gel de sílice lavado, que había sido previamente equilibrado en una jarra cerrada, con 120 ml de eluyente. La columna fué revelada por adición de una pequeña cantidad de eluyente, cloroformo-acetona (95:5), por la parte superior, para mantener una columna de aproximadamente 2 cm. El grifo de cierre se dejó abierto, para permitir que escapase el aire desplazado del gel de sílice. Tan pronto como el disolvente empezó a fluir de la columna, se recogieron fracciones y se analizó su contenido sobre placas de cromatografía en capa delgada (gel de sílice:benceno-acetato de etilo 4:1, más 1% de ácido fórmico). Se obtuvo de estas fracciones, por cristalización con acetona, un total de aproximadamente 4 g (rendimiento del 56%) de material tetracíclico cristalino. Las fracciones 1 a 4 produjeron aproximadamente 0,66 g de isómero (12); las fracciones 5 y 6 produjeron aproximadamente 0,68 g de isómero (14); y las fracciones 7 a 12 produjeron aproximadamente 2,7 g de una mezcla igual de isómeros (13) y (15). Estos dos últimos isómeros fueron separados adicionalmente, por cristalización fraccionada a partir de acetona. Los productos fueron caracterizados, cada uno, por sus

380657

11 JUL



puntos de fusión, como sigue:

El isómero (12) tenía un punto de fusión de 228-232°C.

El isómero (13) tenía un punto de fusión de 240-244°C.

El isómero (14) tenía un punto de fusión de 214-222°C.

5 El isómero (15) tenía un punto de fusión de 230-237°C.

La identidad de cada isómero fué confirmada además por análisis espectral.

Ejemplo 3

Hidroxilación de (14) a (17)

10 Se disolvió 1,0 g de (14) en 40 ml de dimetilformamida y 100 ml de tetrahidrofurano. Se añadieron 280 mg de fosfito de trietilo, seguidos por 200 mg de hidruro sódico dispersado en aceite mineral. Se hizo burbujear oxígeno en esta solución durante 10 min, y el color cambió de fluorescente naranja a verde mate. Una gota de esta solución, puesta en borato sódico metanólico, mostró que la absorción en la región visible del espectro había desaparecido y había sido reemplazada por un nuevo máximo a aproximadamente 350 milimicras. (Se observó en varias ocasiones que no tuvo lugar inmediatamente reacción con oxígeno -no hubo cambio de color. En estos casos fué necesario iniciar la reacción añadiendo hasta 10 gotas de agua). La solución oxigenada fué acidificada luego con ácido acético, diluída con cloroformo y lavada 4 veces con agua. Fué secada sobre sulfato sódico y evaporada. El producto (15) pudo ser cristalizado directamente a partir de metanol. Se obtuvieron 0,740 g de (15) cristalino puro. La identidad del producto fué confirmada por análisis espectral y elemental.

15

20

25

380657

Ejemplo 4Conversión de la benzamida (15) a
compuesto de dimetilamina (17)

5 Se inyectaron 10 ml de éter (destilado de hidruro
de litio aluminio) en un matraz de 50 ml, de 3 bocas, que
contenía atmósfera de nitrógeno y estaba provisto de tapón
con jeringa. Luego se añadieron 0,820 ml de eterato de tri-
fluoruro de boro y 0,400 ml de epiclorhidrina, y la solu-
10 ción fué agitada enérgicamente durante la noche. El sólido
blanco (tetrafluoroborato de trietiloxonio) fué lavado con
éter fresco, con ayuda de una jeringa de 10 ml provista de
aguja larga. La sal fué disuelta en un pequeño volumen de
diclorometano seco, y precipitada de nuevo con 10 ml de
15 éter. Tras lavar de nuevo con éter, la sal fué disuelta en
10 ml de diclorometano, y se añadieron 430 mg de (15) sus-
pendidos en 20 ml de diclorometano. Tras 48 horas a tempera-
tura ambiente, se añadió un exceso de solución de carbonato
potásico al 5% en agua, y se agitó enérgicamente durante me-
20 dia hora. La capa orgánica fué separada, secada y evaporada.
El residuo fué disuelto luego en 16 ml de tetrahi-
drofurano, se añadieron 8 ml de HCl 0,1N, y se dejó reposar
la solución a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras di-
25 luir con cloroformo, la solución de reacción fué lavada con
agua, secada sobre sulfato sódico y evaporada hasta aceite
oscuro, que fué triturado con éter caliente, dando 265 mg
de clorhidrato de la amina (16), en forma de polvo amorfo
ligero. Este polvo resultó tener una pureza mayor del 90%,
por cromatografía en capa delgada. La identidad del produc-
30 to fué confirmada por medio de su espectro ultravioleta, su
peso molecular y su espectro másico.

380657



Se disolvieron 0,100 g de la amina (16) en 10 ml de cloroformo que contenían 0,38 ml de diisopropiletilamina. Se añadieron 0,17 ml de sulfato de dimetilo, y la reacción fué agitada a temperatura ambiente mientras se seguía su avance por cromatografía en capa delgada. Cuando hubo desaparecido todo el material de partida y el producto de monoalcoholación (aproximadamente 12 horas), la solución en cloroformo fué agitada tres veces con ácido clorhídrico diluido (pH 1) y una vez con agua neutra, fué secada sobre sulfato sódico, y evaporada. El residuo fué cristalizado a partir de cloroformo-metanol, dando 59 mg (rendimiento del 56%) del compuesto (17) dimetilemínico. Fué caracterizado por su punto de fusión, de 247-251°C (descomposición). La identidad del producto fué confirmada por análisis espectral y elemental.

Ejemplo 5

Eliminación de los grupos protectores metoxi y N-terc-butilo

Se pusieron 0,040 g de la dimetilamina (17) en un pequeño tubo de ensayo con 3 ml de ácido bromhídrico al 48%, y se hizo burbujear nitrógeno en el ácido durante 5 min, a temperatura ambiente. El tubo de ensayo se hizo descender luego hasta un baño de aceite que había sido precalentado a 100°C, y se continuó burbujear nitrógeno mientras se calentaba la solución ácida. Tras 5 min de calentamiento, todo el (17) se había disuelto. Se continuó el calentamiento durante 15 min adicionales. La solución transparente fué enfriada, diluída con 10 ml de agua, neutralizada hasta pH 7 con hidróxido sódico acuoso al 20%, y sometida a extracción dos veces con porciones de 10 ml de n-butanol. Los extrac-

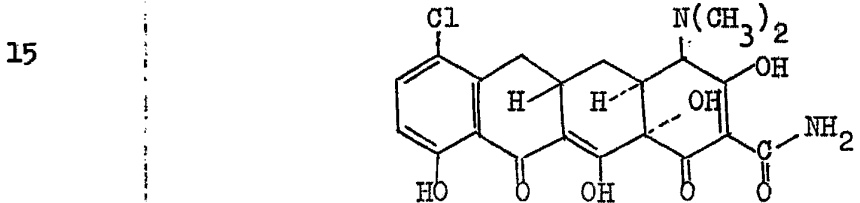
380657



tos en butanol fueron reunidos, lavados con agua, y evaporados hasta sólido seco color canela, que fué disuelto en un pequeño volumen de etanol ácido, y cromatografiado en una corta columna llena de polvo de poliamida seca, sin tratar, usando etanol absoluto como eluyente. Las primeras pocas fracciones fueron cristalizadas, y se obtuvieron 23 mg (rendimiento del 64%) de compuesto (18). El compuesto obtenido se caracterizó por un punto de fusión de 248-250°C con descomposición (dimórfico, p.f. 213-215°C, desc.). La identidad del producto fué confirmada además por su análisis espectral y elemental.

Ejemplo 6

Una muestra del compuesto:



20 fué sometida para ensayo biológico, para determinar su actividad contra diversos microorganismos. Los resultados fueron los siguientes:

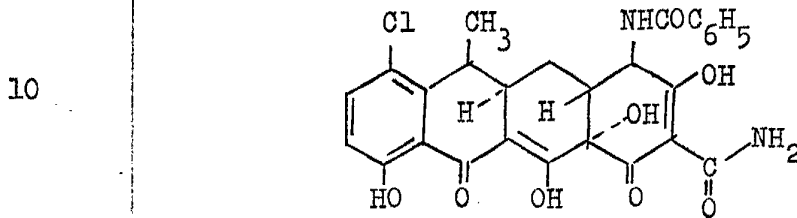
	<u>Microgramos/ml</u>
Staph. aureus	0,78
25 Staph. aureus, cepa resistente a la tetraciclina	0,04
Strept. pyogenes	0,78
E. coli	12,5
P. multocida	0,19
30 Sal. typhosa	25

La actividad anterior fué considerada excepcionalmente favorable

- 12 - 380657

rable. Es particularmente significativo que la tetraciclina natural mostró marcada actividad contra una cepa de Staph. aureus normalmente resistente a los antibióticos del tipo tetraciclina.

5 De manera análoga, se ha evaluado la actividad biológica de otras epitetraciclinas C-5a. Por ejemplo, el compuesto

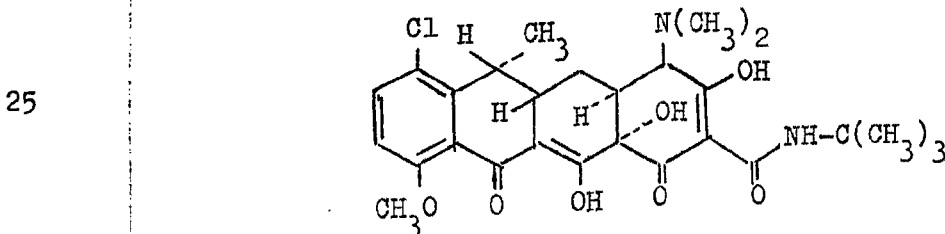


15 mostró que era activo como benzamida de la 6-desoxi-6-desmetiltetraciclina, de actividad biológica total, y también mostró actividad contra las cepas bacterianas normalmente resistentes.

20 Las epitetraciclinas 5a de la presente invención se ofrecen también como productos intermedios para otros compuestos tetracíclicos.

Ejemplo 7

Se disolvió 1 g de



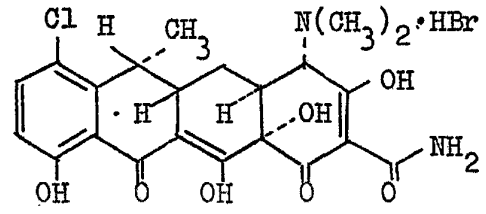
30 en 75 ml de ácido bromhídrico al 48%. La solución fué calentada en un baño de vapor de agua durante 50 min, y luego el

380657



disolvente fué evaporado y el residuo cristalino fué recris-
talizado a partir de etanol y unas pocas gotas de ácido
bromhídrico. El rendimiento del producto

5



10

fué 95%. Funde con descomposición a más de 240°C. La identi-
dad se confirma por análisis espectral y elemental.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en
los Estados Unidos de América, el 12 de Junio de 1.969, ba-
jo el N° 832.681, se acoge a los beneficios del artículo 51
del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

15

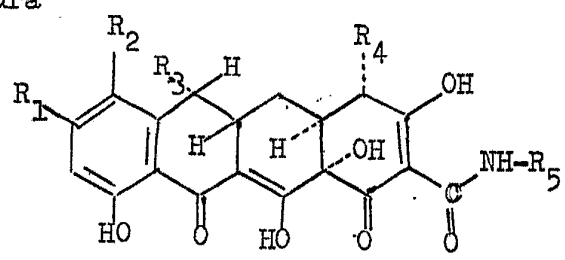
N O T A

20

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

1.- Un procedimiento para preparar compuestos de
la estructura

25



I

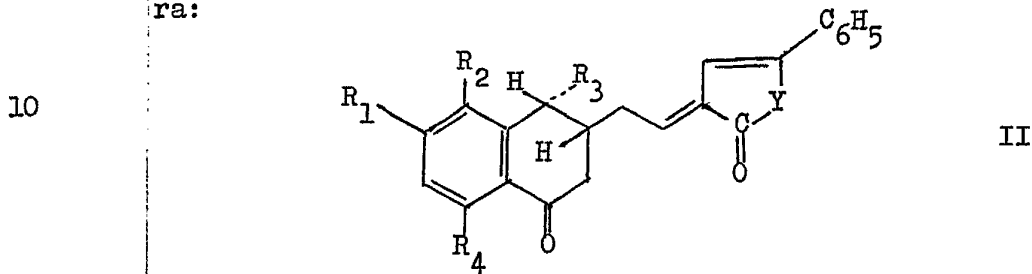
30

Handwritten signature and date: 6.7.70

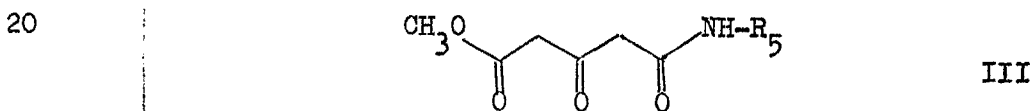
380657



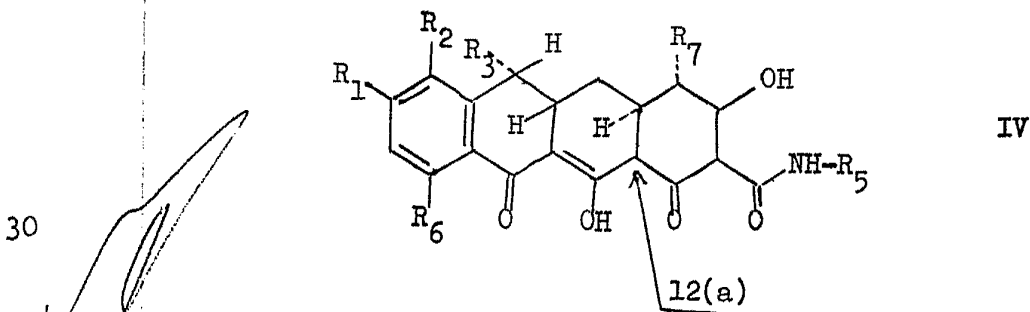
en la que R_1 se elige del grupo que consiste en hidrógeno y OH; R_2 se elige del grupo que consiste en hidrógeno y halógeno; R_3 se elige del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; R_4 se elige del grupo que consiste en dimetilamino y benzamido; y R_5 se elige del grupo que consiste en hidrógeno o alcohol de 1 a 4 carbonos; que comprende (1) hacer reaccionar una azlactona o tiazolona que tiene la estructura:



y en la que R_1 se elige del grupo que consiste en hidrógeno y OH, R_2 se elige del grupo que consiste en hidrógeno y halógeno, R_3 se elige del grupo que consiste en hidrógeno y metilo, R_4 es hidroxilo o un grupo hidroxilo protegido, e Y es oxígeno o azufre, con 3-metiloxoglutaramato que tiene la estructura:



en la que R_5 se elige del grupo que consiste en hidrógeno o alcohol de 1 a 4 átomos de carbono, para formar el compuesto intermedio



30

6.7.70

12 ABR



5 en el que R_7 es benzamido o tiobenzamido, (2) introducir después un grupo cis-hidroxi en la posición 12(a) de dicho producto intermedio y convertir dicho radical R_6 a hidroxi y dicho radical R_7 en dimetilamino o benzamido para formar dicho compuesto I.

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que R_1 es hidrógeno.

10 3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que R_1 es hidrógeno y R_2 se elige del grupo que consiste en hidrógeno y cloro.

4.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que R_1 es hidrógeno y R_4 es dimetilamino.

5.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que R_1 es hidrógeno y R_5 es hidrógeno.

15 6.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que R_1 es hidrógeno, R_2 se elige del grupo que consiste en hidrógeno y cloro, R_4 es dimetilamino y R_5 es hidrógeno.

20 7.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que R_1 es hidrógeno, R_2 es cloro, R_3 es hidrógeno, R_4 es dimetilamino y R_5 es hidrógeno.

8.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que R_1 es hidrógeno, R_2 es cloro, R_3 es metilo, R_4 es benzamido y R_5 es hidrógeno.

25 9.- Un procedimiento para preparar nuevos compuestos de tetraciclina.

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

6.4.71

380657

12 ABR



Esta Memoria consta de diez y seis hojas y la pre
sente escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 12 ABR 1971
P.A.

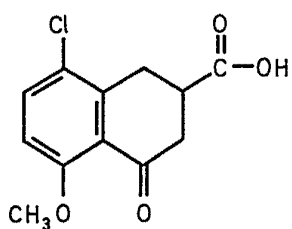
Alberio de Eizaburu
Por Poderes

380657

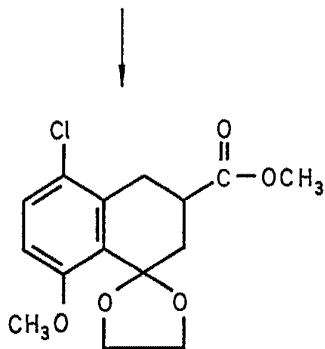
- 17 -

6.4.71
AMC/

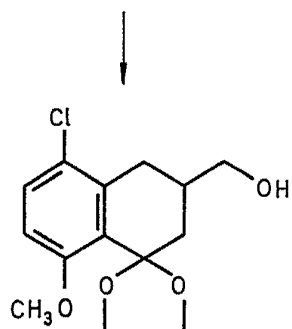
22 MAR 1957



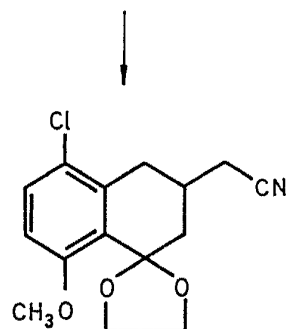
(5)



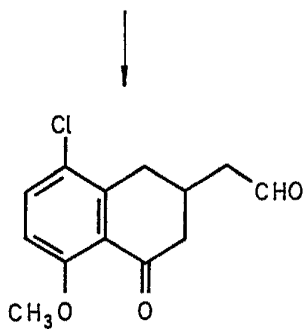
(6)



(7)



(8)

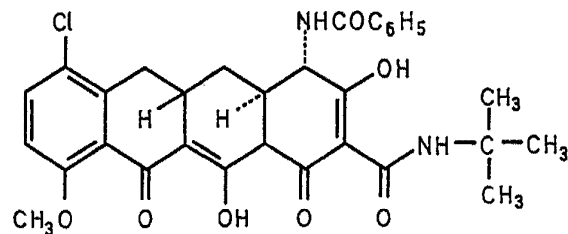
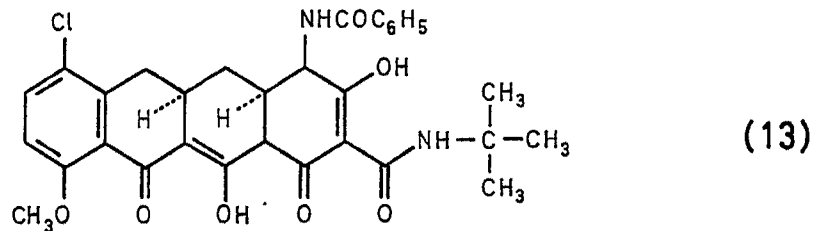
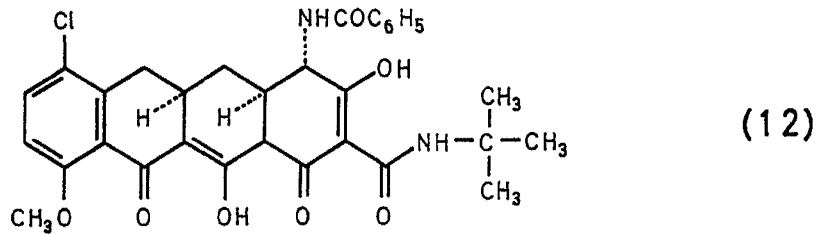
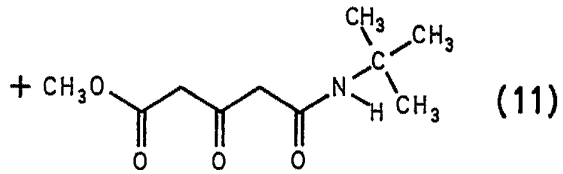
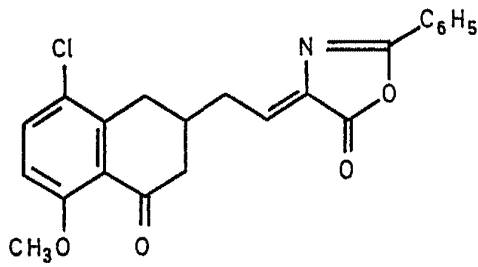


(9)

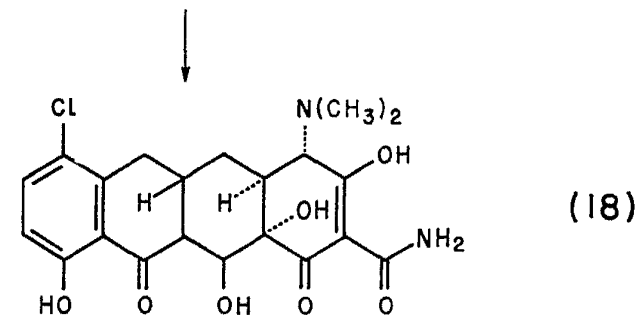
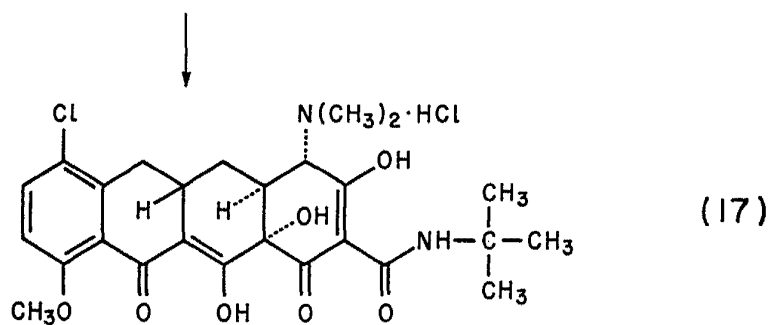
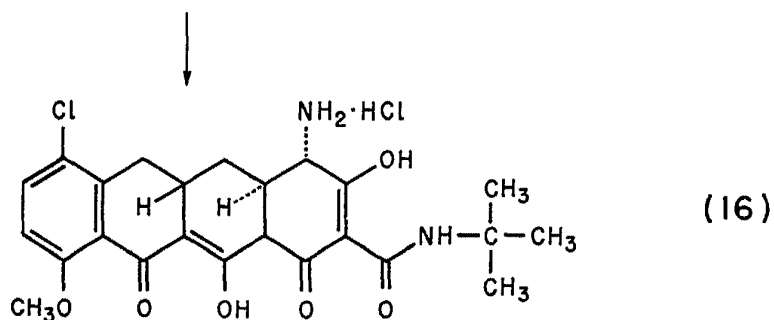
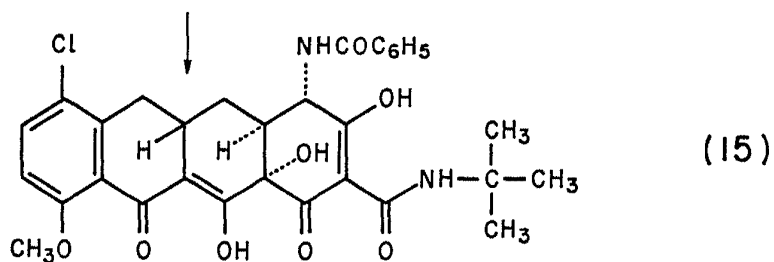
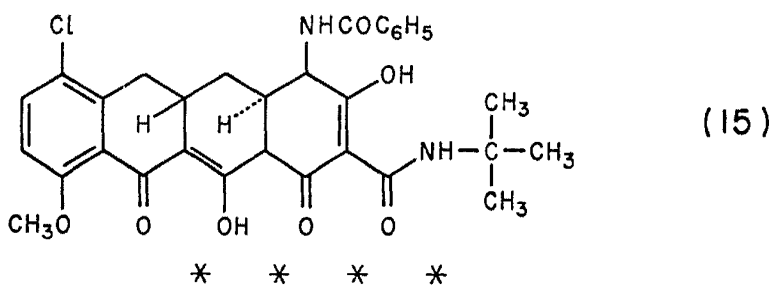
Alberto de B. *Alberto de B.*
For Patent

RECEIVED

22 MAR 1951



Alberto de...
Per...



Alberto G. ...
For Today