

380058

U.S. Ser
Nº 832-650
File 20488 Sp.

Memoria descriptiva



para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de RESEARCH CORPORATION

entidad / ~~de nacionalidad~~ norteamericana

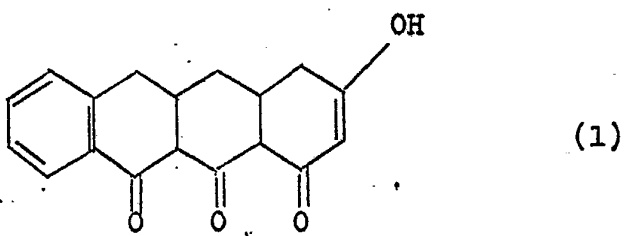
con domicilio en 405 Lexington Avenue, Nueva York, N.Y.,
Estados Unidos de América

por: "MEJORAS INTRODUCIDAS EN EL PROCEDIMIENTO PARA LA
HIDROXILACION 12(a) ESTEREOESPECIFICA DE UNA 12(a)
DESOXITETRACICLINA" (Clase Internacional C07c)

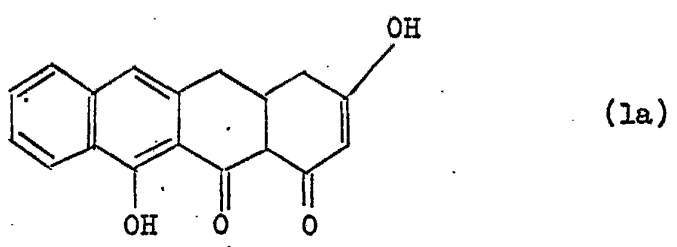


La presente Invención se refiere a un nuevo método para la preparación de compuestos de tetraciclina -- que contienen un sustituyente hidroxilo en 12(a), en posición cis respecto al átomo de hidrógeno 4(a). La introducción estereoselectiva o estereoespecífica del grupo hidroxilo en 12(a), en la síntesis de compuestos de tetraciclina, es de considerable importancia en la síntesis química de antibióticos de tipo tetraciclina, biológicamente activos. Sin embargo, los compuestos de tetraciclina son útiles para otros propósitos también, siendo las más notables aquellas aplicaciones que obtienen ventaja de su eficacia como agentes quelantes.

El núcleo básico de las 12(a) desoxi tetraciclina a que es aplicable la presente Invención, es el siguiente



y



Estos compuestos existen en diversas formas tautómeras y, además, pueden ser o bien mono- o poli-sustituídos en di-



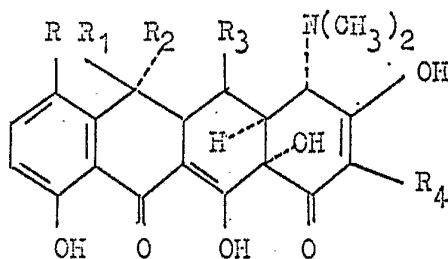
versas posiciones tales como las posiciones 2, 4, 5, - -
5(a), 6, 7, 8, 9 y 10. Por ejemplo, sustituyentes típi-
cos que pueden aparecer en estas diversas posiciones in-
cluyen bromo, yodo, cloro, fluor, trifluorometilo, nitro,
5 ciano, amino, cianato, tiocianato, azido, alcoholo infe-
rior-amino, hidroxilo, alcanolamino, alcoholo inferior,
y grupos alcoholo inferior mono-sustituido, en el que el
sustituyente puede ser fluor, alcoholo inferior-mercapto
alcoxi inferior, amino, alcoholo inferior-amino, alca- -
noiloxi, y alcanolamino.

10 Una extensa variedad de 12(a) desoxitetraciclina-
nas, útiles para los presentes propósitos, se han descri-
to completamente en la Patente de EE.UU. Nº 3.188.346,
la descripción de la cual se incorpora a esta Memoria. -
como referencia.

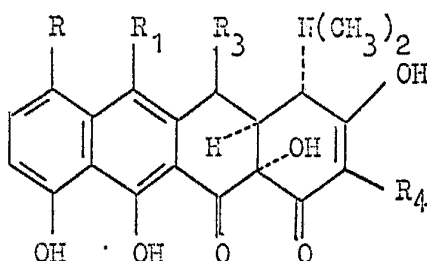
15 Muchos de los productos de la hidroxilaci/3 -
12(a) que pueden ser obtenidos, tienen una actividad bio-
lógica baja o pueden ser inactivos. En algunos casos -
pueden obtenerse productos biológicamente activos median-
te la introducción de grupos apropiados por tratamiento
20 químico o métodos bioquímicos. Sin embargo, como se ha
indicado anteriormente, aún cuando estos compuestos no -
tengan valor o tengan poco valor como agentes biológica-
mente activos, pueden encontrar aplicación en otros cam-
pos.

25 Las tetraciclinas, fácilmente obtenibles, que
son biológicamente activas, tienen la estructura

27

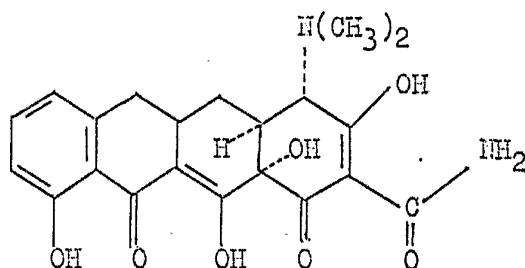


(2)



(2A)

15 en donde R es haluro o hidrógeno, R₁ es H o hidroxilo, R₂
 es hidrógeno o metilo, R₃ es hidrógeno o hidroxilo, y R₄
 es amido, alcohol amido, acetilo o ciano. El miembro más
 sencillo de la familia de la tetraciclina que tiene acti-
 vidad biológica total frente a bacterias tanto Gram-nega-
 20 tivas como Gram-positivas, es la 6-desoxi-6-desmetiltetra-
 ciclina, que tiene la estructura



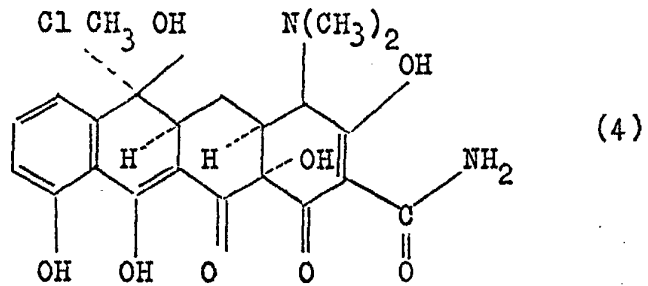
(3)

30

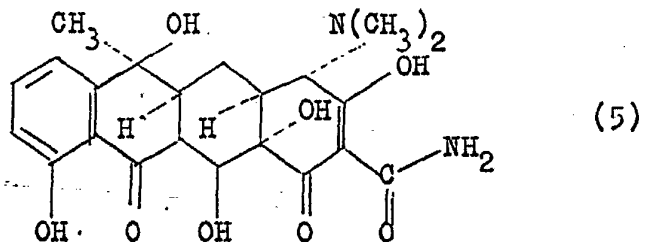


Otros miembros importantes de la familia de la tetraciclina, que han conseguido una amplia aceptación comercial como antibióticos, son los siguientes.

5



10



15

20

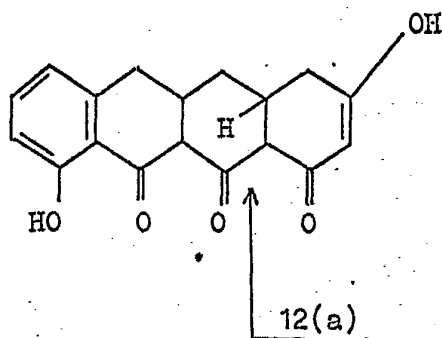
La síntesis química de compuestos de tetraciclina ha demostrado ser una tarea extraordinariamente difícil. Estas dificultades se atribuyen, en gran manera, a la sensibilidad química de los núcleos de tetraciclina y al hecho de que en su síntesis deben formarse, estereoespecíficamente o estereoselectivamente, un cierto número de centros asimétricos.

25

Los procedimientos que han sido desarrollados hasta la fecha para la síntesis total de compuestos de tetraciclina, han llevado consigo la preparación de un precursor que tiene el núcleo:

30

27



(1B)

5
10 al que, para mayor brevedad se le denominará en lo sucesivo, en la Memoria Descriptiva y en las Reivindicaciones "el precursor de tetraciclina". Como se ha indicado antes, los precursores de tetraciclina, útiles en la presente Invención, pueden contener una extensa variedad de res-
15 tos sustituyentes sobre la estructura básica de anillo, indicada en la fórmula (1B). Evidentemente puede estar presente también un grupo protector.

La presente Invención se refiere a un nuevo método para la introducción estereoespecífica de un grupo
20 hidroxilo en 12(a), en el precursor de tetraciclina, como se describe con mayor detalle más adelante, que es predominantemente cis o predominantemente trans respecto al hidrógeno indicado, en la posición 4(a). Se apreciará que los isómeros de imagen en el espejo, del compuesto (1B) pueden
25 utilizarse también con el grupo hidroxilo en 12(a) que se introduce, asumiendo también la posición de imagen en el espejo.

A título de antecedente, es adecuado describir, en primer lugar, un procedimiento, en resumen, que ha
30 sido desarrollado para la síntesis de un importante precursor de tetraciclina, a partir del cual puede obtenerse.



fácilmente oxitetraciclina, que tiene la estructura de la fórmula (5) anterior,

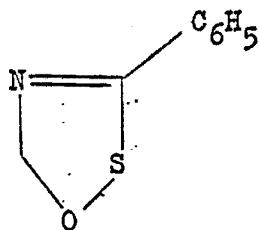
5 El procedimiento para la síntesis química de un precursor de tetraciclina, a partir del cual puede obtenerse, en último lugar, oxitetraciclina, se indica esquemáticamente en el dibujo.

10 puede apreciarse que el precursor específico compuesto (20), mostrado en los dibujos es también accesible mediante síntesis microbiana unida a una manipulación química adecuada del producto de fermentación. Se indica también que la presente invención se refiere no solo con la cis hidroxilación 12(a) de este precursor específico, sino también con la hidroxilación estereoespecífica o estereoselectiva de precursores de tetraciclina, 15 generalmente como se ha indicado en las fórmulas 10 y 11 anteriores, sin embargo estos precursores pueden ser preparados. Pueden prepararse una extensa variedad de precursores, por ejemplo, siguiendo el procedimiento básico ilustrado, con referencia específica a la preparación de oxitetraciclina, haciendo las adecuadas sustituciones y modificaciones de los reactivos, en los casos en 20 que se deseen otros compuestos de tetraciclina.

25 El precursor de tetraciclina para la síntesis de oxitetraciclina se prepara partiendo de los tres bloques básicos: La tiazolona, de estructura,



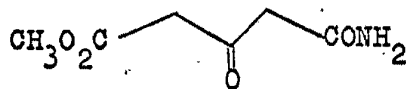
7 JL



(6)

5

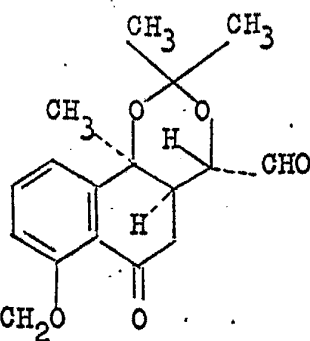
el 3-oxoglutarato de metilo,



(7)

10

y el aldehido, que tiene la fórmula:



(8)

15

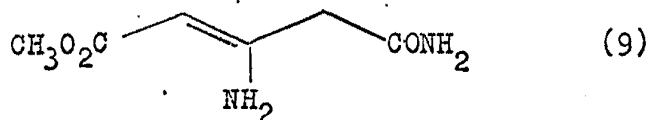
20

La tiazolona (6) se prepara mediante tratamiento de la tiobenzoglicina, como se describe, por ejemplo, por Muxfeldt y otros en Journal of the American Chemical Society, volumen 89, páginas 4991-4996, (Septiembre 1,3, 1967).

25

El 3-oxoglutarato de metilo, compuesto (7), - se obtiene mediante hidrólisis ácido de la enamina

30



5

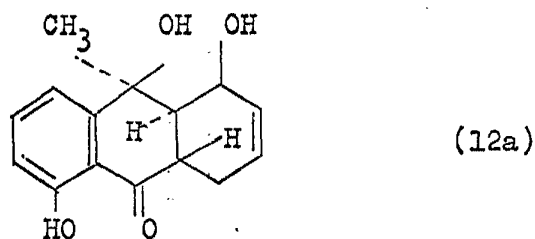
La enamina (9) se prepara, a su vez, mediante un trata-
miento, cuidadosamente controlado, del 3-oxoglutarato de
dimetilo con amoniaco en metanol, y se caracteriza por un
punto de fusión de 120°-121°C.

10

El aldehido (8) se prepara comenzando con la --
adición de 1-acetoxibutadieno (11) a acetato de juglona -
(10) (Véase dibujo). El aducto tricíclico (12) se convier-
te en el aldehido (13). Un procedimiento para efectuar -
esta conversión se indica en detalle, en el trabajo de --
Muxfeldt que figura en Agewandte Chemie, Volumen 74, pági-
nas 825-828 (1962). Brevemente resumido, el procedimien-
to implica el tratamiento del aducto (12),- en una reac-
ción de Grignard,-con yoduro de metil magnesio, lo que --
añade un grupo metilo a la posición 9(a):

15

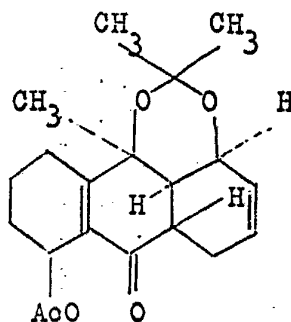
20



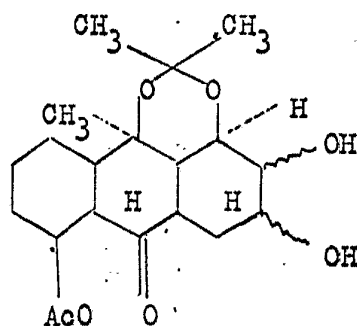
25

30

Este intermedio se trata con acetona absoluta -
y sulfato de cobre anhidro, para obtener el acetónido:



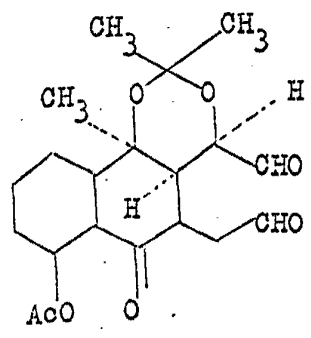
10 La oxidación del acetónido (12b) con clorato potásico en presencia de una cantidad catalítica de tetróxido de osmio, da como resultado el diol:



20 La conversión del diol (12c) en el aldehído (13) se efectuó en una reacción de dos etapas, en la que el diol se oxidó primeramente con tetra-acetato de plomo, para formar el dialdehído (12d):

25

30



(12a)

5

que, a su vez, fué ciclizado para formar el aldehido --
(13).

10

La conversión del aldehido (13) en los aldehi--
dos isómeros mixtos (14) y (15) se efectúa mediante ozo--
nolisis del aldehido (13), tratamiento con agua del ozóni--
do resultante y división del producto de reacción con car--
bonato sódico. Los isómeros puros (14) y (15) se carac--
terizaron por los puntos de fusión de 140^o-143^o C y 171^o--
173^oC, respectivamente.

15

La piperidina, en benceno a reflujo, convirtió
los aldehidos (14) y (15) en la enamina (16) con un ren--
dimiento del -91 por ciento. La enamina (16) se caracte--
rizó por un punto de fusión de 118^o - 119^o C. La enamina
se alcoholó con éter clorometil metílico, obteniéndose --
el éter metoximetílico (17) (p.f. 81^o - 84^o C). Cuando --
(17) se adsorbió sobre gel de sílice desactivada, tuvo --
lugar la hidrólisis selectiva de la función enamínica, --
y se formó el aldehido, oleoso (8) con un rendimiento del
72 por ciento. El espectro de resonancia magnética nu--
claeer fué concordante solamente con una relación copla--
nar trans, de los hidrógenos en las posiciones C-5 y --
C-5(a), que indica que la hidrólisis, mediante la que se

20

25

30



- 7 J

había formado el aldehído, era estereoespecífica.

La condensación del aldehído (8) con la tiazolona (6), en presencia de acetato básico de plomo en tetrahydrofurano, dió por resultado la tiazolona (18) caracterizada por un punto de fusión de 157° - 160° C.

Una combinación de bases fuertes (por ejemplo, n-butillitio y t-butoxido de potasio) catalizó la reacción de la tiazolona (18) con el 3-oxoglutarato de metilo (7) produciendo el compuesto tetracíclico (19) caracterizado por un punto de fusión de 225° C (con descomposición). En general, puede utilizarse cualquier base fuerte que no destruya el producto tetracíclico deseado. La reacción se llevó a cabo bajo condiciones de reflujo, con tetrahydrofurano como disolvente. El grupo metoximetilo fué separado, después, mediante ácido acético, obteniéndose el precursor de tetraciclina (20).

La presente Invención se refiere al tratamiento de precursores de tetraciclina, de fórmulas (10) o (11) (siendo uno de tales precursores, típico, el compuesto (20)), bajo condiciones que dan como resultado la introducción de un grupo hidroxilo en la posición 12(a) en una posición predominantemente cis, relativa al hidrógeno 4(a). Más específicamente, según la presente Invención, se consigue la introducción de este grupo hidroxilo haciendo reaccionar el compuesto (20) con oxígeno molecular, en un medio básico, empleando un disolvente aprótico. Para obtener los mejores rendimientos, se dispone también en el sistema de reacción un agente destructor de peróxido.

El disolvente empleado en la presente Inven-



ción, es uno que no destruye el producto deseado, en presencia de una base fuerte. En general, estos son disolventes apróticos, es decir disolventes que no liberan protones en presencia de una base fuerte. Como ejemplos de disolventes se incluyen, pero no se limita con ello, benceno, tolueno, xileno, diglirimo, tetrahidrofurano, dioxano, éter dietílico, anisol, (así como una diversidad de otros éteres), dimetilformamida, dimetilsulfóxido y acetato de etilo. Otros disolventes análogos a los anteriores, que incluyen algunos de los disolventes mencionados en la patente antes citada, número 3.188.348, resultarán evidentes para los expertos en la técnica.

La base fuerte utilizada en la presente invención debe ser una que tenga la suficiente fuerza para ionizar los grupos hidroxilo existentes en la estructura tetraciclínica, pero, a la vez, debe ser una que no destruya el producto. En general, son las bases tales como las amidas de metal alcalino, los hidruros de metal alcalino y los alcoholes de 1-6 carbonos e hidruros. El hidruro sódico, la sodamida, alcohol litio, y el t-butóxido de potasio, son típicos. Es evidente que algunas de estas sustancias, por ejemplo el hidruro de potasio, son peligrosas de manejar, y se evitan, de preferencia, cuando pueden conseguirse otras sustancias más convenientes. Como regla general, los alcóxidos polivalentes, los hidruros, los alcoholes, y los compuestos semejantes, se han encontrado inadecuados, aunque pueden utilizarse los alcóxidos de magnesio. Los hidruros de metal alcalino son inadecuados, asimismo, dado su efecto destructor sobre la tetraciclina.



Finalmente, se prefiere la presencia de un agente destructor de peróxido, dado que los peróxidos formados durante la etapa de oxigenación pueden destruir el producto tetracíclico deseado y disminuir el rendimiento, por consiguiente. Son agentes destructores de peróxidos, adecuados, los fosfitos de triálcoholo, el paladio o el platino metálico, los ascorbatos de metal alcalino, enzimas de peroxidasa, mercaptanos, sulfuros, sulfonas, y diversas fosfinas. El agente destructor de peróxido debe ser uno que no ataque a la propia estructura tetracíclica. Evidentemente no son preferidas aquellas sustancias que son difíciles de manejar, tales como los mercaptanos y los sulfuros.

Se ha encontrado que a veces es necesario, para iniciar la reacción, una pequeña cantidad de humedad. Cuando la reacción parece que comienza con dificultad, pueden añadirse unas gotas de agua a la mezcla de reacción.

El tratamiento de un precursor de tetraciclina, de los que se representativo el compuesto (20), bajo las condiciones anteriores, con oxígeno molecular anhidro (o bien oxígeno, puro, o aire) se lleva a cabo durante un periodo de tiempo de 2 a 15 minutos. La temperatura es, típicamente, próxima a la temperatura ambiente, aunque en principio pueda emplearse cualquier temperatura comprendida entre el punto de congelación y el punto de ebullición del disolvente.

En la práctica preferida de la presente invención, se regula el tiempo de reacción para que sea justamente el suficiente para consumir la sustancia de parti-



5 da. Esto puede efectuarse convenientemente siguiendo el curso de la reacción fotométrica o colorimétricamente. — Se ha encontrado que éste conduce a un rendimiento ópti-
mo. El prolongar la reacción más del tiempo justamente -
necesario para consumir las sustancias reaccionantes, - -
tiende a causar degradación y pérdidas del producto dese-
do.

10 El tratamiento ácido del producto hidroxilado, —
separa el grupo acetónico enlazando, por un puente, las
posiciones C-5 y C-6 de la estructura anular de tetraci-
clina. La conversión de la tetraciclina (21) en oxite-
traciclina (5) constituye entonces una etapa sencilla, —
que lleva consigo la separación del cromóforo de tioen-
zamida y la sustitución de un grupo dimetilamino.

15 La presente invención se aclara, más completa-
mente, con referencia a los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1

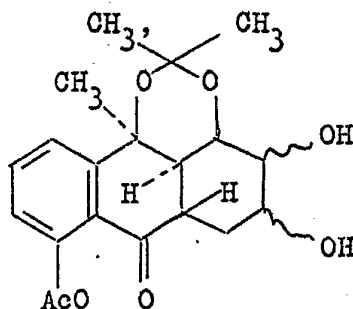
20 El Ejemplo 1 se destina a indicar un método pa-
ra la preparación de un precursor de tetraciclina, típi-
co, [concretamente el precursor (20)] como se muestra -
en los dibujos.

25 1 (a) Oxidación del diol (12c)*

30 * Esta preparación está descrita en la Tesis Doctoral de
Edwin Vedejs, presentada a la Universidad de Wisconsin en
1966.



El diol (12 c) (105 gramos), de estructura:



se disolvió en acetona (5 litros, calidad técnica, destilada dos veces de carbonato potásico anhidro) a 40° C, en un matraz de tres bocas de 12 litros, equipado con un agitador, condensador y un tubo de desecación. Se añadió de una vez tetra-acetato de plomo (157,5 gramos, secado 8 horas a 40°C, bajo vacío) y se mantuvo la agitación durante una hora a 40° C. El baño de calentamiento se separó, y se añadieron 5 litros de hexano. Después de 10 minutos se filtraron las sales de plomo y se lavó completamente, con 2 litros de una mezcla de benceno-cloroformo 1:1. Se combinó la fase orgánica, se evaporó y disolvió en cloroformo. La solución clorofórmica se lavó dos veces con agua, se secó sobre sulfato sódico y se evaporó obteniéndose el dialdehído (12d) en forma de un aceite amarillo. El producto fué lo bastante puro para su empleo en la siguiente etapa.

El dialdehído (12d) se recrystalizó en éter y se caracterizó por un punto de fusión de 135°-138° C. Además, la estructura asignada a éste fué comprobada me-



7

dian te espectros infrarrojo, ultravioleta y de resonancia magnética nuclear, así como mediante análisis elemental.

1. (b) Ciclización a Aldehído Insaturado (12a)[■]

5

El dialdehído oleoso (12d) preparado como se describe en el Ejemplo 1(a), se disolvió en xileno (calidad reactivo, 2,1 litros) y se separó en 7 partes alícuotas de 300 mililitros. Cada parte alícuota se colocó en un matraz de 3 bocas de 2 litros, equipado con un condensador y un separador de agua. Se añadió xileno para llevar el volumen de cada matraz a 750 mililitros y la mezcla se calentó a reflujo. Se añadió de una vez una solución de diazabicyclooctano (4,5 gramos) en ácido acético (75 mililitros), mientras se mantenía una ebullición vigorosa, y se continuó mediante la adición de una solución de 0,5 gramos de piperidina en 25 mililitros de xileno. La solución rojo oscuro se calentó entonces a reflujo 7 minutos. Se paró el calentamiento y se añadió benceno frío (750 mililitros) y la mezcla se enfrió durante 2 minutos en un baño de hielo. La solución, pardo oscura, se lavó rápidamente 5 veces con agua (porciones de 1 litro). La fase acuosa se lavó con benceno (2 litros) y los líquidos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato sódico. Los siete productos de la fase orgánica se juntaron y evaporaron a 60°C en un evaporador instantáneo.

10

15

20

25

■ Esta preparación está descrita en la Tesis Doctoral de Edwin Vedejs, presentada a la Universidad de Wisconsin en 1966.

30



neo. Las últimas trazas de xileno se eliminaron en va-
 cío, obteniéndose una goma oscura, parcialmente cristali-
 na. El producto se calentó con éter (250 mililitros) has-
 ta que toda la sustancias gomosa se hubo disuelto, y se
 5 dejó cristalizar a temperatura ambiente. La sustancia
 parda, cristalina, se filtro, y lavó hasta ausencia de go-
 ma con éter frio, conteniendo 20 % de benceno, obtenién-
 dose 51 gramos del aldehido insaturado. Se caracterizó -
 por un punto de fusión de 162° - 165°C (descomposición) -
 10 después de ser recristalizado en éter tres veces. Su co-
 nstructura fué conformada mediante espectroscopia infrarro-
 ja, ultravioleta y de resonancia magnética nuclear, así -
 como mediante análisis elemental.

15 1 (c) Ozonolisis del Aldehido Insaturado (13)²

Se enfrió a -50° C, una solución que con-
 tenia 5 gramos del aldehido insaturado (13) en 300 mililitros
 20 tres de cloroformo (destilado desde pentóxido de fósforo).
 Se pasó a su través durante 65 minutos, ozono, 10 % en --
 exceso de la cantidad estequiométrica, a una temperatura
 entre -40° C y -50° C. El exceso de ozono se eliminó --
 después pasando nitrógeno a través de la solución fría. --
 25 Se dejó que la mezcla alcanzara la temperatura ambiente -
 y se utilizó directamente en la siguiente etapa. Se ob-
 tuvo una muestra analítica del ozónido eliminando disol-
 vente a 35° C y cristalizando varias veces en éter. Se -

30 ² Esta preparación está descrita en la tesis doctoral de
 Edwin Vedejs, presentada en la Universidad de Wisconsin
 en 1966.



apreció un punto de fusión característico de 104° C (descomposición). La muestra se caracterizó además por medio de sus espectros infrarrojo y ultravioleta, así como mediante análisis elemental.

5 Se añadió agua (25 mililitros) a la solución clorofórmica del ozónido, directamente después de la ozonólisis y se dejó estar la mezcla bifásica, a temperatura ambiente, durante dos días agitando ocasionalmente. La fase acuosa se separó después y la capa clorofórmica se secó sobre sulfato sódico y se evaporó a 40° C. El residuo de color anaranjado pálido se tomó con éter conteniendo un poco de cloroformo (20 mililitros en total) y se dejó evaporar la solución lentamente, a temperatura ambiente. Se recogieron varias "cosechas" de cristales de color crema, en dos días, con un rendimiento total de 3,7 gramos. Los cristales estaban caracterizados por un punto de fusión de 130° - 138° C (descomposición). Sin embargo, a causa de la inestabilidad química de los cristales a temperatura ambiente, no pudieron obtenerse satisfactorios resultados de ellos.

10

15

20

Los cristales de color anaranjado se disolvieron en 1 litro de cloruro de metileno destilado. Se añadió una solución de carbonato sódico 0,5 N (500 mililitros) y se agitó vigorosamente la mezcla durante 2 horas. La capa acuosa, roja, se separó, se lavó con cloruro de metileno (200 mililitros) y se rechazó. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con agua (500 mililitros) se secaron sobre sulfato sódico y se evaporaron. El aceite residual, recristalizado en éter (200 mililitros) propor-

25

30



5

cionó una sustancia cristalina caracterizada por un punto de fusión de 120° - 160° C, siendo esta sustancia cristalina una mezcla de los aldehidos isómeros (14) y (15). - La estructura de la mezcla de los aldehidos (14) y (15) - se comprobó cuidadosamente por medio de espectros infrarrojo, ultravioleta y de resonancia magnética nuclear de los aldehidos separados (14) y (15) y mediante análisis elemental.

10

1 (d) Preparación de la Enamina (16)*

15

La mezcla de aldehidos (14) y (15), preparada en el Ejemplo 1(c), se disolvió en benceno (125 mililitros, destilado desde hidruro de litio y aluminio). - Se añadió piperidina (2,8 gramos destilada desde hidróxido potásico) y la solución roja se calentó a reflujo, bajo un separador de agua, durante una hora. Los disolventes se eliminaron después obteniéndose un residuo cristalino, pardo. El producto, una vez recristalizado en éter se caracterizó por un punto de fusión de 114° - 118° C. - La identificación del producto fué confirmada utilizando espectros infrarrojo, ultravioleta y de resonancia magnética nuclear, así como por análisis elemental.

25

* Esta preparación está descrita en la tesis doctoral de Edwin Vedejs, presentada en la Universidad de Wisconsin en 1966.

30



1 (a) Esterización de la Enamina (16)²

5 La enamina (16) se disolvió en tetrahidro-
 furano anhidro (250 ml calentados a reflujo durante 8 ho-
 ras sobre hidróxido potásico y destilados desde hidruro -
 de litio y aluminio) bajo nitrógeno y el sistema se en- -
 frió a 0° C. Se añadió hidruro sódico (lavado, libre de
 10 aceite mineral, con hexano anhidro y pesado bajo nitróge-
 no) y se dejó calentar ligeramente la mezcla para comen-
 zar la formación de sal. Se controló la formación de es-
 puma enfriando el recipiente de reacción con agua de hie-
 lo. Cuando no se apreció más burbujeo (se requirieron - -
 unos 30 minutos) se añadió gota a gota éter clorometil - -
 15 metílico recién destilado, durante un periodo de 1,5 ho-
 ras, bajo nitrógeno, mientras se agitaba. Después de un
 total de 6 horas de agitación a temperatura ambiente, se
 evaporó el disolvente a 35° C. El residuo amarillo se - -
 extrajo con éter y se filtró el cloruro sódico precipita-
 20 do. Se evaporó el éter y el aceite anaranjado se recrís-
 talizó en hexano. El producto cristalino resultante se -
 recrystalizó dos veces en éter-hexano y se caracterizó - -
 por un punto de fusión de 83° - 85° C. La estructura del
 éter de enamina resultante (17) se confirmó empleando es-
 25 pectroscopia infrarroja, ultravioleta y de resonancia - -
 magnética nuclear, así como mediante análisis elemental.

² Esta preparación está descrita en la tesis doctoral
 de Edwin Vedejs presentada en la Universidad de Wis-
 30 consin en 1966.



1. (f) Preparación del Aldehído (8)

5 100 gramos de la enemina (17), preparada según se indica en el Ejemplo 1(e), se disolvieron en 500 mililitros de benceno anhidro. Se añadió gel de sílice - (300 gramos, 60-250 mallas) desactivado con 80 mililitros de agua, y la masa pastosa se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Se filtró después el disolvente utilizando un embudo Büchner de 12,5 cm de diámetro. Se utilizaron para lavar gel de sílice 2 litros de acetato de etilo - éter (25:75). La evaporación del disolvente (filtrado de bencénico más disolventes de lavado) produjo unos 10 - 15 gramos del aldehído, viscoso, oleoso. (8). El producto se empleó sin purificación posterior.

1 (g) Preparación de la Tiazolona (18)

20 Se preparó una solución de la tiazolona simple (6) combinando dicitclohexilcarbodiimida (5,19 gramos) y ácido tioripúrico (4,90 gramos) en 150 mililitros de tetrahidrofurano, y agitando durante una hora a temperatura ambiente. El aldehído (8) preparado en el Ejemplo 25 1(f) se disolvió en 100 mililitros de tetrahidrofurano, - y se añadió acetato básico de plomo (3,8 gramos, análisis de plomo 33% de PbO) a la solución. La mezcla pastosa de

30 * Esta preparación está descrita en la tesis doctoral - de Jared Ben Mooberry presentada en la Universidad de Cornell en Febrero de 1969.

* Esta preparación está descrita en la tesis doctoral - de Jared Ben Mooberry presentada en la Universidad de Cornell en Febrero de 1969.



5 tiazolona simple, cruda, y dicitolohexilurea, se añadió en
dos porciones iguales, a la solución de aldehído (8) y —
acetato de plomo, vigorosamente agitada. La segunda por-
ción de la masa pastosa de tiazolona simple se añadió —
10 treinta minutos después del comienzo de la reacción que —
prosiguió durante un total de una hora, a temperatura am-
biente. La mezcla heterogénea se filtró a través de un —
embudo con placa de vidrio poroso, utilizando Celite para
evitar el que se obturaran los poros del embudo. El fil-
15 trado se evaporó a presión reducida, se disolvió en 50 —
mililitros de cloroformo, y se hizo una masa pastosa con
40 gramos de gel de sílice. La masa pastosa se filtró —
utilizando embudo con placa de vidrio poroso, grande, y —
se lavó con cloroformo y éter. El filtrado, reunido, se
20 concentró y recristalizó en éter. Se procedió a la idea-
tificación del producto así obtenido, comparando su es- —
pectro de resonancia magnética nuclear con el espectro —
de una preparación semejante cuya autenticidad había sido
confirmada con anterioridad mediante espectroscopia de —
resonancia magnética nuclear, infrarroja y ultravioleta,
así como mediante análisis elemental.

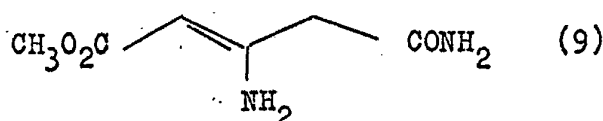
El procedimiento descrito en el Ejemplo 1(g) —
puede llevarse a cabo, también, utilizando el método de —
tribromuro de fósforo para la preparación de la tiazolo-
25 na simple (6), que se describe por Muxfeldt y otros en —
el Journal of the American Chemical Society, vol. 89. pá-
gina 4991.

30



1 (h) Preparación del 3-oxoglutarato de meti-
lo (7)*

5 La hidrólisis de 22 gramos de la enamina recristalizada -
(9) que tiene la fórmula



15 (en 360 mililitros de cloroformo), tuvo lugar rápidamente
por la adición de 12 mililitros de ácido clorhídrico con-
centrado con agitación vigorosa. Se añadieron después 20
gramos de sulfato magnésico anhidro, una vez concluida --
la hidrólisis. La solución se filtró y se concentró en -
vacío. Por recristalización en acetato de etilo se obtu-
vieron 13,2 gramos de una sustancia blanca, cristalina,
20 caracterizada por un punto de fusión de 36° - 38° C. La
identidad del producto así obtenido se verificó mediante
espectroscopía infrarroja, ultravioleta y de resonancia -
magnética nuclear, así como mediante análisis elemental.

25 1. (j) Condensación de la Tiazolona a Sustancia
Tetracíclica (19)*

30 * Esta preparación está descrita en la tesis doctoral de
Jared Ben Mobery presentada en la Universidad de Cor-
nell en Febrero de 1969.



5 El matraz de fondo redondo de 500 mililitros —
y todos los otros aparatos utilizados en este Ejemplo, se
secaron en estufa a 125° C. Todas las reacciones fueron
llevadas a cabo bajo atmósfera de nitrógeno (excepto para
agotar). El tetrahidrofurano se destiló desde hidruro de
litio y aluminio y se conservó bajo nitrógeno hasta su em-
pleo.

10 Se disolvió el 3-oxoglutarato de metilo (7) —
preparado mediante el Ejemplo 1(h) (3,18 gramos), en 85 —
mililitros de tetrahidrofurano en el recipiente de reac-
ción. Después de enfriar a -78° C, se añadió butil litio
(7,7 mililitros de una solución 2,6 molar en hexano). La
solución homogénea se agitó durante 10 minutos a la vez —
que se prepara-ba una solución de la tiazolona (18), conte-
nida mediante el Ejemplo 1(g) (9,5 gramos), en 180 mili-
litros de tetrahidrofurano. La solución de tiazolona se
añadió lentamente a la solución vigorosamente agitada, de
la sal de hemi-amida, mientras se mantenía la temperatura
a -78° C. Esta mezcla se calentó a temperatura ambiente
durante 1 -1/2 horas antes de calentar a reflujo durante
1-1/2 hora más. Después de enfriar a -78° C, de nuevo, —
se trató la mezcla homogénea con 1 mililitro de butanol —
terciario (decantado desde hidruro de calcio), y 8,8 mi-
lilitros de butil litio. La mezcla se calentó a tempera-
tura ambiente durante unos 20 minutos, y se añadieron 270
miligramos de tero-butóxido de potasio. La mezcla se ca-
lentó a 50° C durante 1 hora y después se calentó a refluj-
o durante 2 horas. Se añadieron, 50 minutos después —
de comenzado el reflujo, cantidades adicionales de tero-
tutóxido de potasio (0,38 gramos) y otra vez, 95 minutos



después de comenzado el reflujo (1,0 gramos). La solución caliente, después del reflujo, se dejó enfriar a temperatura ambiente durante una hora y entonces se neutralizó con 6 mililitros de ácido acético.

5 Después de la neutralización, se concentró la mezcla de reacción a presión reducida, se disolvió en cloroformo, se lavó con agua, se evaporó varias veces desde una mezcla de benceno, etanol y cloroformo para eliminar las últimas trazas de agua, y después se disolvió en cloroformo-éter. La cristalización del producto desde la solución de cloroformo-éter, se inició mediante la adición de gel de sílice. El producto precipitado y el gel de sílice se separaron por filtración y se lavaron con cloroformo y éter. Los filtrados, reunidos, se concentraron, disolvieron en una pequeña cantidad de cloroformo, se esbaron con un poco de producto y se dejó cristalizar de nuevo. Se obtuvieron 2,5 gramos de la tetraciclina (19). Esta se caracterizó, una vez recristalizada en acetona, por un punto de fusión de 225° C (descomposición). La estructura del producto aislado (19) se verificó principalmente por su espectro ultravioleta y por el hecho de que, después de hidrólisis, se convirtió en la tetraciclina (20). La estructura del producto se confirmó posteriormente, mediante espectroscopia infrarroja y de resonancia nuclear magnética, así como mediante análisis elemental.

10

15

20

25

30



1. (k) Preparación del Precursor de Tetraciclina (20)[¶]

5 El producto de ciclización (19), preparado en el Ejemplo 1(j) (2,4 gramos) se añadió a un matraz de fondo redondo de 500 mililitros que contenía 200 mililitros de ácido acético y 200 mililitros de agua. Esta mezcla se agitó y calentó rápidamente durante un periodo de 6 minutos, a la temperatura de reflujo, al cabo de cuyo tiempo la solución se había hecho homogénea. Después de calentar a reflujo durante 2 minutos, se enfrió rápidamente la solución en agua fría, y después se concentró a presión reducida. La temperatura no excedió de 30° C durante la evaporación. Por recristalización en cloroformo se obtuvieron 2,0 gramos del precursor (20) que se caracterizó por un punto de fusión de 200° C (con descomposición). La cromatografía en capa delgada sobre una poliamida (tetracloruro de carbonobencenoácido fórmico, 100:100:1) no mostró evidencia de epimerización en la posición C-4, durante la hidrólisis. La estructura del precursor de tetraciclina (20), fue conformada mediante espectroscopía infrarroja, ultravioleta y de resonancia nuclear magnética, así como mediante análisis elemental.

10

15

20

25

¶ Esta preparación está descrita en una tesis doctoral de Jared Ben Moobarry presentada a la Universidad de Cornell en Febrero de 1969.

EJEMPLO 2



Cis hidroxilación 12(a) del Precursor de
Tetraciclina (20)[■]

5

10

15

20

25

El precursor de tetraciclina (20) (524) mili-
gramos), se disolvió en 50 mililitros de tetrahidrofura-
no y 50 mililitros de dimetilformamida (decantada desde
hidruro de calcio). Se añadieron entonces a la solución
fosfito de trietilo (0,25 mililitros destilados desde so-
dio) a hidruro de sodio (350 miligramos de dispersión al
50 % en aceite). Se hizo burbujear oxígeno a través de-
la solución, mediante un tubo de dispersión de gas, du-
rante 15 minutos. Se añadió lentamente agua (0,14 milili-
tros) durante los primeros 3 minutos. La reacción pare-
ció estar concluida después de 10 minutos, ya que una
parte alícuota, en una solución de borato, tenía muy po-
ca absorción a 450 milimicras. Se añadieron ácido acéti-
co y agua (vigoroso desprendimiento de hidrógeno) hasta
que se obtuvo una solución homogénea y se alcanzó un pH
de 5, aproximadamente. Se añadió un total de 300 milili-
tros de agua antes de la extracción con acetato de etilo.
Los extractos orgánicos se lavaron varias veces con
agua para asegurar la completa eliminación de la dimetil-
formamida. Después de evaporar el acetato de etilo, se -

30

■ Esta preparación está descrita en una tesis doctoral
de Jared Ben Mcoberry presentada a la Universidad de
Cornell en Febrero de 1969.



disolvió el residuo en 20 mililitros de ácido clorhídrico metanólico 0,01 N. Se dejó continuar la hidrólisis durante 1-1/2 horas a temperatura ambiente antes de extraer la solución metanólica con hexano para eliminar el aceite mineral. La mezcla se concentró en vacío, se disolvió en acetato de etilo, se lavó con agua para eliminar el ácido residual, y se concentró de nuevo. Este concentrado se disolvió en 2 mililitros de cloruro de metileno que contenía 3 gotas de ácido fórmico y se hizo una masa pastosa con 2 gramos de polvo de poliamida de grado para columnas. La desecación al aire produjo un polvo, que fluye libremente, que se aplicó a la parte superior de una columna que contenía 10 gramos de poliamida previamente tratada con 2 mililitros de cloruro de metileno y 0,03 mililitros de ácido fórmico. Se utilizó cloruro de metileno para eluir una banda amarilla que estaba constituida por una pequeña cantidad del precursor de tetraciclina (20) sin reaccionar y una segunda sustancia que se supuso era un sub-producto hidroxilado en el(a) conteniendo el enlace acetónido intacto. El producto deseado se eluyó después con acetona. La cristalización del producto en acetato de etilo, proporcionó 189 gramos de una sustancia cristalina amarilla ligera caracterizada por un punto de fusión de 200° C (descomposición). La identidad del producto fue confirmada por espectroscopia infrarroja, ultravioleta y resonancia magnética nuclear, así como por análisis elemental. El espectro de resonancia magnética nuclear indicó claramente la presencia de un mol de acetato de etilo y la ausencia del grupo acetónido.



EjemPlo 4

Preparación de Oxitetraciclina*

5

10

14

La tetraciclina hidroxilada (21) (206 miligramos) se dejó estar con yoduro de metilo, en 3 mililitros de tetrahidrofurano, a temperatura ambiente, durante 20 horas. Después de otras 12 horas a -20°C , se eliminó el disolvente en vacío. El concentrado se disolvió en 4 mililitros de tetrahidrofurano y 2 mililitros de ácido clorhídrico 0,5 N. La hidrólisis tuvo lugar durante 1-1/2 horas a temperatura ambiente. Se diluye la mezcla con agua y se extrajo sucesivamente con éter, acetato de etilo, y n-butanol. El extracto en n-butanol se evaporó a 25°C bajo alto vacío para cristalizar el clorhidrato de amina de desdineflaminooxitetraciclina.

20

25

El clorhidrato de amina (166 miligramos) se combinó con N,N-diisopropiletilamina (0,122 mililitros), sulfato de dimetilo (0,18 mililitros), 5 mililitros de tetrahidrofurano y 0,04 mililitros de etanol. La mezcla heterogénea se agitó magnéticamente durante 17 horas a temperatura ambiente, y al término de este tiempo aún era heterogénea. La cromatografía en capa delgada utilizando una poliamida, mostró que al cabo de este tiempo, el producto principal era idéntico a la oxitetraciclina auténtica. Se añadió una pequeña cantidad de metanol a la

30

* Esta preparación está descrita en una tesis doctoral de Jared Ben Hooberry presentada en la Universidad de Cornell en Febrero de 1969.



mezcla, para disolver el sólido y la solución se concentró bajo vacío hasta obtener un aceite viscoso. Se añadió un mililitro de tetrahidrofurano y se mantuvo la solución a -70°C durante 24 horas. El sólido que precipitó se eliminó por filtración. El filtrado se concentró en vacío y se combinó con 0,6 mililitros de N,N-diisopropiletil amina, 2 gotas de ácido acético, 1 mililitro de cloruro de metileno y 1 mililitro de tetrahidrofurano. La solución se transformó en una masa pastosa con 1 gramo de poliamida de grado de columna, y se secó al aire hasta obtener un polvo que fluía libremente (alrededor de 1/2 hora de exposición al aire). Se trataron previamente cinco gramos de poliamida con 5 gotas de ácido acético y cinco gotas de cloruro de metileno antes de ser comprimida, fuertemente, en una pequeña columna. La mezcla de di-oxitetraciclina cruda y poliamida se colocó sobre la parte superior de la columna se comprimió firmemente y se cubrió con una capa de arena. Se eluyó una parte primera con cloruro de metileno, lo que dejó a la d,l-oxitetraciclina adsorbida, próxima a la parte superior de la columna, apareciendo como una zona rojiza, fluorescente bajo una iluminación a 365 milimicras. La oxitetraciclina sintética se eluyó después con ácido acético : acetona : cloroformo (1 : 15 : 84). Después de evaporar hasta obtener un sólido amorfo, la oxitetraciclina racémica se reprecipitó en acetona. La espectroscopia infrarroja, ultravioleta y de resonancia magnética nuclear, demostró que el producto era idéntico a la oxitetraciclina auténtica y contenía 0,8 moles de acetona (por mol de producto) en la sustancia cristalina seca. Una valoración



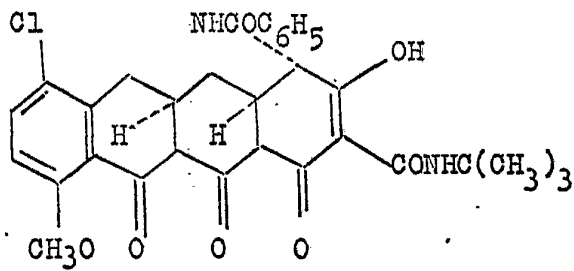
ción biológica del producto mostró que la dl-oxitetraci-
clina sintética era casi exactamente el 50 % tan activa -
como el producto auténtico preparado mediante fermenta- -
ción.

5

EJEMPLO 4

1,0 gramo del precursor de tetraciclina, de fó-
mula

10



15

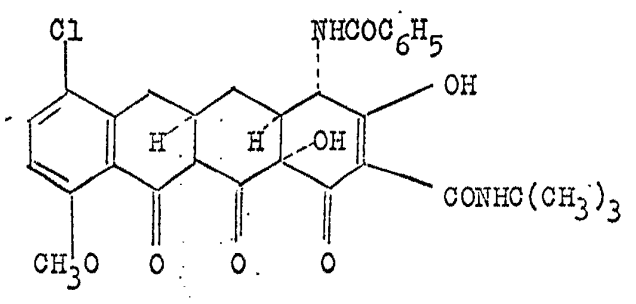
se disolvió en 40 mililitros de dimetil formamida y 100 -
mililitros de tetrahidrofurano. Se añadieron 280 miligra-
mosde fosfito de trietilo, seguidos de 200 miligramos --
de hidruro sódico disperso en aceite mineral. Se hizo --
burbujear oxígeno por la solución durante 10 minutos y el
color cambió desde un color naranja fluorescente a un ver-
de apagado. Una gota de esta solución, colocada en bora-
to sódico metanólico, mostró que la absorción en la re-
gión visible del espectro había desaparecido y había si-
do reemplazada por un nuevo máximo a unas 350 milimicras.
La solución oxigenada se acidificó entonces con ácido áce-
tico, se diluyó con cloroformo se lavó 4 veces con agua,-

25

30

se secó sobre sulfato sódico y se evaporó. Se obtuvo una tetraciclina cis hidroxilada que tenía la estructura:

5



10

La estructura del producto resultante fué comprobada mediante espectroscopía infrarroja y ultravioleta y por análisis elemental. Se recogieron también sustancias sub-productos, habiendo 220 miligramos de una sustancia recristalizada, que se identificó como poseedora del grupo hidroxilo en la posición trans en el átomo de carbono C-12 y 104 miligramos de un sub-producto identificado como poseedor del grupo hidroxilo en la posición 11(a).

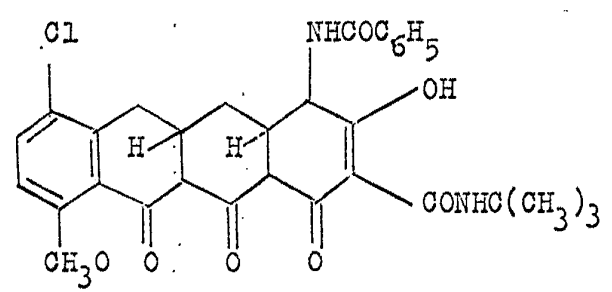
15

20

EJEMPLO 5

1,0 gramo del precursor de tetraciclina.

25

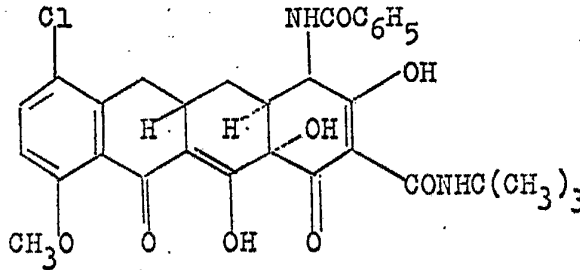


30



se hidroxiló con oxígeno, exactamente igual a lo descrito en el Ejemplo 4. Sin embargo, en este caso, la reacción fué bastante neta, ya que después de agotar, el producto, que tenía asignada la estructura

5



10

pudo cristalizarse directamente desde metanol. Se obtuvieron 0,74 gramos del producto puro cristalino. La estructura asignada fué comprobada por análisis espectral en el ultravioleta y por análisis elemental.

15

Son de esperar resultados similares a los indicados en los Ejemplos 2,4 y 5, cuando se sustituyen el tetrahydrofurano-dimetil formamida utilizado en los ejemplos anteriores, por disolventes tales como el éter dietílico, dioxano, anisol, tolueno y benceno. De manera semejante, el fosfito de trifenilo puede ser sustituido por sustancias tales como el dimetil sulfóxido, trifenil fosfina y trietil fosfina. Como bases fuertes adecuadas que pueden utilizarse en lugar del hidruro sódico, se incluyen el t-butóxido de potasio, el butil litio, el fenil litio y la sodamida.

20

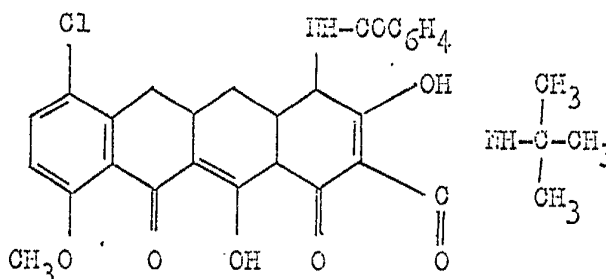
25

30

27 MAR. 1971



0,500 gramos de precursor de tetraciclina,
que tiene la estructura:



se hidroxiló exactamente igual a lo descrito en el Ejem-
plo 4.

For separación cromatográfica del producto
final se obtuvieron dos compuestos:

200 miligramos (40% de rendimiento) de sus-
tancia hidroxilada trans en la posición
C-12a. El punto de fusión era de 275° -
280° C con descomposición. La identidad
del producto fué confirmada por análi-
sis espectrográfico y análisis elemen-
tal; y

50 miligramos (10% de rendimiento) de sus-
tancia hidroxilada cis en la posición
C-12a. La identidad del producto fué
confirmada por análisis espectrográfico
y análisis elemental.

Esta solicitud que corresponde a la presen-
tada en los Estados Unidos de América, el 12 de Junio de 1969,



bajo el número 832.680, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

REIVINDICACIONES

10

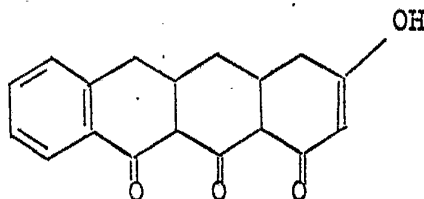
15

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

20

1.- Mejoras introducidas en el procedimiento para la hidroxilación 12(a) esteroespecífica de una 12(a) deoxitetraclina en la que un precursor de 12(a) deoxitetraclina que tiene un núcleo elegido del grupo que consiste de:

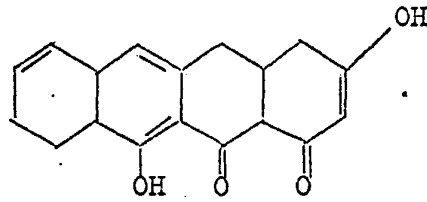
25



30



y



5

10

15

es puesto en contacto con oxígeno molecular; cuyas mejoras comprenden llevar a cabo dicha hidroxilación (12(a)), mientras que dicho precursor de 12(a) deoxitetraciclina se disuelve en un disolvente que es inerte con respecto a la estructura de la tetraciclina en presencia de una base fuerte que es capaz de ionizar los grupos hidroxilo de la estructura de la tetraciclina sin destruir dicha estructura.

2.- Mejoras según la reivindicación 1, en las cuales dicho procedimiento se lleva a cabo en presencia de un agente destructor de peróxido que es inerte con respecto a la estructura del anillo tetracíclico.

20

3.- Mejoras según la reivindicación 1, en las cuales dicho disolvente se elige del grupo que consiste en tetrahidrofurano, dimetilformamida, benceno, tolueno, xileno, diglieno, dioxano, diteil éter, anisola, sulfóxido de dimetilo y acetato de etilo.

25

4.- Mejoras según la reivindicación 1, en las cuales dicha base fuerte se elige de un grupo que consiste en hidruros de metales alcalinos, amidas de metales alcalinos, alcoholes de metales alcalinos de 1-6 átomos de carbono, y butóxidos de metales alcalinos.

30

5.- Mejoras según la reivindicación 1, en las

27
27 MAR 1971
10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100
cuales dicho agente destructor de peróxido se elige de un grupo que consiste en fosfito de trimetilo, paladio, platino, ascorbatos de metales alcalinos, enzimas de peroxidasa, trifenil fosfina y trietil fosfina.

5 6.- Mejoras según la reivindicación 1, en las cuales se añade al disolvente de reacción una cantidad de agua efectiva para provocar la reacción de hidroxilación.

10 7.- Mejoras según la reivindicación 1, en las cuales dicho precursor de 12(a) desoxitetraciclina es d, 1-4-tiobenzamido-12(a)-desoxitetraciclina.

15 8.- Mejoras según la reivindicación 1, en las cuales dicho precursor de tetraciclina es d, 1-2(N-t-butil-amido)-4-benzamido-6-desoxi-6-desacetil-7-cloro-10-metoxi-12(a)-desoxitetraciclina.

9.- Mejoras según la reivindicación 1, en las cuales dicho disolvente se elige del grupo que consiste en dimetilformamida y tetrahidrofureano.

20 10.- Mejoras según la reivindicación 1, en las cuales dicha base se elige del grupo que consiste en sodamida, hidruro de sodio y t-butoxido de potasio.

11.- Mejoras según la reivindicación 2, en las cuales dicho agente destructor de peróxido es trimetil fosfito.

25 12.- Mejoras introducidas en el procedimiento para la 12(a) hidroxilación estereoespecífica de una 12(a) desoxitetraciclina.

30



17

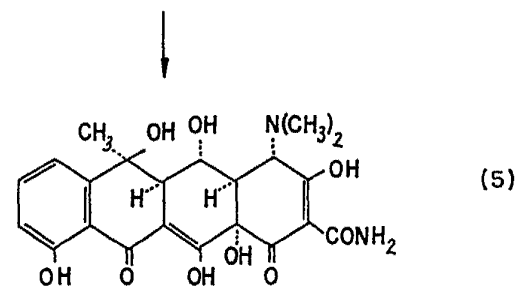
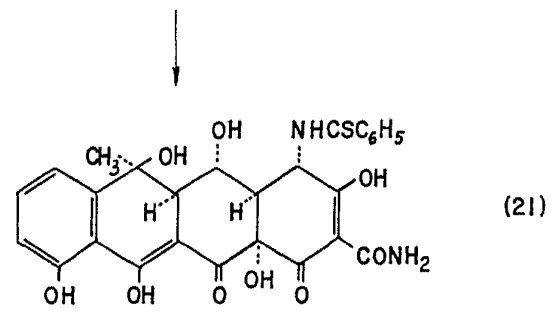
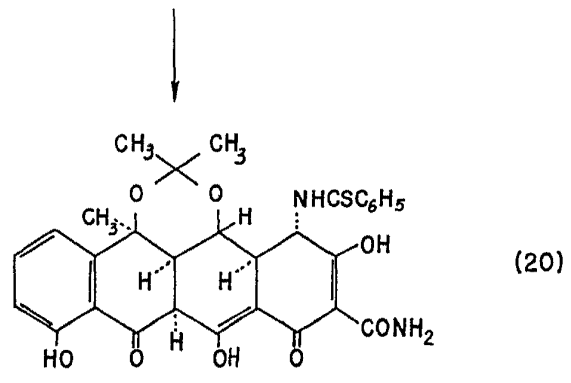
Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y para los fines que se han especificado.

5 Esta Memoria consta de treinta y nueve hojas escritas a máquina por una sola cara.

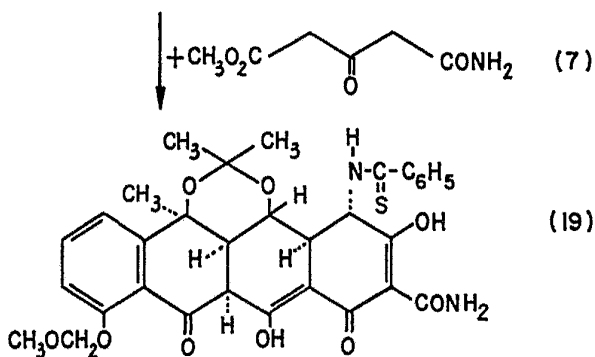
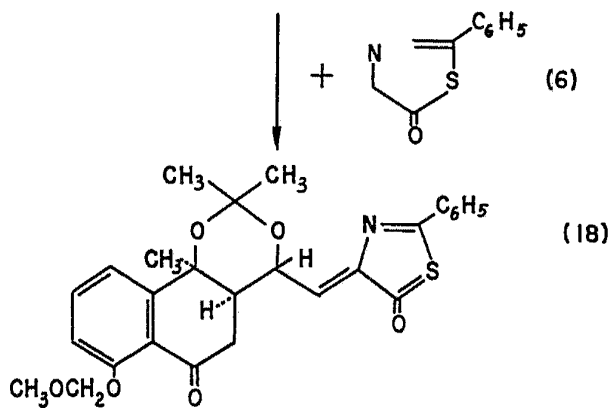
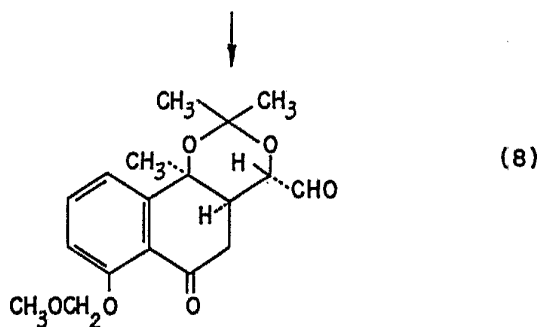
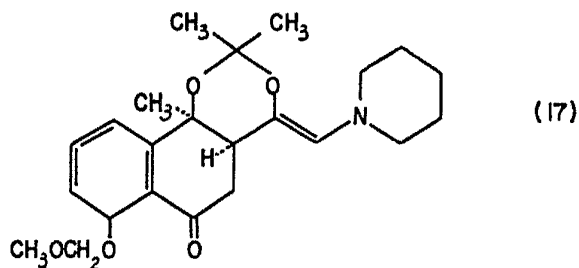
Madrid, 7 JUL 1970

P.A.

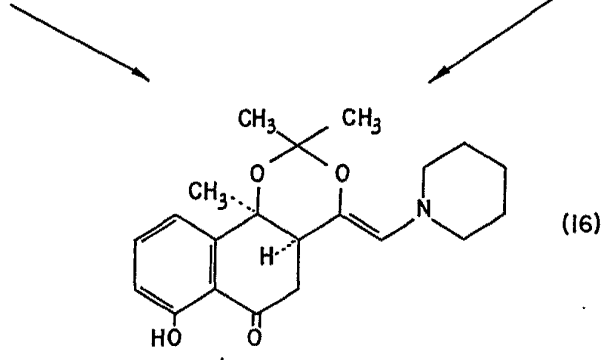
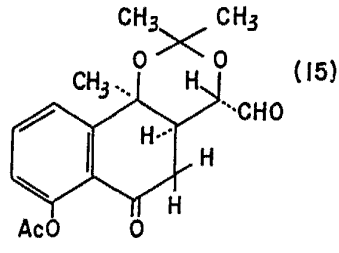
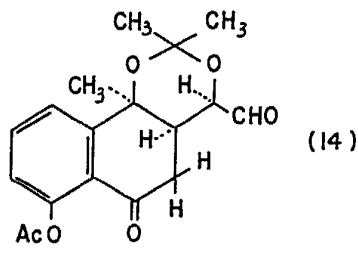
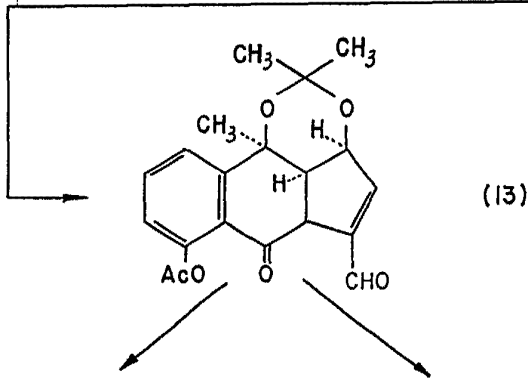
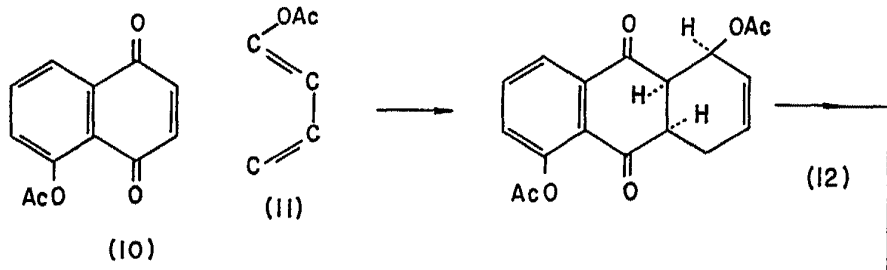
Alberico de Larrea
Por Fede



Alberto de Lencastre
 For Power. *[Signature]*



RESEARCH CORPORATION
 10000 W. 10th Avenue
 DENVER, COLORADO



Handwritten signature or initials.