

405902

P.- 53.520

Case 992X-8



Memoria descriptiva

Int. Cl.: C 12 D, A 61 K

para solicitar PATENTE DE INVENCION

por 20 años

a nombre de SCHERICO LTD.

entidad / ~~nacionalidad~~ suiza

con domicilio en Töpferstrasse 5, 6000 Lausana, Suiza

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UNA SUBSTANCIA

ANTIBIOTICAMENTE ACTIVA DENOMINADA ANTIBIOTICO

G-418"

(Clase Internacional C12d)

25.1.74

405902



MEMORIA DESCRIPTIVA

Esta invención se refiere a un nuevo antibiótico, designado G-418, y a su preparación por cultivo de una especie hasta ahora desconocidas del género Micromonospora, a saber la Micromonospora rhodorangea.

Están asimismo incluidos dentro del objeto de esta invención los derivados farmacéuticamente aceptables del nuevo antibiótico G-418, tal como las sales de adición de ácido y los derivados de base de Schiff-oxazolidina, que asimismo son antibióticos valiosos.

La invención se refiere asimismo a las composiciones farmacéuticas que contiene el nuevo antibiótico G-418 o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo.

El microorganismo.-

Micromonospora rhodorangea (referida aquí a veces como M. rhodorangea) ha sido clasificada como una nueva especie de Micromonospora a base de su propiedad taxonómica y de desarrollo sobre una pluralidad de medios de agar usuales. En tales medios, las colonias tienen un aspecto rojo-anaranjado y por consiguiente el microorganismo se ha designado Micromonospora rhodorangea. La producción del Antibiótico G-418 es una característica de esta especie. Micromonospora rhodorangea se ha depositado en

405902



el Northern Utilization Research and Development División,
U.S. Dept. of Agriculture, Peoria, Illinois, y se ha adi-
cionado a su colección de microorganismos como NRRL 5326.

5 El microorganismo tiene las siguientes propieda-
des microscópicas, macroscópicas y bioquímicas:

Taxonomía.-

10 (a) La observación macroscópica de un cultivo de 30 días
incubado a 24^o-26^oC sobre un medio de 3% de amina NZ ti-
po A, 1% de dextrosa y 1,5% de agar muestra crecimiento
pobre sin características que se distinguen en forma visi-
ble.

15 (b) La observación microscópica del mismo cultivo mues-
tra el micelio que es de aproximadamente 0,4-0,8 micras
en diámetro y ramificado en forma esparcida. Ocasionalmen-
te se observan clamidosporas; sin embargo, no se observan
esporas verdaderas. Así la especie parece ser una no es-
porulante.

20 (c) Las observaciones sobre agar de Emerson, agar de Ben-
nett, agar de extracto de levadura-dextrosa y agar de al-
midón son substancialmente las mismas que las descritas
en (b).

25 Este microorganismo es aeróbico y puede culti-
varse convenientemente a temperaturas de 20^o a 40^oC y a
un pH de 6,5 a 8,5. La gama de temperatura preferida es

405902



de 28° a 35°C y la gama de pH preferida es de 7,2 a 8,3. No se verifica desarrollo a o por encima de 45°C. Micro-monospora rhodorangea reduce el nitrato.

5 En la descripción del microorganismo M. rhodorangea se utilizan en esta memoria dos designaciones de color. La primera designación de color se toma del "Color Harmony Manual", 4ª edición, 1.958, publicado por el Container Corporation of America (U.S.A.) y la descripción para la primera designación de color se toma del "Descriptive Color Name Dictionary" por Taylor, Knoche y Granville, 10 publicado asimismo por el Container Corporation of America (1.950). La segunda designación de color es un sinónimo o casi un sinónimo de la primera y se toma del National Bureau of Standards Circular nº 553 (1.955) U.S.A.

15 Las tablas I, II y III muestran además la caracterización de la M. rhodorangea :

TABLA I

20 OBSERVACIONES DE COLONIA DE MICROMONOSPORA RHODORANGEA SOBRE VARIOS MEDIOS

| <u>Medio</u> | <u>Observación</u> |
|----------------------------|--------------------|
| Agar de glucosa-asparagina | Sin desarrollo |
| 25 Gelatina | débilmente licuada |

405902



TABLA I (cont.)

| | | |
|----|---|---|
| | Leche | buen crecimiento, hidrólisis completa, colonia plegada, rojo coral brillante, g6pa, anaranjado rojizo vivo 34 |
| 5 | Sucrosa | utilizada |
| | Almidón | buen crecimiento hidrólisis completa |
| | Celulosa | descompuesta |
| 10 | Agar de sucrosa de Czpek (Fidco) | crecimiento pobre, plano, color: borgoña g7pl, grisáceo oscuro, pardo rojizo 47 |
| 15 | Agar de Bennett | buen crecimiento, plegado, membranoso, sin micelio aéreo, sin pigmento difusible, color rojo de China g6pg, naranja rojizo profundo 36. |
| | Agar de pasta de tomate-harina de avena | crecimiento pobre, no registrable |
| 20 | Agar de glucosa-extracto de levadura | crecimiento regular, membranoso, sin micelio aéreo, sin pigmento difusible, color rojo opaco, grado pardo rojizo 43 |
| | rodaje de patata | sin crecimiento |
| 25 | Agar de nitrato de sucrosa (Agar de Czapek) | crecimiento pobre, plano, vino oscuro g 7-1/2 pi, pardo rojizo oscuro 44 |

405902



TABLA I (cont.)

| | | |
|----|---|---|
| 5 | Agar de tirosina(levadura de tirosina) Tirosina de carne de vaca [observaciones a 2, 7 y 14 días (según Gordon y Smith, J. Bact. 69:147)] | crecimiento pobre, plegado, cristales disueltos, pigmento difusible ambar oscuro, Crecimiento pobre, plano, cristales no disueltos, pigmento difusible ambar tenue |
| | Agar de peptona-hierro observaciones a 2, 7 y 14 días | sin crecimiento |
| 10 | Solución de Czapek-glucosa | crecimiento pobre a 3 y 10 días; textura un precipitado floculento muy fino; un color naranja amarillento apagado presente en el caldo después de 10 días de incubación |
| | Bromo cresol Leche purpúrea | completamente peptonizado, castaño oscuro |

TABLA II

UTILIZACION DE CARBOHIDRATO

| | <u>Carbohidrato</u> | <u>Observación</u> |
|----|---------------------|----------------------|
| | L (+) Arabinosa | crecimiento moderado |
| 20 | D (-) Arabinosa | " " |
| | Celulosa | " regular |
| | D (+) glucosa | " bueno |
| 25 | D (-) galactosa | " regular |



TABLA II (Cont.)

| | beta-lactosa | crecimiento regular | |
|----|--------------------------------------|---------------------|-------|
| | D (-) levadura (fructosa) | " | pobre |
| 5 | D (+) manosa | " | bueno |
| | D (+) rafinosa | " | pobre |
| | L (+) ramnosa | " | " |
| 10 | Almidón | " | bueno |
| | Sucrosa | " | " |
| | D (+) xilosa | " | " |
| | i - inositol | " | pobre |
| 15 | D (+) manitol | " | " |
| | Sorbitol | " | " |
| 20 | Testigo 0,5% de extracto de levadura | | |

TABLA III

UTILIZACION DE FUENTES DE NITROGENO

| | <u>Fuentes de nitrógeno</u> <u>+ 1% de glucosa</u> | <u>Observación</u> |
|----|---|---------------------------|
| 25 | 0,5% de extracto de levadu- | crecimiento regular, mem- |

405902



TABLA III (Cont.)

| | | |
|----|-------------------------|--|
| | ra Difco | branoso, sin micelio, aéreo pigmento no difusible, color rojizo g 6-1/2 pg, pardo rojizo profundo 41 |
| 5 | 1,0% de amina NZ tipo A | crecimiento regular, plano, estriado, sin micelio aéreo, pigmento no difusible, rojo de China g6pc, naranja rojizo oscuro 36 |
| 10 | 1% de asparigina | crecimiento pobre, plano, sin micelio aéreo, pigmento no difusible, pardo caoba g6pi, pardo rojizo oscuro 41 |
| | 1% de ácido glutámico | crecimiento pobre, plano, sin micelio aéreo, pigmento no difusible, color vino oscuro g7pi, pardo rojizo oscuro 44 |
| 15 | 1% de nitrato de sodio | sin crecimiento |
| | 1% de nitrato de amonio | sin crecimiento |

20 La Tabla IV compara la M. rhodorangea con otros Micromonosporas que producen antibióticos.

25

TABLA IV COMPARACION DE MICROMONOSPORA GRISEA Y M. RHODORANGEA CON OTRA MICROMONOSPORA

| | <u>M. Purpurea</u> (NRRL 2953) | <u>M. echinospora</u> (NRRL 2985) | <u>M. carbonacea</u> <u>var. carbona-</u> <u>cea</u> (NRRL 2972) | <u>M. Carbonacea</u> <u>var. aurantica</u> (NRRL 2997) | <u>M. megalomica</u> (NRRL 3274 y 3275) | <u>M. rhodorangea</u> (NRRL 5326) |
|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---|--|---|--------------------------------------|
| Esporófos largos | Si # | Si | Si | Si | Si | No |
| Esporófos ramifi- cados | Si # | Si | Si | Si | Si | No |
| Esporófos cortos | Si # | Si | Si | Si | Si | No |
| Crecimiento en agar nutriente | Regular a pobre | Regular a pobre | Regular a pobre | Regular a pobre | pobre | pobre |
| Crecimiento so- bre patata | Pobre | Pobre | Regular | Regular | No | Pobre |
| Licuífación de gelatina | Débil | Débil | Si | Si | No | Si |
| Hidrólisis de almidón | Si | Si | Si | Si | Si | Si |

24.1.74

- 9 -

206902



TABLA IV (Continuación)

| Inversión de sucrosa | Si | Si | Si | Si | Si | Si |
|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| Descomposición de celulosa | Atacada en ligera extensión | Atacada en ligera extensión | Atacada en ligera extensión | Atacada en ligera extensión | Atacada en ligera extensión | Si |
| Antagonismo | Gentamicinas | Gentamicinas | Evernimocinas | Evernimocinas | Evernimocinas | Megalomicinas Antibiótico G-418 |

Esperulación pobre o abortiva

405902



405902



Fermentación de Micromonospora rhodorangea

5 La fermentación se realiza utilizando métodos usuales para la preparación de antibióticos por cultivo de microorganismos.

10 Se producen cantidades substanciales de antibióticos cuando se cultiva el microorganismo en un medio nutritivo acuoso que contiene fuentes asimilables de carbono y nitrógeno bajo condiciones aerobias, de preferencia aerobias sumergidas. Ejemplos de fuentes de carbono asimilables son los carbohidratos, tal como los indicados en la tabla II, especialmente glucosa, xilosa y manosa. Ejemplos de fuentes asimilables de nitrógeno son las proteínas y los aminoácidos, y sustancias que los contienen, tal como extracto de carne de vaca, extracto de levadura y harina de soja. Se puede obtener un buen crecimiento y producción de antibióticos utilizando los procedimientos de fermentación indicados más abajo en el ejemplo 1. Los medios pueden suplementarse con cantidades de traza de sales inorgánicas, tal como sulfato de magnesio, sulfato ferroso, y en especial cloruro de cobalto para mejorar la producción antibiótica.

25 La fermentación se conduce usualmente en dos o tres etapas, dedicándose la primera etapa o las dos primeras etapas a la germinación del microorganismo para produ

405902



cir un inoculum apropiado. Como una regla general, las fermentaciones en gran escala (tanque) requieren dos etapas de fermentación mientras que las fermentaciones en frasco sacudido requieren solamente una etapa de germinación.

5 Las etapas de germinación se efectúan bajo condiciones aerobias con agitación, de preferencia agitación rotativa, por ejemplo, a unas 250-400 r.p.m., usualmente a una temperatura en la gama desde aproximadamente 25° a unos 35°C por de 1 a 4 días.

10 La última etapa de fermentación (la etapa de producción) se inicia por inoculación bajo condiciones estériles de un medio apropiado con el inoculum previamente preparado. La etapa de producción de la fermentación se efectúa usualmente en la misma gama de temperatura que la etapa de germinación. Además, usualmente, se requiere de aproximadamente 4 a unos 7 días para alcanzar la actividad de cresta. En forma diferente, la etapa de germinación donde el pH permanece usualmente estable, la etapa de producción requiere la regulación del pH a la gama desde aproximadamente 7,2 a unos 8,3.

15

20

25 Durante el curso de la fermentación, especialmente después de las primeras 24 horas, se analiza la fermentación a intervalos convenientes (por ejemplo cada 6 a 8 horas), para determinar cuando se alcanza la actividad de cresta del antibiótico.

405902



El análisis es de preferencia un análisis en placa discoidal usual, utilizando un medio usual y organismo de prueba. Detalles completos de los análisis preferidos se dan en una última sección de la descripción.

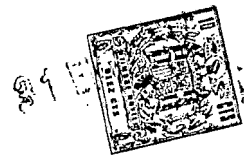
5

Aislación de los antibióticos.-

10 Cuando se alcanza la actividad de cresta del antibiótico, se cosecha el producto, en general por una combinación de etapas tal como acidificación, filtración adsorción, elución y evaporación, por ejemplo liofilización. En un procedimiento de aislación preferido, se precipitan iones de calcio presentes como una sal insoluble, la totalidad del caldo se acidifica, de preferencia con un ácido mineral, y la mezcla de fermentación se clarifica por filtración o
15 centrifugación. Después de la neutralización, el producto antibiótico se adsorbe sobre una resina apropiada intercambiadora de cationes, por ejemplo una resina de intercambio iónico débilmente ácida en la forma de amonio, se eluye con álcali diluido, de preferencia hidróxido de amonio, y se
20 aísla por evaporación, por ejemplo por liofilización.

En un procedimiento especialmente preferido, se adiciona ácido oxálico, aproximadamente de 5 a 8 gramos/litro de fermentación, al caldo total para precipitar calcio como la sal oxalato insoluble, y se ajusta el pH de la fermentación a 2,0 con ácido mineral fuerte, por ejemplo áci
25

405902



do sulfúrico 6N, para liberar el antibiótico del micelio. Después de la filtración, el caldo clarificado se neutraliza con hidróxido de amonio, los antibióticos se adsorben sobre resina intercambiadora de iones Amberlite IRC-50 NH₄⁺ de 20-50 mallas (Rohm and Haas, Philadelphia, Pennsylvania) y se descarta el caldo agotado (extraído). La composición antibiótica se eluye de la resina con base, de preferencia hidróxido de amonio 2N, y el eluato se concentra a un pequeño volumen en vacío y se evapora hasta sequedad, por ejemplo por liofilización.

Antibióticos producidos por cultivo de Micromonospora rhodorangea.-

Al someter el producto crudo obtenido en la etapa de aislamiento a cromatografía y bioautografía, se observan una pluralidad de zonas de inhibición, por ejemplo, utilizando un sistema cromatográfico que consta de 2-butanona-butanol terciario-metanol-amoniaco concentrado en la proporción de 16:3:1:6 (v/v) sobre papel Whatman nº 4, descendente por la noche (16 horas), se detecta un producto principal y aproximadamente cinco productos secundarios por bioautografía contra Staphylococcus aureus ATCC 5638P. El Antibiótico G-418 (el producto principal) es el menos polar del grupo.

De los siguientes datos fisicoquímicos y de la

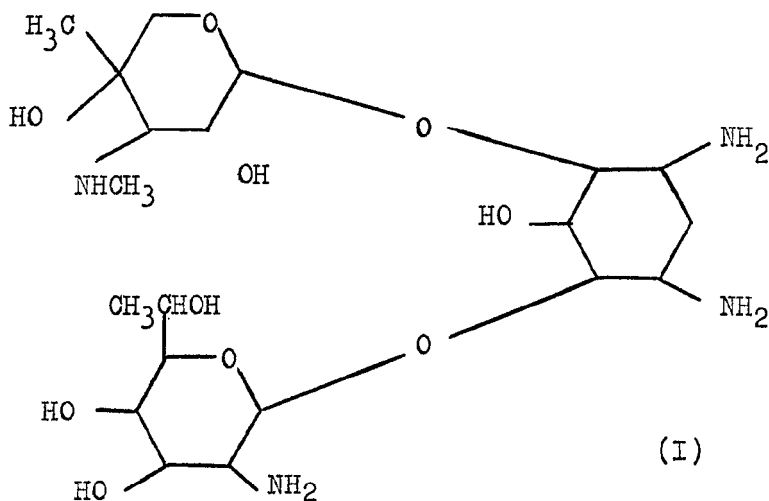


degradación química, se cree que el Antibiótico G-418 tiene la estructura mostrada más abajo en la fórmula I. Sin embargo, de la citada fórmula estructural no pueden deducirse conclusiones concernientes a la estereoquímica:

5

10

15



Quando se somete a los procedimientos cromatográficos normales, el Antibiótico G-418 substancialmente puro exhibe las pautas siguientes:

20

25

| | R_F | R_t (16 horas) |
|---|-------|------------------|
| I. Cloroformo-metanol-amoniaco concentrado sobre Chromas 500 (ascendente) | 0,40 | |

405902



| | R_f | R_t (16 horas) |
|---|-------|------------------|
| 5 | | |
| II. 2-butanona-butanol terciario-metanol-amoníaco concentrado (descendente) | | 0,24 |
| III. fenol acuoso al 80% (ascendente) | 0,32 | |
| IV. Metanol-agua, +3% de NaCl (descendente) | 0,64 | |
| 10 V. -Propanol-piridina-ácido acético-agua (ascendente) | 0,51 | |

$$R_t = \frac{\text{distancia de zona desde el origen}}{\text{distancia desde el origen al final del papel.}} \text{ en tiempo } t$$

15 El Antibiótico G-418 es un antibiótico aminoglicósido y por consiguiente pertenece a la clase que incluye gentamicina, neomicina, paramomicina, sisomicina y canamicina. Usualmente se aísla en la forma de un sólido blanco amorfo que tiene las siguientes constantes físicas: punto de fusión 138-144°C; rotación: $+ 140^\circ \pm 9^\circ$ (c = 0,3, H₂O); peso molecular (espectrometría de masa) = 497; fórmula empírica: C₂₀H₄₀O₁₀N₄ (base); C₂₀H₄₀O₁₀N₄ · 2H₂SO₄ (sulfato). Espectro de resonancia magnética nuclear: Substancialmente como se muestra en la figura 2 de los dibujos que se acompañan, que se obtuvo a partir de una solución conteniendo

20

25



15% de Antibiótico G-418 en deuterio-metanol con 3% de tetrametilsilano adicionado como la referencia interna. Espectro infrarrojo: En una preparación de nujol sustancialmente como se muestra en la figura 1 de los dibujos que se acompañan, que tiene bandas características de absorción como sigue:

| | | |
|----------|-----------|-----------|
| 3.02 (F) | 9.07 (F) | 11.86 (D) |
| 6.32 (M) | 9.49 (F) | 13.05 (D) |
| 7.76 (D) | 9.77 (F) | 13.87 (D) |
| 8.70 (M) | 10.42 (M) | |

(F) = fuerte, (M) = mediano, (D) = débil

Además las propiedades químicas y físicas del antibiótico G-418 se indican en las tablas V y VI siguientes:

TABLA V

Ensayos clasificación de antibióticos

| | Rociado de ninhidrina | Reactivo de Sakaguchi | Hipoclorito almidon KI | Ensayo Elson Morgan |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|---------------------|
| Sulfato de Antibiótico G-418 | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo |

405902



TABLA VI

Solubilidad

(Terminología según U.S. Pharmacopeia XVIII, pág. 8)

| Solvente | Antibiótico G-418 | Sulfato de Antibiótico G-418 |
|------------|-------------------------|------------------------------|
| Metanol | Escasamente soluble | Insoluble |
| Cloroformo | muy ligeramente soluble | muy ligeramente soluble |
| Benceno | Insoluble | Insoluble |

Análisis microbiológico de Antibiótico G-418.-

El análisis es un análisis de placa discoidal usual utilizando medio número 5 antibiótico Difco y Bacillus subtilis A.T.C.C. 6633 como el organismos de ensayo. Las condiciones físicas del ensayo son substancialmente las descritas por Grove and Randall para la neomicina en "Assay Methods of Antibiotics", publicado por Medical Enciclopedia Incorporated (1.955). El análisis se opone a una preparación patrón de Antibiótico G-418 que tiene una potencia definida de 1.000 mcg/mg. Un microgramo de la preparación patrón de una zona de inhibición de $16,5 \pm 1,5$ mm en el ensayo. La sal sulfato del antibiótico patrón analiza unos 750 mcg/mg frente a la base del antibiótico patrón.

405902



Sales.-

5 El nuevo antibiótico de esta invención, a sa-
ber G-418, es básico y forma sales de adición de ácido
con ácidos orgánicos e inorgánicos. Ejemplos de tales
ácidos son los ácidos sulfúrico, clorhídrico, fosfóri-
co, toluen-p-sulfónico, succínico, maleico, acético,
propiónico, ciclo-propan-carboxílico, adamantan-carboxí-
lico, furoico, benzoico y fenilacético; las sales in-
cluyen asimismo los derivados de metal alcalino de las
10 sales antibióticas de ácidos bibásicos o tribásicos.
En general, las sales son acuosolubles y pueden formar-
se al tratar una solución acuosa del antibiótico con una
cantidad estequiométrica de ácido y al liofiliar la solu-
ción resultante. Las sales pueden asimismo ser precipi-
15 tadas de una solución acuosa con la adición de solventes
orgánicos miscibles con agua, tal como alquilcetonas in-
feriores (por ejemplo, acetona), alcoholes inferiores
(por ejemplo metanol), éteres cíclicos (por ejemplo te-
trahidrofurano), o amidas terciarias inferiores, tal co-
20 mo dimetilformamida o dietilacetamida.

Derivados de base de Schiff-oxazolidina.-

25 Antibiótico G-418 forma asimismo derivados bac-
terianos de base de Schiff-oxazolidina con aldehidos me-

405902



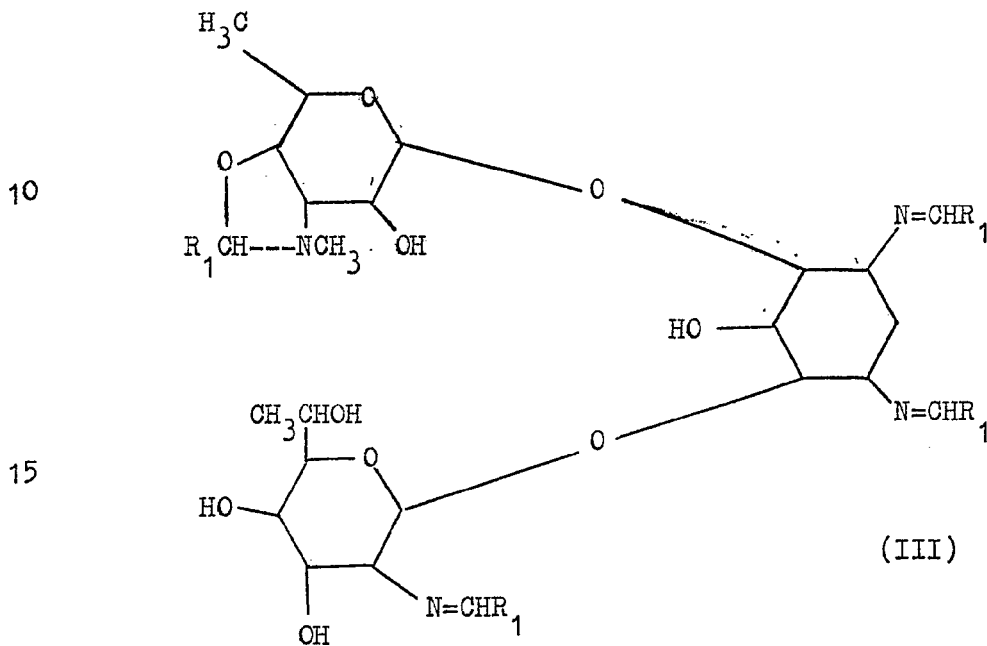
diante procedimientos que son conocidos en la técnica.
Derivados particularmente preferidos de base de Schiff-oxazolidina son los formados al condensar el antibiótico con aldehidos alifáticos, alicíclicos, aromáticos o ete
5 rocíclicos que tienen hasta unos 12 átomos de carbono, por ejemplo acetaldehído, propionaldehído, furfural, ci
clopentilacetaldehído, vainillina, piridoxal, aldehído verátrico, aldehído butírico, crotonaldehído, benzaldehí
do, y p-nitro-benzaldehído.

10 Los derivados de base de Schiff-oxazolidina aceptables farmacéuticamente se preparan en general al tratar una solución alcohólica de la base de antibióti
co exenta de nitrógeno con un exceso de aldehído o un derivado reactivo del mismo, por ejemplo un acetal, espe
15 cialmente el dietilacetal, por encima de la temperatura ambiente por aproximadamente una hora, y al enfriar la solución para obtener el producto deseado, usualmente en la forma de un sólido cristalino. Como puede verse en la fórmula I, el Antibiótico G-418 tiene tres grupos de ami
20 no primarios, cada uno de los cuales puede formar una ba
se de Schiff. Además, el antibiótico tiene un grupo ami
no secundario y un grupo de hidroxilo terciario vecino a ellos, cuyos grupos, al reaccionar con un aldehído, dan origen a un anillo de oxazolidina. Así, cuando el anti
25 biótico se hace reaccionar con un exceso de aldehído $R_1\text{CHO}$,



o un derivado reactivo del mismo, cuatro moles de aldehido reaccionan con cada mol de antibiótico para proporcionar el derivado de base de Schiff-oxazolidina mostrado en la fórmula III:

5



20

En esta fórmula, R_1 es de preferencia un radical de alquilo que contiene de 1 a 11 átomos de carbono, un radical de cicloalquilo que contiene de 3 a 11 átomos de carbono, un radical de ciclo-alquilo-alquilo que contiene de 4 a 11 átomos de carbono, o un radical aromático heterocíclico o un radical de alquilo aromático-hete

25

405902



rocíclico que contiene de 5 a 11 átomos de carbono.

Los derivados de base de Schiff-oxazolidina no son apreciablemente solubles en agua pero son solubles en solventes orgánicos comunes, tal como cloroformo, metanol, acetona, acetato de etilo y similares. Además, estos derivados son inestables en solventes orgánicos que contienen trazas de agua y revertirán al antibiótico libre. La presencia de una traza de ácido facilita la reversión.

Propiedades biológicas del Antibiótico G-418

En las tablas VII y VIII se muestran las actividades antibacterianas in vitro del Antibiótico G-418 frente a una variedad de bacterias gram-positivas y gram-negativas, como se obtiene utilizando métodos usuales comprendidos en la técnica:

TABLA VII

Actividad antibacteriana in vitro - Medio: caldo de fosfato de triptosa pH 7,2 - 7,5.

| <u>Oganismo</u> | <u>CLM⁺ (mcg/ml)</u> |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| <u>Staphylococcus aureus</u> 209P | 0,8 |
| Gray | 7,5 |
| Wood | 0,8 |
| Ziegler | 0,8 |



TABLA VII (Cont.)

| | | | |
|---|-------------------------------|------|------|
| | <u>Streptococcus sp.</u> | C | 25 |
| | | C203 | 17,5 |
| | <u>Escherichia coli</u> | Sc | 3,0 |
| | | 894 | 7,5 |
| 5 | <u>Klebsiella pneumoniae</u> | DA20 | 3,0 |
| | <u>Pseudomonas aeruginosa</u> | VA6 | 3,0 |
| | | 37 | 17,5 |

‡ Concentración inhibitoria mínima

TABLA VIII

10

Actividad antibacteriana in vitro (caldo Mueller-Hinton
pH 7,2 - 7,5).

| | <u>Organismo</u> | <u>CIM (mcg/ml)</u> |
|----|---------------------------------|---------------------|
| | <u>Bacillus subtilis</u> 6633 | 3,0 |
| 15 | <u>Staphylococcus aureus</u> 12 | 3,0 |
| | 1257 | 0,3 |
| | Sm 1 | 0,3 |
| | 6 | 0,3 |
| | 23 | 0,3 |
| 20 | 26 | 3,0 |
| | 32 | 7,5 |
| | <u>Streptococcus sp.</u> 30 | 7,5 |
| | 27 | 7,5 |
| | <u>Streptococcus sp.</u> 16245 | 7,5 |
| 25 | 6589 | 7,5 |

405902



TABLA VIII (Cont.)

| | | | |
|----|-------------------------------|-------|------|
| | | 3045 | 7.5 |
| | <u>Escherichia coli</u> | 777 | 3.0 |
| | | 887 | 3.0 |
| 5 | <u>Pseudomonas aeruginosa</u> | 1262 | 17.5 |
| | | 1236 | 17.5 |
| | | 20 | 3.0 |
| | | 83 | 7.5 |
| | <u>Proteus mirabilis</u> | 12453 | 7.5 |
| 10 | <u>morganii</u> | 8019 | 0.8 |
| | <u>rettgeri</u> | 9250 | 0.3 |

En la tabla IX se muestran los datos antibacterianos in vivo obtenidos con Antibiótico G-418. Los animales huésped utilizados para obtener los datos fueron ratones Carworth Farms CF-1 que pesan unos 18-20 g., divididos en grupos de 7. La protección in vivo (DP₅₀) se determina al inyectar el ratón intraperitonealmente con una dosis letal de bacteria patogénica. Un grupo de ratones sirve como testigo: los otros grupos reciben varias dosis unitarias de Antibiótico G-418 una hora más tarde. Los testigos no protegidos mueren en 18-24 horas. El ensayo finaliza 48 horas después de la infección, contando el número de ratones vivos en cada grupo que recibió antibiótico G-418. Los resultados se analizan por



métodos estadísticos usuales para determinar los valores de DP_{50} con 95% de límites de seguridad.

TABLA IX

5

Actividad antibacteriana in vivo

A. Actividad protectora

| <u>Organismo</u> | <u>Ruta</u> | <u>DP_{50} (mg/kg)</u> |
|--|-------------|-------------------------------------|
| <u>Staphylococcus aureus Gray</u> | S.C. | 2.5 |
| | Oral | 40 |
| <u>Escherichia coli Sc.</u> | S.C. | 1.5 |
| <u>Staphylococcus aureus St.M</u> No. 1 | S.C. | 3.0 |
| <u>Pseudomonas aeruginosa N° 1</u> | S.C. | 5.0 |
| B. <u>Toxicidad aguda</u> | | |
| | <u>Ruta</u> | <u>DL_{50} (mg/kg)</u> |
| 15 | I.V. | 140 |

15

La tabla X muestra los resultados de las pruebas in vivo que ilustran la actividad antiprotozoaria del Antibiótico G-418. Los huéspedes para las pruebas fueron ratas macho Royal Hart recientemente destetadas (3-4 semanas de edad) pesando unos 50-70 g. El procedimiento de ensayo es una modificación de uno descrito por R.J. Schnitzer en las páginas 355-443 en "Experimental Chemotherapy", volumen I, Academic Press, Nueva York (1963).

20

25

405902



TABLA X

Actividad oral del Antibiótico G-418 y sustancias de referencia contra infecciones de E. Histolytica cecales experimentales en ratas

| Preparación | dosis oral mg/kg/día | días dosifi- cados | curas para sitológi- cas/total | G.P.I. # |
|----------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------------------|----------|
| Antibiótico G-418 | 25 | 6 | 19/19 | 0 |
| | 12,5 | 6 | 24/24 | 0 |
| | 10 | 3 | 7/7 | 0 |
| | 10 | 1 | 4/7 | 0.7 |
| | 6.5 | 6 | 4/4 | 0 |
| | 6.5 | 3 | 4/5 | 0.4 |
| | 6.5 | 1 | 2/5 | 1.0 |
| | 3.5 | 6 | 5/6 | 0.2 |
| | 3.5 | 3 | 0/7 | 1.7 |
| | Paramomicina | 25 | 6 | 6/7 |
| 12 | | 6 | 4/8 | 0.8 |
| 10 | | 3 | 2/6 | 1.0 |
| 10 | | 1 | 0/7 | 2.1 |
| 6.5 | | 6 | 2/4 | 1.3 |
| 6.5 | | 3 | 1/5 | 1.0 |
| 6.5 | | 1 | 0/4 | 1.0 |
| 3.5 | | 6 | 1/6 | 1.5 |
| 3.5 | | 3 | 1/7 | 1.9 |

405902



TABLA X (Cont.)

| Preparación | dosis oral mg/kg/día | días dosifi- cados | curas para sitológi- cas/total | G.P.I. [⊗] |
|---|-------------------------|--------------------------|--------------------------------------|---------------------|
| 5 Metronidazol | 25 | 6 | 1/5 | 0.8 |
| | 13 | 6 | 2/6 | 0.8 |
| | 6.5 | 6 | 1/4 | 0.8 |
| | 6.5 | 3 | 0/3 | 1.7 |
| | 6.5 | 1 | 0/4 | 1.5 |
| 10 Testigos dosi- ficados con agua | | 6 | 4/45 | 2.2 |

⊗ G.P.I - definido como en grado promedio de infección basado sobre observación de conjunto de cambios patológicos en el saco y observaciones microscópicas del número de amidas hallado. Estas observaciones se registran sobre una escala de 0 a 4, representando 0 un saco substancialmente normal. Los testigos no tratados pero infectados importan de aproximadamente 2 a 4. En los datos se muestra el promedio de testigos 2.2.

20 Uso del antibiótico.-

Como se mostró anteriormente, el Antibiótico G-418 y sus derivados farmacéuticamente aceptables son antibióticos altamente activos que afectan adversamente el crecimiento de microorganismos gram-positivo y gram-

405902



-negativo. Por ejemplo, son activos contra Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Bacillus subtilis, Escherichia coli, Salmonella, Klebsiella, Proteus y Pseudomonas. Además el antibiótico G-418 afecta adversamente el crecimiento de helmintos, tal como Syphacia obvelata y Hymenolepsis nana, y protozoos, especialmente protozoos parásitos, tales como Trichomonas vaginalis y Entamoeba histolytica. Sin embargo el antibiótico G-418 es inactivo contra levadura y hongos filamentosos tal como Saccharomyces, Candida, Aspergillus y Trichophyton.

El Antibiótico G-418 y sus derivados farmacéuticamente aceptables pueden utilizarse bajo condiciones in vivo o in vitro. Pueden utilizarse para inhibir o destruir especies susceptibles como los organismos arriba descritos; y en conjunción con jabones y detergentes, eliminan tales organismos de las superficies de equipo de laboratorio, instrumentos quirúrgicos, artículos de cristal de laboratorio y similares. En vista de su acción in vivo, los antibióticos y sus derivados farmacéuticamente aceptables pueden utilizarse para destruir o inhibir organismos susceptibles dentro de huéspedes mamíferos, por ejemplo ratones, ratas, gatos, perro y ganado.

El Antibiótico G-418 y sus derivados farmacéuticamente aceptables pueden utilizarse asimismo para el tratamiento de enfermedades debidas a organismos suscep

405902



tibles en el hombre.

Preparatorio para su uso in vivo, un antibiótico seleccionado de antibiótico G-418 y sus derivados farmacéuticamente aceptables se lleva a una forma apropiada para la administración terapéutica, por ejemplo, mezclándose con un vehículo o excipiente farmacéutico. Por consiguiente la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden como ingrediente activo por lo menos un compuesto seleccionado de Antibiótico G-418 y sus derivados farmacéuticamente aceptables, junto con un vehículo o excipiente farmacéutico. Las composiciones pueden ser en la forma de una unidad dosada, por ejemplo un producto conformado. Sin embargo, las composiciones están de preferencia en la forma de preparaciones inyectables en ampollas, o bien ungüentos, cremas o lociones.

Los derivados a base de Schiff-oxazolidina de Verdamicin I y de Antibiótico G-418 pueden emplearse, si se desea, como una solución en un medio solvente orgánico (por ejemplo como una tintura). Asimismo se pueden emplear en cremas y ungüentos tópicos, cuando es beneficiosa la compatibilidad con sustancias lipoides.

Ejemplo 1.-

Fermentación de Micromonospora rhodorangea en tanque.-

A. - Primera etapa de germinación: A 1000 cc de agua se

405902



adiciona lo siguiente: 3 g de extracto de carne de vaca,
5 g de triptosa, 5 g de extracto de levadura, 1 g de dex-
trosa, 24 g de almidón, 2 g de carbonato de calcio. La
mezcla se calienta con agitación hasta que los sólidos
están distribuidos uniformemente y/o se disuelven subs-
tancialmente. La mezcla se divide en 10 partes iguales
(por volumen) y se transfieren a frascos sacudidos de
300 cc de capacidad. El medio se esteriliza a 121°C ba-
jo 1,05 kg. cm² de presión por 20 minutos, luego el me-
dio se enfria aproximadamente a temperatura ambiente. Ba-
jo condiciones estériles, se inocula cada frasco con 5
cc de una preparación de caldo completo, previamente pre-
parada. Se incuban los frascos a aproximadamente 35°C con
agitación relativa (300 rpm) por 3 días.

15 B.- Segunda etapa de germinación: A 500 cc de medio es-
téril, preparado como se ha descrito anteriormente, se
transfiere asépticamente 25 cc de medio de la primera eta-
pa de germinación y se incuba a 28°C por 3 días con agi-
tación rotativa (300 rpm).

20 C.- Fermentación: En un fermentador de 14 litros de ca-
pacidad, se preparan 10 litros de medios de fermentación
que tienen la composición siguiente: 350 g de harina de
soja, 500 g de extrina, 50 g de dextrosa, 70 g de carbo-
nato de calcio, 130 mg de cloruro de cobalto, y 10 litros
de agua. El fermentador y el medio se esterilizan a 121°C,

405902



bajo 1,5 kg/cm² por 30 minutos y luego se enfría a aproximadamente a temperatura ambiente. El medio de fermentación se incuba al adicionar 500 cc de inoculum de la segunda etapa de germinación bajo condiciones asépticas.

5 La fermentación se conduce a una temperatura de aproximadamente 35°C con la introducción de aire a una relación de aproximadamente 2,5 a 5,0 litros por minuto. El medio se agita a una relación de aproximadamente 250 a 500 rpm. Se continua la fermentación hasta que se alcanza la actividad de cresta como se determina por la técnica de análisis previamente descrita y se elabora como se ha descrito en el ejemplo 2.

10

Ejemplo 2.-

Aislación de Antibiótico G-418.-

15 A 20 litros de caldo de fermentación se adicionan aproximadamente 130 g de ácido oxálico con agitación vigorosa. El pH del caldo se ajusta a 2,0 con ácido sulfúrico 6N. La mezcla se agita por aproximadamente 30 minutos y se filtra. El precipitado se lava con

20 agua corriente hasta que las lavazas están exentas substancialmente de color. El filtrado y las lavazas se combinan y se ajusta a pH de 7 con hidróxido de amonio 6N. El filtrado y las lavazas combinadas pasan a través de

25 una columna de resina intercambiadora de iones que con-

405902



5 tiene aproximadamente 250 g de IRC-50 en la forma de amonio a una relación de aproximadamente 50 a 75 cc/minuto. El lecho de resina se lava hasta que los productos lavados están exentos de color y se eluye el antibiótico con hidróxido de amonio 2N. El eluato se concentra en
vacio y se liofiliza para proporcionar aproximadamente 5 g de antibiótico crudo que analiza aproximadamente 105 mog/mg. La cromatografía en papel de este antibiótico cru
10 do en un sistema descendente compuesto de 2-butanona: butanol terciario: metanol: hidróxido de amonio concentrado (16:3:1:6), seguido por bioautografía contra Staphylococcus aureus ATCC 6538P, proporciona un bioautograma que consiste substancialmente en una mancha con varias manchas menores escasamente visibles; así el antibiótico
15 co es casi un compuesto simple.

Ejemplo 3.-

Purificación parcial de Antibiótico G-418.-

20 Se disuelve 4 g de Antibiótico G-418 como se obtiene del ejemplo 2 en 100 cc de agua. Se ajusta el pH 4,2 con ácido sulfúrico 2N y se adicionan 250 mg de carbon vegetal activado (Darco G-60, Atlas Powder Co., Wilmington, Delaware). La suspensión se agita por aproximadamente una hora y se filtra. Se concentra el filtrado
25 do a unos 50 cc y se le precipita en 500 cc de metanol.

405902



El precipitado resultante se separa por filtración, se le lava con metanol y se le disuelve en unos 20 cc de agua. Se prepara una columna de IRA-401S (una resina intercambiadora de aniones Amberlite - Rohm and Hass, Philadelphia, Pennsylvania) que tiene substancialmente las dimensiones siguientes: altura 55 cm; diámetro interior 25 cm; resina 200 g. La solución de antibiótico se situa encima de la columna de resina y la solución se lava a través de la columna con agua desionizada. El eluato de la columna se concentra a unos 20 cc en vacio y el producto se liofiliza para obtener de unos 800 mg a aproximadamente 1,2 g de Antibiótico G-418 que analiza aproximadamente 480 mcg/mg.

Ejemplo 4.-

Purificación ulterior del Antibiótico.-

Preparación de sulfato de Antibiótico G-418.-

Se disuelve 2,6 g de Antibiótico G-418, preparado de acuerdo con el ejemplo 3, en 250 cc de agua y se ajusta el pH de la solución a 4,2 con ácido sulfúrico (1-6N) diluído. Se adiciona aproximadamente 5 g de Darco G-60 a la solución y se agita por aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. Se filtra la suspensión y el filtrado se concentra hasta sequedad en vacio.

El residuo se disuelve en 20 cc de agua y la solución se adiciona en forma de gotas a 500 cc de metanol

405902



con agitación vigorosa. La suspensión resultante se fil
tra, el producto sólido se lava con metanol y se seca en
vacio a unos 40°C para obtener 3,36 g de sulfato de Anti
biótico G-418 que analiza aproximadamente 700 mcg/mg.

5 Similarmente, al reemplazar el ácido sulfúrico
con una cantidad equivalente de otros ácidos inorgánicos
u orgánicos y al utilizar acetona como el solvente de pre
cipitación, puede prepararse otras sales de adición de
ácido.

10

- REIVINDICACIONES -

15 Los puntos de invención propia y nueva, que se
presentan para que sean objeto de esta solicitud de Paten
te de Invención en España, por VEINTE años, son los que
se recogen en las reivindicaciones siguientes:

20 1ª.- Procedimiento para la preparación de una
substancia antibióticamente activa denominada Antibióti
co G-418 y sus derivados farmacéuticamente aceptables, ca
racterizado porque se cultiva un microorganismo de la es
pecie Micromonospora rhodorangea en un medio nutriente
en condiciones aerobias hasta que se imparte a dicho me
25 dio una actividad antibiótica sustancial y porque se ais

405902



la el antibiótico Antibiótico G-418 en forma libre o en forma de un derivado farmacéuticamente aceptable.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque el microorganismo de la especie Mi
5 cromonospora rhodorangea es la cepa designada NRRL 5326.

3ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª ó 2ª, caracterizado porque el cultivo se efectua en condiciones aerobias sumergidas.

4ª.- Procedimiento según una cualquiera de las
10 reivindicaciones 1ª a 3ª, caracterizado porque el cultivo se efectua a una temperatura de 20°C a 40°C. y el pH. es de 6,5 a 8,5.

5ª.- Procedimiento de acuerdo con la reivindi
15 cación 4ª, caracterizado porque la temperatura es de 28°C a 35°C y el pH es de 7,2 a 8,3.

6ª.- Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 5ª, caracterizado porque el antibiótico, se aísla en forma de un derivado farmacéuti
camente aceptable.

7ª.- Procedimiento de acuerdo con la reivindi
20 cación 6ª, caracterizado porque el derivado es una sal por adición de ácido.

8ª.- Procedimiento de acuerdo con la reivindi
25 cación 6ª, caracterizado porque el derivado es un produc to de condensación del antibiótico con un aldehído.

ME

27.1.74.

405902



9ª.- Un procedimiento para la preparación de una substancia antibióticamente activa denominada Anti biótico G-418.

5 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.

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

Madrid,

31 ENE. 1974

P. A.

Alberto G. Alonso
Por Poder
Alonso

mge

27.1.74.
MJP/.

405902

405902

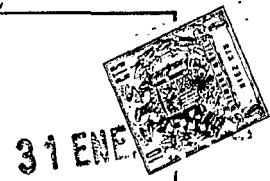


FIG.1

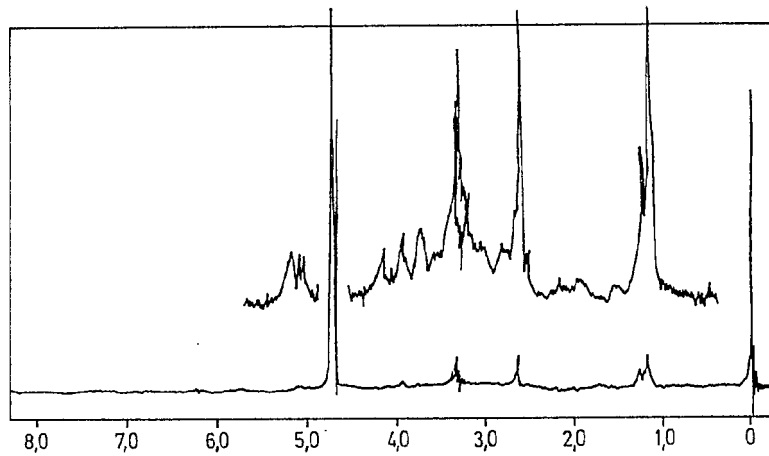
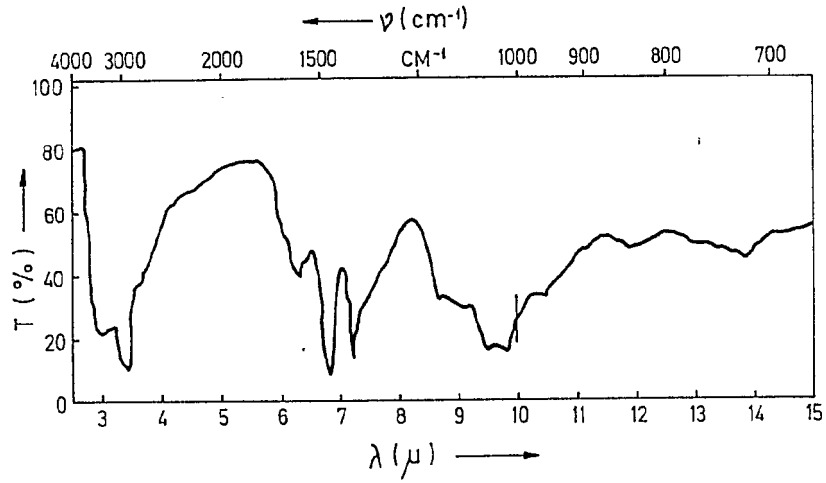


FIG.2

Alberto de Rizzuto
Per Fede