

416742

P.- 54.785

Case 2028

17 SET. 1973



C12D/A61K;C07D

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION por VEINTE años

a nombre de SCHERICO LTD.

entidad suiza

con domicilio en Töpferstrasse 5, Lucerna, Suiza

por: "PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR POR FERMENTACION UN PRO
DUCTO ANTIBIOTICAMENTE ACTIVO QUE CONTIENE ANTIBIO
TICO G-52 Y SISOMICINA"

(Clase Internacional Cl1d, C07d)

prioridades reivindicadas: Estados Unidos de América, 14
de Julio de 1972, Nº 271.838 y Suiza, 6 de Julio de 1973,
Nº 9930/73

**POOR
QUALITY**

9.9.75

- 1 -

416742



P.- 54.785
Case 2028

5 La presente invención se refiere a un nuevo producto antibióticamente activo que comprende antibiótico G-52, y a su preparación por cultivo de una especie hasta ahora desconocida del género Micromonospora, concretamente la Micromonospora zionensis.

Además, la invención proporciona un nuevo método para preparar el antibiótico conocido sisomicina, que es coproducido por el cultivo de Micromonospora zionensis.

10 También están incluidos en el ámbito de la invención los derivados farmacéuticamente aceptables del nuevo producto antibióticamente activo, especialmente del antibiótico G-52, que también son antibióticos valiosos.

15 La invención se refiere también a composiciones farmacéuticas que contienen al menos el nuevo antibiótico G-52.

20 La Micromonospora zionensis aquí descrita ha sido clasificada como una nueva especie de Micromonospora en base a sus propiedades taxonómicas y de crecimiento en un cierto número de medios normalizados. En tales medios, el microorganismo parece estar relacionado con la Micromonospora echinospora más próximamente que con cualquier microorganismo descrito con anterioridad; 25 sin embargo, aparecen sustanciales diferencias cuando

416742

10



se comparan las características de crecimiento de los dos microorganismos. Estas diferencias son particularmente perceptibles en los siguientes aspectos:

	<u>Medio</u>	<u>M. zionensis</u>	<u>M. echinospora</u>
5	Agar de glucosa- -asparagina	crecimiento defi ciente, colorea- do en crema, ma- te	buen crecimiento, color -melocotón brillante- g5IA naranja rojizo moderado 37
10	Agar de Bennett	color - negro	color - castaño oscuro - g7 1/2FL; pardo rojizo grisá ceo oscuro 47
15	Agar de Emerson	chocolate g4nl; pardo amarillen- to grisáceo oscu ro 81	color - rojo teja - g5NE; pardo fuer- te 55
20	Pasta de tomate agar de harina de avena	negro	color - naranja pol voriento g 4LC; na ranja moderado 53
25	Utilización de ram nosa	deficiente	bueno

416742



5 Una muestra de Micromonospora zionensis ha sido depositada en la División Septentrional de Utilización, Investigación y Desarrollo (Northern Utilization Research and Development Division), Departamento de Agricultura de los EE.UU., Peoria, Illinois, y ha sido añadida a su colección de microorganismos como NRRL 5456.

10 El microorganismo tiene las propiedades microscópicas, macroscópicas y bioquímicas que se exponen a continuación.

1. Taxonomía

15 (a) Las observaciones macroscópicas de un cultivo de 30 días de edad, incubado a 24 - 26°C en un medio con 3% de Amina NZ tipo A (una peptona resultante de la digestión pancreática de caseína, producida por Scheffield Chemical Co., de Norwich, Nueva York), 1% de dextrosa y 1,5% de agar, muestran buen crecimiento sin micelio aéreo, sin pigmento difundible, bizcocho g/cco, pardo amarillento grisáceo claro 79.

20 (b) Las observaciones microscópicas del organismo tras 60 días de incubación en medio de extracto de levadura-sacarosa muestran abundantes esporas que tienen forma de globosa a esférica, tienen aproximadamente 1,0 - 1,5
25 μ m de diámetro, y son producidas en esporóforos cor-

416742



tos.

En las descripciones precedentes y siguientes de los microorganismos se usan dos designaciones de color. La primera está tomada del "Manual de armonía del color" ("Color harmony Manual"), 4ª edición, 1958, publicado por la Container Corporation of America (EE.UU.), y la descripción para la primera designación está tomada del "Diccionario descriptivo de nombres de colores" ("Descriptive Color Name Dictionary"), por Taylor, Knoche y Granville, también publicado por la Container Corporation of America (1950). La segunda designación de color es sinónima o casi sinónima de la primera, y está tomada de la Circular nº 553 (1955) de la National Bureau of Standards, EE.UU.

Características de cultivo

1. La Micromonospora zionensis muestra en general buen crecimiento a 28 a 37°C, y sustancialmente ningún crecimiento a 45°C o más. El microorganismo es aerobio, y crece bien en un intervalo de pH de aproximadamente 6,5 a 8,3; sin embargo, crece y produce mejor a un pH que se aproxime a la neutralidad.

2. El microorganismo no presenta sustancialmente ningún crecimiento en los siguientes medios normalizados: glucosa-de Czapek, glucosa-asparagina, malato cálcico

416742



cico, agar ordinario (agar de agua), agar nutriente, agar de huevo (Medio de huevo Dorset), gelatina, almidón y celulosa.

- 5 3. Taco de patata - crecimiento: deficiente, par
do rojizo claro, cuando se añade carbonato cálcico al
taco de patata el crecimiento es bueno, plegado, negro.
4. Suero de Loeffler - crecimiento: bueno, colo-
reado en crema, substrato reducido a líquido.
- 10 5. Peptona - agar de glucosa - crecimiento: bue-
no, embranoso, sin micelio aéreo, sin pigmento difundible,
ámbar claro g3ic; amarillo naranja oscuro 72.
6. Leche de tomasol - peptonizado dando reacción
ácida.
- 15 7. Medio de tirosina - crecimiento: pobre - no
produce tirosinasa.
8. Utilización de carbohidratos: el microorganis-
mo presenta buen crecimiento en D-arabinosa, L-arabino-
sa, D-galactosa, D-glucosa, manosa sacarosa, D-xilosa
y almidón; presenta buen crecimiento en D-lactosa, D-le-
20 vulosa y D-ribosa; presenta crecimiento pobre en dulci-
ta, glicerina, L-inosita, D-manita, melibiosa, melicito-
sa, rafinosa, L-ramnosa, sorbita y salicina.

La celulosa es descompuesta muy lentamente.
El medio de control contiene 0,5% de extracto de leva-
25 dura y nada de carbohidrato añadido. El microorganismo

416742

10



presenta crecimiento deficiente en este medio; por tanto, cualquier refuerzo de las características de crecimiento del microorganismo es debido a la utilización del 1% de carbohidrato añadido.

- 5 9. Utilización de nitrógeno - Estos datos están obtenidos con medios que contienen una sola fuente de nitrógeno añadido, más 1% en peso/volumen de glucosa.
- (a) Extracto de levadura al 0,5% (Difco) crecimiento: bueno, membranoso, sin micelio aéreo, sin pigmento difundible, pardo claro g4ng; pardo fuerte 55;
- 10 (b) 1,0% de Amina NZ - tipo A (Sheffield Chem. Co., Norwich, Nueva York) - crecimiento: bueno, mate, sin micelio aéreo, sin pigmento difundible, rosa perla g3ca; amarillo naranja pálido 73.
- 15 (c) 1,0% de asparagina - crecimiento: deficiente, mate, sin micelio aéreo, sin pigmento difundible, rojo ladrillo g6ng; pardo rojizo moderado 43.
- (d) 1,0% de ácido glutámico - las características de crecimiento y color son las mismas que en el punto (c).
- 20 (e) 1,0% de nitrato sódico - sin crecimiento visible.
- (f) 1,0% de nitrato amónico - sin crecimiento visible.
10. Tolerancia a la sal - el microorganismo tolerará un máximo de 3% de cloruro sódico en un medio de crecimiento.
- 25 11. Agar de Bennett - crecimiento: bueno, plega-

416742

10



- do - membranoso, sin micelio aéreo, sin pigmento difundible, negro.
12. Agar de Emerson - crecimiento: bueno, plegado, sin micelio aéreo, sin pigmento difundible, negro.
- 5 13. Agar de glucosa - extracto de levadura - crecimiento: bueno, plegado, sin micelio aéreo, sin pigmento difundible, pardo gris oscuro góni; pardo rojizo grisáceo 46.
14. Agar de Czapek - crecimiento: deficiente
- 10 15. Agar de tirosina - crecimiento: muy deficiente; en agar de tirosina y extracto de carne de vacuno - no produce tirosinasa, crecimiento: bueno; en agar de tirosina y extracto de levadura - se produce tirosinasa (cristales disueltos), pigmento difundible pardo claro. Observaciones a 2, 7 y 14 días - (véase Gordon y Smith, J. Bact. 69:147).
- 15 16. Agar de peptonas hierro - crecimiento: bueno, no se produce sulfuro de hidrógeno.
17. Agar de infusión de cerebro y corazón - crecimiento: bueno, plegado, membranoso, sin micelio aéreo, sin pigmento difundible, roble amarillo g3le; pardo amarillento fuerte 74.
- 20 18. Agar A de extracto de malta - crecimiento: bueno, plegado, membranoso, sin micelio aéreo, sin pigmento difundible, pardo óxido g5pg; pardo fuerte 55.
- 25

416742

10



19. Agar B de extracto de malta - crecimiento: bueno, membranoso, sin micelio aéreo, sin pigmento difundible, pardo especia claro g4Lg; pardo moderado 58.

5 Las anteriores características de cultivo sirven para distinguir la Micromonospora zionensis de todos los microorganismos descritos con anterioridad. Además de lo que antecede, también se puede distinguir la Micromonospora zionensis por su producción, bajo condiciones de fermentación aerobia, de un nuevo producto antibióticamente activo que contiene antibiótico G-52 y sisomicina.

10

Como se ha mencionado antes, la invención se refiere a un procedimiento para preparar un producto antibióticamente activo, que comprende cultivar un microorganismo de la especie Micromonospora zionensis en un medio nutriente acuoso, bajo condiciones aerobias, hasta que se comuniquen a dicho medio una actividad antibiótica sustancial, y aislar del mismo al menos una fracción antibióticamente activa, en forma libre o en forma de un derivado funcional farmacéuticamente aceptable. Se producen cantidades sustanciales del antibiótico cuando el microorganismo es cultivado en un medio nutriente acuoso bajo condiciones aerobias sumergidas. Son ejemplos de fuentes de carbono asimilables los carbohidratos tales como los expuestos antes, especialmente glu-

15

20

25

416742



cosa, xiloxa y sacarosa. Son ejemplos de fuentes asimilables de nitrógeno las proteínas, los amonócidos y las sustancias que los contienen, tales como extracto de carne de vacuno, extracto de levadura, harina de soja y similares. Antes, bajo el título Utilización de nitrógeno, se han expuesto ejemplos específicos de tales fuentes de nitrógeno. Se pueden obtener crecimiento y producción de antibióticos buenos usando los medios y métodos de fermentación expuestos en los ejemplos específicos. Los medios pueden estar suplementados con cantidades de traza de sales inorgánicas tales como sulfato de magnesio, sulfato ferroso, y especialmente cloruro de cobalto, para reforzar la producción de antibiótico. En general, la fermentación se efectúa en un intervalo de temperatura de aproximadamente 23°C a aproximadamente 38°C, de preferencia aproximadamente 35°C, con aireación continua y agitación continua a aproximadamente 250-400 rpm. Bajo estas condiciones, el pico de producción de antibiótico se alcanza en de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 días. El ph de la fermentación es mantenido en general en el intervalo de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,3, de preferencia aproximadamente 7,2. En fermentaciones a pequeña escala, por ejemplo 10 litros, usualmente no es necesario ajustar el pH de la fermentación tras la inoculación. Sin embargo, en fermentaciones a gran escala

416742



5 puede ser necesario añadir materiales para elevar o disminuir el pH del medio. Estos materiales son los generalmente usados en la técnica, por ejemplo ácidos minerales diluidos, hidróxidos y carbonatos de metal alcalino y alcalinotérreo diluidos, y similares.

10 En general, la fermentación se efectúa en dos o más etapas, habiendo una o más etapas de germinación seguidas por una etapa de fermentación. Como regla general, las fermentaciones (en depósitos) grandes utilizan dos etapas de germinación mientras que las fermentaciones en matraz agitado utilizan una sola etapa de germinación.

15 Durante el curso de la fermentación, especialmente tras las primeras 24 horas, se hacen determinaciones de la fermentación a intervalos convenientes (por ejemplo cada 6 a 8 horas), para determinar cuándo se alcanza el pico de producción.

Determinación microbiológica

20 La determinación es una determinación en placa de disco normalizada, usando el Medio antibiótico Difco nº 5[®], y Staphylococcus aureus A.T.C.C. 65536P como organismo de ensayo. Las condiciones físicas del ensayo son sustancialmente las descritas para la neomicina [Grove y Randall, Assay Methods of Antibiotics
25 (Métodos de determinación de antibióticos), publicado

416742



por Medical Encyclopedia Incorporated (1955)] . La de-
terminación se efectúa contra una preparación patrón
de antibiótico G-52, que tiene una potencia definida de
1000 mcg/mg. Un microgramo del patrón da una zona de
5 inhibición de $17,7 \pm 1,0$ mm en el ensayo. La determina-
ción de la sal sulfato de antibiótico normalizada de
aproximadamente 675 mcg/mg, frente a la base antibióti-
ca normalizada.

10 Cuando se alcanza el pico de actividad anti-
biótica, el producto es recogido generalmente por una
combinación de etapas conocidas en la técnica, tales co-
mo acidificación, filtración, adsorción, elución, lio-
filización y similares. En un método de aislamiento (re-
colección) preferido, la totalidad del caldo es acidi-
15 ficada, preferiblemente con un ácido, usualmente un áci-
do mineral, y la mezcla de fermentación es clarificada
por filtración o centrifugación. Tras neutralización, el
producto antibiótico es adsorbido sobre una resina inter-
cambiadora de cationes adecuada, tal como Amberlite
20 IRC-50 (Rohm and Haas, Philadelphia, Pennsylvania, com-
puesto de ácido metacrílico reticulado que contiene gru-
pos carboxilo), es eluido con alcali diluido, preferi-
blemente hidróxido amónico, y es aislado por liofiliza-
ción.

25 El producto obtenido por el método anterior

416742

10



contiene la totalidad del complemento de antibióticos producido mediante la fermentación.

5 El producto antibióticamente activo es separado sometiendo el liofilizado crudo a cromatografía en un adsorbente sólido tal como alúmina, celulosa, tierra de diatomeas, silicato de magnesio o, preferiblemente, gel de sílice. La elución puede efectuarse por métodos conocidos, con cualquier disolvente orgánico polar adecuado, o mezcla disolvente. Sin embargo, cuando se emplea gel de sílice como adsorbente sólido, la elución se efectúa ventajosamente mediante uso de la fase inferior de una mezcla disolvente consistente en cloroformo, isopropanol e hidróxido amónico concentrado (2:1:1 v/v). De esta manera, el producto antibióticamente activo es separado en los dos componente principales, habiendo evidencia de trazas de materiales activos aún no identificados. El primer antibiótico eluido de la columna es el antibiótico G-52, seguido por sisomicina.

10

15

20

Los antibióticos

La sisomicina, antibiótico conocido antes de ahora producido por el procedimiento antes descrito, es conocida también como antibiótico 66-40 y como rickamicina; su estructura empírica se muestra en la página 285

25

416742

10



de Chemical Communications, 1971, The Chemical Society, Burlington House, Londres. Un procedimiento para la preparación, y las propiedades biológicas de la sisomicina, están descritos en el Journal of Antibiotics, Japón, Vol. XXIII nº 11, páginas 551-565.

5 El antibiótico G-52 y sus derivados funcionales farmacéuticamente aceptables afectan adversamente al crecimiento de los microorganismos gram-positivos y gram-negativos. Además, el antibiótico G-52 y sus derivados farmacéuticamente aceptables pueden ser utilizados bajo condiciones in vivo o in vitro, para erradicar o inhibir las bacterias susceptibles. El antibiótico y sus derivados pueden ser usados conjuntamente con jabones y detergentes, para destruir y eliminar tales organismos de la superficie de equipo de laboratorio, instrumentos quirúrgicos, material de vidrio de laboratorio y similares. El antibiótico y sus derivados farmacéuticamente aceptables pueden ser usados también para destruir o inhibir sustancialmente los organismos susceptibles dentro de huéspedes mamíferos tales como ratones, ratas, gatos, perros, ganado vacuno y similares.

15 Tal como aquí se usa, el término derivados funcionales farmacéuticamente aceptables abarca sales de adición de ácido, derivados de base de Schiff-oxazolidina, hidratos y solvatos del antibiótico G-52, así

416742



como solvatos de las sales de adición de ácido y de los derivados de base de Schiff-oxazolidina.

5 El antibiótico G-52 es un sólido blanco que es muy soluble en agua y tiene algún grado de solubilidad en la mayoría de los disolventes orgánicos polares, tales como alcoholes inferiores, di-alcoholo inferior-acilamidas (por ejemplo dimetilformamida), sulfóxidos de di-alcoholo inferior (por ejemplo sulfóxido de dimetilo), piridina y similares.

10 Además, el antibiótico es estable a la ebullición durante al menos treinta (30) minutos, en tampón de MacIlvaines, de pH 2 - 8, y en tampón de hidróxido sódico-ácido bórico de pH 8-10. El antibiótico no presenta absorción en el ultravioleta en el intervalo de 220-400 m μ .

15 El antibiótico G-52 tiene un espectro de RMN característico, como se muestra en la Figura 1. El espectro fué obtenido por uso de un espectrómetro Varian A-60-A (Varian Associates, 611 Hansen Way, Palo Alto, California) con una solución del antibiótico en agua
20 deuteriada (D₂O). Para la determinación de la estructura se consideran relevantes los siguientes picos de absorción: (Δ , PPM) 1,20 singulete, 1,20 multiplete, 2,43 singulete, 2,50 singulete, 3,80 cuartete, 4,02 do
25 blete, 5,03 singulete ancho, 5,07 doblete y 5,35 doblete

416742



te.

El antibiótico tiene un espectro de absorción infrarroja característico, en aceite mineral, sustancialmente según se muestra en la Figura 2.

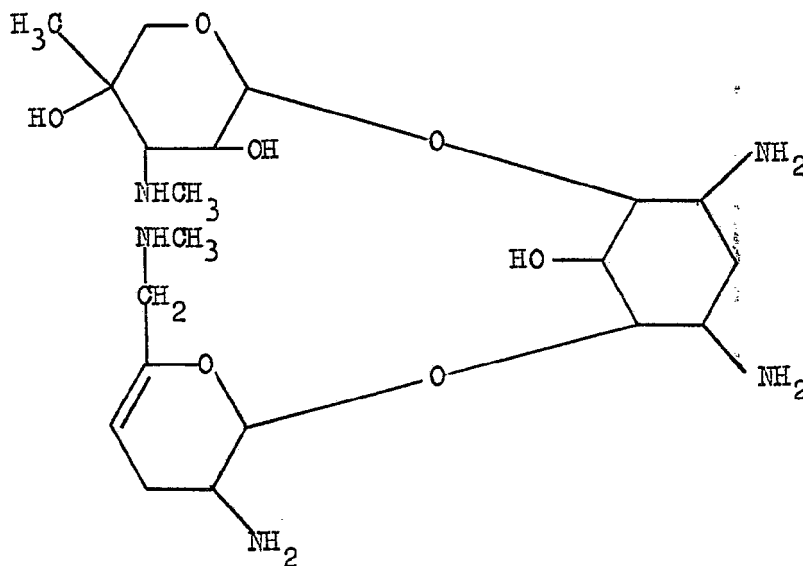
5 El espectro de masa del antibiótico G-52 muestra un ión molecular a 461, que es confirmado por otras fragmentaciones en el espectro y que está en buen acuerdo con una fórmula empírica de $C_{20}H_{39}N_5O_9$.

10 Los datos fisicoquímicos aquí expuestos, especialmente los espectros de RMN, infrarrojo y de masa, son consistentes con la siguiente estructura planar (plana) para el antibiótico G-52.

15

20

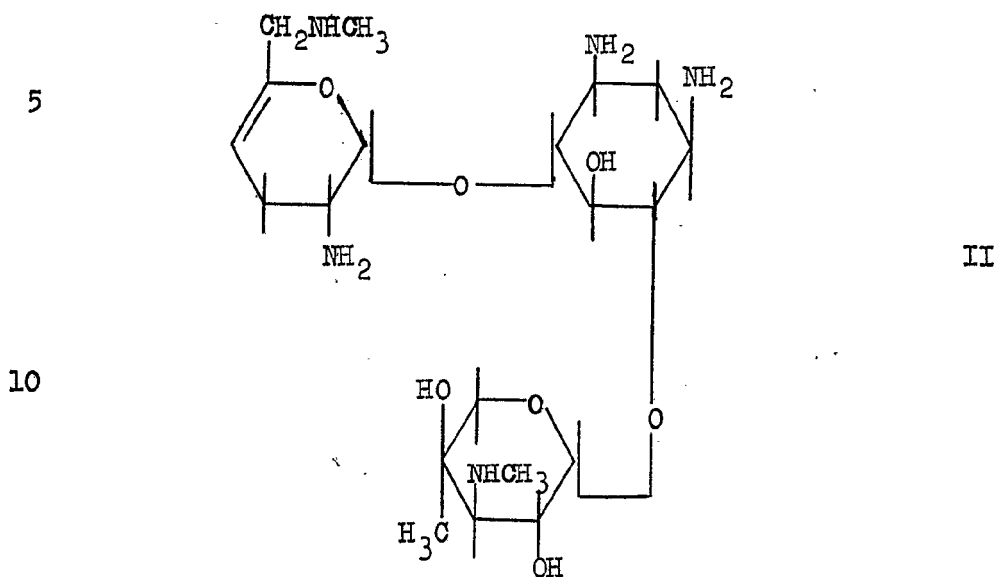
25





416742

El antibiótico G-52 tiene la siguiente fórmula la estereoquímica:



15 El antibiótico G-52 es un antibiótico de aminoglicósido, y por tanto pertenece a la clase que comprende la gentamicina, neomicina, paromomicina, tobramicina, sisomicina, kanamicina y similares. Es un compuesto básico que forma sales no tóxicas de adición de ácido con ácidos orgánicos e inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, acético, esteárico, propiónico, tartárico, maleico, benzoico y similares. También se pueden usar ácidos polivalentes parcialmente neutralizados (por ejemplo neutralizados con una base inorgánica tal como, por ejem-

20

25

416742



5 plo, NaOH, o una base orgánica). En general, las sales
de ácido mineral, tales como las formadas con ácido clor
hídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares,
son solubles en agua. Titulando una solución acuosa de
10 antibiótico G-52 con una cantidad de ácido menor que la
estequiométrica, se pueden formar sales de adición par
cial de ácido. Tal como aquí se usa, el término "sal de
adición de ácido" abarca todos los tales compuestos. Las
sales presentan las mismas propiedades antibacterianas
15 que la base nitrogenada libre antibiótica, pero sí di
fieren en características de solubilidad. Así, estas
sales pueden ser usadas sustancialmente de la misma ma
nera y para los mismos fines antes descritos.

20 Análogamente, los derivados farmacéuticamente
aceptables de base de Schiff-oxazolidina del antibióti
co G-52 se preparan generalmente tratando una solución
alcohólica de la base nitrogenada libre antibiótica con
un exceso de aldehído, por encima de la temperatura am
25 biente, preferiblemente a reflujo durante aproximadamen
te una hora, y enfriando la solución para obtener el
producto deseado, usualmente en forma de un sólido cris
talino. Como se puede ver por las anteriores fórmula I
y II, el antibiótico tiene tres grupos amino primarios,
cada uno de los cuales puede formar una base de Schiff.
Además, el antibiótico tiene un grupo amino secundario



416742

vecinal a un grupo hidroxilo terciario, combinación que con aldehido origina un anillo de oxazolidina. Así, cuando se hace reaccionar el antibiótico con un exceso de aldehido, cuatro moles de aldehido reaccionan con cada mol de antibiótico, produciendo un derivado de base de Schiff-oxazolidina. Estos derivados son también útiles para los mismos fines antes descritos. Sin embargo, debido a sus propiedades de solubilidad, son muy útiles cuando se emplean en medios oleaginosos tales como cremas, jaleas o ungüentos. Las bases de Schiff-oxazolidinas no son apreciablemente solubles en agua, y, de hecho, son descompuestas en medios acuosos que contienen trazas de ácido. A la inversa, son solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos no ácidos comúnmente usados.

Los productos preferidos aquí considerados son aquellos preparados condensando el antibiótico con aldehidos que tienen hasta 12 átomos de carbono. Entre tales aldehidos se incluyen los compuestos alifáticos, alicíclicos, aromáticos y heterocíclicos. Además, se ha de entender que los aldehidos y cetonas que tienen estructura de anillo cerrado pueden llevar sustituyentes tales como hidroxilo, halógeno, nitro, alcoxi inferior, alcanoiloxi inferior y similares. Exclusivamente para ilustración, y sin limitación, los siguientes están en

416742



5 tre los aldehidos aquí considerados: acetaldehido, cro-
tonaldehido, furfural, ciclopentilacetaldehido, vaini-
llina, veratraldehido, benzofenona, benzaldehido, sali-
cilaldehido, pirádoxal y similares. También estos pro-
ductos forman solvatos.

10 Es de importancia observar que el antibióti-
co G-52 y sus sales de adición de ácido, como muchos
otros antibióticos de aminoglicósido, forman hidratos
y solvatos que pueden ser difíciles de romper. Los pro-
ductos aislados contienen agua o disolvente, usualmen-
te aproximadamente un mol por mol de antibiótico. En su
mayoría, pueden ser utilizados en forma solvatada o hi-
dratada, con ajuste adecuado del contenido de antibióti-
co.

15 En la siguiente tabla 1 se exponen comparacio-
nes cromatográficas del antibiótico G-52 con otros anti-
bióticos de aminoglicósido representativos.

20

416742



TABLA I

Valores de R_f comparativos de Antibióticos

Sistemas cromatográficos en papel	Antibiótico G-52	Siso-micina	Componentes de gentamicina			Neo-micina	Kana-micina	Paramo-micina
			C1	C2	Cl			
80% metanol más 3% cloruro sódico (peso/volumen) *** 1:1 descendiendo	0,55	0,45	0,57	0,56	0,48	0,17	0,28	0,28
Propanol:piridina:ácido acético:agua (6:4:1:3) ascendiendo (volumen/volumen)	0,29	0,22	0,34	0,30	0,22	0,05	0,08	0,07
80% fenol ascendiendo (volumen/volumen)	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,12	0,17	0,2
Cloroformo:metanol:hidróxido amónico al 17% 2:1:1	0,46	0,21	0,67	0,40	0,21			
2-butanona:terc-butanol:metanol:hidróxido amónico conc. 16:3:1:6	0,73	0,59	0,75	0,65				

R_t de los antibióticos, t = 16 horas

* R_t = Distancia a la zona desde el origen en el tiempo t

Distancia del origen al final del papel

*** Papel tamponado con Na_2SO_4 0,95 molar + NaHSO_4 0,05 molar

416742

10



Propiedades biológicas del antibiótico G-52

Actividad antibacteriana in vitro

Concentración inhibidora mínima

<u>Organismo</u>	<u>GIM (mcg/ml)</u>
Staphylococcus aureus 209P	0,3
Staphylococcus aureus 45	0,8
Streptococcus pyogenes C	25
Escherichia coli 11775	3,0
Escherichia coli 578	7,5
Klebsiella pneumoniae Ad 17 -kR	0,8
Proteus mirabilis 8019	7,5
Pseudomonas aeruginosa 236-GR	25
Pseudomonas aeruginosa 130-GR	25
Salmonella paratyphi 13311	17,5

Medio de ensayo: caldo de fosfato de triptosa a pH 7,2.

416742



Actividad in vivo del antibiótico G-52 en ratones

Actividad protectora^a

<u>Organismo</u>	<u>Vía de tratamiento</u>	<u>DP₅₀ (mg/kg)</u>
Staphylococcus aureus Gray	S.C.	2,5
Excherichia coli	S.C.	2,5
Pseudomonas aeruginosa	S.C.	1,5

Toxicidad aguda^b

<u>Vía</u>	<u>DL₅₀ (mg/kg)</u>
I.V.	50
S.C.	400
I.P.	200

(a) Ratones (Carworth Farms CF-1, que pesaban aproximadamente 18 - 20 gramos) son tratados con una sola dosis de antibiótico (sulfato) una (1) hora después de una infección intraperitoneal con una cantidad letal (10^7 organismos) del organismo infeccioso. El número de supervivientes se determina 48 horas tras la infección, y los datos son analizados por métodos probit normalizados, para determinar los valores DP₅₀ con límites de confianza del 95%.

416742



(b) La toxicidad aguda del antibiótico G-52 en forma de sal sulfato es determinada de la manera normalizada, por administración del antibiótico a ratones (CF-1) intravenosa, subcutánea e intraperitonealmente. Los resultados son analizados por métodos probit normalizados, para determinar los valores DL_{50} con límites de confianza del 95%.

Los ejemplos siguientes exponen la mejor forma de efectuar la invención.

10

Ejemplo 1

Fermentación de Micromonospora zionensis en depósito

A. Etapa de germinación:

Inocúlese una serie de matraces de 300 ml, conteniendo cada uno 100 ml de medio estéril (véase Medio A más adelante), usando un inoculador lleno de M. zionensis procedente de un cultivo inclinado en agar. Incúbense los matraces con agitación continua durante de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 días, hasta que se obtenga un crecimiento vigoroso. La incubación se efectúa preferiblemente con agitación rotativa continua, a aproximadamente 250 a 300 rpm, a aproximadamente 35°C.

15

20

B. Segunda etapa de germinación:

Transfiéranse 25 ml del inóculo preparado en la etapa A a una serie de matraces Erlenmeyer de 2 litros que

25

416742



contienen 500 ml de Medio A estéril. Incúbese este medio con agitación rotativa como se ha descrito en la etapa A, preferiblemente a 28°C, hasta que se obtenga un crecimiento vigoroso.

5 C. Etapa de fermentación:

Transfíranse 500 ml del cultivo germinado a cada uno de una serie de fermentadores de 14 litros, que contienen 10 litros de medio de fermentación (véase Medio B más adelante), y ferméntese la mezcla con agitación a 10 de aproximadamente 200 a aproximadamente 500 rpm, de preferencia a aproximadamente 400 rpm, a una temperatura comprendida entre 26°C y 38°C, preferiblemente a 15 35°C, y con aireación a aproximadamente 3 a 5 litros/minuto. Determinénse los medios a intervalos convenientes tras las primeras 24 horas, continúese la fermentación hasta que se alcance el pico de actividad antibiótica, y recólctese la mezcla antibiótica como se describe en el Ejemplo 2.

20

25



416742

Medio A

	Sacarosa	25 gramos
	Líquido de maceración de maíz (secado por pulverización)	5 gramos
5	Extracto de levadura	5 gramos
	Amina N-Z (Sheffield Chemical Company)	5 gramos
	Carbonato cálcico	5 gramos
	Agua corriente	1000 ml

Medio B

10	Harina de soja	30 gramos
	Dextrina de patata	500 gramos
	Dextrosa	5 gramos
	Edamin (Sheffield Chemical Company)	5 gramos
15	Carbonato cálcico	7 gramos
	Sulfato ferroso	10^{-3} moles/l
	Cloruro de cobalto	10^{-6} moles/l
	Agua corriente	1000 ml

Ejemplo 2

20

Aislamiento del producto antibióticamente activo

25

Añádanse 380 g de ácido oxálico a 60 litros de caldo de fermentación, y ajústese a pH 2 con ácido sulfúrico 6N. Agítese la mezcla durante aproximadamente 20 minutos, y fíltrese, lávese la torta miceliar con agua,

416742



y combínesse el filtrado transparente con los lavados mi-
celiares. Ajustese el pH a 7 con hidróxido amónico 6N.
Cárguese el filtrado, con agitación, a una resina inter-
cambiadora de cationes, Amberlite [®] IRC-50, en forma
5 amónica, cantidad de resina 600-700 g. Filtrese para eli-
minar la resina. Lávese la resina con agua, y elúyase
con hidróxido amónico 2N. Concéntrese el eluato a apro-
ximadamente 100 ml y liofilícese, para obtener el com-
plejo antibiótico.

10 La cromatografía en papel de este material,
en el sistema de cloroformo:metanol:hidróxido amónico
al 17% (2:1:1 v/v), revela que consiste sustancialmen-
te en sisomicina y antibiótico G-52, con determinación
de 300 mcg/mg.

15

Ejemplo 3

Separación del producto antibióticamente activo

Suspéndanse 1000 g de gel de sílice en la ta-
se inferior de un sistema disolvente compuesto por clo-
20 roformo:isopropanol: hidróxido amónico concentrado
(2:1:1 v/v), y agítese en una columna de vidrio que tie-
ne un diámetro exterior de aproximadamente 5 cm. La al-
tura del gel de sílice sedimentado es de aproximadamen-
te 100 cm. Disuélvanse en agua 12,4 g del complejo an-
25 tibiótico, preparado como se ha descrito en el Ejemplo

416742

10



2, y suspéndanse con aproximadamente 100 g de gel de sílice. Cárguese en la parte superior de la columna la resina que contiene el complejo antibiótico. Pásese la fase inferior del sistema disolvente antes descrito a través de la columna, a velocidad de aproximadamente 1 ml por minuto, y recójense fracciones de 10 ml.

Cromatografíese una porción de cada fracción (por duplicado) en el siguiente sistema disolvente: cloroformo:metanol:hidróxido amónico al 17% (2:1:1 v/v).

10 El material deseado está situado usualmente entre las fracciones 600 a 790. El cromatograma es sometido a pulverización con reactivo ninhidrina, para confirmar la situación de las fracciones positivas a la ninhidrina. El segundo cromatograma (duplicado) es bioautografiado en una placa de agar sembrada con Staphylococcus aureus A.T.C.C. 6538P, para confirmar que las fracciones positivas a la ninhidrina son biológicamente activas.

15
20 Combínense las fracciones apropiadas, concéntrase y liofilícese, para obtener antibiótico G-52 y sisomicina, siendo el menos polar (primero en salir) el antibiótico G-52

Ejemplo 4

Preparación de sulfato de antibiótico G-52

25 Disuélvanse 800 mg de antibiótico G-52 en 100

10



416742

ml de agua, y ajústese el pH a 4,2 con ácido sulfúrico. Agítese la solución con carbón vegetal activado, preferiblemente Darco G-60 (Atlas Powder Company, Wilmington, Delaware), durante aproximadamente 1 hora, y fíltrese. Concéntrese el filtrado, y añádase a un exceso (10 volúmenes) de metanol. Fíltrese el precipitado resultante, para obtener aproximadamente 1,0 g del producto del título, con determinación de 660 mcg/mg.

5

10

Ejemplo 5

Preparación de antibiótico G-52 como base

Disuélvase en aproximadamente 10 ml de agua una porción de 800 mg de sulfato de antibiótico G-52, preparado como se ha descrito en el Ejemplo 4, y cárguese en una columna de resina intercambiadora de aniones Amberlite IRA-401S (OH⁻), que tiene las siguientes dimensiones: altura, 25 cm; diámetro exterior, 2 cm. Elúyase la columna con agua, concéntrese el eluato hasta aproximadamente 10 ml, y liofilícese para obtener aproximadamente 487 mg del producto del título, que tiene una potencia de aproximadamente 1000 mcg/mg.

15

20

El nuevo producto antibióticamente activo, especialmente el antibiótico G-52 y sus derivados farmacéuticamente activos, así como el antibiótico G-52 que comprende sisomicina, o los derivados farmacéuticamen-

25

416742



te aceptables de dichos antibióticos, pueden ser aplica-
dos tópicos, parenteral, oral y rectalmente. Pueden ser
aplicados tópicamente en forma de ungüentos, tanto hi-
drófilos como hidrófobos, en forma de lociones que pue-
5 den ser acuosas, no acuosas o del tipo de emulsión, o
en forma de cremas. Vehículos farmacéuticos útiles en
la preparación de tales formulaciones incluirán, por ejem-
plo, sustancias tales como agua, aceites, grasas, poli-
ésteres, polioles y similares. Los derivados de base de
10 Schiff-oxazolidina son particularmente ventajosos para
preparar formulaciones tópicas no acuosas, ya que tales
derivados presentan compatibilidad con los vehículos far-
macéuticos generalmente usados en tales preparaciones.

En general, las preparaciones tópicas contenen-
15 drán de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3,0 g de
antibiótico por 100 g de ungüento, crema o loción. Las
preparaciones tópicas, por lo general, son aplicadas
suavemente a las lesiones, de aproximadamente 2 a apro-
ximadamente 5 veces al día.

20 Los productos pueden ser también administra-
dos oralmente en forma de cápsulas, tabletas y elixires.
Cuando son administrados así, son especialmente efica-
ces en el tratamiento de las diarreas causadas por in-
fección gastrointestinal por microorganismos suscepti-
25 bles.

416742



Los productos antibióticamente activos de la invención pueden ser utilizados en forma líquida, tal como soluciones, suspensiones y similares, para uso ótico y óptico, y también pueden ser administrados paren-teralmente por inyección intramuscular. La solución o suspensión inyectable será administrada usualmente a de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 5 mg de antibióticos por kilogramo de peso del cuerpo, por día, dividida en de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 dosis.

5

10 En cualquier forma, la dosis precisa depende en gran medida de la etapa y severidad de la infección, la susceptibilidad del organismo infectante al antibiótico, y las características individuales de la especie animal que se esté tratando.

15 El siguiente Ejemplo A expone los ingredientes y el procedimiento para preparar una solución inyectable.

20

416742



Ejemplo A

	<u>Solución inyectable</u>	<u>Por vial de 2,0 ml[¶]</u>	<u>Por 50 litros[¶]</u>
5	Sulfato de antibiótico G-52	84,0 mg	2100,0 g
	Metilparabén, USP	3,6 mg	90,0 g
	Propilparabén, USP	0,4 mg	10,0 g
	Bisulfito sódico, USP	6,4 mg	160, g
	Etilendiamintetraacetato		
10	disódico dihidratado, R.G.	0,2 mg	5,0 g
	Agua para inyección, USP,		
	c.s. para	2,0 ml	50,0 litros

[¶] Incluye un exceso de carga del 5%, para manufactura

15 Método: para una tanda de 50,0 litros

Cárguense aproximadamente 35 litros de agua para inyección en un recipiente encamisado de acero inoxidable, adecuado, y caliéntese a aproximadamente 70°C. Carguense el metilparabén y propilparabén en el agua para inyección calentada, y disuélvase con agitación. Cuando los parabén estén completamente disueltos enfríese el contenido del depósito hasta 25-30°C, haciendo circular agua fría por la camisa del depósito. Hágase burbujear nitrógeno gaseoso por la solución durante al menos 10 minutos, y manténgase cubierta con nitrógeno durante el tratamiento sub

416742



siguiente. Cárguense y disuélvanse el EDTA disódico y bisulfito sódico. Cárguese y disuélvase el sulfato de antibiótico G-52. Llévase el volumen de la tanda hasta 50,0 litros, con agua para inyección, y agítese hasta no mogeneidad.

5

Bajo condiciones estériles, fíltrese la solución a través de un filtro retenedor de bacterias adecuado, recogiendo el filtrado en un depósito de llenado.

Llénense con el producto, asépticamente, viales estériles para dosis múltiple, exentos de pirógenos, tápense y ciérrense herméticamente.

10

Ejemplo B

Ungüento de antibiótico

15	Antibiótico G-52 base	10 g
	Petrolato	990 g

Método

(1) Fúndase el petrolato.

(2) Mézclese antibiótico G-52 base con aproximadamente 10% del petrolato fundido.

20

(3) Pásese la mezcla antibiótico - petrolato a través de un molino coloidal.

(4) Añádase el resto del petrolato, y enfríese la mezcla hasta que se haga semisólida. En esta etapa el producto puede ser puesto en recipientes adecuados.

25

416742



Ejemplo C

	<u>Cápsulas de gelatina dura</u>	<u>Cápsula de 10 mg[‡]</u>	<u>Cápsula de 25 mg[‡]</u>	<u>Cápsula de 100 mg[‡]</u>
	Antibiótico G-52 (sulfato)	10,50 mg	26,25 mg	105,00 mg
5	Lactosa, polvo impalpable	238,50 mg	222,75 mg	144,00 mg
	Estearato de magnesio	1,00 mg	1,00 mg	1,00 mg

[‡] Basado en potencia del 100%, más 5% de exceso de carga para manufactura

Mézclense la lactosa y el antibiótico G-52 en un recipiente de mezcla de tamaño adecuado. Pásese la mezcla por un molino, devuélvase el recipiente de mezcla y mézclese de nuevo. Premézclese el estearato de magnesio con una porción de la mezcla de lactosa-antibiótico, y mézclese luego en la totalidad de la tanda. Llénense cápsulas de gelatina vacías, usando equipo de encapsular adecuado.

11 SE



416742

REIVINDICACIONES

- 5 Los puntos de invención propia y nueva que se
presentan para que sean objeto de esta solicitud de Pa-
tente de Invención en España, por VEINTE años, son los
que se recogen en las reivindicaciones siguientes:
- 10 1ª.- Procedimiento para preparar por fermenta-
ción un producto antibióticamente activo que contiene an-
tibiótico G-52 y sisomicina, que comprende cultivar un
microorganismo de la especie Micromonospora zionensis en
un medio nutriente acuoso, bajo condiciones aerobias, has-
ta que se comunique a dicho medio una sustancial activi-
15 dad antibiótica, y aislar de él al menos una actividad an-
tibióticamente activa, en forma libre o en forma de un de-
rivado funcional farmacéuticamente aceptable.
- 20 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª,
donde el microorganismo es cultivado en un medio nutrien-
te que contiene fuentes asimilables de al menos nitrógeno
y carbono, bajo condiciones aerobias sumergidas.
- 25 3ª.- Procedimiento según las reivindicaciones
1ª ó 2ª, donde el cultivo se efectúa a una temperatura
de 23 a 38°C.
- 4ª.- Procedimiento según la reivindicación 3ª,

9.9.75

- 35 -

m/e

416742



donde la temperatura es 35°C.

5ª.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 4ª, donde el cultivo se efectúa a un pH de 6,5 a 8,3.

5 6ª.- Procedimiento según la reivindicación 5ª, donde el cultivo se efectúa a un pH de 7,2.

7ª.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 6ª, donde el microorganismo de la especie Micromonospora zionensis es la cepa designada NRRL 5466.

10 8ª.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 7ª, donde el producto antibióticamente activo es recuperado del medio de fermentación.

15 9ª.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 8ª, donde la recuperación comprende acidificar el medio de fermentación, separar de él el micelio, neutralizar el medio de fermentación, extraer y aislar el producto antibióticamente activo.

20 10ª.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 9ª, donde el producto antibióticamente activo, antes de o subsiguientemente al aislamiento, es convertido en un derivado funcional farmacéuticamente aceptable.

11ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 9ª ó 10ª, donde el antibiótico G-52, que tiene en forma

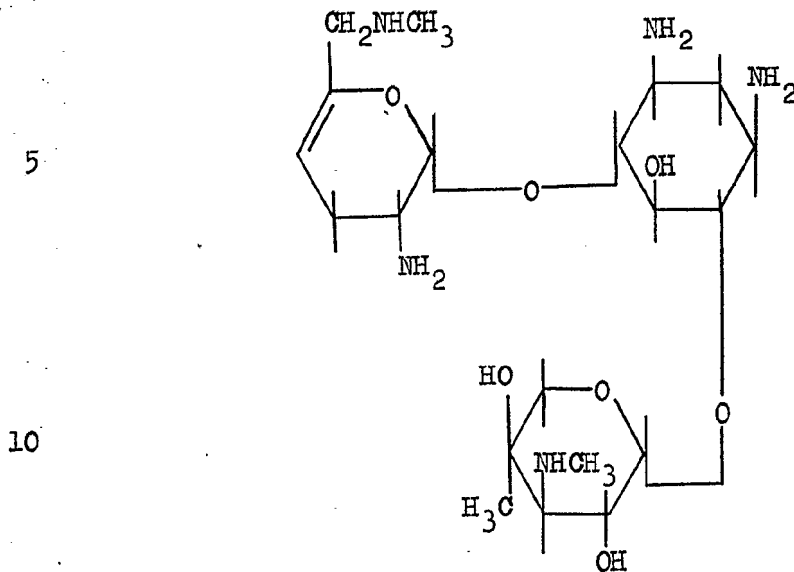
ME 25

19-6-73

416742



libre la fórmula estereoquímica:



es aislado en forma libre o en forma de sus derivados fun
15 cionales farmacéuticamente aceptables.

12ª.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9ª o 10ª, donde se aísla sisomicina en forma libre o en forma de sus derivados funcionales farmacéuticamente aceptables.

20 13ª.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9ª o 10ª, donde una mezcla consistente en antibiótico G-52 y sisomicina es aislada en forma libre o en forma de sus derivados funcionales farmacéuticamente aceptables.

CE 25

14ª.- Procedimiento según cualquiera de las rei

416742

11 SET 1975



vindicaciones 10^a a 13^a, donde el derivado funcional farmacéuticamente aceptable es una sal de adición de ácido, o un solvato de ella.

5 15^a.- Procedimiento según la reivindicación 14^a, donde la sal de adición de ácido es el sulfato.

16^a.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10^a a 13^a, donde el derivado funcional farmacéuticamente aceptable es un hidrato.

10 17^a.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10^a a 13^a, donde el derivado funcional farmacéuticamente aceptable es un solvato.

15 18^a.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10^a a 13^a, donde el derivado funcional farmacéuticamente aceptable es un derivado de base de Schiff-oxazolidina, o un solvato del mismo.

19^a.- Procedimiento para preparar por fermentación un producto antibioticamente activo que contiene un antibiótico G-52 y sisomicina.

20 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.

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

Madrid, 11 SET. 1975

P.A.

Fernando de Elizaburu
Por Poder.

9.9.75
ACM.

mfg



416742

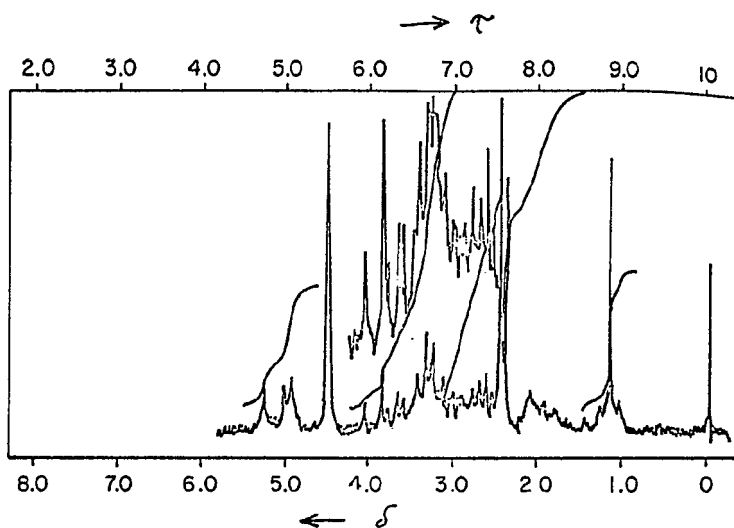


FIG. 1

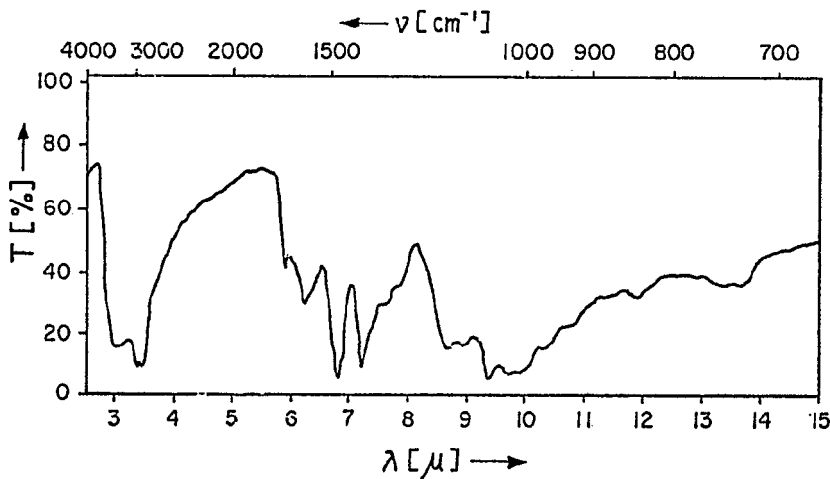


FIG. 2

Handwritten signature or initials.