



ESPAÑA

10 ES	11 21	NUMERO 449.823	10 A1
	22	FECHA DE PRESENTACION 14. julio. 1976	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO 56-86349		13.7.1975	JAPON
47 FECHA DE PUBLICACION		51 CLASIFICACION INTERNACIONAL AGAK	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
64 TITULO DE LA INVENCION "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE ANTIBIOTICOS A BASE DE ISOLEUCOMICINA A ₅ "			
71 SOLICITANTE (S) Toyo Jozo Mabushiki Kaisha			
DOMICILIO DEL SOLICITANTE 632-1, Mifuku, Ohito-cho, Tagata-gun, Shizuoka-ken, JAPON			
72 INVENTOR (ES) Hido SARAKIBARA; Osamu OKEGAWA; Hiroaki ISHIKAWA; Teruo TAKE; Sotoshi OMURA; Tetsuo MATSUDA y Tetsuo WATANABE.			
73 TITULAR (ES) Toyo Jozo Mabushiki Kaisha			
74 REPRESENTANTE VICTOR GIL VEGA			

1

Extracto de la Invención

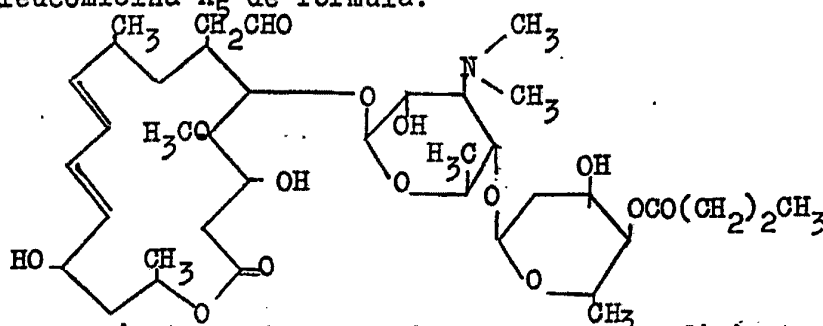
5

El nuevo antibiótico designado como Isoleucomicina A₅ es activo contra las bacterias Gram positivas, presentando un bajo nivel de toxicidad a concentraciones elevadas en la sangre y es útil como quimioterapia en las enfermedades infecciosas causadas por bacterias patogénicas.

UN NUEVO ANTIBIOTICO

10

Esta invención se refiere a un nuevo antibiótico llamado Isoleucomicina A₅ de fórmula:



15

o su sal farmacéuticamente aceptable y a su procedimiento de fabricación.

20

Los antibióticos del grupo Kitasamicina (Leucomicinas y Josamicina), el grupo antibiótico YL-704 y el grupo antibiótico SF-837, correspondientes a los antibióticos macrolida de 16 miembros, son conocidos como una estructura que consiste en una lactona macrocíclica de 16 miembros, el aminoazúcar micaminosa y el azúcar neutro micálosa, unidos mediante un ligando glicósido. Estos antibióticos macrolida de 16 miembros se utilizan en la base libre para la preparación de cápsulas; en los derivados acilados para la preparación de jarabe, debido al fuerte sabor amargo de la base libre; y en la forma de sal, tal como tartrato, para inyección.

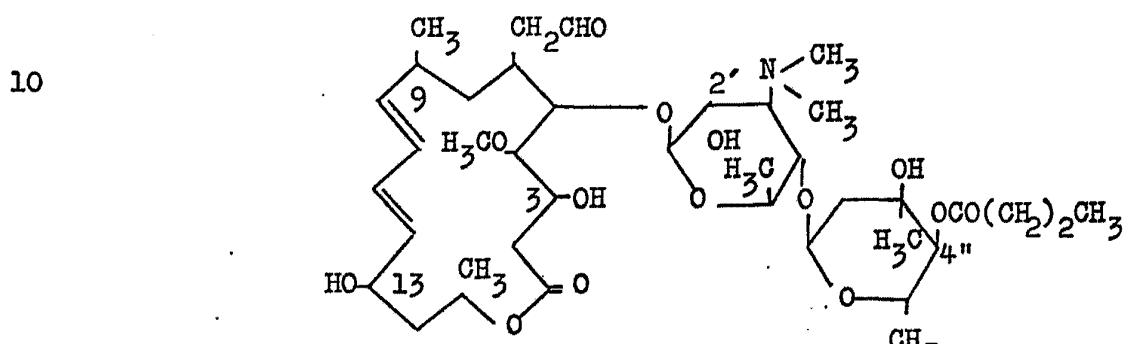
25

30

Los antibióticos macrolida de 16 miembros tienen un bajo nivel de concentración en la sangre, en los animales, en comparación con los antibióticos macrolida de 14 miembros, de-

1 bido a la desacilación de la micalosa en la posición 4" e
hidroxilación en la posición 14 de la lactona macrocíclica
en los antibióticos macrolida de 16 miembros cuando se admi-
nistran in vivo. Estos fenómenos sugirieron el derivado que no
5 se descomponía o que era difícil de descomponerse para anti-
bióticos macrolida de 16 miembros altamente curativos.

Se ha encontrado que el nuevo antibiótico designado
como Isoleucomicina A₅ de fórmula:



tiene una actividad contra las bacterias Gram⁺ positivas, ele-
vado nivel de concentración en la sangre y baja toxicidad,
debido a la dificultad que ofrece la hidroxilación in vivo en
la posición 14 de la estructura de la lactona macrocíclica.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un
nuevo antibiótico efectivo denominado Isoleucomicina A₅ o su
20 sal farmacológicamente aceptable.

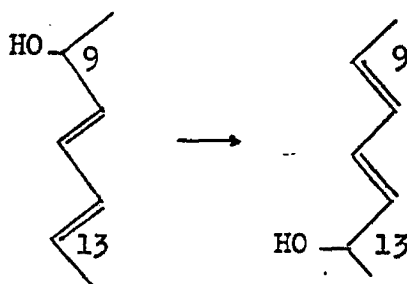
Otro objeto de la presente invención es proporcionar
un procedimiento de fabricación industrial para la Isoleuco-
micina A₅.

25 Otro objeto de la presente invención es proporcionar
un antibiótico que presente un elevado nivel de concentración
en la sangre y un efecto curativo superior.

La isoleucomicina A₅ o su sal farmacológicamente acep-
table pueden prepararse por la transposición alílica de la
30 leucomicina A₅ o su sal soluble, en agua en un medio acuoso en

1 presencia de un catalizador ácido.

El termino "transposición alilica" en la presente invención significa que en la lactona macrocíclica de los anti-
bióticos del grupo leucomicina la transposición de la estruc-
tura es como sigue:



Los antibióticos del grupo leucomicina transpuestos en forma alílica están designados con el prefijo "iso". La isoleucomicina A₅ es por lo tanto un compuesto de transposición alilica de la Leucomicina A₅.

15 La Leucomicina A₅ puede producirse mediante cultivo de Streptomyces kitasatoensis. (Patente de los Estados Unidos 3.535.309, Patente Británica 1.176.501, Patente Francesa 1.579.468 y 7859 M.).

Una reacción de la transposición alílica de la Leucomicina A₅ se lleva a cabo disolviendo la leucomicina A₅ o su sal soluble en agua en un medio acuoso que contiene un catalizador ácido y se deja reposar o se agita.

25 Ejemplos de catalizador ácido es el ácido inorgánico tal como el ácido clorhídrico, el ácido sulfúrico o el ácido fosfórico, el ácido orgánico tal como el ácido acético, el ácido trifluoracético o el ácido cítrico, y el regulador ácido acuoso de pH 2 - 4. Ejemplos de medios acuosos son el disolvente para disolver la leucomicina A₅ o su sal soluble en agua tal como agua, acetona acuosa o dioxano acuoso.

30 La velocidad de la transposición y el rendimiento de

1 Isoleucomicina A₅ pueden ser variados por las condiciones de
reacción tales como temperatura o pH del medio. Por lo gene-
ral a temperaturas más elevadas la velocidad de reacción se
5 acelera; sin embargo el rendimiento de Isoleucomicina A₅ dis-
minuye a temperaturas por encima de los 60°C y la temperatura
preferida es la temperatura ambiente o de 30° a 40°C. Un pH
más bajo acelera la formación de subproducto y un pH más ele-
vado inhibe la reacción de la transposición alílica. El pH
preferible para la transposición alílica se encuentra por lo
10 general comprendido entre 2 y 4. .

Naturalmente puede seleccionarse una cantidad de ca-
talizador ácido en las gamas de pH preferibles. Por ejemplo,
la cantidad de ácido clorhídrico para disolver la leucomicina
A₅ es de 1 a 1,5 moles, equivalente a la base libre de leuco-
15 micina A₅ y la concentración es de aproximadamente 0,03 a 0,08
N, preferentemente de 0,04 N.

El tiempo de reacción depende de la temperatura, pH
y otros; cuando se revela el máximo de producción mediante
la comprobación de la mezcla de reacción por cromatografía en
20 capa delgada, la reacción habrá naturalmente terminado.

El aislamiento de la Isoleucomicina A₅ a partir de la
mezcla de reacción puede realizarse por métodos de separación
conocidos de antibióticos macrolida, tales como de concentra-
ción, extracción, extracción transferida, cromatografía en co-
25 lumna sobre adsorbente o resina de intercambio iónico, recrís-
talización y otros. Por ejemplo, la mezcla de reacción se
ajusta a un pH entre 7,5 y 9,5 y se extrae mediante un disol-
vente no miscible en agua tal como acetato de etilo, acetato
de butilo, metilisobutilcetona, cloroformo o benceno, y des-
30 pués de la evaporación del residuo disolvente orgánico se ex-

1 tracta por separado con un disolvente orgánico adecuado o se
cromatografía sobre una columna de adsorbente tal como gel de
sílice o alúmina activa para obtener una base libre de Isoleu-
comicina A₅ altamente purificada. El producto se recristaliza
5 a partir de un medio acuoso tal como acetona acuosa por debajo
de los 5°C. La base libre es, si se desea, para formar las
sales orgánicas tales como el tartrato, citrato, succinato,
aspartato o glutamato.

Los preparados farmacéuticos que consisten en Isoleu-
comicina A₅ o sus sales farmacológicamente aceptables y el
10 ingrediente o vehículo se preparan por procedimientos conozi-
dos. Los preparados se pueden administrar en forma de dosis
unitarias tales como tabletas, cápsulas, gránulos o microcáp-
sulas, o suspensiones o soluciones acuosas tales como jarabes.
15 Los preparados pueden también prepararse en forma de inyección
intravenosa, tal como una suspensión o solución estéril.

La Isoleucomicina A₅ de la presente invención tiene ..
unas propiedades superiores en comparación con el otro grupo
leucomicina de antibióticos o sus derivados.

20 Por ejemplo, la leucomicina, la leucomicina A₃ (josa-
micina) o leucomicina A₅ tienen un fuerte sabor amargo y estos
no son adecuados para preparados de jarabe y, por lo tanto, pre-
parados de jarabe menos amargos tales como 9-propioniljosami-
cina se encuentran comercialmente disponibles. Esta Isoleuco-
micina A₅ es, por lo tanto, preferible para el preparado de ja-
25 rabes y no tiene ningún gusto amargo.

La potencia de la Isoleucomicina A₅ es equivalente o
más elevada que la de la leucomicina A₃ (josamicina), 1,8 veces
y 1,4 veces de actividad más elevada en comparación con la 9-
30 propioniljosamicina e isoleucomicina A₃ respectivamente.

1 La Isoleucomicina A₅ muestra también un alto nivel de
concentración en la sangre y es 1,2 a 1,3 veces más elevado que
el de la leucomicina A₃ (josamicina), y 3 a 4 veces más alto
que el de la leucomicina A₅, 9-propioniljosamicina e isoleuco-
5 micina A₃. Este nivel más elevado de concentración en la sangre
puede proporcionar un efecto curativo superior.

 El espectro antibacteriano de la Isoleucomicina A₅ es
también superior a . aquél que presenta la leucomicina y la 9-
propioniljosamicina comercialmente disponibles.

10 El nivel de concentración en la sangre y el espectro
antibacteriano de la Isoleucomicina A₅ son como sigue:

 (1) Nivel de concentración en la sangre (comparación
con leucomicina A₅):

 Dosis: 50 mg/kg, por via oral, cápsula.

15 Animal: perro sabueso, peso medio del cuerpo 9,7 kg.;
6 animales en un grupo, pasaron por el método
completo.

 Ensayo: Método de disco de papel; organismo de ensayo:
Sarcina lutea.

20 Los resultados se representan en la Tabla 1

25

30



1

TABLA I

Núm de animales	LEUCOMICINA A ₅ (µg./ml.)					ISOLEUCOMICINA A ₅ (µg./ml.)				
	30 mn.	1 h.	2 h.	4 h.	6 h.	30 mn.	1 h.	2 h.	4 h.	6 h.
1	1,20	0,47	0,21	0,14	0,12	1,35	4,10	1,55	0,60	0,17
2	-	0,23	1,70	0,27	0,12	1,65	3,65	1,60	0,77	0,27
3	1,80	1,82	0,82	0,17	0,06	3,40	2,70	1,45	0,43	0,16
4	0,57	0,70	0,67	0,24	0,08	0,33	4,30	1,65	0,50	0,19
5	0,39	1,70	0,48	0,13	-	2,85	1,98	0,66	0,32	0,25
6	0,33	0,90	1,50	0,32	0,07	0,90	3,50	1,45	0,55	0,16
\bar{X}	0,59	0,97	0,89	0,21	0,07	1,75	3,37	1,39	0,53	0,20

5

10

15

(2) Nivel de concentración en la sangre (comparación con 9-propioniljosamicina):

Dosis: 50 mg/kg., suspensión de CMC-Na, administración oral.

animal: perro sabueso, peso medio del cuerpo:

20

9,53 kg.

8 animales en un grupo, pasaron por el método completo.

ensayo: el mismo que en (1)

Los resultados se representan en la Tabla 2.

25

30

1

TABLA 2

Núm de animales	ISOLEUCOMICINA A ₅ (µg./ml)					PROPIONILJOSAMICINA (µg./ml)				
	30 mn.	1 h.	2 h.	4 h.	6 h.	30 mn.	1 h.	2 h.	4 h.	6 h.
1	4,40	2,60	0,96	0,36	0,16	0,50	0,68	0,45	0,21	0,105
2	5,30	3,30	1,65	0,70	0,35	0,61	1,30	0,96	0,40	0,26
3	2,40	5,60	3,10	1,20	0,49	0,115	0,46	0,94	0,40	0,315
4	5,00	3,00	1,35	0,60	0,28	0,185	0,33	0,335	0,16	0,09
5	5,40	3,50	1,70	0,49	0,26	0,36	0,92	0,68	0,27	0,14
6	3,90	1,90	1,00	0,34	0,18	0,55	0,74	0,36	0,19	0,105
7	5,00	3,35	1,55	0,45	0,22	0,40	0,62	0,38	0,19	0,105
8	2,50	4,40	2,05	0,66	0,21	0,60	1,80	1,35	0,68	0,32
Medio \bar{X}	4,24	3,46	1,67	0,60	0,27	0,42	0,86	0,68	0,31	0,18

10

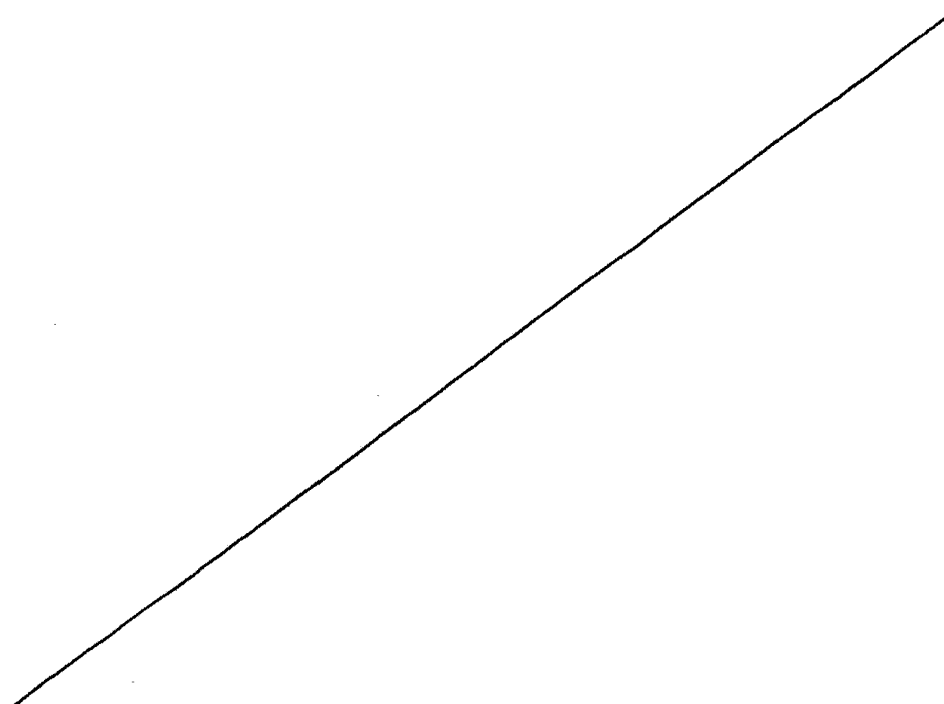
15

(3) La concentración inhibitoria mínima de la Isoleucomicina A₅ se representa en la Tabla 3.

20

25

30



1

TABLA 3

	Organismos de ensayo	Concentración Inhibitoria Mínima (mcg./ml.)		
		Isoleuco- micina A ₅	Leucomi- cina.	9-propionil josamicina.
5	Staphylococcus aureus ATCC 6538	0,8	1,6	1,6
	Staphylococcus aureus MS 353	1,6	3,1	3,1
	Staphylococcus aureus MS 353 C 36	1,6	3,1	1,6
	Staphylococcus aureus MS 353 AO 100	<	<	<
10	Staphylococcus epidermidis sp-al-1	1,6	3,1	3,1
	Streptococcus pyogenes N.Y.5	0,2	0,4	0,2
	Sarcina lutea ATCC 9341	0,2	0,1	0,2
	Corynebacterium diphtheriae P.W.80	0,2	0,4	0,2
	Bacillus subtilis ATCC 6633	0,8	1,6	0,8
15	Escherichia coli NIHJ	100 <	100 <	100 <
	Escherichia coli B	100 <	100 <	100 <
	Salmonella typhosa H 901	100 <	100 <	100 <
	Salmonella paratyphi PA 41-N-22	100 <	100 <	100 <
	Salmonella enteritidis Gaerthner	100 <	100 <	100 <
20	Shigella flexineri tipo 3a	100 <	100 <	100 <
	Shigella sonnei E 33	100 <	100 <	100 <
	Klebsiella pneumoniae ATCC 10031	25	25	25
	Proteus vulgaris OX 19	100 <	100 <	100 <
	Pseudomonas aeruginosa IAM 1095	100 <	100 <	100 <
25	Serratia marcescens	100 <	100 <	100 <

30

1 Los siguientes ejemplos ilustran la invención pero no constituyen una limitación.

Ejemplo 1

5 Se disuelve una base libre de Leucomicina A₅ (50 g.) en 0,04N de HCl (1750 ml.) (pH 2,5) y se agita durante toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se ajustó a un pH de 8,0 añadiendo amoniacó acuoso concentrado bajo enfriamiento y se extractó tres veces con cloroformo (1 lit.). Después de la deshidratación mediante sulfato sódico anhidro, 10 el extracto se concentró a presión reducida para obtener isoleucomicina sin refinar en polvo blanco (49,5 g.). El polvo sin refinar se disuelve en una pequeña cantidad de benceno, se carga en una columna de gel de sílice (2 kg.) y se eluye con bencenoacetona (3:1). Se comprobó el eluato mediante gel de 15 sílice por cromatografía en capa delgada utilizando un sistema disolvente de bencenoacetona (1:1), se recogieron las fracciones alrededor de R_f 0,58, y se concentraron a vacío para obtener Isoleucomicina A₅ como polvo cristalino blanco (13,5 g., rendimiento 27%). p.f.: 118 - 121°C.

20 El polvo se recrystalizó a partir de acetona acuosa al 5% para obtener cristales incoloros en forma de aguja. p.f.: 198 - 205°C.

$$[\alpha]_D^{24} = -73,7^\circ \text{ (c=1, metanol).}$$

$$[\alpha]_D^{24} = -74,9^\circ \text{ (c=1, cloroformo).}$$

25 Espectro UV= $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}} = 235\text{nm}$, $\epsilon_{\text{max}} = 28000$.

Análisis elemental para C₃₉H₆₅O₁₄N:

	C%	H%	N%
Encontrado:	60,41	8,71	2,01
Calculado:	60,68	8,49	1,81

- 1 Valor Rf sobre gel de sílice G_{por} cromatografía en capa delgada
0,26 [CHCl₃-metanol-ácido acético-agua (79:11:8:2)]
(leucomicina A₅ : 0,30).
0,58 [benceno - acetona (1:1)] (leucomicina A₅: 0,65).
- 5 Potencia: 1350 r/mg.
EspectroRI (KBr): 3500, 3440 (ampl), 2970, 2940, 2870,
2840, 2780, 1730, 1720, 1455, 1372,
1302, 1270, 1250, 1168, 1120, 1080,
1050, 1012, 992, 920, 903, 870, 830,
10 810 (CM⁻¹).
Espectro de masa (m/e): 771, 684, 666, 599, 586, 557, 541,
513, 430, 388, 367, 349, 300, 215,
190, 174, 71.

Ejemplo 2.

- 15 La leucomicina A₅ (1g.) se disuelve en 0,05 N de ácido
sulfúrico (30 ml) (pH 2,2) y se agita durante toda la noche a
temperatura ambiente. El pH se ajustó a un pH de 8,0 mediante
adición de amoníaco acuoso concentrado bajo enfriamiento, y
se extractó tres veces con cloroformo (20 ml.). La capa de
20 cloroformo se lavó con agua, se deshidrató mediante sulfato
sódico anhidro y se secó a vacío para obtener Isoleucomicina
A₅ en polvo sin refinar (950 mg.) Este se purificó mediante
el mismo procedimiento cromatográfico en columna del Ejemplo
1 para obtener Isoleucomicina A₅ en polvo blanco cristalino
25 (235 mg., rendimiento: 23,5%).

Ejemplo 3.

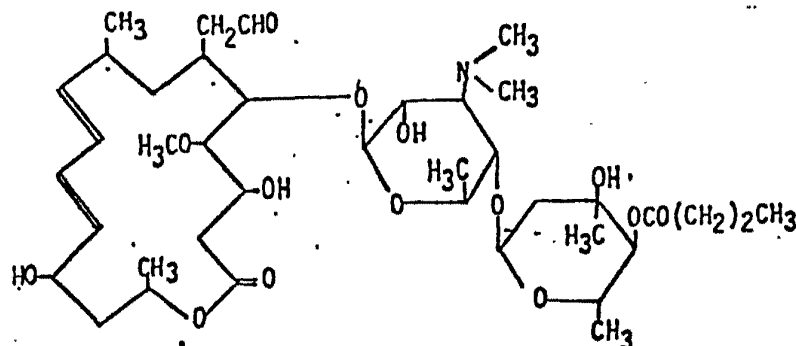
- 30 La leucomicina A₅ (50 g.) se disuelve en 0,04 N de
HCl (1750 ml.) (pH 2,5) y se agita durante toda la noche a
temperatura ambiente. Se añadió amoníaco acuoso concentrado
bajo enfriamiento para ajustar el pH a 9,5 y se extractó tres

5 veces con benceno. Después de la deshidratación mediante sulfato sódico anhidro, se concentró la capa orgánica a vacío para obtener Isoleucomicina A₅ sin refinar en polvo blanco. El polvo se disolvió a una concentración del 1% en acetona acuosa al 2% por debajo de los 5°C, y se dejó reposar a temperatura ambiente. El precipitado se filtró para obtener Isoleucomicina A₅ como cristales incoloros en forma de aguja (10 g., rendimiento : 20%). El licor madre residual se recicló para un uso posterior.

10 Los términos en que se ha redactado esta memoria deberán ser siempre tomados en sentido amplio, no limitativo.

REIVINDICACIONES

15 1) Procedimiento para la preparación de antibióticos a base de Isoleucomicina A₅ de las siguientes fórmulas:



25 caracterizado en que la leucomicina A₅ o su sal soluble en agua se trata para la transposición en alilo mediante un catalizador ácido en medio acuoso, aislando la Isoleucomicina A₅ de la mezcla de reacción.

2) Procedimiento según la reivindicación primera, caracterizado en que el ácido catalizador es un compuesto elegido entre ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido trifluoracético, ácido cítrico , o una solución tampón ácida de Ph 2-4 .

3) Procedimiento según la reivindicación primera, caracterizado en que el medio acuoso es agua, acetona acuosa o un dioxano acuoso.

4) Procedimiento según la reivindicación primera, caracterizado en que la reacción de transposición en alilo se efectúa con un Ph de 2-4 y a la temperatura ambiente.

5) " PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE ANTIBIOTICOS A BASE DE ISOLEUCOMICINA A₅ " .

Tal y como se deja descrito en la memoria precedente que consta de catorce hojas foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

Madrid, 14 de Julio 1976

P.A. de Toyo Jozo Kabushiki Kaisha

Victor Gil Vega

