

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

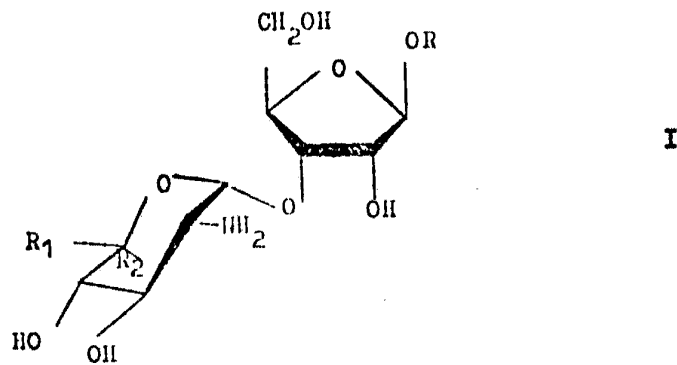
10	ES	11	456743	10	A1
		21			
		22	FECHA DE PRESENTACION		

PATENTE DE INVENCION

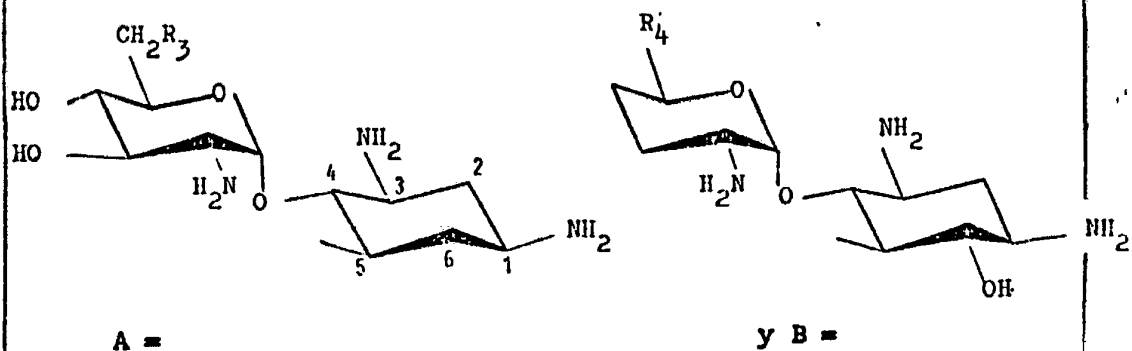
30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
09859/76	11 de marzo de 1976	Inglaterra
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12D/AG1K	
64 TITULO DE LA INVENCION		
Procedimiento para preparar nuevos derivados de aminoglicósido-aminociclitol.		
71 SOLICITANTE (ES)		
LABAZ		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
Avenue Pierre 1er de Serbie, 39, F - 75008 Paris, Francia.		
72 INVENTOR (ES)		
Stephan GERO, Daniel MERCIER, Alain OLESKER, André CIER.		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
GOMEZ-ACEBO		

Esta invención se relaciona con un procedimiento para preparar derivados de aminociclitol y, en particular, para preparar nuevos derivados de aminoglicósido-aminociclitol, que tienen actividad farmacológica y que responden a la fórmula general:

5



en la que  $R_1$  y  $R_2$ , que son diferentes, representan hidrógeno o  $CH_2NH_2$  y  $R$  se elige del grupo consistente en:



10

en donde  $R_3$  representa  $NH_2$  ó  $OH$  y  $R_4$  representa  $CHNH_2$  ó  $CHNHCH_3$  en donde  $R_5$  representa hidrógeno o metilo.

Dentro del alcance de la presente invención, se incluye también la producción de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de dichos derivados.

Los compuestos de fórmula I pueden existir en forma de epímeros y de mezclas de tales epímeros. Dichos epímeros y sus mezclas se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

5 Los compuestos obtenidos mediante el procedimiento de esta invención tienen estructuras químicas que son similares a las de neomicina o paromomicina. Por esta razón, los compuestos de fórmula I se designarán a continuación como derivados de neomicina o paramomicina, como sigue:

10 6-deoxineomicina B cuando  $R_1$  representa hidrógeno,  $R_2$  representa  $CH_2NH_2$  y R representa el grupo A en donde  $R_3$  representa  $NH_2$ .

6-deoxineomicina C cuando  $R_1$  representa  $CH_2NH_2$ ,  $R_2$  representa hidrógeno y R representa el grupo A en donde  $R_3$  representa  $NH_2$ .

15 La mezcla de estos dos epímeros, tal y como se obtiene por el proceso aquí descrito, se denominará de aquí en adelante 6-deoxineomicina.

20 6-deoxiparomomicina I cuando  $R_1$  representa hidrógeno,  $R_2$  representa  $CH_2NH_2$  y R representa un grupo A en donde  $R_3$  representa OH.

6-deoxiparomomicina II cuando  $R_1$  representa  $CH_2NH_2$ ,  $R_2$  representa hidrógeno y R representa el grupo A en donde  $R_3$  representa OH.

25 La mezcla de estos dos epímeros, tal y como se obtiene por el proceso aquí descrito, se denominará a continuación 6-deoxiparomomicina.

La mezcla de 3',4'-dideoxineomicina y sus derivados representan la combinación no separada de compuestos en donde  $R_1$  y  $R_2$ , que son diferentes, representan hidrógeno o  $CH_2NH_2$  y R

representa el grupo B, obteniéndose dicha mezcla por el proceso descrito a continuación.

El término "neomicina" se utilizará a continuación para representar la mezcla de neomicina B y neomicina C que se obtiene al cultivar Streptomyces fradiae.

Similarmente, el término "paromomicina" se utilizará de aquí en adelante para representar la mezcla de paromomicina I y paromomicina II que se obtiene cuando se cultiva Streptomyces rimosus forma paromomyrinus.

Como anteriormente se ha dicho, los compuestos de fórmula I obtenidos por la presente invención tienen actividad farmacológica, por lo que resultan útiles para incorporarse en una composición farmacéutica o veterinaria que contiene, como ingrediente activo esencial, por lo menos uno de los epímeros de fórmula I o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de los mismos, o una mezcla de dichos epímeros o de sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables, en asociación con un vehículo o excipiente farmacéutico para dichos compuestos.

Como se demostrará a continuación, se ha encontrado que los derivados de aminoglicósido-aminociclitol obtenidos por la invención presentan una valiosa actividad antibiótica que los hace probablemente útiles para el tratamiento de enfermedades provocadas por el crecimiento de bacterias patogénicas tales como, por ejemplo:

Escherichia coli, Proteus mirabilis, Staphylococcus aureus, Sarcina lutea, Klebsiella adwardsii, Shigella sonnei, Salmonella typhimurium.

Por consiguiente, los compuestos obtenidos por la invención son útiles para utilizarse en un método para inhibir

5 el crecimiento de bacterias patogénicas en un anfitrión necesita-  
do de dicha inhibición, comprendiendo dicho método administrar  
al citado anfitrión por lo menos uno de los epímeros de fórmula I  
o una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de los  
mismos, o una mezcla de dichos epímeros o de sus sales de adición  
de ácido farmacéuticamente aceptables.

10 Durante algunos años se ha observado que ciertas  
cepas bacteriales han desarrollado una resistencia a la mayor  
parte de los antibióticos comercializados, con el resultado de  
que el valor terapéutico de estos últimos se ha reducido en más  
de la mitad, mientras que ciertas bacterias son incluso ahora lo  
suficientemente fuertes para soportar todos los antibióticos co-  
nocidos.

15 De este modo, es de una necesidad primordial y de  
un interés general crear nuevos antibióticos capaces de destruir  
organismos que han llegado a ser resistentes a los antibióticos  
utilizados actualmente.

20 Se sabe que esta inactivación de antibióticos se  
debe a la destrucción o alteración de la molécula antibiótica  
por enzimas que atacan a dicha molécula en ciertos puntos vulne-  
rables.

25 En particular, los antibióticos de aminoglicósido-  
aminociclitol que se están utilizando cada vez a mayor escala,  
están expuestos a inactivación por bacterias resistentes. La re-  
sistencia desarrollado por algunos organismos normalmente suscep-  
tibles a estos antibióticos de aminoglicósido-aminociclitol, se  
debe a enzimas fosforilantes, acilantes o adenililantes que ata-  
can los grupos hidroxilo y amino libres del antibiótico (Ann.  
Rev. Biochem., 42, 47, 1973).

30 La separación de los grupos hidroxilo hará que el

antibiótico sea immune a la inactivación en estos puntos. De este modo, es deseable producir antibióticos con menos grupos hidroxilo y amino no esenciales.

5 En el transcurso de los experimentos realizados con los compuestos de la invención, se ha encontrado que la mezcla de 3',4'-dideoxineomicina y sus derivados presenta una actividad antibiótica notable contra organismos que son resistentes a otros antibióticos de aminoglicósido-aminociclitol y más particularmente neomicina y gentamicina.

10 Por lo tanto, se ha demostrado que la mezcla de 3',4'-dideoxineomicina y sus derivados resulta activa contra cepas de *Escherichia coli* que como se sabe son resistentes a gentamicina y neomicina en virtud de la enzima 2"-adenililante y enzima 3'-fosforilante respectivamente.

15 Por esta razón, la mezcla de 3',4'-dideoxineomicina y sus derivados, indicada anteriormente, es el antibiótico cubierto por la fórmula I que constituye el antibiótico preferido obtenido por la invención.

20 A partir de la Patente USA No. 3.669.838 se sabe que pueden formarse mutantes de microorganismos conocidos por producir antibióticos que contienen una subunidad aminociclitol, tal como, por ejemplo, neomicina o paromomicina, y que carecen de la capacidad de biosintetizar la subunidad aminociclitol debido a un defecto en la trayectoria aminociclitol, de modo que  
25 no puede producirse ningún antibiótico.

Sin embargo, dichos mutantes aminociclitol-negativos tienen la capacidad de utilizar una molécula de aminociclitol adecuada cuando esta última se añade al medio nutriente, de modo que se puede formar un antibiótico.

30 Igualmente, es conocido que esta técnica se puede

utilizar sustituyendo la subunidad aminociclitol por un pseudo-disacárido.

5 Sin embargo, y a partir de los resultados descritos en publicaciones existentes, no es posible predecir si un determinado diaminociclitol o un pseudo-disacárido se incorporará en un antibiótico por la citada técnica de biotransformación.

Existen de hecho numerosos casos descritos en la literatura en donde este método de producción de nuevos antibióticos ha resultado ser ineficaz.

10 Por lo tanto, el procedimiento anteriormente descrito no se puede generalizar para la producción de nuevos antibióticos semisintéticos o totalmente sintéticos. Este hecho viene confirmado, por ejemplo, en "The Journal of Antibiotics", Vol. XXVI, No. 10, p. 551-561 (1973) en donde se ofrece una descripción de experimentos realizados con 29 aminociclitoles diferentes para la incorporación en un antibiótico por el método de la Patente USA anteriormente citada.

15 Entre los 29 aminociclitoles así ensayados se encontró que solamente se incorporaron streptamina y 2-epistreptamina por medio de los mutantes 2-deoxistreptamina-negativos ( $D^-$ ) de Streptomyces fradiae, de Streptomyces rimosus forma paromomycinus y de Streptomyces kanamyceticus utilizados para esta finalidad.

20 Similarmente, los diaminociclitoles citados en la Patente francesa No. 2.203.808, no pudieron incorporarse en un antibiótico utilizando los mismos mutantes  $D^-$  de S. fradiae, de S. rimosus forma paromomycinus como los utilizados en la citada referencia.

25 En "Biochemistry" Vol. 13, No. 25, p. 5073-5078 (1974), se describe que no se consiguió ningún éxito cuando se

llevaron a cabo intentos para incorporar los pseudo-disacáridos conocidos como neamina, paromamina o 6-canosaminido-2-deoxiestreptamina utilizando D<sup>-</sup> de S. fradiae, de S. rimosus forma paromomycina y de S. kanamyceticus.

5                    Similarmente, "The Journal of Antibiotics", Vol. XXVIII, No. 8, p. 573-579 (1975) indica que las gentaminas, que son pseudo-disacáridos, no se incorporaron antibióticos utilizando un mutante D<sup>-</sup> de Micromonospora inyoensis.

10                    Igualmente, se ha encontrado que 5-O-(<sup>3</sup>D-ribopiranosil-2,4-dideoxistreptamina es incapaz de producir antibióticos utilizando mutantes D<sup>-</sup> de S. fradiae y de S. rimosus forma paromomycinus de acuerdo con el citado procedimiento.

15                    Las publicaciones anteriores han demostrado también que los diaminociclitoles y pseudo-disacáridos que están presentes en antibióticos ya conocidos, tales como streptomycina, bluonsomicina o higromicina, no pueden incorporarse en antibióticos utilizando los mutantes anteriormente citados.

20                    Por ejemplo, en "The Journal of Antibiotics", Vol. XXVI, No. 10, anteriormente citado, se describe que bluonsamina, streptidina, bluonsidina, hiosamina y actinamina, no se incorporan en antibióticos por los mutantes D<sup>-</sup> de S. fradiae, S. rimosus forma paromomycinus y S. kanamyceticus cuando se utilizan estos mutantes para esta finalidad.

25                    Similarmente, neamina y paromamina, que se encuentran en neomicina y paromomicina respectivamente, no se incorporaron en antibióticos utilizando un mutante D de S. fradiae ("Biochemistry": referencia antes citada).

30                    Adicionalmente, se ha observado también que un diaminociclitol o un pseudo-disacárido, que se puede incorporar en un antibiótico utilizando una cepa mutante de acuerdo con el

proceso de la Patente USA anteriormente citada, necesariamente no se incorporará en un antibiótico mediante una cepa mutante diferente. En la referencia antes citada de "The Journal of Antibiotics", Vol. XXVI, No. 10, se ofrecen ejemplos que muestran que un mutante D- de S. rimosus forma paromomycinus con 2-epistreptamina no produce ningún antibiótico mientras que un mutante D<sup>-</sup> de S. fradiae y de S. kanamyceticus es capaz de incorporar esta subunidad en antibióticos.

Por otro lado, el mismo mutante D<sup>-</sup> de S. kanamyceticus con streptamina no proporciona ningún antibiótico mientras que el mismo mutante D<sup>-</sup> de S. fradiae y de S. rimosus forma paromomycinus incorpora este diaminociclitol en antibióticos.

Con respecto a neamina, este pseudo-disacárido puede proporcionar ribostamicina cuando se utiliza un mutante D<sup>-</sup> de S. ribosidificus, como se indica en "The Journal of Antibiotics", Vol. XXVI, No. 12, p. 784-785 (1973), mientras que neamina es incapaz de incorporarse en un antibiótico cuando se utiliza, por ejemplo, un mutante D de S. fradiae.

Por último, indicaciones anteriores han demostrado que la estructura de un antibiótico hipotético no puede producirse, en cualquier caso, cuando se utiliza un diaminociclitol o un pseudo-disacárido conjuntamente con una cepa mutante. Este hecho se demuestra claramente en "The Journal of Antibiotics", Vol. XXVI, No. 12, citado anteriormente, en donde se describe que los antibióticos obtenidos cuando se utiliza un mutante D<sup>-</sup> de S. kanamyceticus junto con 1-N-metil-deoxistreptamina ó mioinosa-q,3-diamina, no son "los productos esperados" sino otros compuestos. Similarmente, neamina y un mutante D<sup>-</sup> de M. inyoensis proporcionan sisomicina pero este mutante junto con paromamina, un pseudo-disacárido diferente, produce también sisomicina

("The Journal of Antibiotics", Vol. XXVIII, No. 8, citado anteriormente).

5                   Igualmente, se ha demostrado que un mutante D<sup>-</sup> de S. ribosidificus en presencia de neamina, solamente produce ribostamicina pero no un análogo de neomicina como podría esperarse ("The Journal of Antibiotics", Vol. XXVI, No. 12, citado anteriormente).

10                   Es evidente a partir de lo anterior que no puede hacerse ninguna predicción válida en relación a la incorporación posible de un diaminociclitol o pseudo-disacárido particular en un antibiótico, utilizando una determinada cepa mutante, de acuerdo con el procedimiento de la Patente USA anteriormente citada. En ningún caso, es posible predecir si este método será válido o no o cual será la estructura exacta del antibiótico  
15                   que se espera producir.

                  Por lo tanto, la alegación hecha en J. Org. Chem., Vol. 40, No. 4, p. 456-461 (1975) en el sentido de que 2,4-dideoxistreptamina podría incorporarse en neomicinas, paromomicinas y ribostamicina, mediante una técnica de bioconversión, debe  
20                   considerarse como excesivamente vaga, indefinida y desprovista de cualquier base razonable y válida.

                  Se ha encontrado ahora muy sorprendentemente, y de acuerdo con la presente invención, que se puede incorporar 2,4-dideoxistreptamina en nuevos antibióticos mediante mutantes  
25                   D<sup>-</sup> de S. fradiae y de S. rimosus forma paromomycinus y que también se puede incorporar una mezcla de pseudo-disacáridos, es decir una mezcla de gentaminas, en nuevos antibióticos mediante un mutante D<sup>-</sup> de S. rimosus forma paromomycinus.

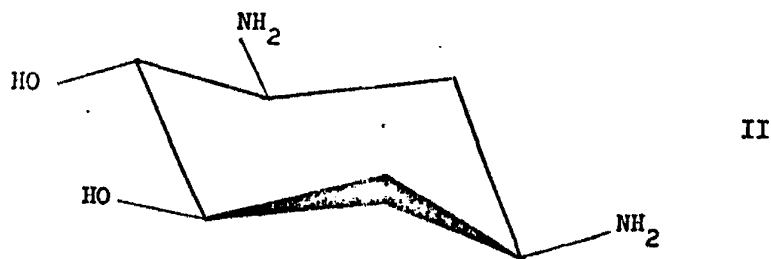
30                   Este descubrimiento se hace todavía más sorprendente cuando se considera que los experimentos realizados con

2,4-dideoxistreptamina en presencia de un mutante D<sup>-</sup> de S. kanamyceticus no produjeron ningún antibiótico y que un mutante D<sup>-</sup> de S. fradiae fue incapaz de incorporar la mezcla de gentaminas en cuestión en un antibiótico.

5                    Todos los resultados obtenidos con 2,4-dideoxi-  
streptamina y con la mezcla de gentaminas, hacen que la inven-  
ción sea totalmente inesperada en relación al estado de la téc-  
nica.

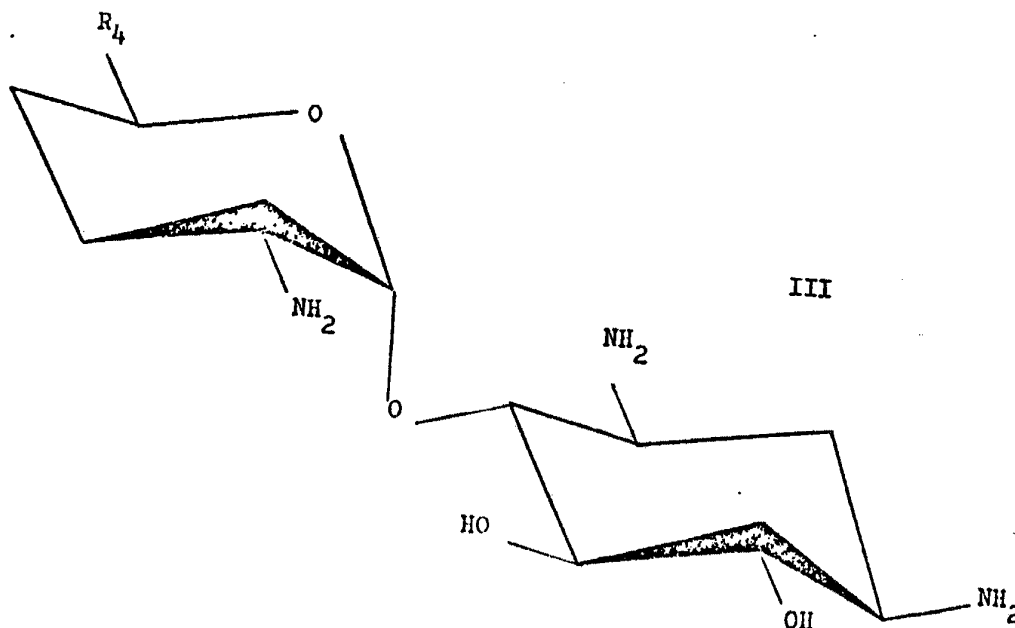
10                   El procedimiento de la invención para preparar los  
compuestos en cuestión comprende cultivar un mutante deoxistrep-  
tamina-negativo de Streptomyces en un medio adecuado que contie-  
ne un carbohidrato soluble, una fuente de nitrógeno similar, sa-  
les minerales esenciales y:

15                   a) cualquiera de los compuestos 1D-(1, 3, 5/2)-1,5-dia-  
mino-2,3-ciclohexanodiol ó 2,4-dideoxiestreptamina, de fórmula:



o sus sales de adición de ácido, por ejemplo el dihidrocloruro;

b) o una mezcla de gentaminas representadas por la fórmula general:



o sus sales de adición de ácido, en donde R<sub>4</sub> se define como en el grupo B de la fórmula I.

5 Cuando se utiliza el procedimiento de esta invención, el antibiótico obtenido se encuentra en forma de la base libre, independientemente de si el diaminociclitol de fórmula II o la mezcla de gentaminas de fórmula III se encuentra en forma de la base libre o en forma de una sal. En el caso de que se desee utilizar el antibiótico resultante como una sal, es suficiente hacerlo reaccionar con un ácido orgánico o inorgánico  
10 adecuado tal como, por ejemplo, ácido sulfúrico, para obtener una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable.

Los microorganismos que se utilizan en la presente invención son D<sup>-</sup> Streptomyces fradiae ATCC21401 y D<sup>-</sup> Streptomyces rimosus forma paromomycinus ATCC21484 ambos descritos en la Pa-  
15 tente USA No. 3.669.838: D<sup>-</sup> Streptomyces fradiae ATCC21401 se utiliza para producir 6-deoxineomicina de la invención y D<sup>-</sup> Streptomyces rimosus forma paromomycinus ATCC 21484 se emplea para la preparación de la 6-deoxiparomomicina y la mezcla de 3', 4'-  
20 dideoxineomicina y sus derivados de la invención.

De acuerdo con técnicas conocidas, el microorganis-

mo se hace crecer en un medio nutriente que tiene el valor pH adecuado y que contiene, por ejemplo, glucosa, hidrolisato de caseína,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCO}_3$  y a continuación se añade a otro medio de crecimiento que  
5 contiene el diaminociclitol de fórmula II o la mezcla de gentaminas de fórmula III, ambos en forma de una base libre o de una sal de adición de ácido y, por ejemplo, harina de glicina, extracto de levadura,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCO}_3$  y glucosa, de nuevo al pH adecuado. El medio de cultivo se incuba a una temperatura entre 28  
10 y 30°C aproximadamente con agitación y buena aireación durante al menos 5 días, para conseguir la producción óptima de la requerida 6-deoxineomicina, 6-deoxiparomomicina o la mezcla de 3',4'-dideoxineomicina y sus derivados.

La 6-deoxineomicina B y 6-deoxineomicina C así  
15 como 6-deoxiparomomicina I y 6-deoxiparomomicina II, se obtendrán a partir de 6-deoxineomicina y 6-deoxiparomomicina respectivamente, por métodos convencionales, por ejemplo mediante separación de las mismas por medio de cromatografía de papel.

Los isómeros que constituyen la mezcla de 3',4'-  
20 dideoxineomicina y sus derivados, se pueden separar también por procedimientos convencionales.

El diaminociclitol de fórmula II es un compuesto conocido que ha sido descrito en la Patente británica No.  
1.445.675. Se puede obtener siguiendo el método descrito en la  
25 citada Patente británica, especialmente por hidrogenación en presencia de un catalizador, por ejemplo níquel Raney, 1D-(1,3, 5/2)-1,5-diazido-2,3-ciclohexanodiol, obtenido a partir de 1L-1,5-di-O-tosil-1,2,5/3-ciclohexanotetrol y azida sódica.

Con respecto a la mezcla de gentaminas de fórmula  
30 III, ésta se puede obtener a partir de sulfato de gentamicina co-

mercial por el método de COOPER et al. descrito en J. Chem. Soc. (c) 1971, 960.

5 Como anteriormente se ha mencionado, los derivados de aminoglicósido-aminociclitol de la invención han resultado presentar una valiosa actividad antibiótica. Esta actividad antibacterial contra varios organismos de ensayo, se ilustra por los siguientes datos:

a) Actividad antibacterial de 6-deoxineomicina y 6-deoxiparomomicina

10 Estos derivados de aminoglicósido-aminociclitol de la invención, se ensayan con respecto a la actividad antibiótica añadiendo cantidades medidas del compuesto bajo estudio en agua estéril a agar nutriente.

15 El agar, conteniendo concentraciones en aumento del compuesto a ensayar, se vierte en platos Petri, a cada uno de los cuales se aplica mecánicamente, con un multiinoculador, varios organismos diferentes, previamente desarrollados en un medio adecuado y almacenados a -20°C en una mezcla 1:1 de medio de crecimiento y glicerol. Los platos se incuban a 37°C durante 20 14 horas y a continuación se inspeccionan en relación con el crecimiento.

Se registra entonces la concentración de antibiótico que inhibe justamente el crecimiento de las bacterias y se denomina "concentración inhibitoria mínima" o M.I.C.

25 Los resultados registrados en este ensayo se ofrecen en la Tabla I en comparación con neomicina y paromomicina, ambas en la forma sulfato.

Las cifras mostradas en las Tablas I y II corresponden a la cantidad de base libre.



TABLA II

Organismo	ug/ml requerido para evitar el crecimiento					
	neomicina	neomicina B	neomicina C	6-deoxi-neomicina	6-deoxi-neomicina B	6-deoxi-neomicina C
Escherichia coli Bristol es decir NCIB 11351	0.62	0.62	80	2.5	2.5	5
Proteus mirabilis es decir NCIB 11355	1.25	1.25	10	5	5	5
Staphylococcus aureus es decir ATCC 9144	0.62	0.62	80	5	2.5	20
Salmonella typhimurium es decir ATCC 19585	2.5	2.5	40	10	5	20

5 A partir de estos resultados, puede llegarse a la conclusión de que 6-deoxineomicina B es algo menos potente que neomicina B pero que 6-deoxineomicina C es más potente que neomicina C.

c) Actividad de la mezcla de 3',4'-dideoxineomicina y sus derivados

10 La actividad antibacterial de la mezcla de 3',4'-dideoxineomicina y sus derivados, se determina de acuerdo con el procedimiento a continuación descrito.

15 Se incuba *D<sup>-</sup> Streptomyces rimosus* forma *paromomycinus* ATCC 21484 a 30°C sobre una placa de agar nutriente conteniendo 50 ug/ml de una mezcla de gentaminas de fórmula III. Después de tres días, la placa se deposita con agar germinado con un organismo de ensayo y la producción de antibiótico se muestra por una zona de inhibición alrededor de *Streptomyces*. Esta zona de inhibición se mide y es comparada con la de un control constituido por agar nutriente solamente.

20 Con fines comparativos, se lleva a cabo también un ensayo similar con 50 ug/ml de neamina como un suplemento

a agar nutriente, en lugar de la mezcla de gentaminas de fórmula III, y utilizando también D<sup>-</sup> Streptomyces rimosus forma paromomycinus ATCC 21484. El antibiótico así producido resulta ser neomicina.

5 Los resultados obtenidos se ofrecen en la siguiente tabla:

TABLA III

Organismo	Zona de inhibición (en mm) cuando el agar nutriente se suplementa con		
	Nada	Neamina	Mezcla de gentaminas de fórmula III
Escherichia coli PT <sub>2</sub>	0	0	21
Escherichia coli ML 1629, es decir NCIB 11354	0	0	25
Escherichia coli ML 1410, es decir NCIB 11353	0	0	20
Escherichia coli JR 66, es decir NCIB 11352	0	0	25

10 Estas cifras demuestran que la mezcla de 3',4'-dideoxineomicina y sus derivados de la invención es activa contra organismos que son resistentes contra la neomicina. Puede añadirse que el organismo E. coli PT<sub>2</sub> es también resistente a la gentamicina.

15 Podrá apreciarse que para su empleo terapéutico los compuestos de la invención se administrarán normalmente en forma de una composición farmacéutica veterinaria en una unidad de dosificación adecuada al modo requerido de administración, comprendiendo la composición como ingrediente activo por lo menos un compuesto de la invención en asociación con un vehículo excipiente farmacéutico para el mismo. Para administración

20

5 oral, la composición puede tener la forma, por ejemplo, de una tableta revestida o no revestida, una cápsula de gelatina dura o blanda, una suspensión o un jarabe. La composición puede tener .  
alternativamente la forma de un supositorio para administración rectal o vaginal, una solución o suspensión para administración parenteral o una crema o unguento para administración local.

Los siguientes ejemplos ilustran la preparación de los compuestos de la invención:

EJEMPLO 1

10 Preparación de la base 6-deoxineomicina y su sulfato

a) 6-deoxineomicina en forma de la base libre

En un matraz, se desarrolla D<sup>-</sup> Streptomyces fradiae ATCC 21401 durante 48 horas en el siguiente medio, previamente ajustado a un pH de 7,2 - 7,3:

15	Glucosa	$\frac{g}{1}$
	hidrolisato de caseína	1
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
	Mg SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,05
	Fe SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,005
20	Cu SO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,005
	CaCO <sub>3</sub>	1
	Agua hasta 100 ml	

25 Este cultivo se sacude y mantiene a 28°C durante el periodo de tiempo indicado. Se añade entonces un inóculo al 10 % del cultivo al siguiente medio de crecimiento previamente ajustado a pH 7,2 - 7,3:

	<u>g</u>
Glucosa	1
Harina de glicina	2,5
Extracto de levadura	0,5
NaCl	0,5
5 CaCO <sub>3</sub>	0,2
Dihidrocloruro de 2,4-dideoxi-estreptamina	0,025
Agua hasta 100 ml	

Los cultivos se incuban en matraces Erlenmeyer a 28-30°C sobre un vibrador rotativo y con buena aireación.

10 La producción de 6-deoxineomicina comienza después de 2 días y resulta óptima después de 5 días.

Los cultivos de control que no contienen dihidrocloruro de 2,4-dideoxiestreptamina no producen 6-deoxineomicina.

15 El medio de cultivo se centrifuga entonces y el líquido sobrenadante se vierte a través de una columna que contiene una resina intercambiadora de cationes de tipo carboxílico (polimetacrílico) debilmente ácida y de porosidad media (Amberlite IRC-50, Amberlite es una marca registrada), en la  
20 forma amónica.

Esta operación se lleva a cabo dos veces para extraer la 6-deoxineomicina y el dihidrocloruro de 2,4-dideoxiestreptamina inalterado. La columna se lava con agua, y la 6-deoxineomicina se eluye con una solución de hidróxido amónico 2N en agua. El eluado se concentra bajo vacío sobre un  
25 evaporador rotativo y se aplica entonces a una columna Sephadex G-10. La elución con solución de hidróxido sódico 0,1M proporciona 6-deoxineomicina en las primeras fracciones y dihidrocloruro de 2,4-dideoxiestreptamina en las fracciones ulteriores.

Según éste método, se produce una cantidad de 6-deoxineomicina en forma de la base libre que representa 83 unidades (1 unidad = 1  $\mu$ g/ml neomicina) de actividad. Esto corresponde a la incorporación en la 6-deoxineomicina así obtenida del 22 % aproximadamente del dihidrocloruro de 2,4-dideoxiestreptamina inicialmente empleado.

Esto representa la actividad máxima obtenida y cualquier vinculación adicional no se traduce en un correspondiente aumento de 6-deoxineomicina.

Según otro procedimiento, la 6-deoxineomicina en bruto se purifica por cromatografía de papel sobre papel Whatman No 3 MM desarrollado con una solución de metanol/hidróxido amónico 4/1. La localización de la 6-deoxineomicina se visualiza utilizando 0,25 % de hipoclorito sódico en agua, a continuación etanol absoluto seguido por 1 % de almidón soluble y 1 % de yoduro potásico en agua, con secado con aire entre cada aplicación.

De éste modo, el valor Rf de la 6-deoxineomicina resulta ser de 0,30.

Con fines comparativos, se puede mencionar que el valor Rf de neomicina, 2-deoxiestreptamina y 2,4-dideoxiestreptamina con el mismo sistema disolvente, es:

	<u>Rf</u>
Neomicina	0,26
25 2-deoxiestreptamina	0,58
2,4-dideoxiestreptamina	0,62

b) Sulfato de 6-deoxineomicina

La 6-deoxineomicina obtenida anteriormente se convierte a su sal sulfato por reacción con la cantidad equivalente de ácido sulfúrico diluido.

$[\alpha]_D^{24}$  de sulfato de 6-deoxineomicina = +43<sup>o</sup>(c = 1,0, agua)

c) Estructura de 6-deoxineomicina

5 La estructura de compuesto antibiótico de fórmula I en la forma de la base libre obtenida anteriormente, se determina por comparación con el antibiótico natural, neomicina, formado cuando se incubó 2-deoxiestreptamina en el medio adecuado. La 6-deoxineomicina probable se denomina de aquí en adelante compuesto X.

10 La metanólisis de la neomicina del compuesto X con una solución metanólica al 10 % de cloruro de hidrógeno, durante dos horas, bajo reflujo, proporciona dos productos principales, uno de los cuales corresponde a metilneobiosaminida y se produce a partir de ambos compuestos.

15 El otro producto, denominado de aquí en adelante como Z, es diferente en los dos antibióticos, emigrando menos el compuesto Z de neomicina que el producto Z del compuesto X en el ensayo cromatográfico utilizando una solución de metanol/hidróxido amónico 4/1 como disolvente de elución.

20 La confirmación de la estructura de cada producto Z se obtiene por espectrometría de masa de los derivados per-trimetil-sililo.

25 Aunque no se obtienen los iones moleculares, los espectros del compuesto Z a partir de neomicina y del compuesto Z a partir del compuesto X, fueron muy similares excepto que 2 crestas del espectro del primero (m/e 343 y 460) estaban desviadas 88 unidades de masa por debajo del último (m/e 255 y 372). Esto corresponde a una pérdida de  $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$  y al reemplazamiento por hidrógeno.

De éste modo, la estructura de Z a partir de neomicina corresponde a neamina y la estructura de Z a partir del compuesto X corresponde a 6-deoxineamina.

5 La acetilación de ambos compuestos Z en metanol, seguido por hidrólisis ácida con una solución de ácido clorhídrico 3N bajo reflujo durante 10 horas, proporciona en cada caso dos productos principales.

10 En la cromatografía de papel, uno de éstos productos aparece como el mismo en ambos casos tanto si Z procede de neomicina o si Z procede de compuesto X, y se supone que es 2,6-diamino-2,6-dideoxi-D-glucosa. Los otros dos compuestos muestran ser cromatográficamente idénticos a 2-deoxiestreptamina a partir de neamina y a 2,4-dideoxiestreptamina a partir de deoxineamina.

15 Estos resultados llevan a la conclusión de que el compuesto X corresponde a 6-deoxineomicina.

#### EJEMPLO 2

#### Separación de 6-deoxineomicina en 6-deoxineomicina B y 6-deoxineomicina C

20 La 6-deoxineomicina obtenida siguiendo el método descrito en el ejemplo 1, se separa en 6-deoxineomicina B y 6-deoxineomicina C por cromatografía de papel utilizando como disolvente, una mezcla 3/16/6/1 de terc-butanol/butanona/solución de hidróxido amónico 6,5N/metanol.

25 La 6-deoxineomicina B y 6-deoxineomicina C se detectan sobre el papel utilizando el mismo método que anteriormente se ha descrito.

Utilizando como sistema disolvente, metanol e hidróxido amónico en la proporción de 4 a 1, sobre papel

cromatográfico 3MM Whatman, se determinan los valores Rf de 6-deoxineomicinas B y C en comparación con los epímeros correspondientes de neomicina, obteniéndose los siguientes resultados:

	6-deoxineomicina B	0,29
5	6-deoxineomicina C	0,21
	Neomicina B	0,25
	Neomicina C	0,165

EJEMPLO 3

Preparación de 6-deoxiparamomicina y sus epímeros I y II

10 En un matraz se hace crecer D<sup>-</sup> Streptomyces rimosus forma paromomycinus ATCC 21484 durante 2-3 días en el siguiente medio previamente ajustado a pH 7,5:

	Harina de glicina	$\frac{9}{1}$
	Hidrolisato de caseína	0,25
15	CaCO <sub>3</sub>	0,5
	Glucosa	1
	NaCl	0,5
	NH <sub>4</sub> Cl	0,167
	Agua hasta 100 ml	

20 Este cultivo se sacude y mantiene a 28°C durante el periodo indicado de tiempo. A continuación, se añade un inóculo al 10 % de éste cultivo a un medio idéntico al indicado anteriormente pero conteniendo además 0,025 g de dihidrocloruro de 2,4-dideoxiestreptamina.

25 Los cultivos se incuban en matraces Erlenmeyer a 28-30°C sobre un sacudidor rotativo y con buena aireación.

30 Las ulteriores operaciones de preparación y purificación de la 6-deoxiparamomicina son exactamente iguales a las descritas en el ejemplo 1a anterior.

La purificación por cromatografía de papel bajo las mismas condiciones que las descritas en el ejemplo 1 anterior, muestra que el valor Rf de 6-deoxiparomomicina es de 0,30.

5 Con fines comparativos, se puede mencionar que el valor Rf de paromomicina, en un ensayo cromatográfico idéntico, es de 0,27.

Utilizando como sistema disolvente, metanol e hidróxido amónico en la proporción de 4 a 1 sobre papel cromatográfico 3MM Whatman, se determinan los valores Rf de 6-deoxiparomomicinas I y II en comparación con los correspondientes epímeros de paromomicina, obteniéndose los siguientes resultados:

6-deoxiparomomicina I	0,34
15 6-deoxiparomomicina II	0,275
Paromomicina I	0,3
Paromomicina II	0,22

#### EJEMPLO 4

Preparación de la mezcla de 3,4'-dideoxineomicina y sus derivados.

##### a) Mezcla de gentaminas de fórmula III

Se prepara primeramente una mezcla de gentaminas de fórmula III a partir de sulfato de gentamicina disponible en el comercio. Esta sal se convierte primero a su base libre y se evapora para obtener un aceite. A éste aceite se añade una solución de ácido clorhídrico en metanol, preparada añadiendo ácido clorhídrico a metanol seco, y la solución así obtenida se refluje durante 2 horas. El ácido clorhídrico metanólico se separa bajo vacío y el aceite resultante se re-

cibe en un poco de agua y se pasa a través de una columna de Amberlite I.R.A. 400 para proporcionar la base libre de las gentaminas deseadas. Las distintas fracciones así recogidas se evaporan hasta sequedad y se separan en metilgarosaminida y

5 gentaminas mezcladas por cromatografía sobre gel de sílice utilizando, como disolvente, una mezcla de metanol/cloroformo/hidróxido sódico 1/1/1. En ésta separación cromatográfica, la metilgarosaminida muestra un valor Rf de 0,8 y la mezcla de gentaminas un valor Rf de 0,2.

10 b) Mezcla de 3',4'-dideoxineomicina y sus derivados

En un matraz se hace crecer D<sup>-</sup> Streptomyces rimosus forma paromomycinus ATCC 21484 durante 2-3 días en el siguiente medio previamente ajustado a pH 7,5:

	<u>g</u>
15 Harina de glicina	1
Hidrolisato de caseína	0,25
CaCO <sub>3</sub>	0,5
Glucosa	1
NaCl	0,5
20 NH <sub>4</sub> Cl	0,167

Este cultivo se sacude y mantiene a 28°C durante el periodo indicado de tiempo. A continuación se añade un inóculo al 10 % de éste cultivo a un medio idéntico al indicado anteriormente, ajustado a pH 7,2, pero conteniendo además

25 50 µg de la mezcla de gentaminas previamente obtenidas.

Los cultivos se incuban en matraces Erlenmeyer a 30°C en un sacudidor rotativo y con buena aireación durante 5 días. La mezcla en bruto de 3',4'-dideoxineomicina y sus derivados, así obtenida, se purifica por cromatografía de

30 papel sobre papel Whatman No 3MM desarrollado con una solución

5 de metanol/hidróxido amónico 4/1. La localización de la mezcla de 3',4'-dideoxineomicina y sus derivados se visualiza utilizando 0,25 % de hipoclorito sódico en agua, a continuación etanol absoluto y seguido por 1 % de almidón soluble y 1 % de yoduro potásico en agua, efectuando un secado con aire entre cada aplicación.

En éste ensayo, el valor Rf de la mezcla de 3',4'-dideoxineomicina y sus derivados, resulta ser de 0,25.

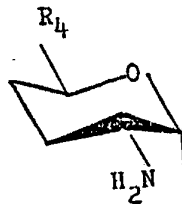
10 Con fines comparativos, se puede mencionar que el valor Rf de la mezcla de gentaminas de fórmula III, en un ensayo cromatográfico idéntico, es de 0,5 a 0,7.

15 Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.



o sus sales de adición de ácido, en donde X e Y, cuando son iguales, representan ambos hidrógeno, ó X e Y, cuando son diferentes, son tales que cuando X es OH, Y representa un grupo de fórmula:

5



en donde  $R_4$  representa  $CH-NH_2$  ó  $CH-NHCH_3$  en donde  $R_5$  representa hidrógeno o metilo, para obtener, en forma de la base libre, los compuestos de fórmula I; siendo dicho mutante de Streptomyces deoxiestreptamina-negativo D<sup>-</sup> Streptomyces fradiae ATCC21401 ó D<sup>-</sup> Streptomyces rimosus forma paromonycinus ATCC21484 cuando el medio es suplementado con un compuesto de fórmula II en donde X e Y son iguales y D<sup>-</sup> Streptomyces rimosus forma paromonycinus ATCC21484 cuando el medio es suplementado con un compuesto de fórmula II en donde X e Y son diferentes, tratándose adicionalmente, si se desea, el compuesto de fórmula I, en forma de la base libre, con un ácido orgánico o inorgánico adecuado para proporcionar una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable, o bien se separa en sus isómeros por cromatografía de papel.

15

20

2.- Procedimiento para preparar nuevos derivados de aminoglicósido-aminociclitol, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria.

Esta Memoria consta de 29 hojas escritas a máquina  
por una sola cara.

Madrid, 28 FEB. 1978

LABAZ,

~~I. M. GOMEZ ARCE Y PARRA  
c. p. Financ. y Econ. Ind.~~

20