

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

⑩ ES	⑪ NUMERO 467.724	⑩ A1
	⑫ FECHA DE PRESENTACION 9-3-78	

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

PATENTE DE INVENCION

⑤① PRIORIDADES:		
⑤② NUMERO 778.299	⑤③ FECHA 16-3-77	⑤④ PAIS Estados Unidos
⑤⑤ FECHA DE PUBLICIDAD	⑤⑥ CLASIFICACION INTERNACIONAL C04H; A61K	⑤⑦ PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
⑤⑧ TITULO DE LA INVENCION UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE NUEVOS ANTIBIOTICOS AMINOGLICOSIDOS.		
⑤⑨ SOLICITANTE (S) MERCK & CO., INC.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE 126 East Lincoln Avenue - RAHWAY, New Jersey 07065 ESTADOS UNIDOS		
⑤⑩ INVENTOR (ES) Mitree M. Ponpipom y Ray S. Dewey ambos de nacionalidad estadounidense.		
⑤⑪ TITULAR (ES)		
⑤⑫ REPRESENTANTE D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU		

RESUMEN DE LA INVENCION

1
5
1,4-Diamino-1,4-didesoxi-3-O-[4-desoxi-4-propionamido(y acetamido)- α -D-glucopiranosil]-D-glucitol, que presenta baja toxicidad y un amplio espectro de actividad antibacteriana, se prepara por acilación de 1,4-diamino-1,4-didesoxi-3-O-(4-amino-desoxi-4- α -D-glucopiranosil)-D-glucitol.

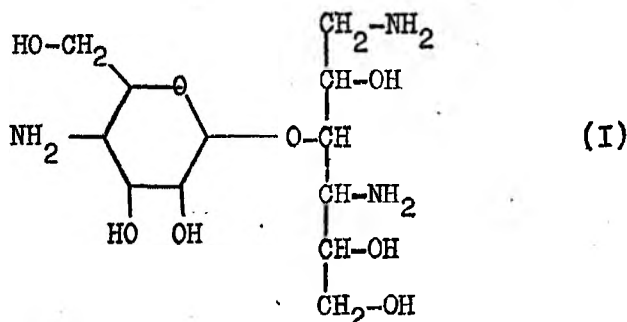
ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10
15
20
El descubrimiento de que los aminoglicósidos poseían propiedades antibióticas estimuló un gran interés en este campo. Ello ha dado lugar al hallazgo de muchas sustancias antibióticas aminoglicósidas valiosas tales como gentamicina, kanamicina y estreptomina. En general, la actividad antibacteriana de cada uno de estos antibióticos no incluye ciertas bacterias patógenas clínicamente importantes. Por ejemplo, algunos no son activos contra la importante especie Pseudomonas. La resistencia adquirida en el transcurso de la extensa aplicación de los antibióticos existentes en el tratamiento de las infecciones bacterianas ha hecho surgir un grave problema de resistencia. Hasta ahora, el problema más grave encontrado en el caso de los antibióticos aminoglicósidos clásicos es la oto-toxicidad o nefrotoxicidad asociada al núcleo de desoxiestreptamina o estreptidina de los aminoglicósidos.

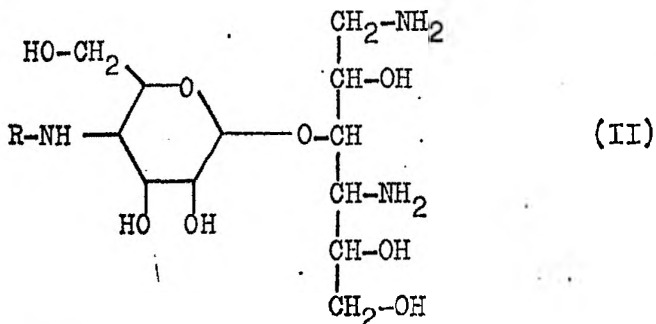
25
30
Por consiguiente, las deficiencias de los antibióticos aminoglicósidos conocidos han estimulado nuevas investigaciones para hallar otros antibióticos aminoglicósidos que sean activos contra una amplia gama de patógenos así como contra las cepas resistentes de microorganismos particulares y que presenten menos efectos tóxicos secundarios.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a un nuevo compuesto químico denominado 1,4-diamino-1,4-didesoxi-3-O-(4-amino-4-desoxi- α -D-glucopiranosil)-D-glucitol o despropionil-G1A₁, de la siguiente estructura:



útil como intermediario para la preparación de los antibióticos aminoglicósidos de la siguiente estructura:



donde R es acetilo o propionilo. Los antibióticos aminoglicósidos de estructura II han sido descritos en la solicitud de patente estadounidense de Frederick Kahan y colaboradores, número de serie 677.117, presentada el 15 de Abril de 1976.

Cuando R es acetilo, el compuesto (II) se denomina 1,4-diamino-1,4-didesoxi-3-O-(4-acetamido-4-desoxi- α -D-glucopiranosil)-D-glucitol o G1A₂; cuando R es propionilo, el compuesto (II) se denomina 1,4-diamino-1,4-didesoxi-3-O-(4-desoxi-4-propionamido- α -D-glucopiranosil)-D-glucitol

1 o G1A₁.

5 Un objeto de esta invención es proporcionar un nuevo y útil intermediario para la preparación de antibióticos aminoglicósidos que son eficaces en la inhibición del crecimiento de diversos microorganismos Gram-negativos y Gram-positivos en el hombre y en los animales. Otro objeto es proporcionar un procedimiento para la preparación de estos antibióticos aminoglicósidos por acilación de despropionil-G1A₁. Otros objetos de esta invención resultarán evidentes en la descripción detallada de la misma dada a continuación.

15 El nuevo intermediario, despropionil-G1A₁, de esta invención se produce por eliminación selectiva del grupo propionilo o acetilo del G1A₁ o del G1A₂, respectivamente. Los compuestos G1A₁ y G1A₂ se obtienen cultivando en condiciones controladas el microorganismo Streptoverticillium netropsis por el método descrito en la solicitud de patente estadounidense 677.117 que se incorpora aquí por referencia.

20 Basándose en estudios taxonómicos, el Streptoverticillium netropsis fue identificado como un actinomicete y ha sido denominado MA-4350 en la colección de cultivos de Merck & Co., Inc., P.O. Box 2000, Rahway, New Jersey 07065. Se ha depositado un cultivo sin restricciones en cuanto a su disponibilidad en la Fermentation Section de los Northern Utilization Research Branch, Departamento de Agricultura de Estados Unidos en Peoria, Illinois, y se ha incorporado a su colección de cultivos permanente y está a disposición del público bajo el número de cultivo NRRL

25 30 8149.

1 Las características morfológicas y de cultivo del Streptoverticillium netropsis están indicadas en la siguiente tabla.

5 Morfología - Los esporóforos forman verticilos, habitualmente biverticilados, a intervalos regulares a lo largo del micelio aéreo. Las cadenas de esporas habitualmente contienen de 10 a 15 esporas y pueden ser rectas flexuosas o formando ganchos, lazos abiertos y lo que parecen espirales primitivas. Las esporas son habitualmente de ovales a cilíndricas, de un tamaño de 0,9 x 1,2 micras.

10 Cultivo

Agar harina de avena

Crecimiento vegetativo - reverso marrón;

15 Micelio aéreo - aterciopelado, beige rosado pálido (4ec);

Pigmento soluble - marrón claro;

Czapek Dox (agar sacarosa-nitrato)

Crecimiento vegetativo - malo, incoloro;

20 Micelio aéreo - escaso, crema tostado;

Pigmento soluble - ninguno.

Agar albúmina de huevo

Crecimiento vegetativo - reverso tostado rosado;

25 Micelio aéreo - pulverulento a aterciopelado, predominantemente beige rosado pálido (4ec) mezclado con crema rosado tostado (3ca);

Pigmento soluble - tostado pálido.

Agar glicerol-asparagina

30 Crecimiento vegetativo - reverso tostado amarillento pálido;

- 1 Micelio aéreo - aterciopelado, crema rosado tostado (3ca) bordeado de beige rosado pálido (4ec);
Pigmento soluble - tostado pálido.
- 5 Agar sales inorgánicas-almidón
Crecimiento vegetativo - reverso tostado grisáceo;
Micelio aéreo - pulverulento, beige rosado pálido (4ec);
Pigmento soluble - tostado pálido.
- 10 Agar extracto de levadura-dextrosa + sales
Crecimiento vegetativo - marrón;
Micelio aéreo - ninguno;
Pigmento soluble - marrón pálido.
- 15 Agar extracto de levadura-extracto de malta
Crecimiento vegetativo - reverso marrón;
Micelio aéreo - aterciopelado, predominantemente beige rosado pálido (4ec) mezclado con crema rosado tostado (3ca);
Pigmento soluble - marrón pálido.
- 20 Agar leche descremada
Crecimiento vegetativo - tostado rosado;
Micelio aéreo - ninguno;
Pigmento soluble - marrón pálido;
Hidrólisis de la caseína - buena.
- 25 Leche de tornasol
Crecimiento vegetativo - anillo de crecimiento moderado marrón oscuro;
Micelio aéreo - ninguno;
Color - púrpura parduzco;
Coagulación y/o peptonización - peptonización completa con un pH de 7,5.
- 30

- 1 Leche descremada
Crecimiento vegetativo - anillo marrón de crecimiento moderado;
Micelio aéreo - ninguno;
- 5 Pigmento soluble - tostado;
Coagulación y/o peptonización - peptonización completa con un pH de 7,5.
- Agar tirosina
Crecimiento vegetativo - tostado grisáceo;
10 Micelio aéreo - moderado, crema tostado;
Pigmento soluble - tostado;
Descomposición de la tirosina - positiva.
- Agar peptona-hierro-extracto de levadura
Crecimiento vegetativo - marrón claro;
15 Micelio aéreo - ninguno;
Pigmento soluble - marrón pálido;
Producción de H₂S - negativa.
- Agar nutriente
Crecimiento vegetativo - tostado bordeado de marrón
20 rojizo pálido;
Micelio aéreo - ninguno;
Pigmento soluble - tostado pálido.
- Agar almidón nutriente
Crecimiento vegetativo - tostado;
25 Micelio aéreo - ninguno;
Pigmento soluble - tostado pálido;
Hidrólisis del almidón - buena.
- Agar gelatina nutriente
Crecimiento vegetativo - marrón rojizo;
30 Micelio aéreo - ninguno;

1 Pigmento soluble - tostado pálido;
Licuefacción de la gelatina - buena.

Trozo de patata

5 Crecimiento vegetativo - tostado;
Micelio aéreo - ninguno;
Pigmento soluble - ninguno.

Suero sanguíneo de Loeffler

10 Crecimiento vegetativo - color crema;
Micelio aéreo - ninguno;
Pigmento soluble - ninguno;
Licuefacción - nula.

15 Todas las lecturas registradas fueron tomadas al ca-
bo de tres semanas de incubación a 28°C. El pH de los me-
dios utilizados en estos estudios era aproximadamente neu-
tro, es decir, pH 6,8-7,2. Las designaciones de colores
utilizadas en la descripción están de acuerdo con las defi-
niciones del Color Harmony Manual, 4ª Edición, (1958),
Container Corporation of America, Chicago, Illinois.

20 También se determinó la capacidad del Streptovercilli-
llium netropsis para utilizar o asimilar diversos hidratos
de carbono. Para este fin, el microorganismo se cultivó en
medio sintético basal (Pridham y Gottlieb) conteniendo 1 %
del hidrato de carbono a 28°C, durante tres semanas. El pH
de los medios empleados en el estudio era aproximadamente
25 neutro (6,8-7,2). La Tabla I muestra la utilización de estas
fuentes de hidratos de carbono por el Streptovercillium
netropsis: + = buen crecimiento, ± mal crecimiento y
- = crecimiento nulo sobre el hidrato de carbono particular.

30

1

TABLA I

5

Glucosa	+	Maltosa	+
Arabinosa	-	Manitol	-
Celulosa	-	Manosa	+
Fructosa	+	Rafinosa	-
Inositol	+	Ramnosa	-
Lactosa	+	Sacarosa	+
Xilosa	-		

10

El grado de crecimiento al variar la temperatura y los requisitos de oxígeno del microorganismo son los siguientes: Intervalo de temperaturas (agar extracto de levadura-glucosa + sales):

28°C - bueno

37°C - moderado

15

50°C - crecimiento nulo

Requisitos de oxígeno (cultivo en planchas en agar extracto de levadura-dextrosa + sales):

Aerobio.

20

Los compuestos G1A₁ y G1A₂ son producidos durante la fermentación aerobia de medios nutritivos acuosos adecuados, en condiciones controladas, mediante la inoculación con el organismo Streptoverticillium netropsis. Son adecuados para producir los aminoglicósidos de esta invención los medios acuosos como los empleados para la producción de otros antibióticos. Estos medios contienen fuentes de carbono, nitrógeno y sales inorgánicas asimilables por el microorganismo.

25

30

Debe observarse que los medios descritos en los ejemplos son simplemente ilustrativos de la amplia variedad de medios que pueden emplearse y no se pretende que sean limi-

1 tativos.

Propiedades físicas y químicas de los compuestos G1A₁ y G1A₂

5 El antibiótico G1A₁ presenta la fórmula empírica C₁₅H₃₁N₃O₉. La composición elemental calculada es: 45,33 % de carbono, 7,86 % de hidrógeno, 10,57 % de nitrógeno y 36,24 % de oxígeno. La rotación óptica es $[\alpha]_D^{25} + 87,1^\circ$ (c = 1,0, agua). Los picos de resonancia magnética protónica presentados por el compuesto G1A₁ en D₂O son los siguientes: τ 4,83 (d, J_{1,2} 2,0 Hz, H-1), τ 7,70 (q, J 7,0 Hz, CH₃-CH₂-C(=O)-), τ 8,89 (t, J 7,0 Hz, CH₃-CH₂-C(=O)-). El espectro de masas presenta picos a 319, 218 y 162.

10 Un espectro infrarrojo del G1A₁, como pastilla en KBr, revela los siguientes picos de absorción: 3350, 2925, 1680, 1575, 1460, 1375, 1075 y 1025 cm⁻¹.

15 El antibiótico G1A₁ se caracteriza además como derivado peracetilado, 1,4-diacetamido-2,5,6-tri-O-acetil-1,4-didesoxi-3-O-(2,3,6-tri-O-acetil-4-desoxi-4-propionamido- α -D-glucopiranosil)-D-glucitol, que contiene ocho grupos acetilo. El derivado peracetilado del G1A₁ responde a la
20 fórmula empírica C₃₁H₄₇N₃O₁₇. La composición elemental calculada del derivado peracetato del G1A₁ es: 50,75 % de carbono, 6,46 % de hidrógeno, 5,73 % de nitrógeno y 37,06 % de oxígeno. El derivado peracetato de G1A₁ tiene un punto de fusión de 197-198°C, una rotación óptica $[\alpha]_D^{25} + 68,5^\circ$
25 (c = 1,01, cloroformo). La cromatografía en gel de sílice presenta una R_F de 0,52 (cloroformo/metanol 90:10), detectada por rociada con ácido sulfúrico. El espectro de masas presenta picos a m/e 734 (M + 1)⁺, 588, 529 y 344. El espectro de RMN del derivado peracetilado de G1A₁ se encuentra
30 en la Tabla I.

TABLA I

	<u>δ</u>	<u>J</u>
1	6,80	8,0
	6,35	10,0
5	6,14	9,0, 3,5
	5,57	9,0, 9,0
	~ 5,08	9,0, 3,5
	~ 5,03	3,5
	4,95	9,0, 7,0, 3,0
10	4,72	8,0, 6,0, ~1,0
	4,50	10,0, 9,0, ~1,0
	4,38	12,5, 9,0, ~1,0
	~ 4,25	~13,0, 3,0
	~ 4,20	9,0, 8,0
15	~ 4,15	
	3,99	6,0, 1,0
	3,99	13,0, 7,0
	2,80	12,5, 8,5, 3,5
	2,20	
20	1,96	
	2,01	
	2,05	
	2,07	
	2,10	
25	2,13	
	1,15	

El antibiótico G1A₂ responde a la fórmula empírica C₁₄H₂₉N₃O₉. La composición elemental calculada del G1A₂ es 43,86 % de carbono, 7,62 % de hidrógeno, 10,96 % de nitrógeno y 37,56 % de oxígeno.

30

1 El G1A₂ se caracteriza como el derivado peracetilado
1,4-diacetamido-3-O-(4-acetamido-2,3,6-tri-O-acetil-4-deso-
xi- α -D-glucopiranosil)-2,5,6-tri-O-acetil-1,4-didesoxi-D-
5 glucitol, que contiene nueve grupos acctilo. El derivado
peracetilado del G1A₂ responde a la fórmula empírica
C₃₉H₄₅N₃O₁₇. La composición elemental calculada del deriva-
do peracetato del G1A₂ es: 50,07 % de carbono, 6,30 % de
hidrógeno, 5,84 % de nitrógeno y 37,79 % de oxígeno. El de-
rivado peracetilado presenta las siguientes propiedades fí-
10 sicas: p.f. 187,5-188,5°C, $[\alpha]_D^{25} + 68,3^\circ$ (c = 1,0, metanol).
Una solución del producto en CDCl₃ presenta los siguientes
picos de RMP:

τ 7,86, 7,90, 7,93 (singlete de 6 protones), 7,95,
7,98, 8,0 y 8,04 (singlete de 6 protones) (27 protones,
15 NAc y OAc). El espectro de masas presenta los siguientes pi-
cos: m/e 720 (M + 1)⁺, 574, 515 y 330.

Los compuestos G1A₁ y G1A₂ dan reacción coloreada po-
sitiva con la ninhidrina.

20 Los compuestos G1A₁ y G1A₂ se resuelven bien por cro-
matografía en capa fina de gel de sílice en los siguientes
sistemas disolventes:

	<u>Sistema A</u>		<u>Sistema B</u>
	CHCl ₃ 2 volúmenes		CHCl ₃ 1 volumen
	MeOH 2 volúmenes		MeOH 2 volúmenes
25	NH ₄ OH al 28 % 1 volumen		NH ₄ OH al 28 % 2 volúmenes

La detección se realiza mediante la reacción positi-
va con ninhidrina. Los valores de R_f son los siguientes:

	<u>Muestra</u>	<u>Sistema A</u>	<u>Sistema B</u>
30	G1A ₁	0,35	0,7
	G1A ₂	0,25	0,58

1 Los antibióticos G1A₁ y G1A₂ fueron evaluados además
 mediante el método de dilución en agar. Un inoculum de
 2 x 10⁴ a 1 x 10⁵ organismos se aplica como gotita de
 0,002 ml a la superficie de agar Mueller-Hinton conteniendo
 5 diluciones seriadas al doble del antibiótico que ha de
 ser ensayado, desde 3,1 hasta 200 µg/ml. Los resultados
 (Tabla II) están indicados como concentración mínima de in-
 hibición en µg/ml, siendo ésta la concentración mínima de
 antibiótico a la cual el crecimiento del organismo de ensa-
 10 yo es inhibido durante un periodo de 18 horas a 37°C.

TABLA II

Valores de la CMI por dilución en agar

<u>Cepa</u>	<u>Resistencia*</u>	<u>G1A₁</u>	<u>G1A₂</u>
<u>Staphylococcus aureus</u>	-	100	200
15 <u>Staphylococcus aureus</u>	Estr [*] , Neo, Kan	200	>200
<u>Staphylococcus aureus</u>	-	50	200
<u>Streptococcus faecalis</u>	-	200	>200
<u>Bacillus subtilis</u> (ATCC 6633)	-	50	100
20 <u>Brucella bronchiseptica</u> (ATCC 4617)	-	100	200
<u>Escherichia coli</u>	-	50	100
<u>Escherichia coli</u>	Estr [*] , Neo, Kan, Gm	50	100
<u>Escherichia coli</u> (ATCC 9637)	-	50	200
25 <u>Salmonella gallinarum</u>	-	<3,1	200
<u>Serratia (sin pigmentar)</u>	-	200	>200
<u>Serratia marcescens</u>	-	>200	>200
<u>Erwinia atroseptica</u> (ATCC 4446)	-	<3,1	100
30			

1

TABLA II (continuación)

<u>Cepa</u>	<u>Resistencia*</u>	<u>G1A₁</u>	<u>G1A₂</u>
<u>Proteus vulgaris</u> (ATCC 21100)	-	100	200
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	Estr	50	200
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	-	50	200

5

* Mediado por plásmido; si no, aislado de laboratorio.

10

La eficacia in vivo del G1A₁ en ratones infectados con 39 DL₅₀ de Klebsiella pneumoniae AD se encuentra en la Tabla IV.

TABLA IV

<u>Antibiótico</u>	<u>Vía</u>	<u>DE₅₀, mg/kg/dosis</u>
G1A ₁	i.p. x 2	17
	s.c. x 2	32

15

El compuesto G1A₁ no manifiesta toxicidad aguda (determinada durante 120 horas después de una inyección intraperitoneal) a la dosis de 2 g/kg, que es la más alta ensayada.

20

Un método preferido de recuperación de G1A₁ y G1A₂ purificados consiste en pasar una solución de los antibióticos, tal como el caldo de fermentación filtrado, cuyo pH se ha ajustado entre 5 y 8,5, a través de una columna que contiene una resina cambiadora de catión del tipo ácido carboxílico metacrílico en un ciclo mixto de sodio e hidrógeno (IRC-50). El adsorbato resultante se eluye después con un eluyente adecuado como NH₄OH 2 N. Los eluatos se recogen en fracciones, cuya magnitud depende del tamaño de la columna empleada. Puede purificarse mejor mediante una se-

25

30

1 cuencia de procedimientos que implican los siguientes me-
dios cromatográficos: readsorción y elución de una columna
rellena de IRC-50, seguido de cromatografía en una resina
5 cambiadora de anión del tipo de poliestireno-trimetilamonio
v.g. Dowex 1 x 2 en el ciclo hidróxido, eluyendo con agua
destilada. Las fracciones se exploran mediante la reacción
coloreada con ninhidrina y bioactividad utilizando E. coli
(ATCC 9637) como organismo de ensayo. Las fracciones que
10 contienen actividad antibiótica se liofilizan y el residuo
se cromatografía en gel de sílice y se eluye con una solu-
ción de metanol/cloroformo/hidróxido amónico. Las fraccio-
nes se exploran mediante la reacción coloreada con ninhi-
drina y la bioactividad de los eluatos se mide analizando
el eluato con E. coli (ATCC 9637) como organismo de ensayo
15 El eluato está constituido por dos fracciones correspon-
dientes a los antibióticos G1A₁ y G1A₂.

Los ejemplos que siguen ilustran los métodos median-
te los cuales pueden obtenerse los productos de esta inven-
ción. Sin embargo, los ejemplos son ilustrativos solamente
20 y resultará evidente al que posea la experiencia habitual
en este campo que esta invención incluye los productos fun-
cionalmente equivalentes y los métodos para su preparación.
Por lo tanto, cualquier modificación de los procedimientos
aquí descritos que dé lugar a la formación de un producto
25 idéntico debe considerarse constitutiva de un método aná-
logo. Los procedimientos descritos son susceptibles de am-
plias variaciones y modificaciones y cualquier desviación
o ampliación mínima se considera al alcance del experto en
este campo y comprendida dentro de los límites de esta in-
30 vención.

EJEMPLO 1

Se abre asépticamente un cultivo liofilizado de Streptovercillium netropsis MA-4350 y el contenido se suspende en un tubo de ensayo que contiene 2 ml de Medio A de la siguiente composición:

Medio A

Extracto de levadura	10	g
Glucosa	10	g
Tampón de fosfato*	20	ml
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	g
Agua destilada	1000	ml

*

Tampón de fosfato

KH ₂ PO ₄	91	g
Na ₂ HPO ₄	95	g
Agua destilada	1000	ml

pH 7,0

Se utilizan 0,1 ml del Medio A inoculado para inocular 2 ml de Medio A en un tubo de 18 ml. El tubo se incuba en un sacudidor rotatorio a 220 rpm durante 96 horas, a una temperatura constante de 28°C. Se extienden 0,5 ml del cultivo desarrollado sobre la superficie de una placa Petri de 85 ml de diámetro que contiene 15 ml de Medio B de la siguiente composición.

Medio B

Extracto de carne	3	g
NZ-amina	10	g
Dextrosa	15	g
Ardamine	1	g
NaCl	2,5	g
CaCO ₃	5	g

1	MgSO ₄ ·7H ₂ O	50	mg
	Agar-agar	20	g
	Agua destilada	1000	ml
	pH 6,5.		

5 Los tubos inclinados inoculados se dejan crecer siete días a 28°C. Se transfieren 4 ml del cultivo del tubo inclinado a un Erlenmeyer de 250 ml, con tabiques, que contiene 50 ml de Medio A de la siguiente composición:

Medio A

10	Ardaminé	10	g
	Glucosa	10	g
	Tampón de fosfato*	2,0	ml
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	50	mg
	Agua destilada	1000	ml
15	pH 6,5		

*

Tampón de fosfato

	KH ₂ PO ₄	91	g
	NH ₂ HPO ₄	95	g
20	Agua destilada	1000	ml
	pH 7,0		

25 El matraz se incuba en un sacudidor rotatorio a 160 rpm a 28°C, durante 72 horas. Se agregan 10 ml de este cultivo a un Erlenmeyer de 2 litros provisto de tabiques, que contiene 500 ml de Medio A. El matraz se incuba en un sacudidor rotatorio a 160 rpm a 28°C, durante 48 horas. Este cultivo se agrega a 160 litros de Medio B de la siguiente composición:

30

1

Medio B

Levadura autolizada, tipo pH 10 g
Dextrosa 10 g
MgSO₄·7H₂O 50 mg
KH₂PO₄ 0,18 g
Na₂HPO₄ 0,188 g
Agua destilada 1000 ml
pH 6,5

5

10

conteniendo hasta 0,1 % de poliglicol 2000 en un fermentador de acero inoxidable de 189 litros. Este tanque opera a 28°C utilizando una velocidad de agitación de 150 rpm y un caudal de aire de 3 pies³/minuto (81 litros/minuto) durante 48 horas. Se determinan el pH y los perfiles de dextrosa, que son los siguientes:

15

<u>Edad, horas</u>	<u>0</u>	<u>12</u>	<u>24</u>	<u>36</u>	<u>48</u>
pH	6,4	6,6	6,3	7,0	7,4
Dextrosa, mg/ml	9,4	9,1	4,1	1,0	-

Se añaden 43 litros del cultivo de 48 horas a 467 litros de Medio C de la siguiente composición:

20

Medio C

NZ-amina 2,5 g
Extracto de carne (Difco) 1,0 g
NaCl 5,0 g
Harina de soja 10,0 g
Solubles de destilería 2,0 g
Licor de infusión de maíz 5,0 g
Dextrosa 20,0 g
K₂HPO₄ 2,0 g
Agua destilada 1000 ml
pH ajustado a 7,0

25

30

1 que contiene hasta 0,1 % de poliglicol 2000 en un fermentador de acero inoxidable de 756 litros. Este tanque opera a 28°C empleando un caudal de aire de 10 pies³ (270 litros) por minuto y una velocidad de agitación de 130 rpm durante 5 96 horas. Se obtienen el pH y los perfiles de dextrosa que son los siguientes:

<u>Edad, horas</u>	<u>0</u>	<u>12</u>	<u>24</u>	<u>36</u>	<u>48</u>	<u>60</u>	<u>72</u>	<u>84</u>	<u>96</u>
pH	6,6	6,2	6,8	7,1	7,2	7,4	7,7	7,9	-
Dextrosa, mg/ml	18,0	13,8	5,8	2,2	0,9	0	-	-	-

10 El caldo completo resultante a pH 8,0 se centrifuga para obtener un filtrado transparente. La torta del filtro se lava con 25 galones (94,5 litros) de agua desionizada y las aguas de lavado se combinan con el filtrado. El filtrado se trata con Super-Cel y el pH se ajusta a 6,5-7,0 con 15 ácido sulfúrico 6 N. El caldo a pH ajustado se filtra a través de un filtro prensa de 30 pulgadas (75 cm). La torta del filtro se lava con agua desionizada hasta que las aguas de lavado son transparentes. Las aguas de lavado se combinan con el caldo filtrado.

20 El caldo filtrado se pasa a razón de 6 galones/minuto (22,7 litros/minuto) a través de una columna de 18 pulgadas (45 cm) rellena con 60 galones (227 litros) de resina Amberlite IRC-50 especialmente tamponada, que contiene un miliequivalente de Na⁺/ml de volumen de columna. La resina 25 IRC-50 tamponada se prepara de acuerdo con las siguientes etapas:

1. Se lavan 60 galones (227 litros) de resina Amberlite IRC-50 con agua para separar los finos y el agua se 30 decanta.

1 2. A la resina lavada se agregan 1071 litros de agua destilada y 130 kg de hidróxido sódico en lentejas. Después de agitar la resina durante 2 horas, se decanta y se lava cinco veces con agua por decantación.

5 3. La resina lavada se suspende en 1071 litros de agua. A la suspensión se agregan 300 litros de ácido clorhídrico concentrado. La suspensión se agita durante 2 horas y se lavó cinco veces por decantación con agua.

10 4. Se mide el volumen de la resina húmeda y a la misma se añaden 1071 litros de agua y 40 g de hidróxido sódico/litro de resina. La resina se agita durante 2 horas. El pH de la resina es $7,0 \pm 0,2$.

15 5. Se filtra la resina y se almacena hasta su uso. La columna que contiene los antibióticos se lava con 120 galones (454 litros) de agua desionizada a un caudal de 6 galones (22,7 litros) por minuto y los antibióticos adsorbidos se eluyen con 350 galones (1325 litros) de NH_4OH 1 N a un caudal de 5 galones (18,9 litros) por minuto. El eluato se concentra a vacío hasta 30 galones (113,6 litros),
20 manteniendo la temperatura por debajo de 30°C . El pH del eluato concentrado se ajusta a 6,5 con H_2SO_4 6 N y el eluato a pH ajustado se filtra por un filtro de 18 pulgadas (45 cm) a través de una capa de Super-Cel para separar la materia insoluble.

25 La solución filtrada, con un volumen de 33 galones (125 litros), se carga a razón de 0,5 galones (1,9 litros) por minuto sobre 10 galones (37,8 litros) de resina IRC-50 especialmente tamponada, donde esta última se prepara como se ha descrito antes en este ejemplo para la primera columna de resina IRC-50. La columna se lava con 30 galones
30

1 (113,6 litros) de agua desionizada a un caudal de 0,5 galones (1,9 litros) por minuto y se eluye lentamente con 35 galones (132,5 litros) de hidróxido amónico 1 N. Se recoge una sola fracción de 35 galones (132,5 litros) y se concentra a vacío hasta un volumen de 2 galones (7,56 litros) mientras se mantiene la temperatura por debajo de 35°C.

5 El eluato concentrado de la segunda columna de IRC-50 se adsorbe en una columna de 9 pulgadas (22,5 cm) rellena con 8 galones (30,3 litros) de resina Dowex 1 x 2 en el ciclo OH⁻. La resina Dowex 1 x 2 se prepara haciendo pasar 1000 litros de hidróxido sódico al 5 % por una columna de 10 galones (37,8 litros) de resina, a un caudal de 1 galón/minuto (3,78 litros/minuto). La columna se lava con agua hasta que el pH de las aguas de lavado es 8,0. La capa superior de media pulgada (12,7 mm) de la resina se desprecia antes de utilizarla.

15 La columna de Dowex 1 x 2 se eluye con agua desionizada a un caudal de 1 litro/minuto y se recoge una fracción de 5 galones (18,9 litros), 47 fracciones de 1 galón (3,78 litros) y 4 fracciones de 5 galones (18,9 litros). Se combinan las fracciones 14 a 24 y se concentran hasta 6 litros mientras se mantiene la temperatura por debajo de 25°C.

20 Estos 6 litros se concentran de nuevo a vacío, manteniendo la temperatura por debajo de 35°C, hasta un volumen de 1060 ml. El análisis por el método de difusión en disco frente a Bacillus subtilis ATCC 6633, empleando G1A₁ puro como patrón indica una actividad equivalente a 63,6 g de G1A₁. Los 1060 ml se liofilizan para dar un peso seco de 68,7 g de una mezcla que contiene G1A₁ y G1A₂.

30

1 El bioanálisis frente a Bacillus subtilis ATCC 6633
por el método de difusión en disco indica que el producto
tiene una actividad equivalente a la del G1A₁ del 80 % de
pureza aproximadamente. El ensayo de difusión en disco se
5 realiza prácticamente de la misma forma descrita para el
método de difusión en disco empleando E. coli ATCC 9637,
descrito en la sección titulada Bioanálisis donde se utiliza
como patrón G1A₁ puro.

EJEMPLO 3

Despropionil-G1A₁

10 Se prepara una solución de G1A₁ disolviendo 21,7 mg
de G1A₁ en unos 0,1 ml de hidrazina al 97 %.

15 La solución se calienta en un tubo herméticamente
cerrado a 100°C durante 16 horas y después se concentra a
sequedad a presión reducida. El residuo restante después
de concentrar se recoge en un volumen de metanol alrededor
de 10 veces mayor que el del residuo y de nuevo se concen-
tra a sequedad para eliminar la hidrazina residual. Otra
vez se recoge el residuo en 50 ml de metanol. A esta solu-
20 ción metanólica se agregan 60 ml de éter, produciéndose un
precipitado. El precipitado se recoge y se lava con una mez-
cla de metanol/éter 50:50. Se recoge el precipitado y se
identifica como despropionil-G1A₁ por cromatografía en ca-
pa fina y análisis espectral de masas.

25 Se obtiene un espectro de masas del compuesto en
forma de derivado trimetilsilílico. El espectro muestra
varios fragmentos típicos del despropionil-G1A₁:

m/e	450
m/e	306
m/e	623

30

EJEMPLO 4

Preparación de 4-amino-3-O-(4-amino-4-desoxi- α -D-glucopiranosil)-1-benciloxicarbonilamino-1,4-didesoxi-D-glucitol-(N₁-benciloxicarbonil-despropionil-G1A₁)

Una solución de 30 g (0,12 moles) de N-(benciloxicarboniloxi)succinimida en 100 ml de dimetilformamida se agrega gota a gota sobre 35 g (0,103 moles) de despropionil-G1A₁ en 200 ml de agua y 200 ml de 2-propanol a -10°C. La mezcla se mantiene en un frigorífico durante la noche y después se evapora a sequedad. El producto deseado se aísla por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyendo con cloroformo/metanol/agua 60:40:10); rendimiento: 32 g (66 %). Por cristalización en metanol-acetato de etilo se obtiene el material puro, p.f. 154,5-155,5°C, $[\alpha]_D^{25} + 67,2^\circ$ (c = 1,0, metanol). Una solución en D₂O del producto presenta picos de rmp a δ 2,67 (singlete de 5 protones, -CH₂Ph), 4,87 (H-1) y 4,97 (-CH₂-Ph). La composición elemental calculada para la fórmula empírica C₂₀H₃₃N₃O₁₀ es:

Calculado: C, 50,52; H, 7,0; N, 8,34

Encontrado: C, 50,15; H, 7,33; N, 8,63.

EJEMPLO 5

Preparación de 1,4-diamino-3-O-(4-desoxi-4-propionamido- α -D-glucopiranosil)-1,4-didesoxi-D-glucitol(G1A₁) por acilación de despropionil-G1A₁

Una solución de 0,43 milimoles de cloruro de propionilo en 0,5 ml de dimetilformamida se agrega gota a gota a una solución agitada de 200 mg (0,42 milimoles) de N₁-benciloxicarbonil-despropionil-G1A₁ en 0,5 ml de agua y 0,5 ml de dimetilformamida. El progreso de la reacción se sigue por cromatografía en capa fina empleando cloroformo/metanol/

1 agua 60:40:10 como disolvente desarrollador. Al cabo de
1 hora, la mezcla de reacción se concentra a sequedad y los
dos componentes principales de la mezcla de reacción se se-
paran por cromatografía en capa gruesa. El componente prin-
5 cipal de movimiento lento contiene N_1 -benciloxicarbonil-
 N_4 -propionamido-despropionil-G1A₁. El componente principal
de movimiento rápido que contiene N_1 -benciloxicarbonil-G1A₁
se eluye de la placa y se concentra hasta formar un jarabe.
Por hidrogenólisis en dioxano acuoso sobre paladio al 10 %
10 en carbón se separa el grupo de bloqueo N_1 -benciloxicarbo-
nilo. El material desbloqueado se purifica por cromatogra-
fía en una columna rellena de Sephadex CM-25 en la forma
 NH_4^+ . La columna se eluye con un gradiente lineal de hi-
dróxido amónico 0,25 N para dar G1A₁.

15 El G1A₁ sintetizado es idéntico en todos los aspek-
tos al producto natural obtenido mediante la fermentación
descrita en el Ejemplo 1: $[\alpha]_D^{25} + 87,1^\circ$ (c = 1,0, agua).
Una solución del producto en D₂O presenta los siguientes
picos de rmp:

20 γ 4,83 (d, J_{1,2} 2,0 Hz, H-1), 7,70 (q, J 7,0 Hz,
CH₃-CH₂-O-), 8,89 (t, J 7,0 Hz, CH₃-CH₂-O-).

El espectro de masas presenta los siguientes picos
m/e: 319, 218 y 162. La composición elemental calculada pa-
ra la fórmula empírica C₁₅H₃₁N₃O₉ es:

25 Calculado : C, 45,33; H, 7,86; N, 10,57

Encontrado: C, 45,15; H, 8,21; N, 10,34.

El G1A₁ sintetizado se caracteriza además en forma
de su octaacetato, 1,4-diacetamido-2,5,6-tri-O-acetil-3-
O-(2,3,6-tri-O-acetil-4-desoxi-4-propionamido- α -D-glucopi-
30 ranosil)-1,4-didesoxi-D-glucitol, p.f. 197-198°C,

1 $[\alpha]_D^{25} + 68,5^\circ$ ($c = 1,01$, cloroformo); R_f 0,52 (cloroformo/metanol 90:10). Una solución del octaacetato en $CDCl_3$ presenta los siguientes picos de rmp:

5 γ 3,20 (ancho, N_4H), 3,65 (ancho, N_4H), 3,86 (ancho, N_1H), 4,97 (d, $J_{1,2} = 3,5$ Hz), 7,80 (q, J 7,0 Hz, $CH_3-CH_2-C(=O)-$), 7,87, 7,90, 7,93 (singlete de 6 protones), 7,45, 7,99 (singlete de 6 protones), 8,04 (24 protones, NAc y OAc), 8,85 (t, J 7,0 Hz, $CH_3CH_2-C(=O)-$).

10 El espectro de masas presenta los siguientes picos: m/e 734 ($M + 1$)⁺, 588, 529 y 344. La composición elemental calculada para la fórmula empírica $C_{31}H_{47}N_3O_{17}$ es:

Calculado : C, 50,75; H, 6,46; N, 5,73

Encontrado: C, 50,83; H, 6,29; N, 5,52

EJEMPLO 6

15 Preparación de 3-O-(4-acetamido-4-desoxi- α -D-glucopiranosil)-1,4-diamino-1,4-didesoxi-D-glucitol(G1A₂) por acilación de despropionil-G1A₁

20 Una solución de 0,43 milimoles de cloruro de acetilo en 0,5 ml de dimetilformamida se agrega gota a gota a una solución agitada de 200 mg (0,42 milimoles) de N_1 -benciloxicarbonil-despropionil-G1A₁ en 0,5 ml de agua y 0,5 ml de dimetilformamida. El progreso de la reacción se sigue por cromatografía en capa fina empleando cloroformo/metanol/agua 60:40:10 como disolvente desarrollador. Al ca
25 bo de 1 hora, la mezcla de reacción se concentra a sequedad y los dos componentes principales de la mezcla de reacción se separan por cromatografía en capa gruesa. El componente principal de movimiento lento contiene N_1 -benciloxicarbonil- N_4 -acetamido-despropionil-G1A₁. El componente principal de movimiento rápido que contiene N_1 -benciloxicarbonil-

30

1 GLA_2 se eluye de la placa y se concentra hasta formar un
jarabe. Por hidrogenolisis en dioxano acuoso sobre paladio
al 10 % en carbón se separa el grupo de bloqueo N_1 -bencil-
oxicarbonilo. El material desbloqueado se purifica por cro-
5 matografía en una columna rellena de Sephadex CM-25 en la
forma NH_4^+ . La columna se eluye con un gradiente lineal de
hidróxilo amónico 0,25 N para dar GLA_2 .

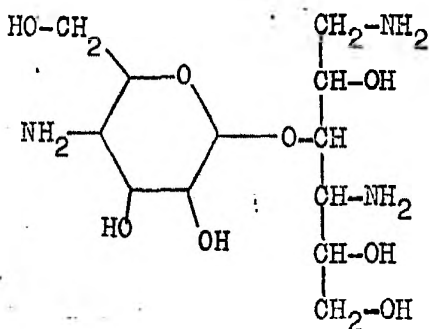
El GLA_2 se caracteriza como el peracetato, p.f.
187-189°C.

10 En resumen, la Patente de Invención que se solici-
ta deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento para la preparación de nue-
vos antibióticos aminoglicosidos de fórmula:

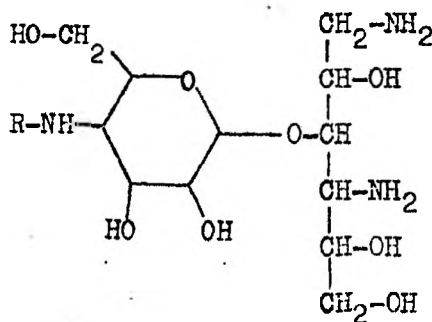
15



20

cuyo procedimiento comprende hacer reaccionar un compuesto
de fórmula:

25



[Handwritten signature]

30

donde R es ácido, con hidrazina.

1

2. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE NUEVOS ANTEBIOTICOS AMINOGLICOSIDOS.

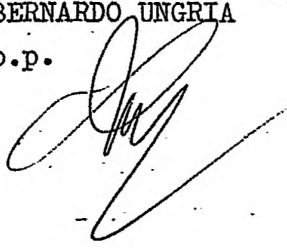
5

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente Memoria descriptiva que consta de veintiocho páginas mecanografiadas.

Madrid, 9 de Marzo de 1978

BERNARDO UNGRIA

p.p.



10

15

20

25



30