



NORGE

[NO]

**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

[B] (11) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 148558

[C] (45) PATENT MEDDELT

2. NOV. 1983

(51) Int. Cl.³ C 12 P 19/52, C 07 H 15/22,

// (C 12 R 1/54, 1/59)

(21) Patentsøknad nr. 770852

(22) Inngitt 10.03.77

(24) Løpedag 10.03.77

(41) Alment tilgjengelig fra 13.09.77

(44) Søknaden utlagt, utlegningsskrift utgitt 25.07.83

(30) Prioritet begjært 11.03.76, Storbritannia, nr. 09859/76

(54) Oppfinnelsens benevnelse Analogifremgangsmåte for fremstilling av amino-glykosid-aminocyklitol-derivater.

(71)(73) Søker/Patenthaver SANOFI,
40, Avenue George V,
F-75008 Paris,
Frankrike.

(72) Oppfinner STEPHAN GERO, Orsay,
DANIEL MERCIER, Gif-Sur-Yvette,
ALAIN OLESKER, Gif-Sur-Yvette,
ANDRE CIER, Neuilly-sur-Seine,
Frankrike.

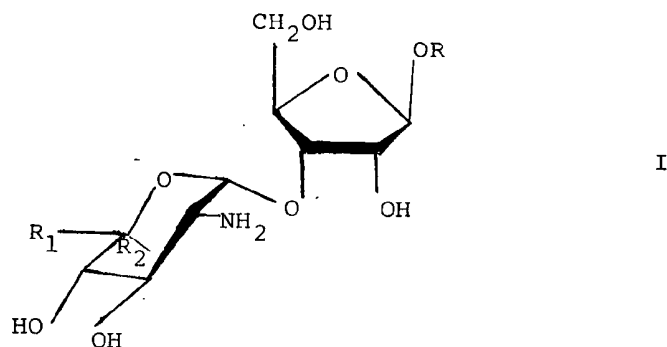
(74) Fullmektig Cand.mag. Johan H. Gørbitz,
Bryn & Aarflot A/S, Oslo.

(56) Anførte publikasjoner Litt.: P.G. Sammes, "Topics in Antibiotic Chemistry", Vol. 1 (1977), Ellis Horwood Limited, Chichester, p. 26-30 og 85.
The Journal of Organic Chemistry, Vol. 40 (1975), p. 456-461.

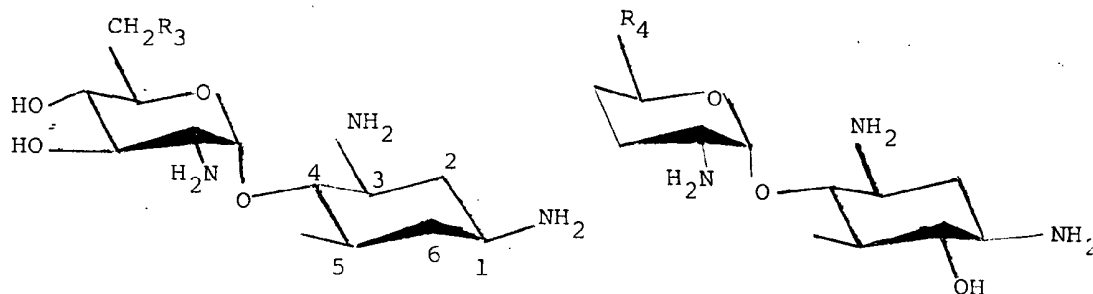
148558

Denne oppfinnelse angår en analogifremgangsmåte for fremstilling av nye aminoglykosid-aminocyklitol-derivater som har farmakologisk aktivitet.

Aminoglykosid-aminocyklitol-derivatene som fremstilles kan angis med den generelle formel:



hvor R_1 og R_2 , som er forskjellige, betyr hydrogen eller CH_2NH_2 og R er valgt fra gruppen bestående av:



A=

og B=

148558



hvor R_3 betyr NH_2 eller OH og R_4 betyr $CHNH_2$ eller $CHNHCH_3$, hvor R_5 betyr hydrogen eller metyl.

De farmasøytisk akseptable syreaddisjonssalter av disse derivater er også inkludert innen omfanget av oppfinnelsen.

Forbindelsene med formel I kan foreligge i form av epimerer og blandinger av nevnte epimerer.

Slike epimerer og blandinger derav er inkludert innen omfanget av foreliggende oppfinnelse.

Forbindelsene som fremstilles i henhold til foreliggende oppfinnelse, har kjemiske strukturer som er av lignende art som strukturene til neomycin eller paromomycin. Av denne årsak vil forbindelsene med formel I heretter bli betegnet som neomycin- eller paromomycin-derivater så som angitt i det følgende:

6-deoksyneomycin B når R_1 betyr hydrogen, R_2 betyr CH_2NH_2 og R betyr gruppen A hvor R_3 betyr NH_2 .

6-deoksyneomycin C når R_1 betyr CH_2NH_2 , R_2 betyr hydrogen og R betyr gruppen A hvor R_3 betyr NH_2 .

Blandingen av disse to epimerer, så som oppnådd ved fremgangsmåten beskrevet her, vil heretter bli referert til som 6-deoksyneomycin.

6-deoksyparomomycin I når R_1 betyr hydrogen, R_2 betyr CH_2NH_2 og R betyr gruppen A hvor R_3 betyr OH .

6-deoksyparomomycin II når R_1 betyr CH_2NH_2 , R_2 betyr hydrogen og R betyr gruppen A hvor R_3 betyr OH .

Blandingen av disse to epimerer, så som oppnådd ved fremgangsmåten beskrevet her, vil heretter bli referert til som 6-deoksyparomomycin.

Blandingen av 3',4'-dideoksyneomycin og dets derivater betegner den useparate sammensetning av forbindelser hvor R_1 og R_2 , som er forskjellige, betyr hydrogen eller CH_2NH_2 og R betyr gruppen B, og nevnte blanding erholdes ved fremgangsmåten beskrevet nedenfor.

"Neomycin" vil heretter bli anvendt for å betegne blandingen av neomycin B og neomycin C som oppnås ved dyrking av *Streptomyces fradiae*.

På samme måte vil "paromomycin" heretter anvendes for å betegne blandingen av paromomycin I og paromomycin II som oppnås ved dyrking av *Streptomyces rimosus* forma *paromomycinus*.

Et farmasøytisk- eller veterinærmedisinsk preparat kan som vesentlig aktiv ingrediens inneholde minst én av epimerene med formel I eller et farmasøytisk akseptabelt syreaddisjonssalt derav eller en blanding av nevnte epimerer eller deres farmasøytisk akseptable syreaddisjonssalter, i kombinasjon med en farmasøytisk bærer eller et inert formgivningsmiddel.

Farmasøytiske- eller veterinærmedisinske preparater kan fremstilles ved å blande minst én av epimerene med formel I eller et farmasøytisk akseptabelt syreaddisjonssalt derav eller en blanding av nevnte epimerer eller av deres farmasøytisk akseptable syreaddisjonssalter med en passende bærer eller et inert formgivningsmiddel.

Aminoglykosid-aminocyklitol-derivatene som fremstilles i henhold til oppfinnelsen, som senere vil bli demonstrert, er blitt funnet å gi verdifull antibiotisk aktivitet som er passende for å gjøre dem nyttige ved behandling av sykdommer som er forårsaket av vekst av patogene bakterier som f.eks.: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Klebsiella edwardsii*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*.

De nye forbindelser kan anvendes for å inhibere vekst av patogene bakterier hos en vert som har behov for slik inhibering, og for dette formål administreres til nevnte vert minst én av epimerene med formel I eller et farmasøytisk akseptabelt syreaddisjonssalt derav eller en blanding av nevnte epimerer eller deres farmasøytisk akseptable syreaddisjonssalter.

Det er i noen år blitt iaktatt at visse bakteriestammer har utviklet en motstandsevne mot de fleste kommersialiserte antibiotika med det resultat at den terapeutiske verdi av disse antibiotika er blitt redusert med mer enn halvparten, og visse bakterier er nå endog sterke nok til å motstå alle de kjente antibiotika.

Det er således meget nødvendig og av generell interesse å skape nye antibiotika som er i stand til å ødelegge organismer som er blitt motstandsdyktig mot de antibiotika som nå anvendes.

Det er kjent at denne inaktivering av antibiotika skyldes ødeleggelse eller forandring av antibiotika-molekylet med

148558

enzymer som angriper dette molekyl på visse sårbare punkter.

Spesielt er aminoglykosid-aminocyklitol-antibiotikaene, som blir anvendt i økende grad, tilbøyelig til å bli inaktivert av motstandsdyktige bakterier. Den motstandsevne som er utviklet av visse organismer som vanligvis er mottagelige for disse aminoglykosid-aminocyklitol-antibiotikaene, skyldes fosforylerende, acylerende eller adenylerende^{yl} enzymer som angriper de frie hydroksyl- og aminogru^{yl}pper i antibiotikumet (Ann. Rev. Biochem., 42, 47, 1973).

Fjerning av hydroksylgruppene vil gjøre antibiotikumet immunt overfor inaktivering på disse steder. Det er derfor ønskelig å fremstille antibiotika med mindre uvesentlige hydroksyl- og aminogru^{yl}pper.

Under forløpet av forsøk utført med forbindelsene fremstilt i henhold til oppfinnelsen, ble blandingen av 3',4'-dideoksyneomycin og dets derivater funnet å gi klar antibiotisk aktivitet mot organismer som er motstandsdyktige mot andre aminoglykosid-aminocyklitol-antibiotika, og mer spesielt neomycin og gentamicin.

Det ble således demonstrert at blandingen av 3',4'-dideoksyneomycin og dets derivater er aktive mot *Escherichia coli* stammer som er kjent for å være motstandsdyktige mot gentamicin og neomycin ved innvirkning av henholdsvis det 2''-adenylylerende enzym og det 3'-fosforylerende enzym.

Av denne grunn er blandingen av 3',4'-dideoksyneomycin og dets derivater, referert til ovenfor, det antibiotikum dekket av formel I som er det foretrukne antibiotikum i henhold til oppfinnelsen.

Det er kjent fra U.S.-patentskrift nr. 3.669.838 at det kan dannes mutanter av mikroorganismer som er kjent for å danne antibiotika som inneholder en aminocyklitol-underenhet, så som f.eks. neomycin eller paromomycin, som mangler evnen til å biosyntetisere aminocyklitol-underenheten på grunn av en mangel ved aminocyklitol-veien slik at det ikke kan dannes noe antibiotika.

Slike aminocyklitol-negative mutanter har imidlertid evne til å utnytte et egnet aminocyklitol-molekyl når dette settes til næringsmediet slik at det kan bli dannet et antibiotikum.

Det er også kjent at denne teknikk kan nyttiggjøres ved innsettelse av et pseudodisakkarid i aminocyklitol-underenheten.

Fra resultatene som er omtalt i de eksisterende publikasjoner er det imidlertid ikke mulig å forutsi om en gitt diamino-

cyklitol eller et pseudodisakkarid vil bli inkorporert i et antibiotikum ved den forannevnte bio-omdannelseseteknikk.

Det er i virkeligheten beskrevet tallrike tilfeller i litteraturen hvor denne metode til å fremstille nye antibiotika har vist seg å være ineffektiv.

Den ovenfor beskrevne fremgangsmåte kan derfor ikke generaliseres for fremstilling av nye halv-syntetiske eller hel-syntetiske antibiotika.

Dette er f.eks. bekreftet i "The Journal of Antibiotics", Vol. XXVI, No. 10, s. 551-561 (1973), hvor det er gitt en beskrivelse av forsøk utført med 29 forskjellige aminocyklitoler på inkorporering i et antibiotikum ved metoden i det ovenfor siterte U.S.-patentskrift.

Blant de således testede 29 aminocyklitoler ble det funnet at bare streptamin og 2-epistreptamin ble inkorporert ved hjelp av de 2-deoksyestreptamin-negative (D^-) mutanter av *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces rimosus* forma *paromomycinus* og *Streptomyces kanamyceticus* anvendt for dette formål.

Det mislykkedes likeledes å inkorporere diaminocyklitolene sitert i fransk patentskrift nr. 2.203.808 i et antibiotikum ved anvendelse av de samme D^- mutanter av *S. fradiae* og av *S. rimosus* forma *paromomycinus* som ble benyttet i forannevnte referanse.

I "Biochemistry", Vol. 13, No. 25, s. 5073-5078 (1974), er det omtalt at det ikke ble oppnådd noen suksess når det ble gjort forsøk på å inkorporere de pseudodisakkarider som er kjent som neamin, paromamin eller 6-kanosaminido-2-deoksyestreptamin, ved anvendelse av D^- mutanter av *S. fradiae*, *S. rimosus* forma *paromomycin* og *S. kanamyceticus*.

På samme måte omtales i "The Journal of Antibiotics", Vol. XXVIII, Nr.8, s. 573-579 (1975), at gentaminer, som er pseudodisakkarider, ikke ble inkorporert i antibiotika ved anvendelse av en D^- mutant av *Micromonospora inyoensis*.

Det er også blitt funnet at 5-O- β D-ribopyranosyl-2,4-dideoksyestreptamin ikke er i stand til å danne antibiotika ved anvendelse av D^- mutanter av *S. fradiae* og av *S. rimosus* forma *paromomycinus* i samsvar med den forannevnte fremgangsmåte.

Tidligere publikasjoner har også vist at diaminocyklitoler eller pseudodisakkarider som er tilstede i allerede kjente

antibiotika, så som streptomycin, bluensomycin og hygromycin, ikke kan inkorporeres i antibiotika ved anvendelse av de ovenfor siterte mutanter.

Det er f.eks. omtalt i "The Journal of Antibiotics", Vol. XXVI, No. 10, sitert ovenfor, at bluensamin, streptidin, bluensidin, hyosamin og actinamin ikke inkorporeres i antibiotika ved D^- mutantene av *S. fradiae*, *S. rimosus* forma paromomycinus og *S. kanamyceticus* når disse mutanter blir anvendt for dette formål.

På lignende måte ble ikke neamin og paromamin, som man finner i henholdsvis neomycin og paromomycin, inkorporert i antibiotika ved anvendelse av en D^- mutant av *S. fradiae* ("Biochemistry": referanse sitert ovenfor).

Det har videre også blitt iakttatt at en diaminocyklitol eller et pseudodisakkarid, som kan inkorporeres i et antibiotikum ved anvendelse av en mutant-stamme i samsvar med fremgangsmåten i det ovenfor siterte U.S.-patentskrift, ikke nødvendigvis vil inkorporeres i et antibiotikum med en forskjellig mutant-stamme. Det er gitt eksempler i den forannevnte referanse fra "The Journal of Antibiotics", Vol. XXVI, No. 10, som viser at en D^- mutant av *S. rimosus* forma paromomycinus med 2-epistreptamin ikke danner noe som helst antibiotikum mens en D^- mutant av *S. fradiae* og av *S. kanamyceticus* er i stand til å inkorporere denne underenhet i antibiotika.

Videre tilveiebringer ikke den samme D^- mutant av *S. kanamyceticus* med streptamin noe som helst antibiotikum mens den samme D^- mutant av *S. fradiae* og av *S. rimosus* forma paromomycinus inkorporerer denne diaminocyklitol i antibiotika.

Med hensyn til neamin, så kan dette pseudodisakkarid tilveiebringe ribostamycin når en D^- mutant av *S. ribosidificus* blir anvendt, som angitt i "The Journal of Antibiotics", Vol. XXVI, No. 12, s. 784-785 (1973), mens neamin ikke er i stand til å bli inkorporert i et antibiotikum når det f.eks. anvendes en D^- mutant av *S. fradiae*.

Endelig har tidligere publikasjoner også vist at strukturen av et hypotetisk antibiotikum ikke i noe tilfelle kan forutsettes når en diaminocyklitol eller et pseudodisakkarid blir anvendt sammen med en mutant-stamme. Dette er klart vist i "The Journal of Antibiotics", Vol. XXVI, No. 12, sitert ovenfor, hvor det er omtalt at antibiotikaene oppnådd når en D^- mutant av *S. kanamyceticus*

blir anvendt sammen med 1-N-metyl-deoksystreptamin eller myo-inosol, 1,3-diamin, ikke er de "ventede produkter" men andre forbindelser. Likeledes tilveiebringer neamin og en D⁻ mutant av *M. inyoensis* sisomicin, men denne mutant sammen med paromamin, et forskjellig pseudodisakkarid, danner også sisomicin ("The Journal of Antibiotics", Vol. XXVIII, No. 8, sitert ovenfor).

Det har også blitt vist at en D⁻ mutant av *S. ribosidificus* i nærvær av neamin bare tilveiebringer ribostamycin, men ikke en analog av neomycin slik som man skulle vente ("The Journal of Antibiotics", Vol. XXVI, No. 12, sitert ovenfor).

Det er av det foregående klart at det ikke kan gjøres noen holdbar forutsigelse med hensyn til en mulig inkorporering av en spesiell diaminocyklitol eller et pseudodisakkarid i et antibiotikum ved anvendelse av en gitt mutant-stamme i samsvar med fremgangsmåten i det ovenfor siterte U.S.-patentskrift. Det er ikke i noe tilfelle mulig å forutsi om denne metode vil være holdbar eller hva som vil være den nøyaktige struktur av antibiotikumet som man håper å fremstille.

Derfor må den påstand i *J. Org. Chem.*, Vol.40, No.4, s. 456-461 (1975), at 2,4-dideoksystreptamin kan inkorporeres i neomyciner, paromomyciner og ribostamycin ved en bio-omdannelses-teknikk betraktes som ytterst uklar, ubestemt og fri for noe som helst rimelig og holdbart grunnlag.

Det er nå ganske uventet funnet, i samsvar med foreliggende oppfinnelse, at 2,4-dideoksystreptamin kan inkorporeres i nye antibiotika med D⁻ mutanter av *S. fradiae* og av *S. rimosus* forma paromomycinus og at en blanding av pseudodisakkarider, d.v.s. en blanding av gentaminer, også kan inkorporeres i nye antibiotika med en D⁻ mutant av *S. rimosus* forma paromomycinus.

Denne oppdagelse blir enda mer overraskende når man tar i betraktning at forsøk utført med 2,4-dideoksystreptamin i nærvær av en D⁻ mutant av *S. kanamyceticus* ikke frembragte noe som helst antibiotikum og at en D⁻ mutant av *S. fradiae* var ute av stand til å inkorporere den angjeldende blanding av gentaminer i et antibiotikum.

Alle resultatene oppnådd med 2,4-dideoksystreptamin og blandingen av gentaminer gjør oppfinnelsen fullstendig uventet i forhold til teknikkens stilling.

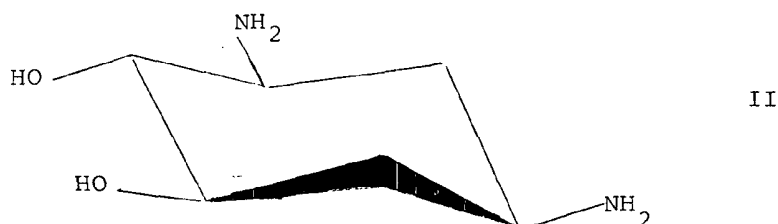
De nye forbindelser med formel I i henhold til oppfinnelsen fremstilles ved å dyrke den deoksystreptamin-negative

148558

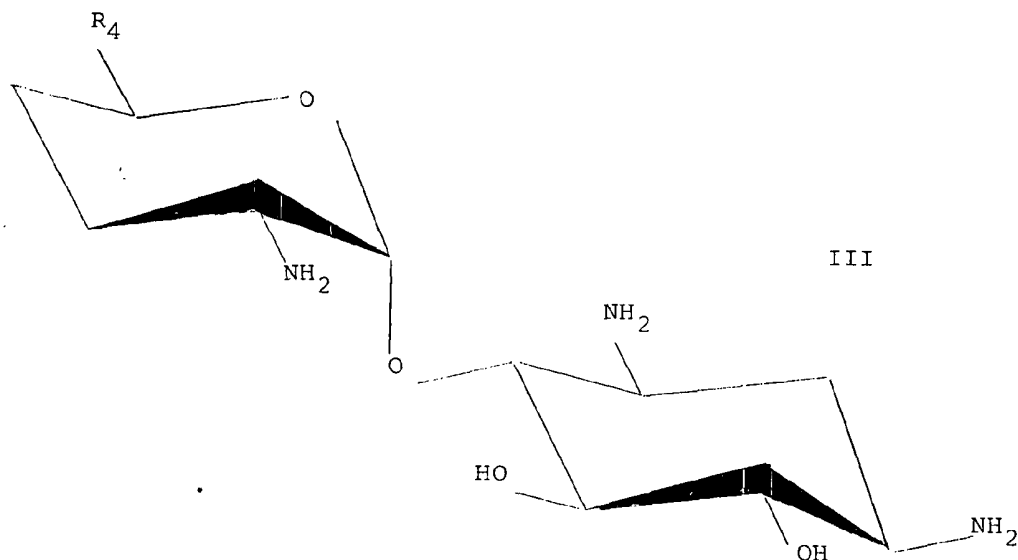
8

mutanten

a) *Streptomyces rimosus* forma *paromomycinus* ATCC 21484, i nærvær av 1D-(1, 3, 5/2)-1,5-diamino-2,3-cykloheksandiol eller 2,4-dideoksyestreptamin med formelen:



eller et syreaddisjonssalt derav, f.eks. et hydroklorid, eller i nærvær av en blanding av gentaminer med den generelle formel:



eller et syreaddisjonssalt derav, hvor R_4 har de samme betydninger som i gruppe B i formel I, eller

b) *D-Streptomyces fradiae* ATCC 21401 i nærvær av 2,4-dideoksyestreptamin med formel II eller et syreaddisjonssalt derav, i et medium som inneholder et oppløselig karbohydrat, en kilde for assimilerbart nitrogen og vesentlige mineral-salter, hvorefter den erholdte frie base eventuelt omsettes med en organisk eller uorganisk syre til et farmasøytisk akseptabelt syreaddisjonssalt, og/eller en erholdt blanding av forbindelser med formel I separeres.

Når den her beskrevne fremgangsmåte anvendes, er det erholdte antibiotikum i form av fri base, uten hensyn til om diaminocyklitolen med formel II eller blandingen av gentaminer med formel III er i form av fri base eller i form av et salt. Dersom det er ønsket å benytte det resulterende antibiotikum som et salt,

er det tilstrekkelig å omsette det med en egnet organisk eller uorganisk syre, f.eks. svovelsyre, for å oppnå et farmasøytisk akseptabelt syreaddisjonssalt.

De mikroorganismer som blir anvendt ved foreliggende oppfinnelse er D^- Streptomyces fradiae ATCC21401 og D^- Streptomyces rimosus forma paromomycinus ATCC21484, begge beskrevet i U.S.-patentskrift nr. 3.669.838: D^- Streptomyces fradiae ATCC21401 blir benyttet til å fremstille 6-deoksyneomycin i henhold til oppfinnelsen og D^- Streptomyces rimosus forma paromomycinus ATCC21484 blir benyttet ved fremstillingen av 6-deoksyparomomycinet og blandingen av 3',4'-dideoksyneomycin og dets derivater i henhold til oppfinnelsen.

I samsvar med kjent teknikk blir mikroorganismene dyrket i et næringsmedium med en passende pH-verdi og inneholdende f.eks. glukose, kaseinhydrolysat, $(NH_4)_2HPO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ og $CaCO_3$, og det blir så satt til et annet vekstmedium inneholdende diaminocyklitolen med formel II eller blandingen av gentaminer med formel III, begge i form av en fri base eller et syreaddisjonssalt, og f.eks. soyabønnemel, gjærekstrakt, NaCl, $CaCO_3$ og glukose, og igjen ved en passende pH-verdi. Kulturmediet blir inkubert ved en temperatur på ca. 28-30°C med risting og god lufting i minst 5 dager for å oppnå optimal produksjon av det ønskede 6-deoksyneomycin, 6-deoksyparomomycin eller av blandinger av 3',4'-dideoksyneomycin og dets derivater.

6-deoksyneomycin B og 6-deoksyneomycin C og 6-deoksyparomomycin I og 6-deoksyparomomycin II oppnås fra henholdsvis 6-deoksyneomycin og 6-deoksyparomomycin ved konvensjonelle fremgangsmåter, f.eks. ved å separere dem ved hjelp av papirkromatografi.

Isomerene som utgjør blandingen av 3',4'-dideoksyneomycin og dets derivater kan også separeres ved konvensjonelle fremgangsmåter.

Diaminocyklitolen med formel II er en kjent forbindelse som er beskrevet i britisk patentskrift nr. 1.445.675. Den kan oppnås ved å gå frem etter den metode som er beskrevet i forannevnte britiske patentskrift, nemlig ved i nærvær av en katalysator, f.eks. Raney's nikkel, å hydrogenere 1D-(1, 3, 5/2)-1,5-diazido-2,3-cykloheksandiol oppnådd fra 1L-1,5-di-O-tosyl-1,2, 5/3-cykloheksantetrol og natriumazid.

Med hensyn til blandingen av gentaminer med formel III,

så kan denne oppnås fra kommersielt gentamicinsulfat ved metoden til COOPER et al., beskrevet i J.Chem. Soc. (c) 1971, 960.

Som nevnt ovenfor har man funnet at aminoglykosid-aminocyklitol-derivatene fremstilt i henhold til oppfinnelsen gir verdi-
full antibiotisk aktivitet.

Denne antibakterielle aktivitet mot forskjellige test-organismer er belyst med de følgende data:

a) Antibakteriell aktivitet av 6-deoksyneomycin og 6-deoksy-paromomycin

Disse aminoglykosid-aminocyklitol-derivatene i henhold til oppfinnelsen ble testet med hensyn til antibiotisk aktivitet ved å tilsette målte mengder av den undersøkte forbindelse i sterilt vann til næringsagar.

Agaren, som inneholdt økende konsentrasjoner av forbindelsen som ble undersøkt, ble så hellet inn i petri-skåler, og til hver av disse ble det mekanisk med en multiinokulator tilført forskjellige organismer, som på forhånd var dyrket i et passende medium og lagret ved -20°C i en 1 til 1 blanding av vekstmedium og glyserol. Skålene ble inkubert ved 37°C i 14 timer og ble undersøkt med hensyn til vekst.

Den konsentrasjon av antibiotika som akkurat inhiberte vekst av bakteriene ble nedskrevet og referert til som "minimal inhiberende konsentrasjon" eller M.I.C.

De resultater som ble registrert ved denne test, er oppført i tabell I i sammenligning med resultatene for neomycin og paromomycin, begge i sulfatform.

Tallene som er angitt i tabellene I og II, svarer til mengden med fri base.

Tabell I

µg/ml som er nødvendig for å hindre vekst

Organisme (a)	neomycin	6-deoksy- neomycin	paromo- mycin	6-deoksy- paromo- mycin
<i>Escherichia coli</i> W3110 ATCC 27325	2,5	1,25	5,0	40
<i>Proteus mirabilis</i> NCIB 11355	5,0	5,0	1,25	20
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 9144	2,5	3,75	1,25	20
<i>Sarcina lutea</i>	2,5	2,5	5,0	40
<i>Klebsiella edwardsii</i>	7,5	10	2,5	40
<i>Shigella sonnei</i> C 631978 NCIB 11357	2,5	3,75	2,5	40
<i>Salmonella typhimurium</i> LT ₂ , ATCC 19585	5,0	5,0	2,5	40

(a) ATCC, American Type Culture Collection;

NCIB, National Collection of Industrial Bacteria (Storbritannia)

Disse resultater viser at fjerningen av hydroksylgruppen i 6-stillingen på aminocyklitolandelen av neomycin, som svarer til 6-deoksyneomycin, ikke gir noen betydelig forandring av den samlede antibakterielle aktivitet av neomycin. Det kan bemerkes at den antibakterielle aktivitet av 6-deoksyneomycin mot *Escherichia coli* W 3110 er bedre enn aktiviteten av neomycin.

b) Aktivitet av 6-deoksyneomycin B og 6-deoksyneomycin C

Den antibakterielle aktivitet av 6-deoksyneomycin B og 6-deoksyneomycin C ble testet ved den samme metode som den ovenfor beskrevne, ved anvendelse av D.S.T. agar som næringsmedium, og verdier for M.I.C. ble registrert ved sammenligning med neomycin og 6-deoksyneomycin:

Tabell II

Organisme	µg/ml som er nødvendig for å hindre vekst					
	neo- mycin	neo- mycin B	neo- mycin C	6-deoksy- neomycin	6-deoksy- neomycin B	6-deoksy- neomycin C
Escherichia coli Bristol NCIB 11351	0,62	0,62	80	2,5	2,5	5
Proteus mirabilis NCIB 11355	1,25	1,25	10	5	5	5
Staphylococcus aureus ATCC 9144	0,62	0,62	80	5	2,5	20
Salmonella typhimurium ATCC 19585	2,5	2,5	40	10	5	20

Av disse resultater kan det konkluderes at 6-deoksy-neomycin B er noe mindre kraftig enn neomycin B men at 6-deoksy-neomycin C er kraftigere enn neomycin C.

c) Aktivitet av blandingen av 3',4'-dideoksyneomycin og dets derivater

Den antibakterielle aktivitet av blandingen av 3',4'-dideoksyneomycin og dets derivater ble bestemt i samsvar med fremgangsmåten beskrevet nedenfor.

D⁻ Streptomyces rimosus forma paromomycinus ATCC 21484 ble inkubert ved 30°C på en næringsagar-plate inneholdende 50 µg/ml av en blanding av gentaminer med formel III. Etter 3 dager ble denne plate dekket med agar besådd med en testorganisme, og dannelsen av antibiotika ble vist ved en sone med inhibering rundt Streptomyces. Denne inhiberingssone ble målt og sammenlignet med sonen for en sammenligning som bestod av næringsagar alene.

Som en sammenligning ble det også utført en lignende test med 50 µg/ml med neamin som et supplement til næringsagar, i stedet for blandingen av gentaminer med formel III, og også ved anvendelse av D⁻ Streptomyces rimosus forma paromomycinus ATCC 21484. Det således dannede antibiotikum ble funnet å være neomycin.

De oppnådde resultater er angitt i den følgende tabell:

Tabell III

Organisme	Inhiberingssone (i mm) når nærings- agar er supplert med		
	Ingenting	Neamin	Blanding av gentaminer med formel III
Escherichia coli PT ₂	0	0	21
Escherichia coli ML 1629 NCIB 11354	0	0	25
Escherichia coli ML 1410 NCIB 11353	0	0	20
Escherichia coli JR NCIB 11352	0	0	25

Disse tall viser at blandingen av 3',4'-dideoksyneomycin og dets derivater i henhold til oppfinnelsen er aktive mot organismer som er motstandsdyktige mot neomycin. Det kan tillegges at organismen E.coli PT₂ også er motstandsdyktig mot gentamicin.

Det vil forstås at for terapeutisk anvendelse vil forbindelsene fremstilt i henhold til oppfinnelsen vanligvis bli administrert i form av et farmasøytisk eller veterinær-medisinsk preparat i en doserings-enhetsform som er passende for den anvendte administrasjonsmåte, idet preparatet som aktiv ingrediens omfatter minst én av forbindelsene fremstilt i henhold til oppfinnelsen sammen med en farmasøytisk bærer eller et inert formgivningsmiddel. For oral administrasjon kan preparatet ha form av, f.eks. en belagt eller ikke-belagt tablett, en hård- eller myk-gelatin kapsel, en suspensjon eller en sirup. Preparatet kan alternativt ha form av et suppositorium for rektal eller vaginal administrasjon, en løsning eller suspensjon for parenteral administrasjon eller en krem eller salve for topisk administrasjon.

De følgende eksempler illustrerer fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen:

Eksempel 1

Fremstilling av 6-deoksyneomycinbase og dens sulfat

a) 6-deoksyneomycin i fri baseform

I en kolbe ble D⁻ Streptomyces fradiae ATCC 21401 dyrket i 48 timer på det følgende medium som på forhånd var justert til en pH-verdi på 7,2-7,3:

148558

	g
Glukose	1
Kaseinhydrolysat	1
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1
$\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05
$\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,005
$\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,005
CaCO_3	1
Vann til 100 ml	

Denne kultur ble ristet og holdt ved 28°C under den angitte tidsperiode. En 10%-ig innpodning av kulturen ble så satt til det følgende vekstmedium som på forhånd var justert til en pH-verdi på 7,2-7,3:

	g
Glukose	1
Soyabønnemel	2,5
Gjærekstrakt	0,5
NaCl	0,5
CaCO_3	0,2
2,4-dideoksy-streptamindihydroklorid	0,025
Vann til 100 ml.	

Det ble inkubert kulturer i Erlenmeyer-kolber ved 28 til 30°C på en roterende rister og med god lufting.

Dannelsen av 6-deoksyneomycin begynte etter 2 dager og var optimal etter 5 dager.

Sammenligningskulturer som ikke inneholdt noe 2,4-dideoksy-streptamindihydroklorid, frembragte ikke noe som helst med 6-deoksyneomycin.

Kulturmediet ble så sentrifugert og væsken som fløt ovenpå ble helle gjennom en kolonne som inneholdt en svakt sur, karboksylisk (polymetakrylisk) type av kation-bytter-harpiks av middels porøsitet ("Amberlite" IRC-50, "Amberlite" er et registrert varemerke) i ammoniumform. Denne operasjon ble foretatt to ganger for å ekstrahere 6-deoksyneomycinet og uforandret 2,4-dideoksy-streptamindihydroklorid. Kolonnen ble vasket med vann og 6-deoksyneomycinet ble eluert med en 2 N ammoniumhydroksydløsning i vann. Eluatet ble konsentrert i vakuum på en roterende inndamper og ble

så satt til en Sephadex G-10 kolonne. Eluering med 0,1 M ammoniumhydroksydløsning ga 6-deoksyneomycin i de første fraksjoner og 2,4-dideoksyestreptamindihydroklorid i de etterfølgende fraksjoner.

Ved denne metode ble det dannet en mengde av 6-deoksyneomycin i fri baseform som representerte 83 enheter (1 enhet = 1 µg/ml neomycin) med aktivitet. Dette tilsvarer en inkorporering i det således oppnådde 6-deoksyneomycin på tilnærmet 22% av det opprinnelig anvendte 2,4-dideoksyestreptamindihydroklorid.

Dette representerer den maksimale aktivitet som ble oppnådd, og ytterligere inkubering resulterte ikke i noen økning av 6-deoksyneomycin.

Som en alternativ fremgangsmåte ble det urensede 6-deoksyneomycin renset ved papirkromatografi på Whatman No 3 MM papir med en 4/1 metanol/ammoniumhydroksydløsning. Beliggenheten av 6-deoksyneomycinet ble gjort synlig ved anvendelse av 0,25% natriumhypoklorit i vann, så absolutt etanol fulgt av 1% løselig stivelse og 1% kaliumjodid i vann med lufttørking mellom hver påføring.

Ved dette forsøk ble Rf-verdien for 6-deoksyneomycin funnet å være 0,30.

Det kan nevnes, for å sammenligne, at Rf-verdiene for neomycin, 2-deoksyestreptamin og 2,4-dideoksyestreptamin med samme system av løsningsmidler er:

	<u>Rf</u>
Neomycin	0,26
2-deoksyestreptamin	0,58
2,4-dideoksyestreptamin	0,62

b) 6-deoksyneomycinsulfat

6-deoksyneomycinet oppnådd som beskrevet ovenfor ble omdannet til dets sulfatsalt ved omsetning med en ekvivalent mengde med fortynnet svovelsyre.

$[\alpha]_D^{24}$ for 6-deoksyneomycinsulfat = $+43^{\circ}$ (c = 1,0, vann)

c) Struktur av 6-deoksyneomycin

Strukturen av den antibiotiske forbindelse med formel I i fri baseform som ble oppnådd ovenfor, ble bestemt ved sammenligning med det naturlige antibiotikum, neomycin, dannet når 2-deoksyestreptamin blir inkubert i et passende medium.

148558

Det forutsatte 6-deoksyneomycin blir heretter referert til som forbindelse X.

Metanolyse av både neomycin og forbindelse X med 10%-ig metanolisk hydrogenkloridløsning i 2 timer under tilbaketilgang ga to hovedprodukter, hvorav ett tilsvarer metylneobiosaminid og ble dannet fra begge forbindelser. Det andre produkt som heretter refereres til som Z, var forskjellig i de to antibiotika, idet Z-forbindelsen fra neomycin migrerte mindre enn Z-produktet fra forbindelse X ved den kromatografiske prøve ved anvendelse av en 4/1 metanol/ammoniumhydroksydløsning som eluerings-løsningsmiddel.

Bekreftelse på strukturen for hvert Z ble oppnådd ved massespektrometri av per-trimetyl-silyl-derivatene.

Selv om molekyllære ioner ikke ble oppnådd, så var spektrene av Z-forbindelsen fra neomycin og av Z-forbindelsen fra forbindelse X svært like, bortsett fra at to spisser fra spektret til den førstnevnte (m/e 343 og 460) var forskjøvet 88 masse-enheter lavere i den sistnevnte (m/e 255 og 372). Dette tilsvarer et tap av $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$ og erstatning med hydrogen.

Strukturen av Z fra neomycin tilsvarer således neamin og strukturen av Z fra forbindelse X tilsvarer 6-deoksyneamin.

Acetylering av begge Z-forbindelser i metanol fulgt av sur hydrolyse med en 3 N saltsyreløsning under tilbaketilgang i 10 timer, ga i hvert tilfelle to hovedprodukter. Ved papir-kromatografi viste det seg at ett av disse produkter var det samme i begge tilfeller, enten det ble oppnådd fra X utgått fra neomycin eller Z utgått fra forbindelse X, og det må antas å være 2,6-diamino-2,6-dideoksy-D-glukose. De andre to forbindelser viste seg å være kromatografisk identiske med 2-deoksystreptamin fra neamin og 2,4-dideoksystreptamin fra deoksyneamin.

Disse resultater fører til den konklusjon at forbindelse X tilsvarer 6-deoksyneomycin.

Eksempel 2

Separering av 6-deoksyneomycin til 6-deoksyneomycin B og 6-deoksyneomycin C

6-deoksyneomycinet som ble oppnådd ved å følge fremgangsmåten beskrevet i eksempel 1, ble separert til 6-deoksyneomycin B og 6-deoksyneomycin C ved papir-kromatografi ved anvendelse av en 3/16/6/1 blanding av tert-butanol/butanon/6,5 N ammoniumhydroksydløsning/metanol som løsningsmiddel.

6-deoksyneomycin B og 6-deoksyneomycin C ble påvist på

papiret ved anvendelse av den samme metode som beskrevet ovenfor.

Ved som løsningsmiddelsystem å anvende metanol og ammoniumhydroksyd i forholdet 4 til 1 på 3MM Whatman kromatograferingspapir ble Rf-verdiene for 6-deoksymycinene B og C bestemt i sammenligning med de tilsvarende epimerer av neomycin, og de følgende resultater ble oppnådd:

6-deoksyneomycin B	0,29
6-deoksyneomycin C	0,21
Neomycin B	0,25
Neomycin C	0,165

Eksempel 3

Fremstilling av 6-deoksyparomomycin og dets I og II epimerer

I en kolbe ble *D⁻Streptomyces rimosus* forma paromycinus ATCC 21484 dyrket i 2 til 3 dager på det følgende medium som på forhånd var justert til en pH-verdi på 7,5:

	g
Soyabønneemel	1
Kaseinhydrolysat	0,25
CaCO ₃	0,5
Glukose	1
NaCl	0,5
NH ₄ Cl	0,167
Vann til 100 ml	

Denne kultur ble ristet og holdt ved 28°C i den angitte tidsperiode. En 10%-ig innpodning av denne kultur ble så satt til et medium som var identisk med det ovenfor angitte, bortsett fra at det i tillegg inneholdt 0,025 g med 2,4-dideoksytreptamindihydroklorid.

Kulturer ble inkubert i Erlenmeyer-kolber ved 28°C til 30°C på en roterende raster med god utlufting.

De etterfølgende operasjoner ved fremstilling og rensing av 6-deoksyparomomycin var nøyaktig de samme som dem som er beskrevet i eksempel 1a ovenfor.

Rensing ved papirkromatografi under de samme forhold som dem som er beskrevet i det foregående eksempel 1, viste at Rf-verdien til 6-deoksyparomomycin var 0,30.

Det kan til sammenligning nevnes at Rf-verdien til paromycin ved en identisk kromatografisk prøve var 0,27.

Ved som løsningsmiddelsystem å anvende metanol og ammon-

148558

iumhydroksyd i forholdet 4 til 1 på 3MM Whatman kromatograferings-papir, ble Rf-verdiene til 6-deoksyparomomycinene I og II bestemt i sammenligning med for de tilsvarende epimerer av paromomycin, og følgende resultater ble oppnådd:

6-deoksyparomomycin I	0,34
6-deoksyparomomycin II	0,275
Paromomycin I	0,3
Paromomycin II	0,22

Eksempel 4

Fremstilling av blandingen av 3',4'-dideoksyneomycin og dets derivater

a) Blanding av gentaminer med formel III

En blanding av gentaminer med formel III ble først fremstilt fra kommersielt tilgjengelig gentamicin-sulfat. Dette salt ble først omdannet til dets frie base og inndampet for å oppnå en olje. En løsning av saltsyre i metanol, fremstilt ved å sette saltsyre til tørr metanol, ble satt til denne olje og den således oppnådde løsning ble tilbakeløpsbehandlet i 2 timer. Den metanoliske saltsyre ble fjernet under vakuum og den resulterende olje ble tatt opp i litt vann og ført gjennom en kolonne med "Amberlite" I.R.A. 400 for å tilveiebringe den frie base av de ønskede gentaminer. De forskjellige fraksjoner som således ble oppsamlet, ble inndampet til tørrhet og separert til metyl-garosaminid og blandede gentaminer ved kromatografering på silikagel ved anvendelse av en 1/1/1 metanol/kloroform/ammoniumhydroksydblanding som løsningsmiddel. Ved denne kromatografiske separering fremviste metyl-garosaminid en Rf-verdi på 0,8 og blandingen av gentaminer en Rf-verdi på 0,2.

b) Blanding av 3',4'-dideoksyneomycin og dets derivater

I en kolbe ble *D⁻ Streptomyces rimosus* forma paromomycinus ATCC 21484 dyrket i 2 til 3 dager på det følgende medium som på forhånd var justert til en pH-verdi på 7,5:

148558

	g
Soyabønnemel	1
Kaseinhydrolysat	0,25
CaCO ₃	0,5
Glukose	1
NaCl	0,5
NH ₄ Cl	0,167

Denne kultur ble ristet og holdt ved 28°C i den angitte tidsperiode. Det ble så satt en 10%-ig innpodning av denne kultur til et medium som var identisk med det ovenfor angitte, justert til pH 7,2, bortsett fra at det i tillegg inneholdt 50 µg av den tidligere oppnådde blanding av gentaminer.

Kulturer ble inkubert i Erlenmeyer-kolber ved 30°C på en roterende rister og med god utlufting i 5 dager. Den således oppnådde urensede blanding av 3',4'-dideoksyneomycin og dets derivater ble renset ved papirkromatografi på Whatman No 3MM papir utviklet med en 4/1 metanol/ammoniumhydroksydløsning. Beliggenheten av blandingen av 3',4'-dideoksyneomycin og dets derivater ble gjort synlig ved anvendelse av 0,25% natriumhypoklorit i vann, så absolutt alkohol fulgt av 1% løselig stivelse og 1% kaliumjodid i vann med lufttørking mellom hver tilsetning.

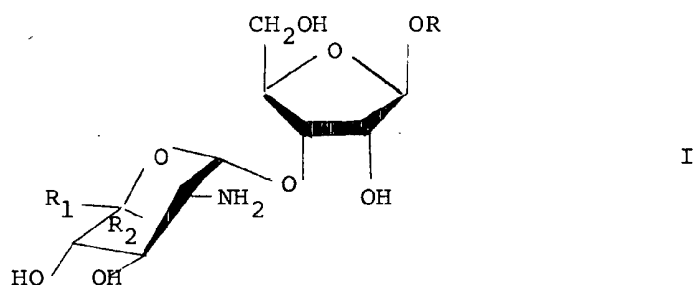
Ved denne prøve ble Rf-verdien til blandingen av 3',4'-dideoksyneomycin og dets derivater funnet å være 0,25.

Det kan til sammenligning nevnes at Rf-verdien for blandingen av gentaminer med formel III ved en identisk kromatografisk prøve var fra 0,5 til 0,7.

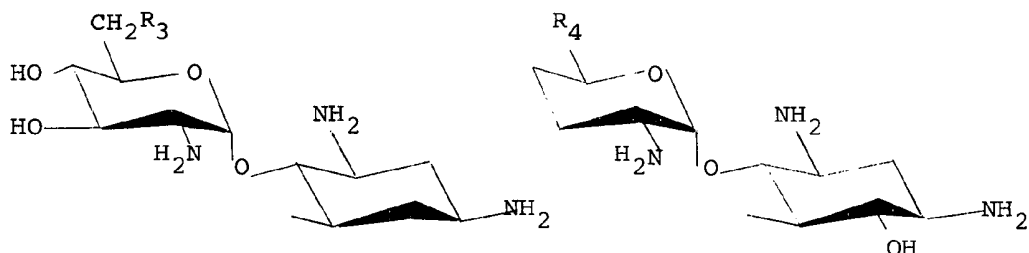
148558

P a t e n t k r a v

1. Analogifremgangsmåte for fremstilling av nye antibiotisk aktive aminoglykosid-aminocyklitol-derivater med den generelle formel



hvor R_1 og R_2 , som er forskjellige, betyr hydrogen eller CH_2NH_2 og R er valgt fra gruppen bestående av:



A =

og B =

hvor R_3 betyr NH_2 eller OH og R_4 betyr CH-NH_2 eller CH-NHCH_3 , hvor R_5 betyr hydrogen eller metyl, og farmasøytisk akseptable syreaddisjonssalter derav, k a r a k t e r i s e r t v e d

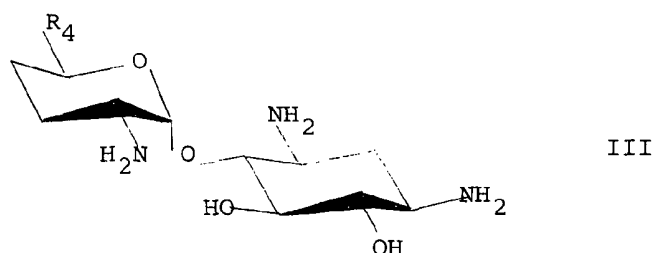
å dyrke den deoksyestreptamin-negative mutanten

a) D-Streptomyces rimosus forma paromomycinus ATCC 21484 i nærvær av 2,4-dideoksyestreptamin med formel:



148558

eller et syreaddisjonssalt derav, eller i nærvær av en blanding av gentaminer med den generelle formel



hvor R_4 betyr $\begin{array}{c} R_5 \\ | \\ CH-NH_2 \end{array}$ eller $\begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ CH-NHCH_3 \end{array}$, hvor R_5 betyr hydrogen eller metyl, eller et syreaddisjonssalt derav, eller

b) D-Streptomyces fradiae ATCC 21401 i nærvær av 2,4-dideoksyestreptamin med formel II eller et syreaddisjonssalt derav,

i et medium som inneholder et oppløselig karbohydrat, en kilde for assimilerbart nitrogen og vesentlige mineralsalter, hvorefter den erholdte frie base eventuelt omsettes med en organisk eller uorganisk syre til et farmasøytisk akseptabelt syreaddisjonssalt, og/eller en erholdt blanding av forbindelser med formel I separeres.

2. Fremgangsmåte i henhold til krav 1,

karakterisert ved at D⁻Streptomyces fradiae ATCC21401 dyrkes i nærvær av 2,4-dideoksyestreptamin eller et syreaddisjonssalt derav for å oppnå 6-deoksyneomycin i fri baseform.

3. Fremgangsmåte i henhold til krav 1,

karakterisert ved at D⁻Streptomyces fradiae ATCC21401 dyrkes i nærvær av 2,4-dideoksyestreptamin-dihydroklorid for å oppnå 6-deoksyneomycin i fri baseform.

4. Fremgangsmåte i henhold til krav 1,

karakterisert ved at D⁻Streptomyces rimosus forma paromomycinus ATCC21484 dyrkes i nærvær av blandingen av gentaminer for å oppnå blandingen av 3',4'-dideoksyneomycin og dets derivater i fri baseform.