

254061

254061



1959

PATENTE DE INVENCION

por 20 años

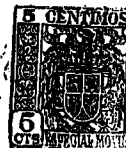
en España, a favor de Dr. Sumio OMEZAWA, de nacionalidad japonesa, domiciliado en TOYOTAMA, NERIMAKU, TOKYO (Japón) 25, Kita-4-chome, por:

"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE NUEVOS DERIVADOS DE ANTIBIOTICOS BASICOS, SOLUBLES EN EL AGUA".

-. - . - . -

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento, se refiere a un procedimiento para la preparación de nuevos derivados de antibióticos básicos solubles en el agua. La canamicina, las neomicinas y similares pertenecen al grupo de antibióticos básicos solubles en el agua que contienen varios grupos de aminos. Estos antibióticos son efectivos contra la tuberculosis M y tienen un amplio espectro antibacterico. En el



- 2 -

254061

- 5.- curso los estudios estructurales sobre la canamici-
cina, que recientemente ha adquirido una importan-
cia práctica, el inventor descubrió que el anti-
biótico es altamente estable al tratamiento quí-
mico. La estabilidad sugirió la posibilidad de mo-
dificar antibióticos básicos solubles en el agua
con la esperanza de hallar derivados con menor
grado de toxicidad y con actividades similares o su-
periores a las de los propios antibióticos mencio-
nados. Por lo tanto, el inventor ha llevado a ca-
bo ciertas investigaciones con objeto de preparar
nuevos derivados de los mencionados antibióticos.
- 10.- Recientemente, como resultado de las inves-
tigaciones llevadas a cabo, el inventor ha sinte-
tizado nuevos derivados, esto es, N-metanosulfo-
natos de los antibióticos básicos solubles en el
agua y descubrió que los nuevos derivados mostra-
ban mucha menos toxicidad que los antibióticos
originales y unas actividades antibacterias fuer-
tes, casi del mismo grado que los antibióticos
originales.
- 15.- Según el presente invento, se proporciona un
procedimiento para la producción de nuevos deri-
vados menos tóxicos, de antibióticos básicos so-
lubles en el agua que contienen grupos libres de
aminos en los que los grupos de ácido metanosul-
fónico se introducen en los grupos de aminos de
dichos antibióticos, por medio de la reacción en-
- 20.-
- 25.-

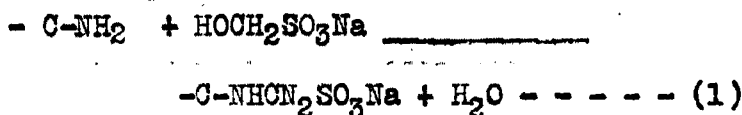


tre dichos antibióticos y varios compuestos capaces de sustituir los grupos de ácido metanosulfónico.

5.-

Cuando antibióticos básicos solubles en el agua que contengan grupos libres de aminas se hacen reaccionar con hidroximetansulfonato (o formaldehído y bisulfito) en una solución acuosa, pueden obtenerse nuevos derivados, a saber N-metansulfonatos (I) de los antibióticos, según la reacción representada por la siguiente fórmula de reacción (1):

10.-

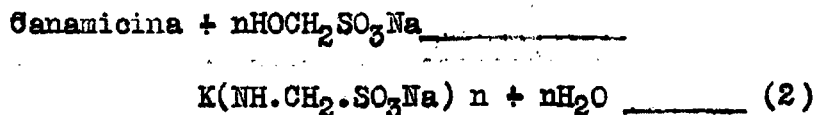


(I)

15.-

Cuando la canamicina se hace reaccionar con hidroximetansulfonato sódico (o con formaldehído y bisulfito sódico) en una solución acuosa, pueden obtenerse nuevos derivados, a saber, canamicina-N-metansulfonatos sódicos (II), según la siguiente fórmula de reacción (2):

20.-



(II)

25.-

donde K representa la parte residual resultante de eliminar (NH₂)_n de la molécula de canamicina; n = 1 - 4 .

Ajustando la proporción moléculas de hidroximetansulfonato: canamicina, se obtiene el mencio



- 5.- nado derivado correspondiente a n=1-4, como producto principal. Cuando se hacen reaccionar cuatro o dos moléculas de hidroximetanosulfonato sódico con una molécula de canamicina, el producto principal obtenido es canamicina-tetra-N-metasulfonato tetra-sódico o canamicina-di-N-metanosulfonato di-sódico, respectivamente, como se indica en el Ejemplo 1 ó 3.
- 10.- En lugar de hidroximetanosulfonato sódico, la mezcla equimolecular de formaldehído o de bisulfito sódico ha demostrado ser un reactivo útil para preparar dichos derivados de N-metanosulfonato, de la canamicina, como se indica en el Ejemplo 2.
- 15.- La hidrólisis del mencionado canamicina-tetra-N-metanosulfonato tetra-sódico con ácido hidrocloórico diluído libera el formaldehído en un movimiento razonable, demostrando que el derivado es un N-metanosulfonato. Esto puede confirmarse mediante análisis elementales y por la determinación del espectro infrarrojo del derivado.
- 20.- Cuando el monosulfonato de canamicina se hace reaccionar con dos moléculas de hidroximetanosulfonato sódico en una solución acuosa, puede obtenerse un nuevo derivado, a saber, el sulfato de canamicina-di-metanosulfonato di-sódico, representado por la fórmula III en la siguiente reacción
- 25.- (3) :

25.081

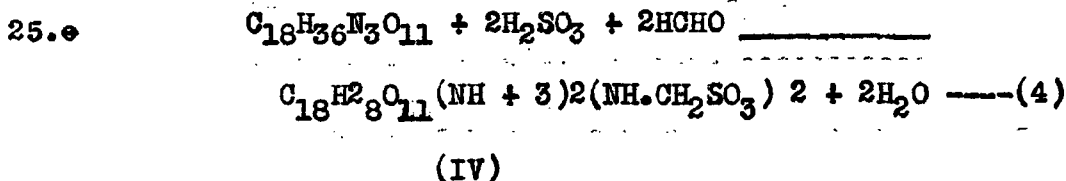


(III) ----- (3)

5.- La hidrólisis del compuesto (III) con ácido hidrocblórico diluido libera el formaldehido en un rendimiento razonable, mostrando que el derivado es un N-metanosulfonato. Esto puede confirmarse mediante análisis elementales y por la determinación del especto infrarrojo de absorción del derivado, como se indica en el ejemplo 4.

10.- Como el monosulfato de canamicina es fácilmente cristalizabile y, por lo tanto, es la sal más importante que puede utilizarse para purificar la canamicina en la producción comercial, la preparación del compuesto (III) mediante la reacción arriba mencionada, es considerablemente ventajosa en la producción comercial de canamicina-N-metanosulfonato.

15.- Cuando se hace reaccionar una suspensión acuosa de canamicina base con dos moléculas de dióxido de azufre y después con paraformaldehido, puede obtenerse un nuevo derivado, a saber, ácido caninadi-N-metanosulfónico, representado por la fórmula IV en la siguiente reacción (4):



25.e La hidrólisis del compuesto (IV) con ácido

254061



5.-

hidroclórico diluído libera el formaldehído en un rendimiento razonable, demostrando que el derivado es un N-metanosulfonato. El nuevo derivado se considera es una sal interior o zwitterión y puede representarse por la formula IV en la formula de reacción (4), y esto puede confirmarse mediante la determinación del espectro de absorción infrarrojo del derivado (ejémplo 5).

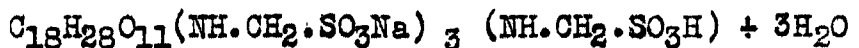
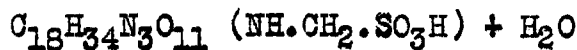
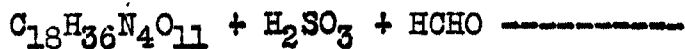
10.-

Cuando se hace reaccionar una suspensión acuosa de base canamicina con una molécula de dióxido sulfúrico y una molécula de formaldehído (o cantidad calculada de paraformaldehído) y después la solución resultante se hace reaccionar con tres

15.-

moléculas de hidroximetanosulfonato sódico in situ puede obtenerse un nuevo derivado, a saber, sal trisódica de ácido canamicina tetra-N-metasulfónico representado por la formula V en la siguiente reacción:

20.-



(V)

----- (5)

25.-

Los resultados analíticos y la determinación del espectro de absorción infrarrojo del derivado (V) aprueban que el derivado es un metanosulfonato de canamicina como se muestra en el ejémplo 6.



- 5.- Se ha comprobado que el canamicina-N-metanosulfonato, como derivado presentado por la fórmula I, puede obtenerse mediante la reacción de hidroximetanosulfonato con sal de ácido debilcanamicina, como carbonato de canamicina. Cuando se calienta una solución acuosa de carbonato de canamicina e hidroximetanosulfonato sódico, se observa la evolución del dióxido de carbono y puede obtenerse canamicina-N-metanosulfonato sódico.
- 10.- Mediante la reacción de carbonato de canamicina con cuatro moléculas de hidroximetanosulfonato sódico, puede obtenerse canamicina-tetra-N-metanosulfonato tetra-sódico, derivado correspondiente a $n = 4$ en la fórmula II, según se muestra en el
- 15.- Ejemplo 7. La reacción de carbonato de canamicina con cantidades cuantitativas de formaldehído y bisulfito de sodio también produce canamicina-tetra-N-metanosulfonato tetra-sódico, según se describe en el ejemplo 8.
- 20.- Como resultado de ulteriores investigaciones el inventor ha descubierto que la N-metanosulfonación arriba descrita es, por lo general, útil para preparar derivados menos tóxicos de los antibióticos básicos, solubles en el agua, que contienen varios grupos de aminos. Como otro ejemplo,
- 25.- cuando la neomicina (fradiomicina) se hace reaccionar con hidroximetanosulfonato sódico (con formaldehído y bisulfito) por un procedimiento análogo



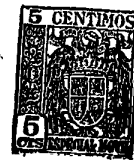
5.- al utilizado en la preparación de canamicina-N-metano-sulfonato sódico, puede obtenerse un nuevo derivado, a saber, neomicina N-metanosulfonato sódico. El derivado de la neomicina ha demostrado ser mucho menos tóxico que la propia neomicina y poseer fuertes actividades antibactericas, como se indica en la tabla 3.

10.- La neomicina se compone a veces de dos clases de neomicina, a saber, neomicina B y C, que son estereoisómeros y tienen la misma fórmula molecular $C_{23}H_{46}N_6O_{13}$ y contiene seis grupos de aminos. La estructura de la neomicina ha sido explicada parcialmente (recientes informes sobre la estructura de la neomicina: J.H.Ford et al, J.Amer. Chem. Soc. 77, 5311 (1955) K.L.Rinhart, Jr. et al, ibid., 79 4567 (1957), ibid., 80, 6463(1958).

15.-
20.- Como su estructura definida no se conoce todavía, no puede representar la estructura del producto obtenido por la N-metanosulfonación de la neomicina. Sin embargo, el inventor ha demostrado que el derivado de la neomicina es N-metanosulfonato por medio de análisis elementales, hidrólisis con ácido hidrocórico diluido y la determinación del espectro infrarrojo de absorción del derivado.
25.-

Cuando la neomicina base se hace reaccionar con hidroximetanosulfonato, puede obtenerse un nuevo derivado que se considera es neomicina-hesa-

- 9 - 254061



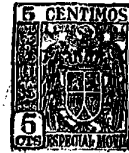
5.- N-metasulfonato hesa-sódico, como se indica en el Ejemplo 9. La hidrólisis del producto con ácido hidroclicórico diluido libera el formaldehído en un rendimiento razonable, mostrando que el derivado es un N-metanosulfonato. La determinación del espectro infrarrojo del producto muestra absorciones características del N-metanosulfonato.

10.- El mismo derivado, neomicina-N-metanosulfonato sódico, puede obtenerse mediante la reacción de hidroximetanosulfonato sódico con sal de ácido débil-neomicina, como es el carbonato de neomicina, según se muestra en el ejemplo 10. La reacción de carbonato de neomicina con cantidades cuantitativas de formaldehído y de bisulfito también produce la neomicina-N-metanosulfonato sódico, como se describe en el ejemplo II.

15.- Además, se ha descubierto que el canamicina-N-metanosulfonato o el neomicina-N-metanosulfonato pueden diferenciarse de la canamicina o la neomicina por medio de cromatografía con papel con una solución de cloruro de amonio al 0.4%; la canamicina o la neomicina permanecen en el punto original ($R_f = 0$), mientras que los N-metanosulfonatos-derivados de la canamicina o la neomicina se desplazan con el solvente. Utilizando el papel cromatográfico, se ha comprobado que la canamicina o la neomicina es absorbida por el mediotipo de resina de cambio de cationes, como es el

20.-

25.-



IRC-50, mientras que los derivados de metanosulfonato no son absorbidos por el mismo cambiador; por lo tanto, los derivados de N-metanosulfonato pueden hacerse libres de canamicina o neomicina base por medio de este método de cambio de iones.

5.-

El inventor ha comprobado que todos los derivados de N-metanosulfonato de la canamicina y la neomicina arriba descritos tienen una actividad fuertemente antibacteriana y son muchos menos tóxicos que los antibióticos originales. El canamicina

10.-

tetra-N-metanosulfonato tetra-sódico tiene una toxicidad inferior a un dieciochoavo de cada sulfato de canamicina-di-N-metanosulfonato di-sódico y el ácido canamicina-di-Nometanosulfónico tiene una toxicidad inferior a un treceavo de toxicidad del monosulfato de canamicina y dan altos niveles de sangre y presentan efectos terapéuticos in vivo. El neo-

15.-

micina-N-metanosulfonato sódico ejerce también efectos bacteriostáticos y tiene una toxicidad inferior a un 80avo de toxicidad del sulfato de neomicina.

20.-

Para la determinación de la actividad bacteriostática de los derivados de N-metanosulfonato de canamicina o neomicina, arriba descritos, a las tres horas después de adicionarse a medios en los que han sido inculado estafilococos mediante un método rápido de placa de cilindro o método tur

25.-



- 5.- bidimetrico, se mostró que todos los N-metanosulfonatos arriba descritos revelan ya en la primera fase de incubación las actividades bacteriostáticas del mismo grado que las que se revelan a las veinticuatro horas de incubación. El resultado indica que los propios N-metanosulfonatos son bacteriostáticos y bactericidas, negando la posibilidad de liberación de antibióticos originales por hidrólisis en una solución que pueda presentar efectos bacteriostáticos.
- 10.- Aunque los N-metanosulfonatos arriba descritos liberan los antibióticos originales por la acción del ácido o del calor, se observó una escasa descomposición en 2 a 3 horas en una solución de neutralizador. En los estudios farmacológicos sobre la conversión de los derivados de N-metanosulfonatos en antibióticos originales después de inyección a conejos, confirman que, en el período del más elevado nivel sanguíneo, no se reconoció la conversión de antibióticos originales, pero se confirmó después la conversión. Así, puede demostrarse que los derivados de N-metanosulfonato son menos tóxicos y de uso práctico.
- 15.- De los resultados arriba indicados, los derivados similares de otros antibióticos básicos, solubles en el agua, deben considerarse ejercen efectos bacteriostáticos y menos toxicidad y que tienen posibilidades de uso práctico.
- 20.-
- 25.-



La invención se explica a continuación, mediante los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1:

Preparación de canamicina-tetra-N-metanosulfonato tetrasódico.

- 5.- Una mezcla de 3.6 g. de canamicina, 4.0 g. de hidroximetanosulfonato sódico y 4.0 cc. de agua se calentó en un baño de agua, agitando durante 2 horas y después se enfrió a la temperatura ambiente.
- 10.- A la solución se añadieron 300 cc. de metanol, con lo que inmediatamente se precipitó un producto viscoso y, al frotar con una varilla de cristal, se convirtió en un polvo cristalino, rendimiento 4 g.
- 15.- El polvo se disolvió en 9 cc. de agua y a la solución se añadió metanol, para precipitar fraccionalmente; La principal fracción fue un polvo cristalino incoloro muy soluble en el agua, m.p. alrededor de 202° C. El producto se secó a unos 105° C bajo vacío y se analizó. El análisis elemental mostró
- 20.- que la fracción principal era canamicina-tetra-N-metanosulfonato tetra-sódico, que corresponde al caso de N = 4 de la mencionada fórmula II.

Análisis: Hallado: C, 28.10; H, 4.41; N, 6.15; S, 12.90
Na, 9.49%

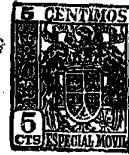
25.- Calculado para $C_{22}H_{40}O_{23}N_4S_4Na_4$ C, 27.83;

H, 4.25; N, 5.95; S, 13.51; Na, 9.70%.

10 = + 65° (e = 1, agua)
D

Hidrólisis con ácido hidrocórico diluido

Una muestra de 0.2 g. del derivado arriba des



crito de canamicina se disolvió en 3/0 cc. de ácido 2N hidroclicórico y 5. 0 cc. de agua, y la solución se calentó en un baño de agua durante quince minutos.

- 5.- La solución se enfrió a la temperatura ambiente y se neutralizó con hidróxido de 1N sodio. A la solución neutralizada se añadió una mezcla de 150 mg. de dimedono 0.5 cc. de agua y 1 cc. de metanol para dar agujas incoloras de formaldehídometono; rendimiento, 124 mg., mp. 184-187° C.
- 10.- Mediante recristalización, el punto de fusión se elevó a 190° C. La determinación del punto de fusión mezclado con un espécimen auténtico de formaldehidometono (m.p. 190° C) no mostró ninguna depresión. El resultado indicó que el derivado arriba mencionado es el N-metanolulfonato de canamicina.
- 15.-

Espectro infrarrojo de absorción:

- El derivado arriba mencionado mostró absorciones máximas a 3400 cm^{-1} (ancho, OH, NH), 1650 cm^{-1} (característica del metanosulfonato), 1200 cm^{-1} y 1040 cm^{-1} (característico del sulfonato), indicando que el derivado es el N-metanosulfonato de canamicina.
- 20.-

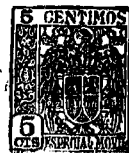
Toxicidad y actividades antibacterias

- La toxicidad y actividades antibacterias del canamicina-tetra-N-metanosulfonato tetra-sódico se muestran en la Tabla 1, en comparación con las del monosulfonato de canamicina.
- 25.-



Tabla 1.- Toxicidad y espectro antibacterico
(1) de canamicina-tetra-N-metanosulfonato tetrasódico y monosulfato de canamicina.

Organismos de ensayo	Concentración inhibitoria mínima mgc/co	
	Canamicina-tetra- N-metanosulfonato tetra-sódico.	Monosulfato de canamicina
5.- M. piogenes var aureus 209-P	3.13	0.6
10.- B. anthracus	3.13	1.25
B. subtilis	1.56	0.6
B. coli	6.25	5.0
E. coli estreptomicina-rápida	6.25	5.0
K. pneumonise	3.13	1.25
15.- Pr. vulgaris OX-19	12.5	10.0
Ps. aeruginosa	50	25
Sh. flexneri	6.25	5.0
Sh. dysenterias	6.25	5.0
Sh. sonnei	6.25	5.0
20.- S. paratyphi A	3.13	5.0
S. paratyphi B	6.25	5.0
S. enteritidis	6.25	2.5
S. typhosa	3.13	2.5
M. phlei	6.25	0.5
25.- M. tuberculosis	3.13	2.0
M. 607	1.56	2.5
M. 607 estreptomicina-rápida	1.56	2.5
C. diphtherie	1.56	0.75



Toxicidad a ratones por	:	:
medio de inyección intra	:	:
venosa LD50	:	5500 mg/kg : 313 mg/kg

(1) Por el método de placa de agar.

5.-

Además, se ha confirmado que el derivado de canamicina es efectiva contra la infección de los ratones por el *M. pyogenes* y *S. typhosa*.

Ejemplo 2:

Preparación de canamicina-tetra-N-metanosulfonato tetra-sódico.

10.-

Se agitó bien una mezcla de 3.0 g. de bisulfito sódico y 3.2 g. de solución acuosa de formalina (35%). A la solución se añadió 5.0 g. de canamicina y 4.5 cc. de agua y se calentó la solución en un baño de agua durante 1.5 horas y se enfrió a la temperatura ambiente.

15.-

A la solución se añadieron 250. cc. de metanol para dar un precipitado viscoso que, al frotar con una varilla de cristal, se convirtió en un polvo cristalino; rendimiento 7.0 g. Esto se disolvió en agua y se precipitó fraccionadamente añadiendo metanol. El producto principal fué canamicina-tetra-N-metanosulfonato tetra-sódico descrito en el ejemplo 1.

20.-

Ejemplo 3:

25.-

Preparación de canamicina-di-N-metanosulfonato di-sódico.

Una mezcla de 3.6 g. (0.0074 moles) de canamicina 2.26 g. (0.15 moles) de hidroximetanosulfo-



5.- nato sódico y 4.6 cc. de agua, se calentó en un baño de agua durante 15 horas y se enfrió después a la temperatura ambiente. A la solución se añadieron 300 cc. de metanol para precipitar un producto viscoso que pronto se cambió en un sólido polvoso; rendimiento, 2.82 g. (53%). Este se disolvió en 12 cc. de agua y se precipitó fraccionadamente añadiendo metanol. Las cuatro fracciones fueron polvos higroscópicos; rendimiento de la segunda fracción 300 mg. El análisis elemental mostró que la fracción era canamicina-di-N-metanofulfonato di-sódico, correspondiente al caso de $n = 2$ de la fórmula II arriba mencionada.

10.- Análisis: Hallado: C, 32.72; H, 5.41; N, 7.15; S, 9.07; Na, 5.71%.

Calculado para $C_{20}H_{38}O_{17}N_4S_2Na_2$: C, 33.46; H, 5.34; N, 7.81; S, 9.94; Na, 6.42%

Ejemplo 4:

20.- Preparación de sulfato de canamicina-di-N-metanofulfonato disódico.

25.- Se hizo refundir una mezcla de 3.0 g. de monosulfato de canamicina y 3.04 g. de hidroximetanosulfonato sódico en 4 cc. de agua en un baño de agua durante 1.3 horas para dar una solución amarilla pálido. A la solución en frío se añadieron 180 cc. de metanol para dar un precipitado viscoso, que se trocó en un polvo cristalino al frotar con una varilla de cristal; rendimiento, 5.5 g.



5.- El producto se disolvió en 22 cc. de agua y se filtró para eliminar todo trazo de materias insolubles. Al filtrado se añadieron 25 cc. de metanol y se dejó reposar la mezcla para precipitar un producto viscoso, que se separó por decantación, y se trocó en un polvo cristalino al frotar con una varilla de cristal; rendimiento, 2.1g., 18.5

10.- D = + 83,02 (α = 2, agua). Se fundió con descomposición indefinidamente por encima de los 206°C.

15.- El análisis elemental de la muestra que se secó a 105°C, aproximadamente, en vacío, dió el siguiente resultado, demostrando que el producto es un sulfato de canamicina-di-N-metanosulfonato di-sódico.

Análisis: Hallado: C, 28.75; H, 5.11; N, 6.25; S, 11.68 Na, 5.69%.

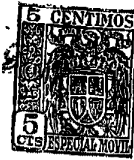
Calculado para $C_{18}H_{32}N_2O_{11}(NHCH_2SO_3Na)_2 \cdot N_2SO_4$:

C 29.45; H, 4.91; N, 6.87; S, 11.78;

20.- Na, 5.64%.

Hidrolisis con ácido hidrocórico diluido.

25.- En 3.0 cc. de 2N ácido hidrocórico y 5 cc. de agua se disolvió una muestra de 0.2 g. de la muestra arriba imencionada. La solución se calentó en un baño de agua durante quince minutos, se enfrió a la temperatura ambiente y se neutralizó con hidróxido 1N sódico: A la solución se añadió una mezola



de 200 mg. de dimedono 0.5 cc. de agua y 1 cc. de metanol y la solución se calentó y después se enfrió para dar agujas incoloras de formaldehído-dimedono; rendimiento, 92 mg. m.p. 184-7°C. Mediante recristalización, el punto de fusión se elevó a 190°C. La determinación del punto de fusión mezclada con un espécimen auténtico no mostró ninguna depresión.

Espectro infrarrojo de absorción:

El derivado arriba indicado mostro fuertes absorciones a 3400 cm^{-1} (ancho, OH, NH), 1630 cm^{-1} (característica del hidroximetanosulfonato), 1200 - 1110 cm^{-1} (SO_3^-), indicando que el derivado es el N-metanosulfonato de canamicina.

Toxicidad y actividad antibacterica:

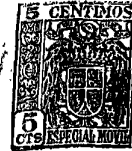
El sulfato de canamicina-di-N-metanosulfonato di-sódico mostro muchos menos tixicidad que la propia canamicina y una fuerte actividad antibacterica, como se indica en la Tabla ". Además se ha confirmado que el derivado es efectivo contra la infección de ratones por *M. piogenes* y *S. typhosa*.

Tabla 2.- Actividad antibacterica y toxicidad del sulfato de canamicina-di-N-metanosulfato di-sódico, en comparación con el monosulfato de canamicina.

25.-

	: Concentración mínima inhibitoria	
Organismos de ensayo	: Sulfato de canamicina-di-sódico.	: Sulfato de canamicina

254081



	M. pyogenes var. aureus 209-p	0.78-1.56	0.6
	S. anthracis	0.39-0.78	1.25
	B. subtilis	0.39-0.78	0.6
	E. coli	6.25	5.0
5.-	E. coli estreptomici- na-rapida	3.1-6.25	5.0
	K. pneumoniae	3.1-6.25	1.25
	Sh. flexneri	6.25-12.5	0.5
	Sh. sonnei	6.25-12.5	5.0
	S. typhosa	3.1	2.5
10.-	S. paratyphi A	3.1	5.0
	S. paratyphi B	6.25-12.5	5.0
	S. enteritidis	6.25	2.5
	M. tuberculosis	1.5	2.0
	M. 607	1.5	2.5
15.-	M. 607 estreptomici- na-rapida	1.5	2.5
Toxicidad a ratones por: inyeccion intravenosa, LD 50		4000 mg/kg	300 mg/kg

20.- Ejemplo 5:

Preparación de ácido canamicina-di-N-metanosul
fónico.

25.- Se pasó dióxido de azufre en una suspensión de 4.85 g. (0.01 mole) de base libre de canamicina en 5 cc. de agua hasta que fué absorbida la cantidad calculada de dióxido de azufre (1.28 g.). La solución viscosa resultante mostró un pH de 6.6. A la



solución se añadieron 0.60 g. de paraformaldehído (o 2.0 g. de 30% de solución de formalina) y la solución se dejó reposar a la temperatura ambiente durante 24 horas. La solución resultante mostró un pH de 7.2-7.3. La solución se vertió en 40 cc. de etanol donde precipitó un producto viscoso cuando se cristalizó al frotar con una varilla de cristal. El producto se disolvió nuevamente en 10 cc. de agua y, después de su filtración, se precipitó añadiendo 50 cc. de etanol; rendimiento de polvo cristalino secado a unos 50° C; 6.32 g. (94%). El análisis elemental demostró que el producto era una sal interior de ácido canamicina-di-N-metanosulfónico.

15.- Análisis: Hallado: C, 34.90; H, 6.23; N, 8.06; S, 8.96%
 Calculado para $C_{18}H_{28}O_{11}(NH + 3)_2(NHCH_2SO^{-3})_2 \cdot H_2O$;
 C, 34.78; H, 6.13; N, 8.11; S, 9.53%
 20 = + 103% (o = 2, agua)
 D

20.- Hidrólisis con ácido hidróclórico diluído
 Una muestra de 0.2 g. del derivado de canamicina arriba indicado se hidrolizó con ácido hidróclórico diluído para liberar el formaldehído, el cual fué aislado como formaldehidometono (110 mg), de la misma forma que se describe en el ejemplo anterior

25.- 1 ó 3. El resultado demostró que el mencionado producto es el ácido N-metanosulfónico de canamicina.

Espectro infrarrojo de absorción

El derivado arriba mencionado mostró absorciones



máximas a 3350 cm^{-1} / ancho, OH,NH/ 1630 cm^{-1} (carac-
terística del metanosulfonato), 1525 cm^{-1} (NH₃),
1170 cm^{-1} y 1030 cm^{-1} (característica del ácido sul-
fónico), indicando que el derivado era el ácido N-
metanosulfónico de la canamicina.

5.-

Toxicidad y actividad antibacterica:

La sal interior del ácido-canamicina-di-N-meta-
nosulfónico mostró la potencia de 710 U/mg. en tér-
minos de unidad de canamicina contra *Mpyogenes* var.
aureus 209-P y, cuando se inyectó a ratones por via
intravenosa, LB50 de la sal interior fué de 3500 mg/kg.

10.-

Ejemplo 6:

Preparación de canamicina-tetra-N-metanosulfo-
nato trisódico.

15.-

Se pasó dióxido de azufre a una suspensión de
4.85 g.(0.01 mole) de canamicina base en 10 cc. de
agua hasta que se hubo absorbido la cantidad calcu-
lada de dióxido de azufre (0.64 g., 0.01 mole) y a
la solución se añadieron 0.30 g. de paraformaldehi-

20.-

do (o 10.0 g. de solución de formalina al 30%). Des-
pués de reposar a la temperatura ambiente durante
media hora, la solución resultante se mezcló con
4.56 g.(0.03 moles) de hidroximetanosulfonato sódico
y se dejó reposar a la temperatura de la sala du-
rante la noche. La solución resultante mostró un

25.-

pH de 7.0. La solución se vertió en 50 cc. de eta-
nol, en donde se precipitó un producto viscoso que
se cristalizó después de frotar con una varilla de
cristal. El producto se disolvió nuevamente en 1.0
cc. de agua y, después de su filtración, se preci-

254081



pitó añadiendo 50 cc. de etanol, rendimiento del polvo cristalino secado a unos 50°C: 88 g.(95%. Los análisis elementales mostrarón que el producto era canamicina-tetra-N-metanolsulfonato trisódico.

5.-

Análisis: Hallado: C, 28.69; H, 4.76; N, 5.89; S, 13.4; Na, 7.02%

Calculado para $C_{18}H_{28}O_{11}(NH.CH_2SO_3Na)_3(NH.CH_2SO_3H)$; C, 28.51; H, 4.46; N, 6.05; S, 13.85; Na, 7.44%

$D = \frac{18}{100} \rightarrow 73.32$ (o = 2, agua).

10.-

La determinación del espectro infrarrojo de absorción del derivado arriba mencionado mostró absorciones máximas a 3400 cm^{-1} (ancho) 1635 - 1645 cm^{-1} 1150 - 1200 cm^{-1} , 1020 - 1050 cm^{-1} indicando que el derivado era un N-metanosulfonato de canamicina.

15.-

El canamicina-tetra-N-metanosulfonato trisódico, mostró una potencia de 461 U/mg. en términos de unidad de canamicina contra el *M. pyogenes* var. *aureus* 209-P. Una solución de 1.0 g. del producto en 5 cc. de agua mostró un pH de 6.9, sugiriendo que el derivado era conveniente y de uso práctico para inyectar.

20.-

Ejemplo 7:

25.-

Preparación de canamicina-tetra-N-metanosulfonato tetrasódico. Una mezcla de 4.5 g. de monosulfato de canamicina y 3.0 g. de carbonato de bario en agua, se agitó durante 2 horas y se dejó reposar a la temperatura ambiente para precipitar sulfato de bario, el cual fué eliminado por filtración. El filtrado, a saber, una solución de carbonato de ca



namicina, se concentró a unos 45° C bajo vacío a un volumen de 10 cc. aproximadamente, y 4.0 g. de solución de hidroximetanosulfonato sódico fué añadida.

5.- La mezcla resultante se calentó en un baño de agua durante dos horas, cuando se observó la evolución del dióxido de carbono.

10.- De la solución resultante, se aisló el canamicina-tetra-N-metanosulfonato tetra-sódico, añadiendo metanol de la misma manera que la indicada en el Ejemplo 1/ La muestra analizada, se obtuvo mediante precipitación fraccionada de una solución acuosa del producto añadiendo metanol.

Análisis: Hallado: C, 28.10; H, 4.41; N, 6.15; S, 12.72; Na, 9.60%

15.- Calculado para $C_{18}H_{28}O_{11}(NHCH_2SO_3Na)_4$: C, 27.83; H, 4.25; N, 5.95; S, 13.51; Na, 9.70%

20.- El espectro infrarrojo de absorción del producto fué totalmente sobrepuesto al del canamicina tetra-N-metanosulfonato tetra-sódico descrito en el ejemplo 1.

Ejemplo 8:

preparación de canamicina-tetra-N-metanosulfonato tetra-sódico.

25.- Una mezcla de 4.5 g. de monosulfato de canamicina y 3.0 g. de carbonato de bario en agua se agitó durante dos horas y se dejó reposar a la temperatura ambiente para precipitar sulfato de bario,



- el cual fué eliminado por filtración: El filtrado, esto es, a una solución de carbonato de canamicina se concentro a unos 45° C. bajo vacío a un volumen de unos 10 cc. a la cual se añadió una solución bien agitada de 3.0 g. de bisulfito sódico y 3.2 g. de solución acuosa de formalina (35%) y la solución se calentó en un baño de agua durante 1.3 horas. A la solución enfriada a la temperatura ambiente se añadieron 300 cc. de metanol para dar un precipitado viscoso que, al frotarlo con una varilla de cristal, se trocó en un polvo cristalino rendimiento, 4.0 g.
- 5.-
- 10.-

La precipitación fraccional de una solución acuosa del producto añadiendo metanol produjo canamicina-tetra-N-metanosulfonato tetra-sódico.

15.-

Ejemplo 9:

Preparación de neomicina-N-metanosulfonato sódico. El sulfato de la muestra de neomicina utilizada en este experimento mostró una potencia de 640 mcg/mg y, mediante papel cromatográfico con un 2% de p-tolueno-sulfónico (ácido) -butanol saturado con agua, se demostró que la muestra contenía principalmente neomicina B y una pequeña cantidad de neomicina C.

20.-

Una mezcla de 4.3 g.(c.007 moles) de neomicina y 6.4 g.(0.048 moles) de hidroximetanosulfonato sódico se disolvió en 600 cc de agua, se calentó en un

25.-

254061



5.- baño de agua agitando durante dos horas y se dejó enfriar a la temperatura ambiente. A la solución se añadieron 60 cc. de metanol, en donde se precipitó inmediatamente un producto viscoso y al frotarlo con una varilla de cristal, se trocó en un polvo cristalino; rendimiento, 8.5 g.

10.- Una muestra de 7.0 g. del polvo se disolvió en 25 cc. de agua y se precipitó fraccionadamente añadiendo metanol. Las fracciones principales, a saber, F₂ y F₃ que se muestran en la tabla siguiente son incoloras en forma de polvo cristalino; F₃:
 $D^{12} = + 28.52$ (O = 2, agua).

	Metanol añadido (cc.)	Fracciones	Peso de las fracciones. (g)
15.-	48	F ₁	1.6
	14	F ₂	2.3
	18	F ₃	1.3
	12	F ₄	0.34
	28	F ₅	0.3
20.-	40	F ₆	0.1

Los resultados de los análisis elementales de las fracciones indicarán que el principal producto obtenido era hexa-N-metanosulfonato de neomicina.

Análisis: F₂: Hallado: C, 24.3; H, 4.1; N, 5.7; S, 13.7 Na, 10.7%

25.-

F₃: C, 25.7; H, 3.9; N, 5.9; S, 13.9; Na, 10.5%

Calculado para C₂₃H₄₀O₁₃N₆ (CH₂SO₃Na)₆: C, 26.6;

H, 4.0; N, 6.4; S, 14.7; Na, 10.5%



Hidrólisis con ácido hidroclicórico diluido.

5.- Una muestra de 0.2 g. del derivado arriba mencionado de neomicina se disolvió en 3 cc. de ácido 2H hidroclicórico y 5 cc. de agua. La solución se calentó en un baño de agua durante 15 minutos, se enfrió a la temperatura ambiente y se neutralizó con hidróxido de 1N sodio, a la solución neutralizada se añadió una mezcla de 270 mg de dimedono, 1cc. de agua y 2cc. de metanol para dar agujas incoloras de formaldehidometono; rendimiento, 186 mg.

10.- m.p. 184-188° C. Por recristalización, el punto de fusión se elevó a 190° C. La determinación del punto de fusión mezclado, con un espécimen auténtico, de formaldehidometono (m.p. 190°C) no mostró ninguna depresión. El resultado indica que el derivado es el N-metanosulfonato de neomicina.

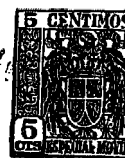
15.-

Espectro infrarrojo de absorción:

20.- La absorción infrarroja del derivado de neomicina mostro una absorción máxima a 1170-1210 cm⁻¹ (SO⁻³) y la ausencia de absorción cerca de 1590 cm⁻¹ (NH₂) indicando que el derivado es N-metanosulfonato de neomicina.

Toxicidad y actividades antibacterias:

25.- El neomicina-N-metanosulfonato sódico mostro mucha menos toxicidad que la propia neomicina y fuertes actividades antibacterias, como se indica en la Tabla 3. La toxicidad del derivado para los ratones por inyección intravenosa fué alrededor del



254081

1/80 de la propia neomicina.

Tabla 3: Toxicidad y actividades antibactericas
(1) de neomicina N-metanosulfonato sódico en compa
ración con el sulfato de neomicina.

Organismos de ensayo		Concentración mínima inhibito ria - mcg/cc.	
		Neomicina-N-metano- sulfonato sódico	Sulfato de neomicina
10.-	M. pyogenes var. aureus 209-P	3.13	1.56
	B. Abthracis	1.56	1.56
	B. subtilis	1.56	1.56
	E. coli	25.0	3.13
	E. coli estreptomycin- rapida	25.0	3.13
15.-	K. pneumoniae	12.5	3.13
	Pr. vulgaris OX-19	25.0	3.13
	Ps. aeruginosa	> 200	> 200
	Sh. flexneri	50	3.13
	Sh. dysenterias	50	3.13
20.-	Sh. sonnei	50	3.13
	S. paratyphi A	12.5	3.13
	S. paratyphi B	50.0	3.13
	S. enteritidis	12.5	3.13
	S. typhosa	12.5	3.13
25.-	M. phlei	3.13	1.56
	M. tuberculosis	5.0	2.5
	M. 607	3.13	1.56
	M. 607 estreptomycin rapida	3.13	1.56

254061



Toxicidad a ratones por
 inyección intravenosa > 3500 mg/kg. 50 mg/kg.
 LD
 50

(1) Por el método de dilución de agar.

8.- Además, se ha confirmado que el derivado de la neomicina es efectivo contra la infección de ratones por el *M. pyogenes* y el *S. typhosa*.

Ejemplo 10:

Preparación de neomicina-N-metanosulfonato
 sódico.

10.- Una mezcla de 6.4 g. de sulfato de neomicina y 9.0 g. de carbonato de bario en agua se agitó durante varias horas y se dejó reposar a la temperatura ambiente, para precipitar sulfato de bario, el cual fué eliminado por filtración. El filtrado, a
 15.- saber, una solución de carbonato de neomicina, se concentró aproximadamente 45° C bajo vacío a un volumen de unos 10 cc. y se añadieron 6.4 g. de hidroximetanosulfonato sódico. La mezcla resultante se calentó en un baño de agua durante dos horas, observándose mientras tanto la evolución del dióxido de
 20.- carbono. De la solución resultante, se aisló neomicina-N-metanosulfonato sódico añadiendo metanol de la misma forma que se indica en el Ejemplo 8.

Análisis F₂: Hallado: C, 24.25; H, 3.93; N, 5.67; S, 15.58

25.-

Na, 10.70%

F₃: Hallado: C, 24.82; H, 4.09; N, 5.71; S, 14.84;

Na, 10.20%



Calculado para $C_{23}H_{34}O_{13}(NH.CH_2.SO_3Na)$ 6: 0,26.56

H, 3.97; N, 6.41; S, 14.66; na, 10.53%

El espectro de absorción infrarrojo del producto E₃ se comprobó era totalmente superponible al del producto descrito en el

5.-

Ejemplo 9:

Ejemplo 11:

Preparación de neomicina-N-metanosulfonato sódico

Durante dos horas se agitó una mezcla de 6.5 g.

10.-

de sulfato de neomicina y 9.0 g. de carbonato de bario en agua y se dejó reposar para precipitar sulfato de bario, el cual fué eliminado por filtración.

15.-

El filtrado, a saber, una solución de carbonato de neomicina se concentró a unos 45° C bajo vacío a un volumen aproximado de 10cc. y se añadió una solución bien agitada de 4.1 g. de formalina (35%) y 5 g. de bisulfito sódico. La solución se calentó en un baño de agua durante dos horas. A la solución enfriada en agua se hielo se le añadieron unos 100cc.

20.-

de metanol para precipitar un producto viscoso, el cual, al frotar con una varilla de cristal, se trocó en un polvo cristalino; rendimiento, H.2 g. La precipitación fraccional de una solución acuosa del producto añadiendo metanol, produjo un derivado de

25.-

N-metanosulfonato considerado idéntico al producto descrito en el Ejemplo 9 por la determinación del espectro de absorción infrarrojo.

NOTA

Se declaran de propiedad y novedad en España el contenido de las siguientes:



REIVINDICACIONES

- 5.- 1ª.- Procedimiento para la preparación de nuevos derivados de antibióticos básicos, solubles en el agua, de acuerdo con el cual se procede a la producción de N-metanosulfonatos menos tóxicos, de antibióticos básicos, solubles en el agua, en los que un antibiótico básico soluble en el agua que contiene grupos libres de amino se hace reaccionar con metanosulfonato de hidroxilo.
- 10.- 2ª.- Procedimiento para la preparación de nuevos derivados de antibióticos básicos, solubles en el agua, de acuerdo con los cuales se procede a la producción de N-metanosulfonatos de antibióticos básicos, solubles en el agua, en los que un antibiótico básico, soluble en el agua que contiene grupos libres de amino, se hace reaccionar con formaldehído y bisulfito.
- 20.- 3ª.- Procedimiento para la preparación de nuevos derivados de antibióticos básicos, solubles en el agua, de acuerdo con la producción de N-metanosulfonatos de antibióticos básicos solubles en el agua en los que un antibiótico básico, soluble en el agua, que contiene grupos de amino libres se hace reaccionar con dióxido de azufre, primeramente y con paraformaldehído(or formalina), después.
- 25.- 4ª.- Procedimiento para la preparación de nuevos derivados de antibióticos básicos, solubles en



5.- el agua, de acuerdo con la producción de N-metano-sulfonato de antibióticos básicos, solubles en el agua en los que un antibiótico básico, soluble en el agua que contiene grupos libres de amino, se hace reaccionar con dióxido de azufre y paraformaldehído(o formalina), primeramente y con hidroximetanosulfonato, después.

10.- 5ª.- Procedimiento para la preparación de nuevos derivados de antibióticos básicos, solubles en el agua, caracterizado porque la producción de N-metanosulfonatos de antibióticos básicos solubles en el agua, reivindicados en 1ª a 4ª, en los que, en lugar de una base libre de antibiótico soluble en el agua, se utiliza su sal con un ácido débil, como es el carbonato.

15.- 6ª.- " PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE NUEVOS DERIVADOS DE ANTIBIOTICOS BASICOS, SOLUBLES EN EL AGUA".

20.- A los efectos de la prioridad y de conformidad con lo dispuesto en los convenios internacionales de los que España es signataria, se reivindica la obtenida en las solicitudes formuladas el 12 de Diciembre de 1.958, 28 de Marzo de 1.959, 21 de Mayo de 1.959 y 29 de octubre de 1.959 en Japón con los números: 35545/58; 9622/59; 15955/59; 33841/59.

Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de TREINTA Y UNA hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 9 de Diciembre 1.959

REPUBLICA DE CUBA