

15



MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un ^a

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: ABBOTT LABORATORIES

RESIDENCIA: NORTH CHICAGO, Illinois 60064,

Estados Unidos

ENUNCIADO: "UN METODO PARA PRODUCIR 4'-HIDROXIERYTROMICINA A"

Prioridad: Patente estadounidense n.º 654.046 del 18-7-1.967

GC.-



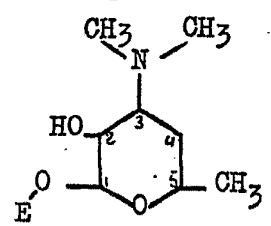
1
5
10
15
20
25
30

Se ha visto que el derivado 4'-hidroxieritromicina A junto con sus sales de adición ácida tiene actividad antibiótica. Este compuesto ha sido preparado por oxidación de la eritromicina A, obteniéndose el N-óxido, el cual por pirólisis ha sido transformado en 3-(desdimetilamino) --- $\Delta^{3',4'}$ -eritromicina A. El compuesto no saturado se convierte entonces en un epóxido y, abriendo el anillo epoxi con una azida, se obtiene 3'-(desdimetilamino)-3'-azido-4'-hidroxieritromicina A. La azida se reduce después a 3'-(desdimetilamino)-3'-amino-4'-hidroxieritromicina A, la cual se somete a la reducción ulterior en presencia de formaldehído, obteniéndose así 4'-hidroxieritromicina A.

Descripción de la Invención:

Esta invención se relaciona con los nuevos derivados de la eritromicina A y con un procedimiento de obtención de los mismos. De manera particular, esta invención se refiere a los derivados 3',4'-desosamínicos del antibiótico eritromicina A.

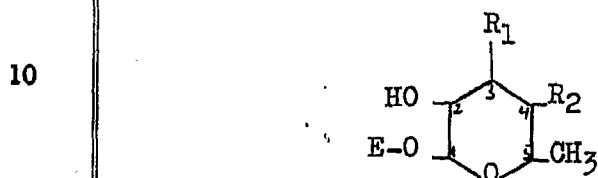
La eritromicina A es un antibiótico bien conocido que tiene un amplio espectro de actividad antibacteriana y es eficaz contra las cepas de bacterias que se encuentran con más frecuencia en las infecciones en animales de sangre caliente. La estructura completa de la eritromicina A fué publicada en J.A.C.S. 79 6062 (1.957). Para nuestro objeto a veces será conveniente abreviar la fórmula estructural publicada a la siguiente:





1 donde E representa la mitad formada por la eritronolida y
cladinosa, mientras que la mitad constituida por la desosa
mina figura en su totalidad. Las fórmulas estructurales en
las que aparece E siempre tendrán el mismo significado.

5 Los derivados que se describen en esta invención -
tienen sustituciones en la posición 4', o en las posicio-
nes 3' y 4'. Los compuestos en cuestión tienen la fórmula
estructural siguiente:



15 en la que R₁ representa un radical seleccionado del grupo
que incluye dimetilamino, amino, azido y R₂ es hidroxilo. --
R₁ y R₂ cuando se toman juntos representan un grupo epoxi.

20 La 4'-hidroxieritromicina A y la 3'-des(dimetilami-
no)-3'-amino-4'-hidroxieritromicina A tienen actividad an-
tibiótica. Los otros compuestos de esta invención, incluyen
do 3'-des(dimetilamino)-3'-amino-4'-hidroxieritromicina A,
sirven de precursores en la preparación de la 4'-hidroxie-
ritromicina A.

25 Según los resultados expuestos en las Tablas I a -
III, la 4'-hidroxieritromicina A tiene un espectro de acti-
vidad similar al de la eritromicina A. En la Tabla I está
representada la actividad de la 4'-hidroxieritromicina A -
frente a varias cepas de bacterias y de algunos otros mi-
croorganismos.

30 Como en el caso de la eritromicina A, los compues-
tos de esta invención son capaces de formar sales de adi-
ción ácida estables como clorhidrato, sulfato y fosfato, y



1 también con ácidos orgánicos, como el ácido acético. Las -
sales de adición ácida constituyen un medio estable adecua
do para guardar derivados antes de usarse.

5 Las sales que se forman añadiendo ácidos a la 4'-
hidroxieritromicina A también tienen actividad antibiótica,
y caso de usarse con fines terapéuticos el ácido escogido
tiene que tener un anión fisiológicamente aceptable.

TABLA I

BACTERIAS

	<u>Organismo</u>	<u>Concentración mínima de inhibición (CMI) microgramos/c.c., 24 horas.-</u>
	Staph. aureus 209P	0,2
	Staph. aureus 209PER	6,2 (>100 - 48 horas)
	Staph. aureus Smith	0,39
	Staph. aureus Smith ER	> 100
15	Staph. aureus 45	0,39
	Staph. aureus 45 ER	>100
	Staph. aureus 67	0,39
	Staph. aureus 67 ER	>100
	Staph. aureus Quinones	>100
20	Staph. aureus Wise 155	>100
	Staph. aureus WEB	0,39
	Staph. epidermidis 3519	0,39
	Staph. epidermidis 3519 ER	>100
	Strep. piogenes 0203	0,05
25	Strep. faecalis 10541	0,2
	Diplococcus pneumoniae Tipo 1	0,05
	Haemophilus influenzae 9334	6,2
	E. coli Juhl	100
	A. aerogenes 13048	>100
30	Kleb. pneumoniae 10031	12,5



1	<u>Organismo</u>	<u>Concentración mínima de inhibición (CMI) microgramos/c.c., 24 horas.-</u>
	Sal. typhimurium Ed. nº 9	50
	Sal. Typhosa 992	100
	Shig. sonnei 9290	25
5	Prot. Vulgaris JJ	>100
	Prot. mirabilis nº 9	>100
	Pseudo. aeruginosa 9027	>100

OTROS MICROORGANISMOS

10	Mycoplasma gallisepticum	0,2 *
	Mycoplasma granularum	0,1 *
	Mycoplasma hyorhinitis	50 *
	Mycoplasma pneumoniae	0,2 *
	Panagrellus redivivus	
	Prueba de Destrucción	>100
15	Prueba de Estasis	>100
	Schisto. mansonii	100
	Trich. vaginalis	>100
	Crithidia fasciculata	>100
20	T. cruzi	>10

* indica incubación de 7 días.

25

30

La Tabla II ilustra la actividad bactericida de la 4'-hidroxieritromicina A contra una sola cepa de Staph. aureus y de Strep. pyogenes. El método usado fué una prueba clásica de dilución en tubo con el recuento en placas de los microorganismos de los tubos en los que no se observó crecimiento alguno después de 24 y 48 horas de incubación. La concentración bactericida mínima (CBM) es la concentración que causa una destrucción del 99,9 % de las células viables según el recuento en placas.



1

TABLA II

<u>Organismo</u> <u>y Tiempo de Incubación</u>	<u>4'-Hidroxieritromicina A</u>	
	<u>CIM microgramos</u> <u>por c.c.</u>	<u>CBM microgramos</u> <u>por c.c.</u>
Staph. aureus Smith		
24 horas	0,39	6,2
48 horas	0,39	0,78
Strep. pyogenes G203		
24 horas	0,05	0,2
48 horas	0,05	0,1

5

10

15

La Tabla III contiene los resultados obtenidos en las pruebas de dos preparados de la 4'-hidroxieritromicina A contra la infección aguda de los ratones con Staph. aureus (Smith). El tratamiento fué administrado por la vía bucal e intramuscular. En cada grupo se emplearon 10 ratones que recibieron los preparados 1,3,5 y 7 horas después de la infección. El lactobionato de eritromicina se usó como substancia de referencia. Los preparados de la 4'-hidroxieritromicina A se emplearon en cantidades basadas en el peso seco del antibiótico. La eritromicina A se usó de acuerdo con la actividad calculada en relación con el equivalente de la eritromicina base.

20

TABLA III

Actividad Comparativa de la 4'-Hidroxieritromicina A Determinada en las Pruebas de Protección de Ratones contra Staph. aureus (Smith).-

25

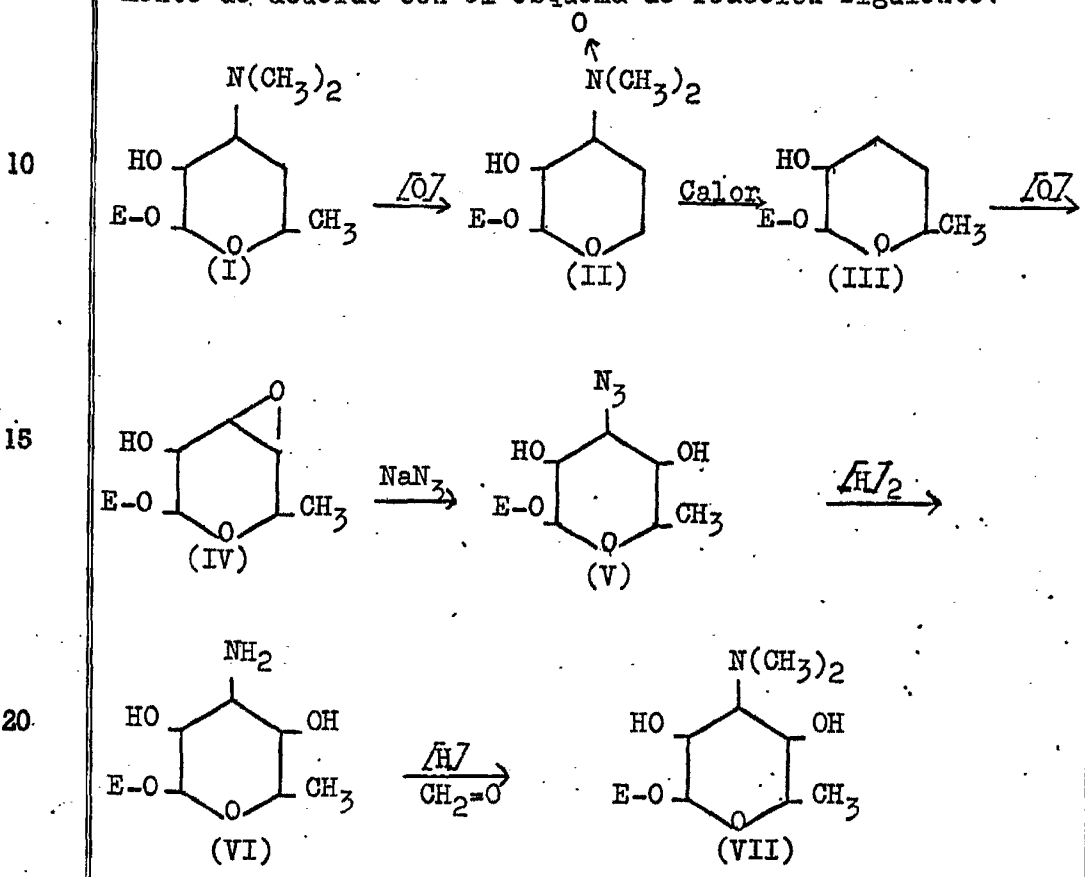
30

<u>Preparado</u>	<u>Vía de Administración</u>	<u>CD₅₀ Aproximado</u> <u>mgm/kg. Dosis Total</u>
4'-Hidroxieritromicina A (prueba 1)®	Intra-muscular	20
4'-Hidroxieritromicina A (prueba 1)®	Bucal	100 - 200
4'-Hidroxieritromicina A (prueba 2)®	Intra-muscular	10 - 20
4'-Hidroxieritromicina A (prueba 2)®	Bucal	150

1	Lactobionato de eritromicina	Intra-muscular	25 - 50
	Lactobionato de eritromicina	Bucal	50

5 La diferencia entre la prueba 1 y 2 consistió en que el compuesto empleado en la prueba 2 fué más puro.

La 4'-hidroxieritromicina A se prepara convenientemente de acuerdo con el esquema de reacción siguiente:



25 De acuerdo con este esquema, la eritromicina A (I) - se trata con un oxidante adecuado del tipo peróxido, usándose preferiblemente el peróxido de hidrógeno. Esta oxidación da lugar a la formación de un derivado de aminóxido (II) el cual, una vez calentado hasta la temperatura suficiente para reaccionar sin destruir la eritromicina A que es sensible al calor, da lugar a la formación del derivado 3', 4'-

30



1 no saturado (III). Se ha visto que se necesita una temperatura de 150° - 170°C para obtener un buen rendimiento.

5 El producto de pirólisis se trata después con un agente epoxidante de la clase de perácidos orgánicos. Para este fin se prefiere el ácido m-cloroperbenzóico por sus cualidades de menos peligro. A continuación, el derivado epoxidado (IV) se hace reaccionar con una azida, como por ejemplo azida de sodio, para formar 3'-(desdimetilamino)-3-azido-4-hidroxieritromicina A (V). Cuando esta azida se reduce para obtener amina (VI) el compuesto se convierte en 3'-(desdimetil)-3'-amino-4'-hidroxieritromicina A la cual forma con formaldehído en condiciones reductoras 4'-hidroxieritromicina A (VII).

15 A continuación se presentan unos ejemplos de procedimientos preparativos para ilustrar los detalles de esta invención, los cuales, sin embargo, no deben ser interpretados como limitando la misma.

Preparación de la 3'-(desdimetilamino)-3',4'-epoxieritromicina A

20 La 3'-desdimetilamino- $\Delta^{3',4'}$ -eritromicina A se preparó sometiendo a pirólisis 54,5 gramos de A-N-óxido de eritromicina (de acuerdo con el método de Flynn descrito en J.A.C.S. 76: 3126, (1.954) a 165° - 170°C y en un vacío de 0,2 milímetros de mercurio durante cuatro horas. Los productos de pirólisis se disolvieron en metanol, se trataron con carbón vegetal activo, se filtraron y se recrystalizaron a partir de una mezcla de cloroformo y éter. La 3'-desdimetilamino- $\Delta^{3',4'}$ se obtuvo con un rendimiento de 24,4 gramos, P. F. 218° - 219°C. Este método se describe con más detalle en la aplicación para la patente de E.E.U.U. número -

25

30



1 de serie 542.219, presentada el 13 de abril de 1.966.

5 Gatorce gramos (0,02 mol) de 3'-desdimetil-amino-
 $\Delta^{3',4'}$ -eritromicina A fueron disueltos en coloroformo. Es-
te disolvente es preferido, pero también pueden usarse ----
10 otros disolventes que sean inertes a la reacción con peráci-
dos y 3'-desdimetilamino- $\Delta^{3',4'}$ -eritromicina A. A la solu-
ción resultante se añaden lentamente 20 gramos de ácido ---
m-cloroperbenzóico durante un período de 1/2 hora aproxima-
damente a la temperatura ambiente. La solución de las subs-
tancias de reacción se enfría hasta 0°C y se mantiene a es-
ta temperatura durante 24 horas aproximadamente. Añadiendo
el perácido a la temperatura ambiente, se obtuvo un mejor -
rendimiento que a la temperatura reducida, mientras que la
15 maduración subsiguiente a la temperatura más baja llegó a -
completar la reacción deseada. Desde luego, la oxidación --
puede llevarse a cabo a otras temperaturas, pero con el ---
riesgo de disminuir considerablemente el rendimiento.

20 La solución clorofórmica, una vez enfriada, fué ex-
traída con soluciones acuosas frías de sulfito sódico, y --
después con una solución acuosa fría de bicarbonato sódico. 4.
Las soluciones acuosas de estas sales, no teniendo propie--
dades ácidas, no rompen el enlace epoxi.

25 El residuo de cloroformo se eliminó calentando sua-
vemente en un baño de maría a presión reducida usando una -
trompa de aspiración.

30 El producto crudo obtenido fué disuelto en 25 ml. -
de acetona templada (28°C). Después de enfriar a la tempera-
tura ambiente, el producto cristalizó espontáneamente de -
la acetona, obteniéndose 10,5 gramos (rendimiento 74 %) de
3'-(desdimetil-amino)-3'-4'-epoxieritromicina A, de P.F. --



1

221^o - 223^oC.

Preparación de 3'-desdimetilamino-3'-azido-4'-hidroxieritromicina A

5

10

15

Se disolvieron 4,2 gramos (0,006 mol) de 3'-desdimetilamino-3'-4'-epoxieritromicina A en 150 ml. de dimetil sulfóxido u otro disolvente apropiado, como dimetilformamida o dimetilacetamida y 6 ml. de agua. Se añadieron a la solución 1,2 gramos (0,006 mol) de perclorato magnésico y 3,9 gramos (0,06 mol) de azida de sodio. La solución se calentó a 80^oC durante 16 horas, y después se añadieron 300 ml. de agua. Se hizo una extracción de la solución con cloroformo, y después se evaporó este disolvente. El producto crudo obtenido contiene una mezcla de 3'-desdimetilamino-3'-azido-4'-hidroxieritromicina A y 3'-desdimetilamino-3'-hidroxi-4'-azidoeritromicina A. Como solamente el primer compuesto es el producto deseado, se hace una extracción con éter etílico en el cual la 3'-azida es soluble, pero no la 4'-azida.

20

La 3'-azida se disuelve en una mezcla de acetato de etilo y n-pentano hasta que aparezca una turbidez ligera. Después de enfriar lentamente, la 3'-azida purificada cristaliza. El producto tiene un punto de fusión de 187^o - 190^oC y muestra una banda infrarroja fuerte a 2116 cm⁻¹ que es característica de las azidas.

25

Preparación de 3'-(desdimetilamino)-3'-amino-4'-hidroxieritromicina A

30

Se disolvió 3'-desdimetilamino-3'-azido-4'-hidroxieritromicina A (1,0 gramo) en etanol absoluto y se agitó en una agitadora de Parr en presencia de hidrógeno y del catalizador PtO₂ durante 2 horas. La solución se filtró y se



1 evaporó a sequedad a presión reducida usando una trompa de aspiración para obtener 1,0 gramo de una substancia vítrea incolora.

5 La amina fué disuelta entonces en 100 ml. de etanol absoluto y a esta solución se añadieron 1,2 ml. de formaldehído al 37 % con 0,85 gramos de Pd sobre el negro de carbón. La mezcla resultante se agitó durante 24 horas en presencia de hidrógeno en una agitadora de Parr. Después de hidrogenar, se filtró la mezcla, se recogió el filtrado, 10 y se eliminó el etanol y el exceso de formaldehído por destilación a presión reducida.

15 El residuo sólido obtenido se disolvió en 300 ml. de KH_2PO_4 0,1M frío y se lavó dos veces con cloruro de metileno. El pH se ajustó aproximadamente a 9 con Na_2CO_3 al 5% y esta solución básica fué extraída dos veces con cloruro de metileno. Los extractos se reunieron y se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro. Después de secar, los extractos se evaporaron a sequedad a presión reducida, obteniéndose 0,7 gramos de una substancia vítrea, amorfa, blanca. Esta sustancia 20 fué recristalizada a partir de cloruro de metileno-éter de petróleo (P.E. $66^\circ - 70^\circ\text{C}$), dando 0,5 gramos (rendimiento 50 %) de prismas incoloras de P.F. $148^\circ - 150^\circ\text{C}$. El producto obtenido fué caracterizado como 4'-hidroxieritromicina A, lo que se ha conseguido haciendo reaccionar el mismo 25 con NaBH_4 y después con una solución de metanol acidificada con ácido clorhídrico. Se obtuvieron dos sustancias. Una de ellas fué identificada como cladinósido de metilo. La otra fué tratada a reflujo con HCl 3n durante 6 horas dando dos productos que fueron identificados como clorhidrato de micaminosa y 9,9-dihidroeritronolida A, respecti- 30



vamente.

Preparación alternativa de 4'-hidroxieritromicina A

Se disolvió un gramo de 3'-desdimetilamino-3'-azido-4'-hidroxieritromicina A en 100 ml. de etanol absoluto. A esta solución se añadieron 1,2 ml. de formaldehído al 37 % junto con 0,85 gramos de Pd al 5 % sobre el negro de carbón. Esta mezcla se agitó durante 24 horas en presencia de H₂ en una agitadora de Parr. Cuando el producto crudo se purificó de manera similar a como se ha descrito más arriba, se obtuvieron 0,68 gms. (rendimiento 68 %) de 4'-hidroxieritromicina A de P.F. 148° - 150°C.

La 4'-hidroxieritromicina A puede emplearse en las dosis similares en que se usa la eritromicina. Ella puede administrarse en cualquier forma conveniente, es decir como compuesto básico o como una sal de adición ácida, y por cualquier vía de administración conveniente.

Acabamos de describir la invención en términos claros para un experto en la materia, entendiéndose que las pequeñas desviaciones de lo que hemos descrito no se alejarán del espíritu y la extensión de la invención reivindicada.

En resumen, la Patente de Invención que se solicita, deberá recaer sobre las siguientes:

- REIVINDICACIONES -

1.- Un método para producir 4'-hidroxieritromicina A, que consiste en hacer reaccionar la 3'-(desdimetilamino)- Δ -3',4'-eritromicina A con un agente epoxidante para formar 3'-(desdimetil)-3',4'-epoxieritromicina A, abrir el anillo del epóxido con una azida para formar 3'-(desdimetilamino)-3'-azido-4'-hidroxieritromicina A y reducir el



1 derivado azido en presencia de formaldehido a 4'-hidroxie-
ritromicina A.

2.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1 -
en el que la 3'-(desdimetilamino)-3'-azido-4'-hidroxieritro
5 micina A es reducida primero a 3'-(desdimetilamino)-3'-ami-
no-4'-hidroxieritromicina A, la cual se reduce después en -
presencia de formaldehido a 4'-hidroxieritromicina A.

3.- Se reivindica por último, como objeto sobre el
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita :
10 "UN METODO PARA PRODUCIR 4'-HIDROXIERITROMICINA A".

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la -
presente memoria, que consta de trece páginas mecanografía-
das.

Madrid, 15 de junio de 1.968

BERNARDO UNGRIA

p.p.

15

20

25

30