

404747

81



Amal E

Int. Cl.: A61K, C07G

404747

404747

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: BRISTOL-MYERS COMPANY

RESIDENCIA: 345 Park Avenue, NEW YORK, N.Y. USA.

ENUNCIADO: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE DERIVADOS DE ANTIBIOTICO DE KANAMICINA.

Prioridad: Patente estadounidense n.º 162.315 del 13-7-71 y 221.378 27-1-72

l.a.

404747

11 JUL



1

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

5

1) Campo de la invención: Esta invención se refiere a derivados 1-sustituídos semisintéticos de kanamicina A o B, siendo preparados dichos compuestos por acilación de la función 1-amino de la kanamicina A o B con un radical γ -amino- α -hidroxibutirilo.

10

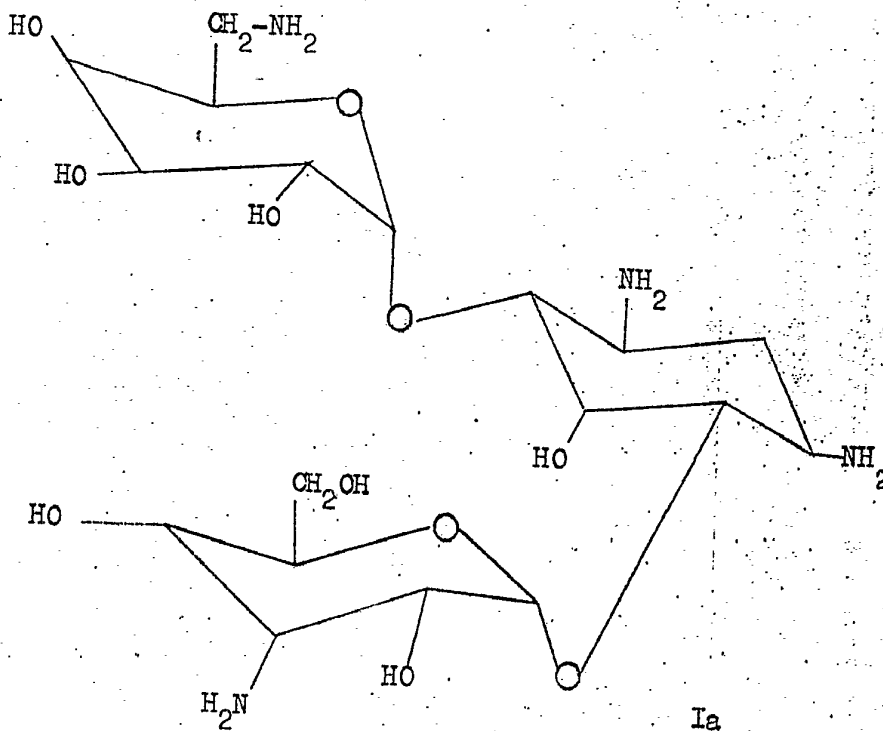
2) Descripción de la técnica anterior: Las kanamicinas son antibióticos conocidos descritos en el Índice de Merck, 8ª edición, págs. 597-598. La kanamicina A es un compuesto de fórmula:

15

20

25

30



POOR
QUALITY

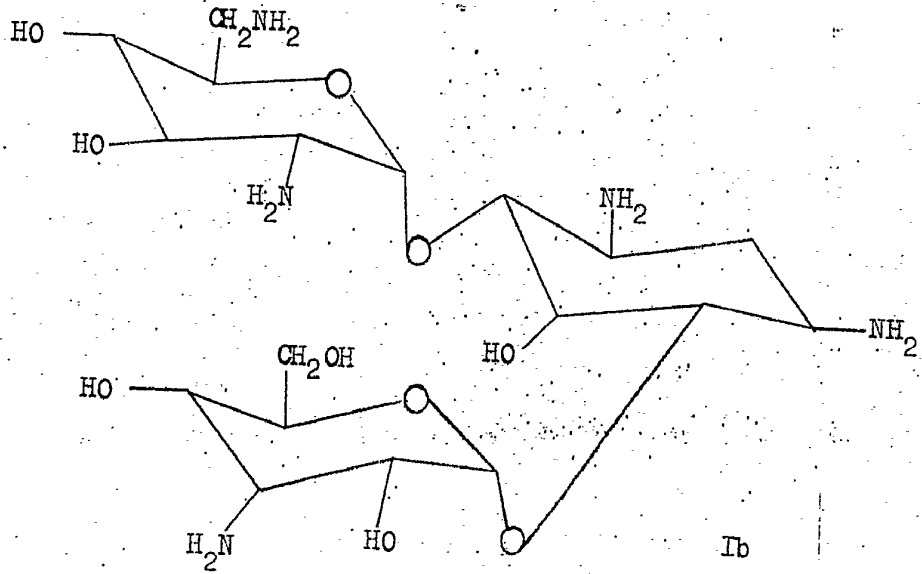


404747

1

La kanamicina B es un compuesto de fórmula:

5

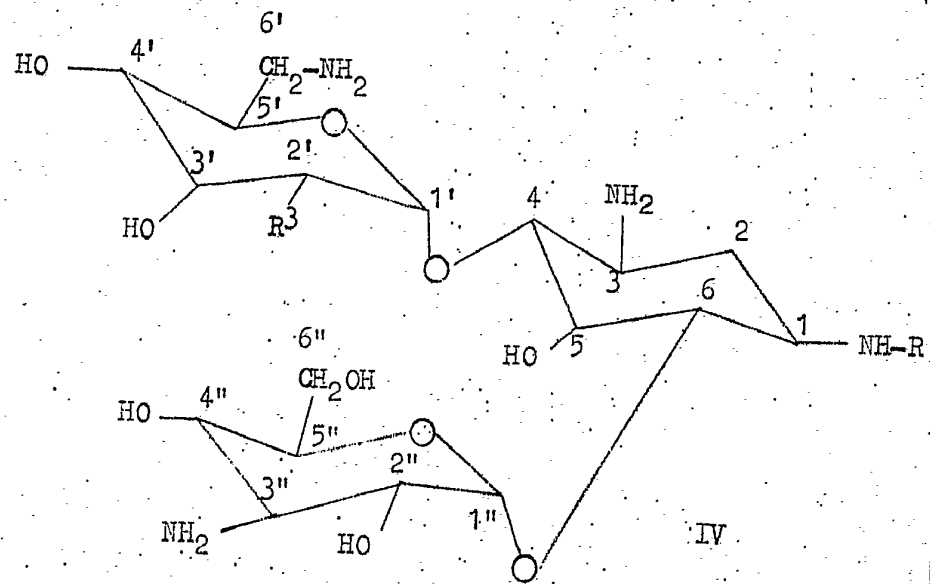


10

15

Esta invención se refiere a derivados semisintéticos de kanamicina A y B, siendo conocidos estos compuestos como 1-[L-(-)-γ-amino-α-hidroxitirilo]kanamicina A y B y respondiendo a la fórmula:

20



25

30

donde R³ es OH o NH₂ y R es L-(-)-γ-amino-α-hidroxitirilo o sus sales de adición con ácidos no tóxicas y farmacéuticamente aceptables.



404747

1

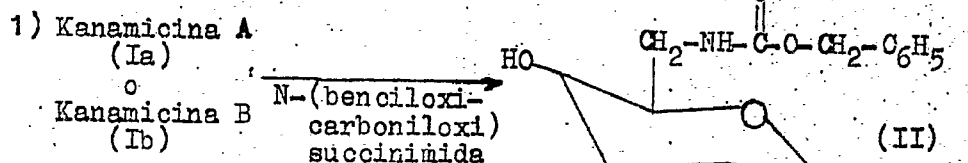
En esta memoria, el término "sales de adición con ácidos no tóxicas y farmacéuticamente aceptables" se refiere a las monosales, disales, trisales o tetrasales formadas por interacción de una molécula del compuesto IV con uno a cuatro moles de un ácido no tóxico y farmacéuticamente aceptable. Entre estos ácidos se encuentran los ácidos acético, clorhídrico, sulfúrico, mandélico, maleico, fosfórico, nítrico, bromhídrico, ascórbico, málico y cítrico y los otros ácidos comúnmente utilizados para formar sales de los productos farmacéuticos que contienen grupos amina.

5

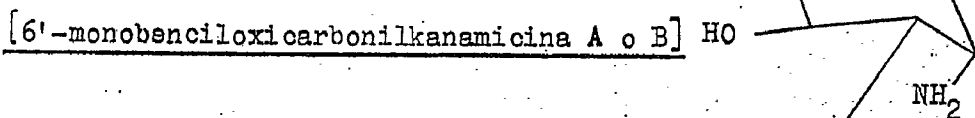
10

Los compuestos de esta invención pueden ser preparados, por ejemplo, mediante la secuencia de reacción preferida siguiente:

15

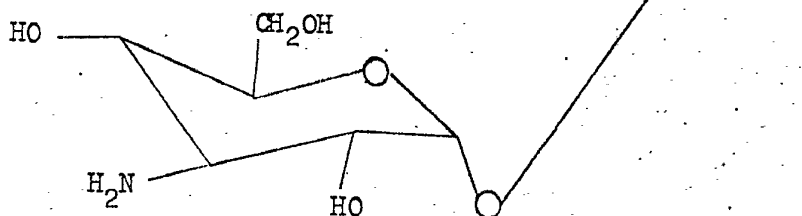


20



25

30



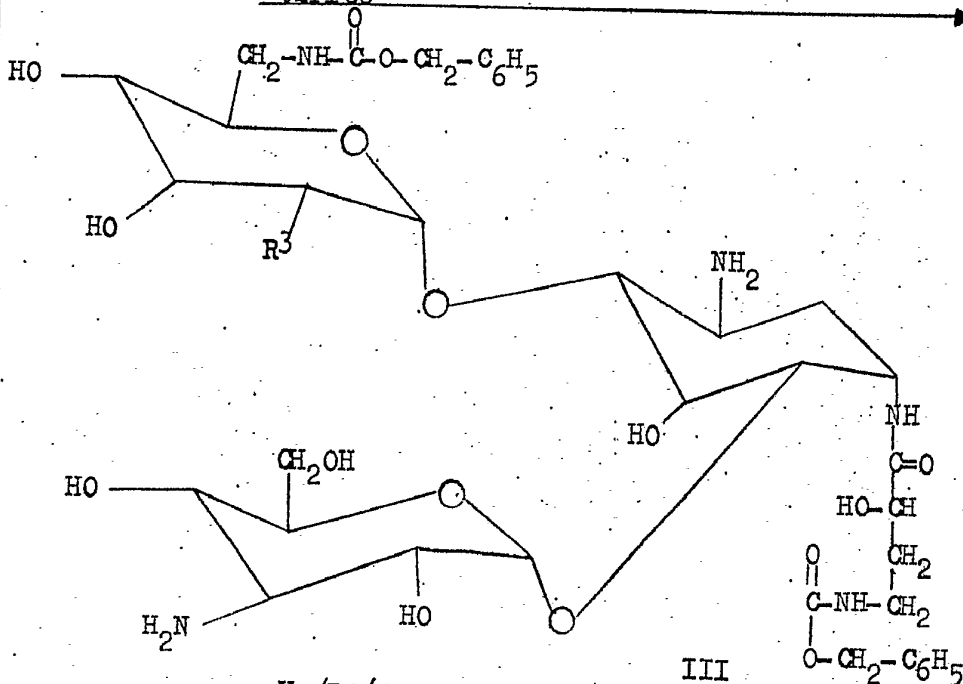
11 JUL



404747

1

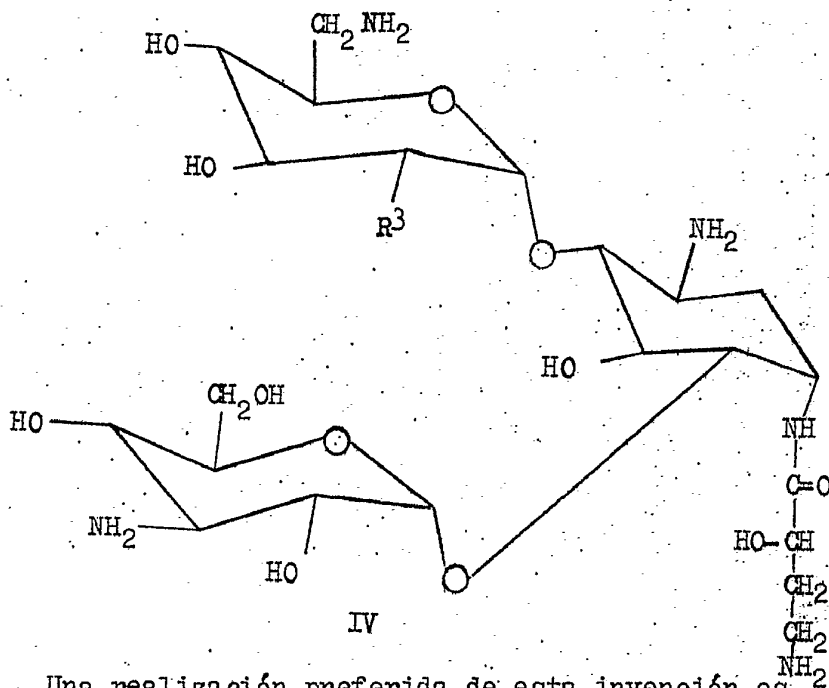
2) Compuesto II $\xrightarrow{\text{Ester de N-hidroxisuccinimida de ácido L-(-)-\gamma\text{-benciloxycarbonilamino-}\alpha\text{-hidroxibutírico}}$



5

10

3) Compuesto III $\xrightarrow{\text{H}_2/\text{Pd/C}}$



15

20

25

Una realización preferida de esta invención es el compuesto de fórmula:

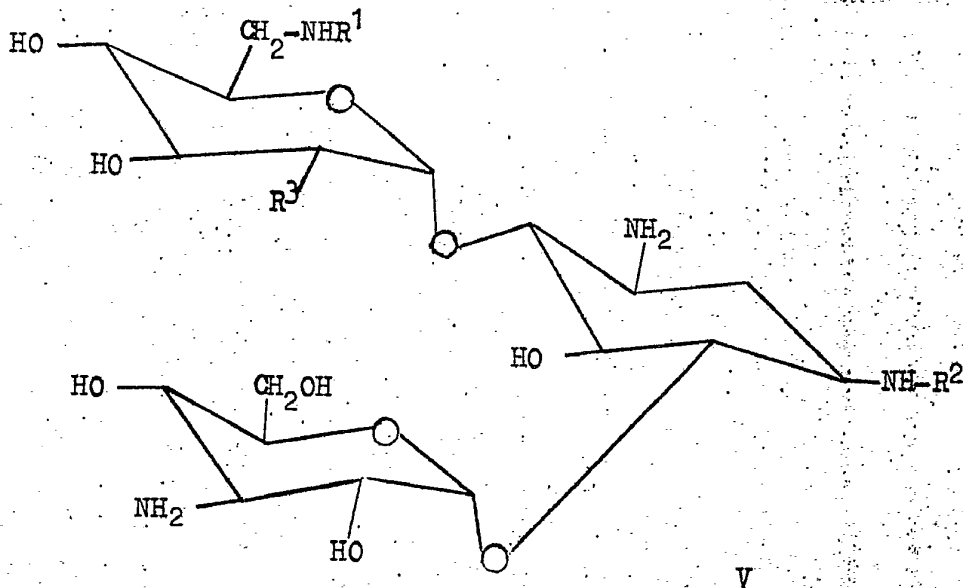
30

404747

11 (11)



1
5
10



15

donde R^1 es hidrógeno o $C_6H_5-CH_2-O-C(=O)-$, R^2 es hidrógeno o L-(-)- γ -amino- α -hidroxibutirilo y R^3 es OH o NH_2 cuando R^1 o R^2 deben ser distintos de hidrógeno; o una sal de adición con ácido del mismo, no tóxica y farmacéuticamente aceptable.

20

Otra realización preferida es el compuesto de fórmula V donde R^1 es $C_6H_5CH_2O-C(=O)-$, R^2 es hidrógeno y R^3 es OH o NH_2 .

25

Una realización más preferida es el compuesto de fórmula V donde R^2 es L-(-)- γ -amino- α -hidroxibutirilo, R^1 es hidrógeno y R^3 es OH o NH_2 .

30

La realización más preferida es el compuesto de fórmula V donde R^1 es hidrógeno, R^2 es L-(-)- γ -amino- α -hidroxibutirilo y R^3 es OH o una sal de adición con ácidos del mismo, no tóxica y farmacéuticamente aceptable.

Otra realización preferida es el compuesto de fórmula V donde R^1 es hidrógeno, R^2 es L-(-)- γ -amino- α -hidroxibutirilo y R^3 es NH_2 o una sal de adición con ácidos del mismo, no tóxica y farmacéuticamente aceptable.

11 JUN 1964



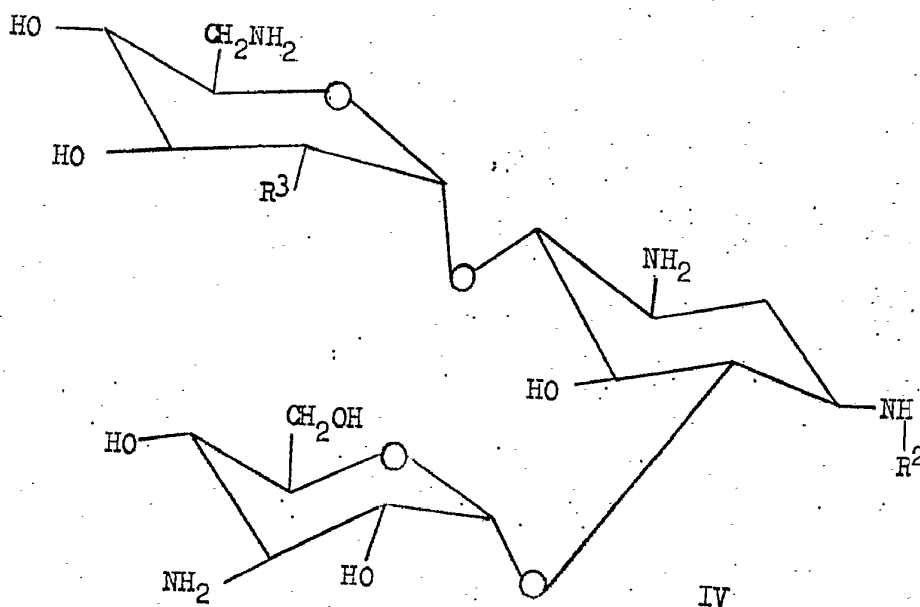
404747

Otras realizaciones preferidas son los sulfatos, hidrocloruros, acetatos, maleatos, mandelatos, citratos, ascorbatos, nitratos o fosfatos de los compuestos V.

Otra realización preferida es el monosulfato del compuesto V.

Todavía otra realización preferida es el disulfato del compuesto V.

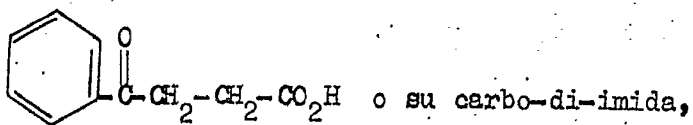
Los objetivos de esta invención se han alcanzado mediante la provisión de un procedimiento para la preparación de los compuestos de fórmula



donde R^2 es L-(-)- γ -amino- α -hidroxibutirilo y R^3 es OH o NH_2 o las sales de adición con ácidos de los mismos, no tóxicas y farmacéuticamente aceptables, cuyo procedimiento comprende las etapas consecutivas consistentes en:

A) acilar la kanamicina A o la kanamicina B con un agente acilante seleccionado entre los compuestos de fórmulas:

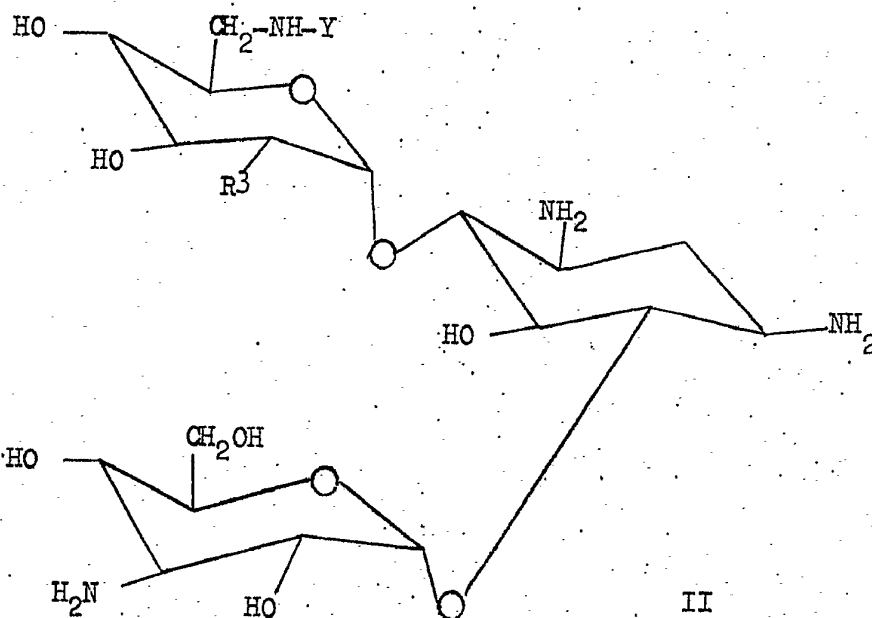
404747



5 donde R⁴ y R⁵ son iguales o diferentes y cada uno de ellos representa hidrógeno, flúor, cloro, bromo, NO₂, OH, alquilo inferior o alcoxi inferior; X es cloro, bromo o yodo o su equivalente funcional como agente acilante, en una proporción de un mol o menos de agente acilante por mol de kanamicina A o B, en un disolvente, preferiblemente seleccionado entre el grupo formado por dimetilformamida, dimetilacetamida, tetrahidrofurano, dioxano, 1,2-dimetoxietano, metanol, etanol, agua, acetona, piridina, N-alquil(inferior)piridina o mezclas de los mismos, pero preferiblemente dimetilformamida, a una temperatura inferior a unos 50°C y preferiblemente inferior a 25°C para producir el compuesto de fórmula:

10

15



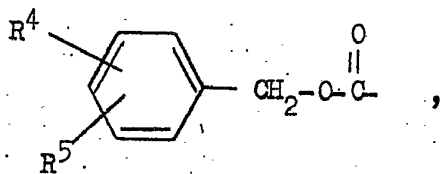
donde Y es un radical de fórmula:

-10-
404747

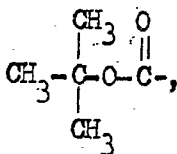
11 JUL 1972



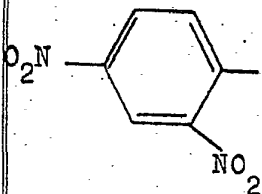
1



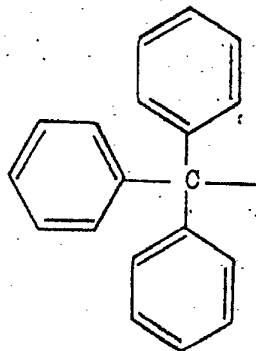
5



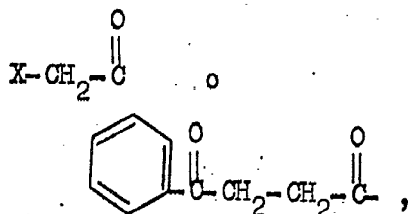
10



15



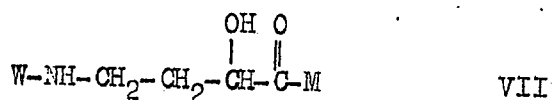
20



donde R^4 , R^5 y R^3 son los definidos anteriormente;

25

B) acilar el compuesto II con un agente acilante de fórmula:



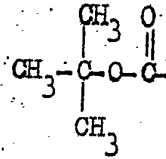
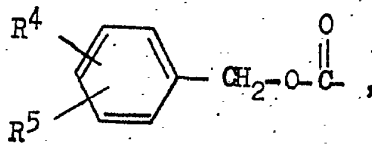
30

procediendo dicho agente acilante del ácido L-(-)- γ -amino- α -hidroxibutírico, donde W es un radical seleccionado entre el grupo formado por

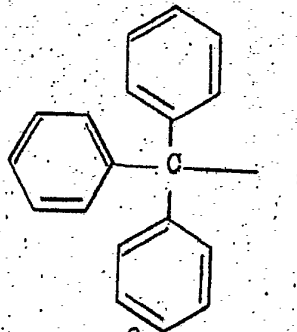
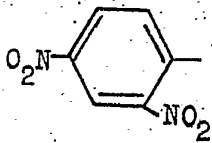
404747



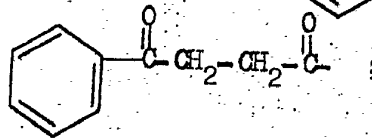
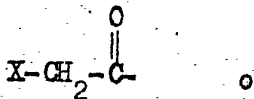
1



5

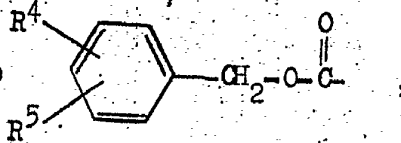


10



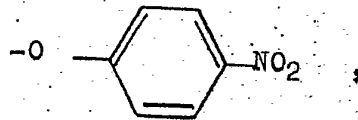
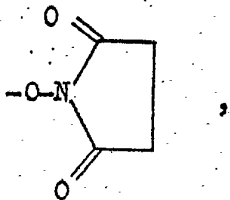
15

pero preferiblemente

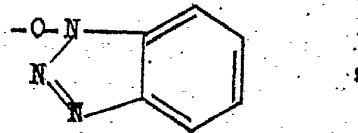
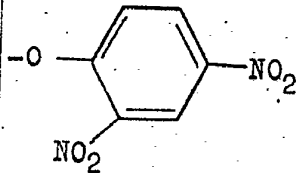


M es un radical seleccionado entre el grupo formado por:

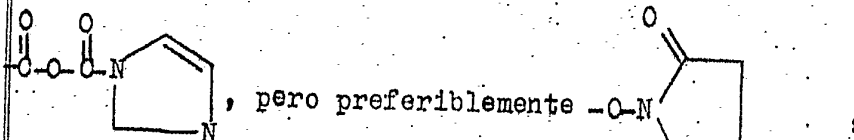
20



25



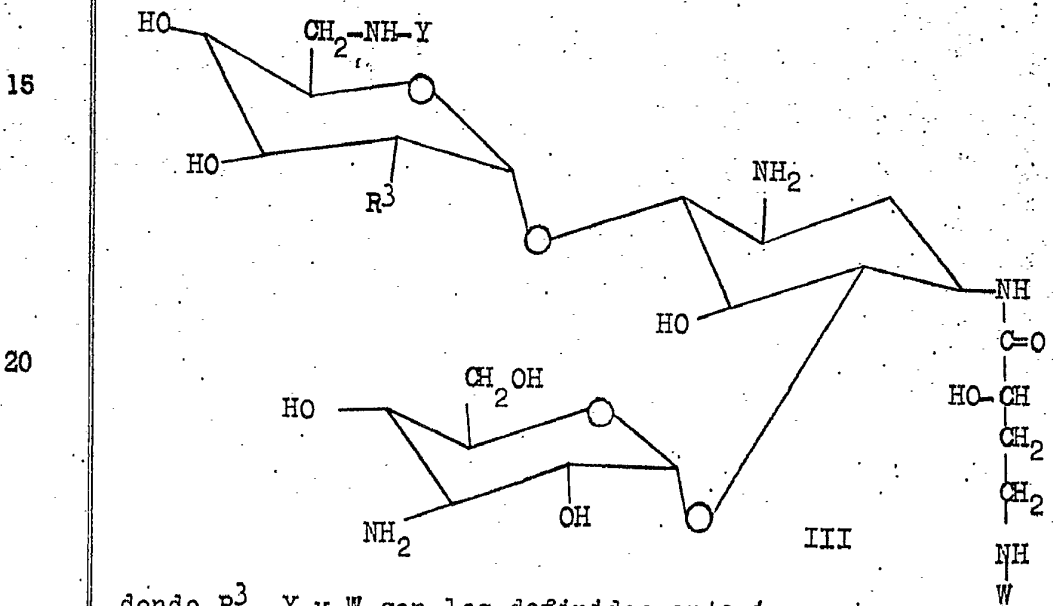
30





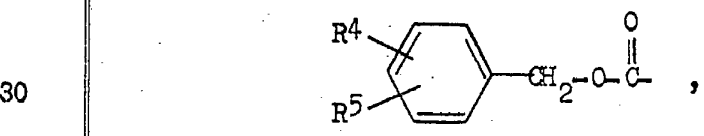
404747

1 donde R⁴ y R⁵ son los descritos anteriormente, o con su
 equivalente funcional como agente acilante de una amina
 primaria, en una proporción de 0,5 moles como mínimo de
 compuesto VII por mol de compuesto II, pero preferiblemen-
 5 te en una proporción alrededor de 0,5 a 1,4 moles y todavía
 mejor en una proporción de 0,8 a 1,1, en un disolvente se-
 leccionado preferiblemente entre el grupo formado por una
 mezcla de agua y éter dimetílico de etilenglicol, dioxano,
 dimetilacetamida, dimetilformamida, tetrahidrofurano, éter
 10 dimetílico de propilenglicol o similares y todavía mejor
 en una mezcla 1:1 de agua y éter dimetílico de etilenglicol,
 para producir un compuesto de fórmula:



donde R³, Y y W son los definidos anteriormente y

C) separar los grupos bloqueantes W e Y del com-
 puesto III por métodos conocidos en la técnica y, preferi-
 blemente, cuando W e Y son radicales de fórmula:



11 JUL



404747

1 por hidrogenación del compuesto III con hidrógeno en pre-
sencia de un catalizador metálico; preferiblemente sele-
5 cionado entre el grupo formado por paladio, platino, níquel
Raney, rodio, rutenio y níquel, pero preferiblemente pala-
dio y todavía mejor paladio sobre carbón, en un sistema for-
mado por agua y un disolvente miscible con agua, preferible-
mente seleccionado entre el grupo formado por agua y dioxana-
10 no, tetrahidrofurano, éter dimetílico de etilenglicol, éter
dimetílico de propilenglicol o similares pero todavía mejor
una mezcla 1:1 de agua y dioxano y preferiblemente en pre-
sencia de una cantidad catalítica de ácido acético glacial,
para producir el compuesto de fórmula IV y, si se desea, con-
15 virtiendo posteriormente el producto por métodos ya conoci-
dos en una sal de adición con ácidos del mismo, no tóxica y
farmacéuticamente aceptable.

Los expertos en la técnica observarán que pueden
utilizarse otros agentes en el procedimiento citado para aci-
lar las funciones amina de los compuestos intermedios de es-
20 ta invención. Pretendemos que en esta memoria estén inclui-
dos todos estos agentes acilantes que producen grupos lá-
biles bloqueantes de la función amina, siendo dichos grupos
bloqueantes lábiles los comúnmente empleados en la síntesis
de péptidos. Los grupos bloqueantes lábiles deben ser fácil-
25 mente separables por métodos conocidos en la técnica. Pueden
encontrarse ejemplos de grupos bloqueantes lábiles y de su
separación en la revisión de A. Kapoor, J. Pharm. Sciences
59, págs. 1-27 (1970). Los equivalentes funcionales o agen-
tes acilantes de los grupos amino primarios comprenden los
30 correspondientes cloruros, bromuros y anhídridos carboxíli-
cos, incluidos los anhídridos mixtos y especialmente los

404747

11 JUL



1 anhidridos mixtos preparados a partir de ácidos más fuer-
tes, tales como los monoésteres alifáticos inferiores del
ácido carbónico, ácidos alquil y arilsulfónicos y ácidos
5 con mayor impedimento estérico como el ácido difenilacéti-
co. Además, puede utilizarse una azida de ácido o un éster
o tioéster activo (v.g. con p-nitrofenol, 2,4-dinitrofenol,
tiofenol, ácido tioacético) o el propio ácido libre puede
ser copulado con el derivado de kanamicina (II) después de
10 haber hecho reaccionar en primer lugar dicho ácido libre
con cloruro de N,N'-dimetilcloroforminio [véase la paten-
te inglesa nº 1.008.170 y Novak y Weichet, *Experientia*
XXI/6, 360 (1965)] o mediante el uso de enzimas o de un
N,N'-carbonil-di-imidazol o de un N,N'-carbonilditriazol
15 [véase Sheehan y Hess, *J. Amer. Chem. Soc.*, 77, 1067, (1955)]
o de un reactivo de alquililamina [véase R. Buijile y H.G.
Viehe, *Angew. Chem., International Edition* 3, 582 (1964)],
o de un reactivo de cetenimina [véase C.L. Stevens y M.E.
Monk, *J. Amer. Chem. Soc.* 80, 4065 (1958)] o de un reactivo
20 de sal de isoxazolio [véase R.B. Woodward, R.A. Olofson y
H. Mayer, *J. Amer. Chem. Soc.*, 83, 1010 (1961)]. Otro equiva-
lente del cloruro de ácido es la azolida correspondiente,
es decir una amida del ácido correspondiente cuyo nitróge-
no amídico es un miembro de un anillo de cinco eslabones
25 cuasi-aromático que contiene por lo menos dos átomos de ni-
trógeno, es decir imidazol, pirazol, triazoles, bencimidaz-
zol, benzotriazol y sus derivados sustituidos. Como ejemplo
del método general de preparación de azolidas, se hace reac-
cionar N,N'-carbonil-di-imidazol con un ácido carboxílico
30 en proporciones equimoleculares, a la temperatura ambiente,



404747

1 en tetrahidrofurano, cloroformo, dimetilformamida o un disolvente inerte similar para formar la imidazolida del ácido carboxílico con un rendimiento prácticamente cuantitativo y liberación de dióxido de carbono y 1 mol de imidazol.

5 Los ácidos dicarboxílicos forman di-imidazolidas. El subproducto imidazol precipita y puede ser separado y aislada la imidazolida, pero esto no es esencial. Estas reacciones son conocidas (véanse las patentes estadounidenses números 3.079.314, 3.117.126 y 3.129.224 y las patentes inglesas 10 núms. 932.644, 957.570 y 959.054).

15 En la preparación de la 6'-amino(bloqueado)kanamicina de la Etapa A, se prefiere regular las proporciones molares de los reactivos de manera que se utilice una proporción de un mol o menos de agente acilante por mol de 6'-amino(bloqueado)kanamicina. Si se aumenta la proporción de agente acilante se produce un rendimiento menor del intermediario deseado debido al aumento de las reacciones secundarias competitivas que producen impurezas de derivados poli- 20 liacilados.

25 Como ocurre con la mayoría de las reacciones químicas, pueden emplearse temperaturas superiores o inferiores a las descritas aquí específicamente. Sin embargo, a temperaturas sustancialmente más altas que las descritas, es decir 50°C, el rendimiento suele ser menor debido a una mayor extensión de las reacciones secundarias.

30 El compuesto IVa, 1-[L(-)-γ-amino-α-hidroxi-butiril]kanamicina A, posee una excelente actividad antibacteriana que es superior a la de la propia kanamicina A. A continuación se dan dos tablas que contienen las concentra-

404747

11 JUL 1967



1 ciones mínimas de inhibición (CMI) de la kanamicina A y del
 compuesto IVa (BB-K8) frente a una variedad de bacterias
 Gram-positivas y Gram-negativas, obtenidas por el método de
 dilución en ágar de Steers (Tabla I) y por el método de di-
 5 lución al doble (Tabla II). En el estudio de la Tabla I se
 utilizó un medio de ágar Mueller-Hinton y en el estudio de
 la Tabla II se utilizó caldo de infusión de corazón.

TABLA I (CMI mg/ml)

10	Organismo	Kanamicina A (6-8198)	Compuesto IVa [BB-K8] lote n° 4
	1. Alk. faecalis A-9423	16	8
	2. " " A 20648	>125	>125
	3. Ent. cloacae A-9656	4	4
	4. " species A-20364	>125	2
15	5. " hafniae 1 A-20674	1	1
	6. E. coli A-0636	2	1
	7. " A-20664	16	4
	8. " A-20665	>125	1
	9. " A-20507	32	2
20	10. " A-20520	>125	4
	11. " A-20365	>125	1
	12. " A-20684	2	2
	13. " A-20682	>125	2
	14. " A-20683	>125	8
25	15. " A-20681	>125	2
	16. " A-15119	4	4
	17. K. pneumoniae A-9867	4	4
	18. " species A-20328	>125	2
	19. " " A-20330	32	32
30	20. " " A-20634	>125	4

17-
404747

11 JUL



TABLA I (CMI mg/ml) (continuación)

	Organismo	Kanamicina A (6-8198)	Compuesto IVE [BB-K8] lote nº 4
1	21. <i>K. pneumoniae</i> A-20680	>125	4
	22. " " A-9977	1	1
5	23. <i>Pr. mirabilis</i> A-9900	2	2
	24. <i>Pr. morgani</i> A-15153	2	2
	25. " <i>vulgaris</i> A-9555	2	1
	26. " <i>rettgeri</i> A-9636	0,25	0,25
	27. " <i>mirabilis</i> A-20645	4	4
10	28. " <i>mirabilis</i> A-20454	2	2
	29. <i>Providencia stuartii</i> A-20615	2	1
	30. " <i>alkalifaciens</i> A-20676	1	1
	31. <i>Es. aeruginosa</i> A-20229	32	2
	32. " " A-9843A	125	16
15	33. " " A-20653	>125	32
	34. " <i>species</i> A-20601	125, 63	16
	35. " " A-20621	>125	>125
	36. " <i>maltophilia</i> A-20620	32	>125
	37. <i>Sal. enteritidis</i> A-9531	1	0,5
20	38. " <i>derby</i> A-20087	>125	1
	39. <i>Ser. marcescens</i> A-20019	2	4
	40. " " A-9933	4	8
	41. " " A-20460	>125	4 2
	42. " " A-20459	4	16
25	43. <i>Shig. flexneri</i> A9684	4	4
	44. <i>Aeromonas</i> sp. A-20670	2	2
	45. <i>Arizona</i> sp. A-20671	2	1
	46. <i>Citrobacter</i> sp. A-20673	4	4
	47. <i>Edwardsiella</i> sp. A-20678	4	4
30	48. <i>Staph. aureus</i> A-9606	1	1

404747

11 JUL 1957



TABLA I (CMI mg/ml) (continuación)

	Organismo	Kanacina A (6-8198)	Compuesto IVa [BB-K8] lote nº 4
	49. Staph. aureus A-4749	0,5	1
5	50. " " A-9537	2	1
	51. " " A-20610	>125	2
	52. " " A-20240	>125	8
	53. " " A-15197	1	2
Medio de Mueller-Hinton + 4 % de sangre de cordero			
10	54. Str. faecalis A-9854	63	63
	55. " " A-9575	125	>125
	56. Str. pyogenes A-20200	32, 16	32
	57. " " A-9604	125	125
	58. " " A-15040	125	125
15	59. " " A-20065	125	125
	60. D. pneumoniae A-9585	63, 32	63
	61. " " A-20159	>125	>125

TABLA II (CMI mg/ml)

	Organismo	Kanamicina A (6-8196)	Compuesto IVa [BB-K8] lote nº 4
20	1. D. pneumoniae + 5 % suero A-9585	63	63
	2. Str. pyogenes + 5 % suero A-9604	125	125
	3. Staph. aureus Smith A-9537	0,5	0,5
25	4. Staph. aureus A-9497	0,5	0,5
	5. Staph. aureus A-20239	>125	4
	6. Staph. aureus A-20240	>125	4
	7. Enter. cloacae A-0656	2	2
	8. Enter. species A-20364	>125	2
30	9. E. pneumoniae A-9867	2	4



404747

1

TABLA II (CMI mg/ml) (continuación)

	Organismo	Kanamicina A (6-8196)	Compuesto IVa BB-K8 lote nº 4
	10. E. coli K-12 ML1410 A-20361	2	4
5	11. E. coli K-12 ML1630 A-20363	>125	2
	12. E. coli K-12 A-9632	2	1
	13. E. coli A-20664	32	8
	14. E. coli A-20665	>125	8
	15. Pr. mirabilis A-9900	2	16
10	16. Pr. morgani A-15153	4	16
	17. Pr. vulgaris A-9436	1	2
	18. Ps. aeruginosa A-20227	4	1
	19. Ps. species A-20499	63	4
	20. Ps. aeruginosa A-20653	>125	4
15	21. Ps. species A-20621	>125	>125
	22. Ser. marcescens A-20019	2	4
	23. Ser. marcescens A-20141	16	16

20

Los valores de las CMI anteriores indican que el compuesto IVa (BB-K8) es superior a la kanamicina A en actividad, especialmente contra los organismos resistentes a la kanamicina A.

25

Los valores de la CMI también concuerdan bien con los resultados in vivo para los tres organismos contra los cuales fueron probadas la kanamicina A y el compuesto IVa.

30

El compuesto IVa y la kanamicina A resultaron igualmente eficaces en las infecciones de ratones causadas por variedades sensibles a la kanamicina A de E. coli A15119 y Staph. aureus A9537. Aunque los valores DC₅₀ (dosis curativa en el 50 % de los ratones infectados letalmen-

404747

11 JUL



1

te) para el Staph. aureus A9537 sugieren que el compuesto IVa es ligeramente menos activo que la kanamicina A, probablemente esta pequeña diferencia no es significativa porque los niveles de dosis eran bastante diferentes (diluciones de cinco veces).

5

Contra la variedad de E. coli A20520 resistente a la kanamicina, como se esperaba la kanamicina A no resultó efectiva in vivo mientras que el compuesto IVa presentó una marcada acción protectora. El compuesto IVa resultó aproximadamente diez veces más activo contra esta variedad de E. coli cuando se administró en un régimen de cuatro tratamientos en lugar de uno en dos tratamientos.

10

15

20

25

30

404747

11 JUL 1970

404747

TABLA VII

Comparación de las actividades in vitro e in vivo del compuesto IVA y Kanamicina A

Compuestos	Número del ensayo	Staphylococcus aureus A937		Escherichia coli A15119		Escherichia coli A20520	
		MCI	DC ₅₀	MCI	DC ₅₀	MCI	DC ₅₀
Compuesto IV	1	2	2,0 x 2	2	2 x 2	2	66 x 2
	2	— ^c	—	—	—	—	5 x 4
Kanamicina A	1	2	0,5 x 2	4	4 x 2	125	200 x 2
	2	—	—	—	—	—	200 x 4

^a CMI = concentración mínima de inhibición (µg/ml). Ensayos realizados en la forma descrita por Christobal y colaboradores (Antimicrob. agents and Chemotherapy-1969, pág. 244, 1970) utilizando como medio de ensayo agar de Inellier-Hinten

^b DC₅₀ = dosis curativa al 50 % (mg/kg/Utilizados x número de tratamientos). Los ratones fueron tratados subcutáneamente al cabo de 1 y 4 horas después de la infección cuando se administraron dos tratamientos y al cabo de 0, 2, 4 y 6 horas después de la infección cuando se administraron cuatro tratamientos. Otros aspectos del ensayo fueron realizados en la forma descrita por Price y colaboradores (J. of Antibiotics 22:1, 1969)

^c — = no determinado.

1

5

10

15

20

25

30

POOR QUALITY

404747

11



- 21 -

TABLA III

Comparación de las actividades in vitro e in vivo del c

Compuestos	Número del ensayo	Staphylococcus aureus A9537		Escal
		MCI	^b DC ₅₀	MCI
Compuesto IV	1	2	2,0 x 2	2
	2	- ^c	-	-
Kenamicina A	1	2	0,5 x 2	4
	2	-	-	-

^aMCI = concentración mínima de inhibición (µg/ml). Ensayos realizados en laboratorios (Antimicrob. agents and Chemotherapy-1969, pág. 244) en agar de Mueller-Hinton

^bDC₅₀ = dosis curativa al 50 % (mg/kg/ utilizados x número de tratamientos) administrada al cabo de 1 y 4 horas después de la infección cuando se observó el aspecto del ensayo fueron realizados en la forma descrita por (22:1, 1969)

^c- = no determinado.



- 21 -

404747

TABLA III

Las actividades in vitro e in vivo del compuesto IVA y kanamicina A

<u>Staphylococcus aureus A9537</u>		<u>Escherichia coli A15119</u>		<u>Escherichia coli A20520</u>	
<u>MCI</u>	<u>^bDC₅₀</u>	<u>MCI</u>	<u>DC₅₀</u>	<u>MCI</u>	<u>DC₅₀</u>
2	2,0 x 2	2	2 x 2	2	66 x 2
- ^c	-	-	-	-	5 x 4
2	0,5 x 2	4	4 x 2	125	200 x 2
-	-	-	-	-	200 x 4

inhibición (µg/ml). Ensayos realizados en la forma descrita por Chrisholm y co-
. agents and Chemotherapy-1969, pág. 244, 1970) utilizando como medio de ensayo

(mg/kg/utilizados x número de tratamientos). Los ratones fueron tratados subcu-
y 4 horas después de la infección cuando se administraron dos tratamientos y
horas después de la infección cuando se administraron cuatro tratamientos. Otros
ron realizados en la forma descrita por Price y colaboradores (J. of Antibiotics

11 JUL.



404747

1

Los compuestos IV son valiosos como agentes antibacterianos, suplementos nutritivos en piensos para animales, agentes terapéuticos en el ganado aviar y animales, incluido el hombre y son especialmente valiosos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas causadas por las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

5

Quando se administran por vía oral, los compuestos IV son útiles como tratamiento auxiliar para la esterilización preoperatoria del intestino. Tanto la flora aerobia como anaerobia que es susceptible a estas drogas es reducida en el intestino grueso. Cuando van acompañados de una limpieza mecánica adecuada, son útiles en la preparación para la cirugía del colon.

10

15

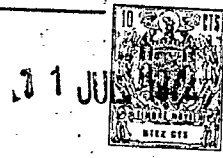
Los compuestos IV son eficaces en el tratamiento de las infecciones bacterianas sistémicas cuando se administran parenteralmente a una dosis comprendida entre unos 250 mg y 3000 mg por día, en dosis divididas en tres o cuatro veces al día. Generalmente los compuestos son eficaces cuando se administran a una dosis de alrededor de 5,0 a 7,5 mg/kg de peso corporal cada 12 horas.

20

25

El compuesto IVb, 1-[L(-)- γ -amino- α -hidroxibutirril]kanamicina B, posee excelente actividad antibacteriana que al parecer es superior a la de la kanamicina A. A continuación ilustramos la Tabla IV que contiene las concentraciones mínimas de inhibición (MCI) de la kanamicina A y del compuesto IVb (BB-K26) contra una variedad de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Los valores de la MCI fueron obtenidos por el método de dilución en agar Steers (Tabla IV) sobre un medio de agar nutritivo.

30



404747

TABLA IV

1
5
10
15
20
25
30

Organismo	Nº de clave Bristol	Resist. a	CMI (mg/ml)	
			BBK-26	Kanamicina A
E. coli NLHJ			0,4	0,8
" Juhl	A15119		1,6	0,8
"	A15169		1,6	1,6
"	A20363	KM	0,8	50
"	A9844		0,8	0,8
"	A20365	KM	0,4	50
" K-12			0,8	0,4
" K-12	A20664	KM	0,8	3,1
" K-12	A20665	KM	0,8	50
K. pneumoniae D11			0,2	0,2
"	A9678		0,8	0,8
S. marcescens	A20019		1,6	1,6
Ps. aeruginosa D15			3,1	12,5
" D113		KM	50	>50
"	A9923		1,6	25
"	A9930		0,8	6,3
"	A15150		6,3	25
"	A15194		1,6	12,5
"	A20479	KM	1,6	50
"	A20616	KM	3,1	25
"	A20653	KM	25	50
"	A9843		1,6	12,5
Pseudomonas sp.	A20355		1,6	6,3
"	A20358	KM	3,1	12,5
"	A20368	GM	50	25
"	A20598	GM	6,3	25
"	A20600	GM	3,1	12,5



404747

TABLA IV (continuación)

1

5

10

15

20

25

30

Organismo	Nº de clave Bristol	Resist. a	CMI (mg/ml)	
			BBK-26	Kanamicina A
Pseudomonas sp.	A20603	GM	6,3	>50
"	A20618	GM	50	50
Pr. vulgaris	A9436		1,6	0,8
"	A9526		0,8	0,8
Pr. mirabilis	A9554		1,6	1,6
"	A9900		1,6	1,6
Pr. morgani	A9553		1,6	1,6
"	A20031		6,3	3,1
Pr. rettgeri	A15167		0,8	0,8
S. aureus 209P			1,6	0,8
" Smith			0,8	0,4
" 209P			1,6	0,8
" A20239		KM	1,6	25
S. lutea FC1-1001			1,6	3,1
M. flavus			0,4	0,8
B. subtilis FC1-219			0,1	0,1
St. pyogenes S-23			25	25
" Dick			1,6	1,6
" Digonnet A9604			12,5	25
" A20065			25	25
D. pneumoniae			50	25
Mycobacterium 607			6,3	0,8
" 607 D105		KM	>100	>100
" 607 D107		KM	>100	>100
" phlei			1,6	1,6
" ranarum			6,3	1,6
" H37Rv st			0,8	0,4



404747

1

* determinada por el método de dilución en tubo.

KM es kanamicina A; GM es gentamicina.

5

Los valores anteriores de la CMI indican que el compuesto IVb (BB-K26) es superior a la kanamicina A en actividad, especialmente contra los organismos resistentes a la kanamicina A.

10

Se realizó una evaluación in vivo del compuesto IVb frente a variedades sensibles y resistentes a la kanamicina B de E. coli y Ps. aeruginosa.

Los organismos fueron denominados como sigue:

15

	<u>Número de clave</u>	<u>Sensibilidad a la kanamicina</u>
<u>E. coli</u> Juhl	A15119	sensible
<u>E. coli</u> ML-1630	A20363	resistente (fosforilación)
<u>Ps. aeruginosa</u> D15	-	moderadamente resistente
<u>Ps. aeruginosa</u> D113	-	muy resistente (fosforilación)

20

El compuesto IVb (BB-K26) y la kanamicina B resultaron igualmente eficaces contra E. coli Juhl A15119 a una dosis de 6,3 mg/kg en ratones. El compuesto IVb presentaba la máxima eficacia contra el E. coli ML-1630 resistente a la kanamicina B, a una dosis de 6,3 mg/kg frente a 100-400 mg/kg para la kanamicina B.

25

El compuesto IVb presentaba contra la Ps. aeruginosa D15 moderadamente resistente una actividad ligeramente mayor que la kanamicina B. El compuesto IVb presentaba una actividad contra la Ps. aeruginosa D-113 muy resistente considerablemente mayor que la kanamicina B (véase la Tabla V).

30

11 JU



404747

TABLA V

dosis (sc)	E. coli Juhl A15119		E. coli ML-1630	
	BB-K26	KM-B*	BB-K26	KM-B
400 mg/kg	-	-	-	2/5
100	5/5	5/5	5/5	2/5
25	5/5	5/5	5/5	0/5
6,3	5/5	5/5	5/5	0/5
1,6	0/5	0/5	2/5	-
DC ₅₀ (mg/kg)	3,1	3,1	1,8	ca 300

Ps. aeruginosa D15			Ps. aeruginosa D-113		
dosis (sc)	BB-K26	KM-B	dosis (sc)	BB-K26	KM-B
100 mg/kg	5/5	5/5	400 mg/kg	-	0/5
25	1/5	0/5	200	3/5	-
6,3	1/5	0/5	50	1/5	-
1,6	0/5	0/5	12,5	0/5	-
			3,1	0/5	-
DC ₅₀ (mg/kg)	38	50	DC ₅₀ (mg/kg)	145	>400

* KM-B es kanamicina B. Las cifras indicadas como 0/5, 1/5, 5/5, etc, indican el número de animales supervivientes por cada cinco animales atacados; por ejemplo, 5/5 indica que sobreviven cinco animales de los cinco que han recibido la dosis letal del organismo atacante cuando se trata con kanamicina B o BB-K26.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Preparación de ácido I-(-)-benciloxycarbonilamino- α -hidroxibutírico (IV)

A una solución de 5,2 g (0,13 moles) de hidróxido sódico en 50 ml de agua se añaden 7,4 g (0,062 moles) de



404747

1 ácido L-(-)- γ -amino- α -hidroxibutírico. A la solución agita-
da se añaden gota a gota, a 0-5°C durante un periodo de me-
5 dia hora, 11,7 g (0,068 moles) de carbobenzoxicloruro y la
mezcla se continúa agitando durante una hora a la misma tem-
peratura. La mezcla de reacción se lava con 50 ml de éter,
se ajusta a pH 2 con ácido clorhídrico diluido y se extrae
con cuatro porciones de 80 ml de éter cada vez. Se combinan
10 los extractos etéreos, se lavan con una pequeña cantidad de
solución saturada de cloruro sódico, se secan con sulfato
sódico anhidro y se filtran. El filtrado se evapora a vacío
y el residuo resultante se cristaliza en benceno para dar
11,6 g (74 %) de placas incoloras; punto de fusión 78,5-
79,5°C, $[\alpha]_D = 4,5$ (c = 2, CH₃OH). Espectro infrarrojo. (IR)
[KBr]: IR (KBr) $\nu_{C=O}$ 1740, 1690 cm⁻¹. Espectro de resonancia
15 magnética nuclear (RMN) (acetona-d₆) δ (en ppm a partir de TMS):
2,0 (2H, m), 3,29 (2H, d-d, J = 6,7 y 12 Hz), 4,16 (1H, d-d,
J = 4,5 y 8 Hz), 4,99 (2H, s), 6,2 (2H, ancha), 7,21 (5H, s).

Análisis para C₁₂H₁₅NO₅:

Calculado : C, 56,91; H, 5,97; N, 5,53

Encontrado: C, 56,66; H, 5,97; N, 5,47

EJEMPLO 2

Ester de N-hidroxisuccinimida de ácido L-(-)- γ -benciloxicar-
bonilamino- α -hidroxibutírico (VII)

25 Una solución de 10,6 g (0,042 moles) de VI y 4,8 g
(0,042 moles) de N-hidroxisuccinimida¹ en 200 ml de acetato
de etilo se enfría a 0°C y después se añaden 8,6 g (0,042 mo-
les) de dicitclohexilcarbo-di-imida. La mezcla se mantiene du-
rante la noche en un refrigerador. La dicitclohexilurea que
se separa se filtra y el filtrado se concentra hasta unos
30 50 ml bajo presión reducida para dar cristales incoloros de



404747

1 VII que se recogen por filtración; 6,4 g, p.f. 121-122,5°C.
 El filtrado se evapora a sequedad a vacío y el residuo cris-
 talino se lava con 20 ml de una mezcla de benceno-n-hexano
 para dar una cantidad adicional de VII. El rendimiento to-
 5 tal es de 13,4 g (92 %). $[\alpha]_D^{25} 1,5^\circ$ (c = 2, CHCl₃). IR
 (KBr): $\nu_{C=O}$ 1810, 1755, 1740, 1680 cm⁻¹. RMN (acetona-d₆)
 δ (en ppm a partir de TMS): 2,0 (2H, m), 2,83 (4H, s), 3,37
 (2H, d-d, J = 6,5 y 12,5 Hz), 4,56 (1H, m), 4,99 (2H, s),
 6,2 (2H, ancha), 7,23 (5H, s).

10 Análisis para C₁₆H₁₈N₂O₇:
 Calculado : C, 54,85; H, 5,18; N, 8,00
 Encontrado: C, 54,79, 54,70; H, 5,21, 5,20; N,
 8,14, 8,12.

15 1. G.W. Anderson y colaboradores, J.Am.Chem.Soc.,
 86, 1839 (1964).

EJEMPLO 3

Preparación de 1-[L-(-)- γ -benciloxicarbonilamino- α -hidroxi-
butiril]-6'-carbenezoxikanamicina A (IIIa)

20 Una solución de 1,6 g (4,6 milimoles) de VII en
 40 ml de éter dimetílico de etilenglicol (EDM) se añade go-
 ta a gota a una solución agitada de 2,6 g (4,2 milimoles)
 de 6'-monobenciloxicarbonilkanamicina A (II) en 40 ml de so-
 lución acuosa al 50 % de éter dimetílico de etilenglicol y
 la mezcla se agita durante la noche. La mezcla de reacción
 25 se evapora a presión reducida para dar un residuo pardo de
 IIIa que se utiliza en la siguiente reacción sin purificar.

EJEMPLO 4

Preparación de 1-[L-(-)- γ -amino- α -hidroxibutiril]kanamicina
A (IVa)

30 El producto crudo IIIa del Ejemplo 3 se disuelve



404747

1 en 40 ml de dioxano acuoso al 50 % y se separa por filtra-
 ción una pequeña cantidad de materia insoluble. Al filtra-
 do se añaden 0,8 ml de ácido acético glacial y 1 g de pala-
 dio al 10 % en carbón y la mezcla se hidrogena a la tempe-
 5 ratura ambiente durante 24 horas en un aparato de hidrogena-
 ción Parr. La mezcla de reacción se filtra para separar el
 catalizador de paladio y el filtrado se vapora a sequedad
 a vacío. El residuo se disuelve en 30 ml de agua y se cro-
 matografía en una columna de resina cambiadora de ión CG-50
 10 (tipo NH_4^+ , 50 x 1,8 cm). La columna se lava con 200 ml de
 agua y después se eluye con 800 ml de NH_4OH 0,1 N, 500 ml
 de NH_4OH 0,2 N y finalmente 500 ml de NH_4OH 0,5 N. Se re-
 cogen fracciones de 10 ml y las fracciones 146 a 154 con-
 tienen 552 mg (22 %, calculado sobre la carbobenzoxikanamici-
 15 na A, II) del producto IV que es denominado BB-K8, lote 2.
 P.f. 137° (desc.). Potencia relativa contra B. subtilis (pla-
 ca de ágar) = 560 mcg/mg (patrón: kanamicina A, base libre).

Una solución de 250 mg de BB-K8, lote 2, en 10 ml
 de agua se somete a cromatografía en una columna de CG-50
 20 (tipo NH_4^+ , 30 x 0,9 cm). La columna se lava con 50 ml de
 agua y después se eluye con NH_4OH 0,2 N. Se recogen fraccio-
 nes de 10 ml. Se combinan las fracciones 50 a 63 y se evapo-
 ran a sequedad bajo presión reducida para dar 98 mg del pro-
 ducto puro, K8, lote 2-1. P.f. 194° (desc.). $[\alpha]_D^{21} +85^\circ$
 25 (c = 2, H_2O). Potencia relativa contra B. subtilis (placa de
 ágar) = 960 mcg/mg (patrón: kanamicina A, base libre).

Análisis para $\text{C}_{22}\text{H}_{43}\text{N}_5\text{O}_{13} \cdot 2\text{H}_2\text{CO}_3$:

Calculado : C, 40,62; H, 6,68; N, 9,87

Encontrado: C, 40,21, 39,79; H, 6,96, 6,87; N, 9,37,

30 9,49.



404747

EJEMPLO 5

Preparación de N-(benciloxicarboniloxi)succinimida

1 Se disuelven 23 g (0,2 moles) de N-hidroxisuccini
5 mida¹ en una solución de 9 g (0,22 moles) de hidróxido só-
dico en 200 ml de agua. A la solución agitada se añaden go-
ta a gota 34 g (0,2 moles) de carbobenzoxicloruro enfriando
10 con agua y después la mezcla se agita a la temperatura am-
biente durante la noche para separar el derivado carboben-
zoxi, que se recoge por filtración, se lava con agua y se
seca al aire. Rendimiento: 41,1 g (82 %). Por recristaliza-
ción en benceno-n-hexano (10:1) se obtienen prismas incol-
ros que funden a 78-79°C.

15 1. G.W. Anderson y colaboradores, J. Am. Chem. Soc.,
86, 1839 (1964).

EJEMPLO 6

Preparación de 6'-carbobenzoxikanamicina A

20 Una solución de 42,5 g (90 milimoles) de kanami-
cina A en forma de base libre en 450 ml de agua y 500 ml de
dimetilformamida (DMF) se enfría por debajo de 0°C y se agi-
ta fuertemente. A la solución se añade gota a gota, durante
un periodo de 2 horas aproximadamente, una solución de 22,4 g
(90 milimoles) de N-(benciloxicarboniloxi)succinimida en
500 ml de DMF. La mezcla se agita entre -10° y 0°C durante
la noche y después a la temperatura ambiente durante un día.
25 La mezcla de reacción se evapora a presión reducida por de-
bajo de unos 50°C. El residuo oleoso se disuelve en una mez-
cla de 500 ml de agua y 500 ml de butanol, filtrando la mez-
cla para separar la materia insoluble y se separa en dos ca-
pas. Las capas butanólica y acética se lavan dos veces con
30 500 ml cada vez de agua saturada de butanol y dos veces con

404747



1 500 ml cada vez de butanol saturado de agua, respectivamente, utilizando una técnica similar a la distribución en contracorriente. Las tres capas acuosas se combinan y evaporan a sequedad bajo presión reducida para dar un residuo oleoso, parte del cual cristaliza al permanecer en reposo a la temperatura ambiente. Al residuo que comprende los cristales se añaden alrededor de 100 ml de metanol, que disuelve el aceite y lo separa de los cristales. Después de añadir alrededor de 300 ml de etanol, la mezcla se mantiene a la temperatura ambiente durante la noche para dar una masa cristalina que se recoge por filtración. Pesa 44 g. El producto contiene una pequeña cantidad de kanamicina A, como indica la cromatografía en capa fina utilizando una mezcla de n-propanol, piridina, ácido acético y agua (15:10:3:12) como sistema disolvente y ninhidrina como reactivo rociador.

15 El producto crudo se disuelve en 300 ml de agua y se cromatografía en una columna de 30 mm de diámetro de resina cambiadora de ión CG-50 (tipo NH_4^+ , 500 ml). La columna es irrigada con solución 0,1 N de hidróxido amónico y el eluato es recogido en fracciones de 10 ml. El producto deseado se encuentra en los tubos núms. 10 a 100, mientras que la kanamicina A se recupera de las fracciones que se mueven más lentamente y el isómero o isómeros de posición del producto parece encontrarse en las fracciones que se mueven más rápidamente. Se combinan las fracciones 10-110 y se evaporan a sequedad bajo presión reducida para dar 24,6 g (45 %) del producto incoloro 6-carbobenzoxikanamicina A (II) (6'-carbobenzoxikanamicina A), que comienza a fundir y colorearse a 204°C, descomponiéndose a 212°C con desprendimiento de gas.



404747

1 $[\alpha]_D + 106^\circ$ (c = 2, H₂O).

Sistema disolvente	Valor Rf			
	6'-carbobenzo- xikanamicina A		Kanamicina A	
5 n-PrOH-Piridina-AcOH-H ₂ O (15:10:3:12)	0,42	0,33	0,15	0,04
	(principal)		menor	
Acetona-AcOH-H ₂ O (20:6:74)		0,24		0,14
10 CHCl ₃ -MeOH-NH ₄ OH c.H ₂ O (1:4:2:1)		0,76		0,50
AcOMe-n-PrOH-NH ₄ OH c. (45:105:60)		0,22*		0,04*

* detectado mediante antrona-ácido sulfúrico.

15 Por cromatografía en capa fina con uno de los sistemas disolventes empleados, se encuentra que el producto final va acompañado de dos pequeños componentes. Sin embargo, el producto final es utilizado sin nueva purificación para la preparación de BB-K8 (I).

EJEMPLO 7

20 Preparación de ácido L(-)-γ-amino-α-hidroxitútrico a partir de ambutirosina A o B o mezclas de éstas

25 Se calientan a reflujo 5,0 g de ambutirosina A (patente estadounidense nº 3.541.078, publicada el 17 de Noviembre de 1970) con 160 ml de hidróxido sódico 0,5 N, durante una hora. El hidrolizado se neutraliza con HCl 6 N y se cromatografía sobre una columna de CG-50 (tipo NH₄⁺). El ácido L(-)-γ-amino-α-hidroxitútrico deseado se aísla desarrollando la columna con agua y separando el agua por liofilización. El ácido L(-)-γ-amino-α-hidroxitútrico se caracteriza como sustancia cristalina con un punto de fusión de

404747



1 212,5-214,5°C (columna 2, líneas 31-38, patente estadounidense nº 3.541.078).

EJEMPLO 8

Preparación de 6'-carbобенzoixikanamicina B

5 A una solución enfriada de 8,1 g (0,0168 moles) de kanamicina B en 120 ml de agua y 80 ml de 1,2-dimetoxietano se añade gota a gota y agitando una solución de 4,2 g (0,0168 moles) de N-(benciloxicarboniloxi)succinimida en 40 ml de 1,2-dimetoxietano. La mezcla de reacción se agita

10 durante la noche y se evapora a presión reducida. El residuo se disuelve en 100 ml de agua y se agita dos veces con 50 ml de n-butanol saturado con agua. La capa acuosa se separa y adsorbe sobre una columna de 100 ml de CG-50 (tipo NH₄⁺). La columna se lava con 200 ml de agua y se eluye con NH₄OH

15 0,05 N. El eluato se recoge en fracciones de 10 ml. Se recogen las fracciones 121 a 180, se evaporan y liofilizan para dar 1,58 g (15 %) del producto deseado. Se evaporan las fracciones 1 a 120 y se cromatografían de nuevo sobre CG-50 (NH₄⁺) para dar 1,21 g (12 %) del producto. P.f. 151-152°C (desc.). [α]_D²⁴ + 104° (c = 2,5, H₂O). C=O 1710 cm⁻¹.

20

Análisis para C₂₆H₄₃N₄O₁₂:

Calculado : C, 50,56; H, 7,02; N, 11,34

Encontrado: C, 50,71; H, 7,38; N, 11,47.

25 Cromatografía en capa fina (gel de sílice F254), R.f. 0,03 en n-PrOH-AcOH-H₂O (15:10:3:12); Rf 0,16 en acetona-AcOH-H₂O (20:6:74).

EJEMPLO 9

Preparación de 1-[L-(-)-γ-benciloxicarbonilamino-α-hidroxi-butiril]-6'-carbобенzoixikanamicina B (IIIb)

30 A una solución agitada de 1,85 g (3,0 milimoles)



404747

1 de 6'-carbобенzoixikanamicina B en 40 ml de H₂O y 50 ml de
1,2-dimetoxietano se añaden de una sola vez, a 5°C, 1,1 g
(3,1 milimoles) de N-(L-γ-carbобенzoixiamino-α-hidroxi-butiriloxi)succinimida. La mezcla de reacción se agita durante
5 la noche a la temperatura ambiente y se somete a hidrogeno-
lisis sin aislar el derivado carbобенzoixi (IIIb). Cromato-
grafía en capa fina (gel de sílice F254): Rf 0,06 (mate-
rial de partida), 0,41, 0,57 (n-PrOH-piridina-AcOH-H₂O 15:
10:3:12), Rf 0,11 (material de partida), 0,21, 0,34, 0,46
10 (acetona-AcOH-H₂O 20:6:74).

EJEMPLO 10

Preparación de 1-[L-(-)-γ-amino-α-hidroxi-butiril]-kanami-
cina B (IVb)

15 A la solución obtenida en el Ejemplo 9 se añaden
0,2 g de paladio al 10 % en carbón. Después de haber hidro-
genado la mezcla a la presión atmosférica durante 5 horas,
se añaden 0,1 g adicionales de paladio al 10 % en carbón y
10 ml de agua. La hidrogenación se prosigue durante la no-
che. Se filtra la mezcla de reacción, el filtrado se eva-
20 pora a presión reducida y el residuo se disuelve en 50 ml
de agua y se cromatografía sobre una columna de CG-50
(NH₄⁺, 1,2 x 50 cm). La columna se lava con 200 ml de agua
y después se eluye con 500 ml de NH₄ OH 0,1 N, 500 ml de
25 NH₄ OH 0,2 N, 900 ml de NH₄ OH 0,5 N y 500 ml de NH₄ OH 1 N.
Los efluyentes se recogen en fracciones de 10 ml. La kana-
micina B se recupera de las fracciones 60 a 76 con un ren-
dimiento del 32 % (459 mg). Se recogen las fracciones 128-
138, se evaporan a presión reducida y se liofilizan para
30 dar 318 mg (17 % calculado sobre la carbобенzoixikanamicina



404747

1 B) de BB-K26 (IVb). P.f. 186-187°C (desc.). $[\alpha]_D^{29} + 78^\circ$
(c = 1,15, H₂O) $\gamma_{C=O}$ 1640 cm⁻¹.

5 Análisis para C₂₂H₄₄N₆O₁₂·H₂CO₃:
Calculado : C, 42,72; H, 7,17; N, 13,00
Encontrado: C, 42,23; H, 7,19; N, 12,37

Cromatografía en capa fina (gel de sílice F254, ninhidrina), Rf 0,11 en acetona-AcOH-H₂O (20:6:74); Rf 0,19 en CHCl₃-MeOH-NH₄OH concentrado-H₂O (1:4:2:1).

10 Se combinan las fracciones 201 a 222, se evaporan a presión reducida y se liofilizan para dar 209 mg (12 %) de otro componente activo que es denominado BB-K27. P.f. 183-184°C (desc.). $\gamma_{C=O}$ 1750 cm⁻¹.

15 Análisis para C₂₂H₄₄N₆O₁₂·H₂CO₃:
Calculado : C, 42,72; H, 7,17; N, 13,00
Encontrado : C, 42,25; H, 6,93; N, 12,18

Cromatografía en capa fina (gel de sílice F254): Rf 0,15 en acetona-AcOH-H₂O (20:6:74); Rf 0,07 en CHCl₃-MeOH-NH₄OH concentrado-H₂O (1:4:2:1).

EJEMPLO 11

20 Preparación de ácido L(-)-γ-amino-α-hidroxi-butírico a partir de ácido DL-α-hidroxi-γ-ftalimidobutírico

25 (A). L-α-hidroxi-γ-ftalimidobutirato de deshidroabietilamonio: A una solución de 25 g (0,1 moles) de ácido 2-hidroxi-γ-ftalimidobutírico¹ en 200 ml de etanol se añade una solución de 29 g (0,1 moles) de deshidroabietilamina en 130 ml de etanol. La solución se agita fuertemente durante un minuto y se mantiene a la temperatura ambiente durante 5 horas, durante cuyo tiempo cristalizan finas agujas. Los cristales se recogen por filtración, se lavan con 30 50 ml de etanol y se secan al aire para obtener 30,1 g

404747

17 JUL



1 (56 %) de un diastereómero de la sal de deshidroabietilami-
na. P.f. 93-94°C $[\alpha]_D^{24} + 15^\circ$ (c = 2,5, MeOH). Por recrista-
lización en 300 ml de etanol se obtienen 23,2 g (43 %) del
producto puro. P.f. 94-95°C. $[\alpha]_D^{24} + 10,8^\circ$ (c = 2,5, MeOH).
5 Una nueva recristalización no altera el punto de fusión ni
la rotación específica.

Análisis para $C_{32}H_{42}N_2O_5 \cdot H_2O$:

Calculado : C, 69,54; H, 8,02; N, 5,07

Encontrado: C, 69,58; H, 8,08; N, 5,07.

10

1. Y. Saito y colaboradores, Tetrahedron Letters, 1970,
4863.

15

B). Acido L-(-)- γ -amino- α -hidroxibutírico: A una
solución de 1,5 g (0,014 moles) de carbonato sódico en
40 ml de agua, se añaden 5,3 g (0,01 moles) de L- α -hidroxi-
 γ -ftalimidobutirato de deshidroabietilamonio y 60 ml de
éter. La mezcla se agita fuertemente hasta que se ha disuel-
to todo el sólido. Se separa la capa etérea. La solución
acuosa se lava dos veces con 20 ml cada vez de éter y se
evapora hasta 15 ml bajo presión reducida. Al concentrado
20 se añaden 10 ml de ácido clorhídrico concentrado y la mez-
cla se calienta a reflujo durante 10 horas. Después de en-
friar, el ácido ftálico separado se elimina por filtración.
El filtrado se evapora a presión reducida. El residuo se
disuelve en 10 ml de agua y la solución se evapora a seque-
dad. Esta operación se repite dos veces más para separar
25 el ácido clorhídrico en exceso. El jarabe residual se di-
suelve en 10 ml de agua y se filtra para separar una peque-
ña cantidad de ácido ftálico insoluble. El filtrado se ad-
sorbe en una columna de IR-120 (H^+ , 1 x 35 cm), se lava la
columna con 300 ml de agua y se eluye con solución 1 N de
30

11 JUL 1972



404747

1 hidróxido amónico. El eluato se recoge en fracciones de
15 ml. Se combinan las fracciones 10 a 16, que dan reacción
positiva con la ninhidrina y se evaporan a presión reduci-
5 da para dar un jarabe que cristaliza gradualmente. Los cris-
tales se trituran con etanol, se filtran y secan en un de-
secador de vacío para dar 0,78 g (66 %) de ácido L(-)- γ -
amino- α -hidroxibutírico, d. P.f. 206-207°C. $[\alpha]_D^{24} -29^\circ$
(c = 2,5, H₂O). El espectro infrarrojo es idéntico al de
una muestra auténtica obtenida a partir de ambutirosina.

10

EJEMPLO 12

Preparación de la sal monosulfato de 1-[L(-)- γ -amino- α -hi-
droxibutiril]kanamicina A o B

15

En uno a tres litros de agua se disuelve un mol
de 1-[L(-)- γ -amino- α -hidroxibutiril]kanamicina A o B. La
solución se filtra para separar el sólido que no se haya
disuelto. A la solución agitada y enfriada se añade un mol
de ácido sulfúrico disuelto en 500 ml de agua. La mezcla
se continúa agitando durante 30 minutos, después de lo
cual se añade etanol frío a la mezcla hasta que se produce
20 la precipitación. El sólido se recoge por filtración y se
determina que es el monosulfato deseado.

20

EJEMPLO 13

Preparación de la sal disulfato de 1-[L(-)- γ -amino- α -hi-
droxibutiril]kanamicina A (BB-K8.2H₂SO₄)

25

Se disuelven 35 g de 1-[L(-)- γ -amino- α -hidroxibu-
tiril]kanamicina A (como trihidrato del monobicarbonato) en
125 ml de agua desionizada. Se observa un pH de aproxima-
damente 9,0. El pH se reduce a 7-7,5 con ácido sulfúrico al
50 % en volumen.

30

Se añaden 8,5 g de Darco G-60 (carbón activo) y

11 JUL



404747

1 la mezcla se suspende a la temperatura ambiente durante
0,5 horas. El carbono se separa por filtración adecuada y
se lava con 40 ml de agua. Las aguas de lavado se añaden al
filtrado.

5 El filtrado y las aguas de lavado combinados se
ajustan a pH 2-2,6 con ácido sulfúrico al 50 % en volumen.
Se desprende una gran cantidad de dióxido de carbono. La
solución se deja en una vitrina de vacío agitando durante
20 minutos para expulsar el dióxido de carbono adicional.

10 Se añaden 8,5 g de Darco G-60 a la solución des-
gasificada. La mezcla se suspende durante media hora a la
temperatura ambiente. El carbono se separa por filtración
adecuada y se lava con 35 ml de agua desionizada. Las aguas
de lavado se agregan al filtrado.

15 El filtrado y las aguas de lavado combinados se
ajustan a pH 1-1,3 con ácido sulfúrico al 50 % en volumen.
Esta solución se añade agitando rápidamente, a lo largo de
un periodo de 10 minutos, sobre 600-800 ml de metanol (3-4
20 volúmenes de metanol). La mezcla se agita durante 5 minutos
a pH 1-1,3, se hace pasar por un tamiz de 100 mallas, se
agita durante dos minutos y se deja sedimentar durante cinco
minutos. La mayor parte del líquido que sobrenada se separa
por decantación. La suspensión restante se filtra adecuada-
mente, se lava con 200 ml de metanol y se seca a vacío a
25 50°C durante 24 horas. El rendimiento de (sulfato dihidróge-
no)₂BB-K8 amorfo es de 32-34 g; $[\alpha]_D^{22} \text{H}_2\text{O} = + 74,75$, des-
composición a 220-230°C.

Análisis elemental (en seco^x)

30

11 JUL



404747

1

5

10

15

20

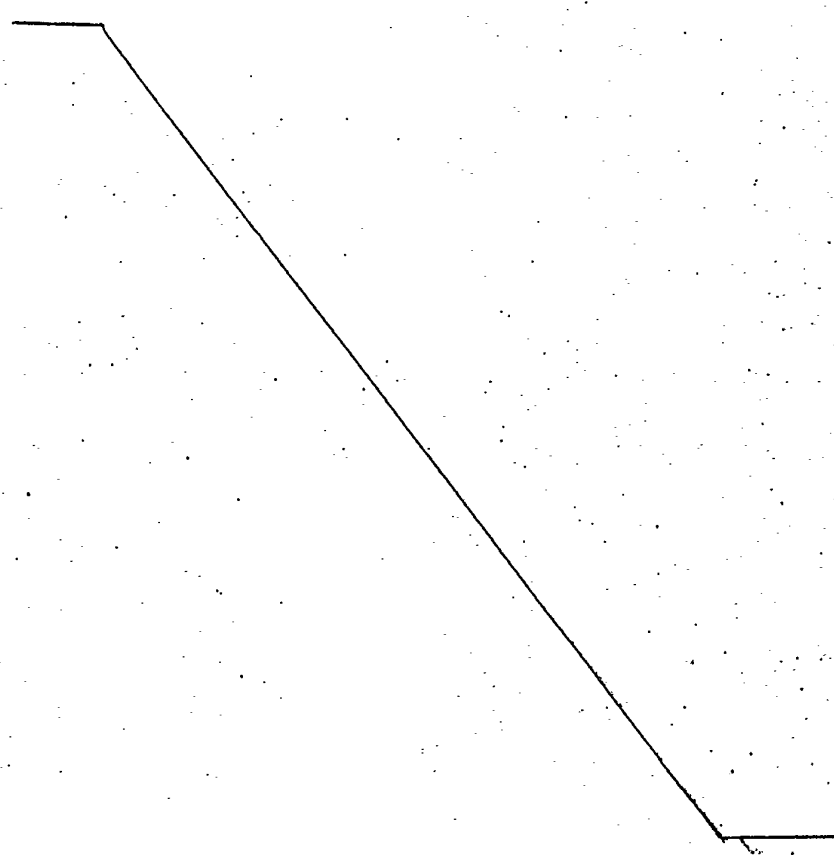
25

30

	<u>Encontrado</u>	<u>Teórico</u>
C %	32,7, 33,5, 32,3	33,5
N %	8,78, 8,7, 8,2, 8,8	8,97
S %	8,75, 8,9, 7,8, 8,85	8,2
Cenizas %	nada	-

* Contenido en agua por Karl Fisher: 2,33, 1,79, 2,87 %
 (la proporción teórica para el monohidrato es 2,25 % de agua). Esta sal es higroscópica pero no deliquescente. Después de mantener al aire a la temperatura ambiente una parte alícuota durante 18 horas, el contenido en agua aumenta a 9,55, 9,89 % (la proporción teórica para un pentahidrato es del 10,33 % de agua).

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

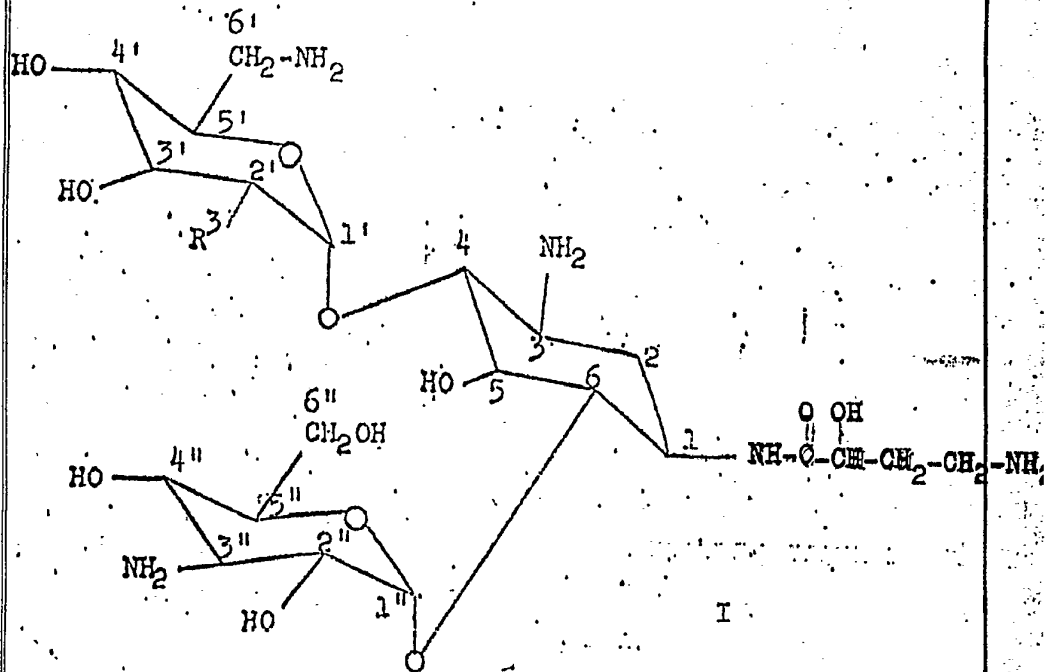


404747



REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de derivados de antibiotio de kanamicina de fórmula:



donde R^3 es OH o NH_2 ; o una sal de adición de ácido del mismo, no tóxica y farmacéuticamente aceptable; cuyo procedimiento comprende las etapas consecutivas de:

A) bloquear el grupo amino en el carbono 6' de la kanamicina A o B con un grupo y protector convencional de un grupo amino para producir un compuesto de fórmula:

Dez
30

404747 31



1

5

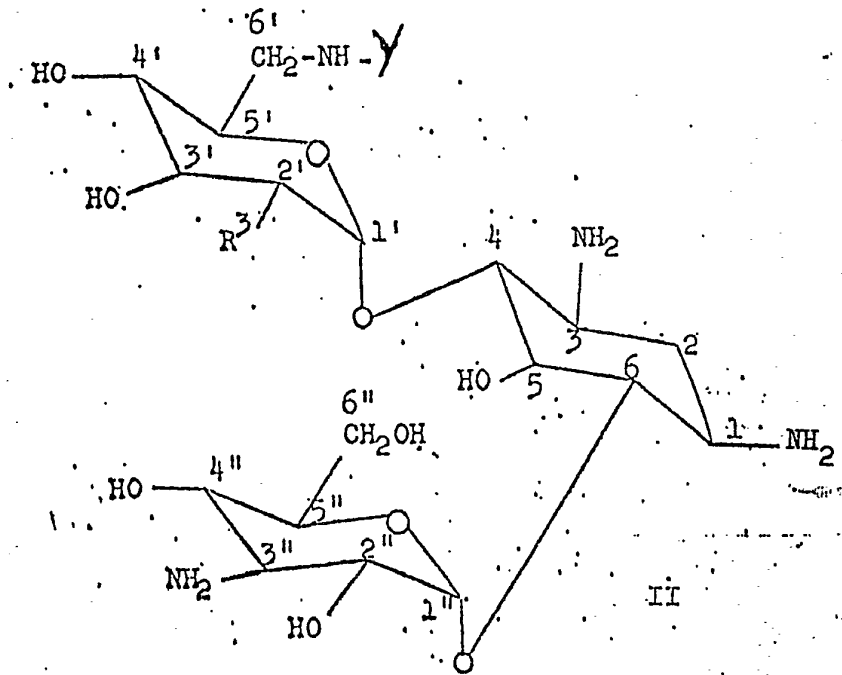
10

15

20

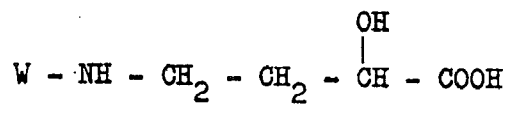
25

Handwritten signature and the number 30.



donde R³ es el definido anteriormente;

B) acilar el grupo amino en la posición 1 del compuesto de fórmula II con un agente acilante de fórmula:



derivando dicho agente aislante del acido L-(-)-γ-amino-α-hidroxi-butírico, donde W representa un grupo convencional protector del amino, o con su equivalente funcional como agente acilante de una amina primaria, para producir un compuesto de fórmula:

.....

404747⁹ 1 EN



1

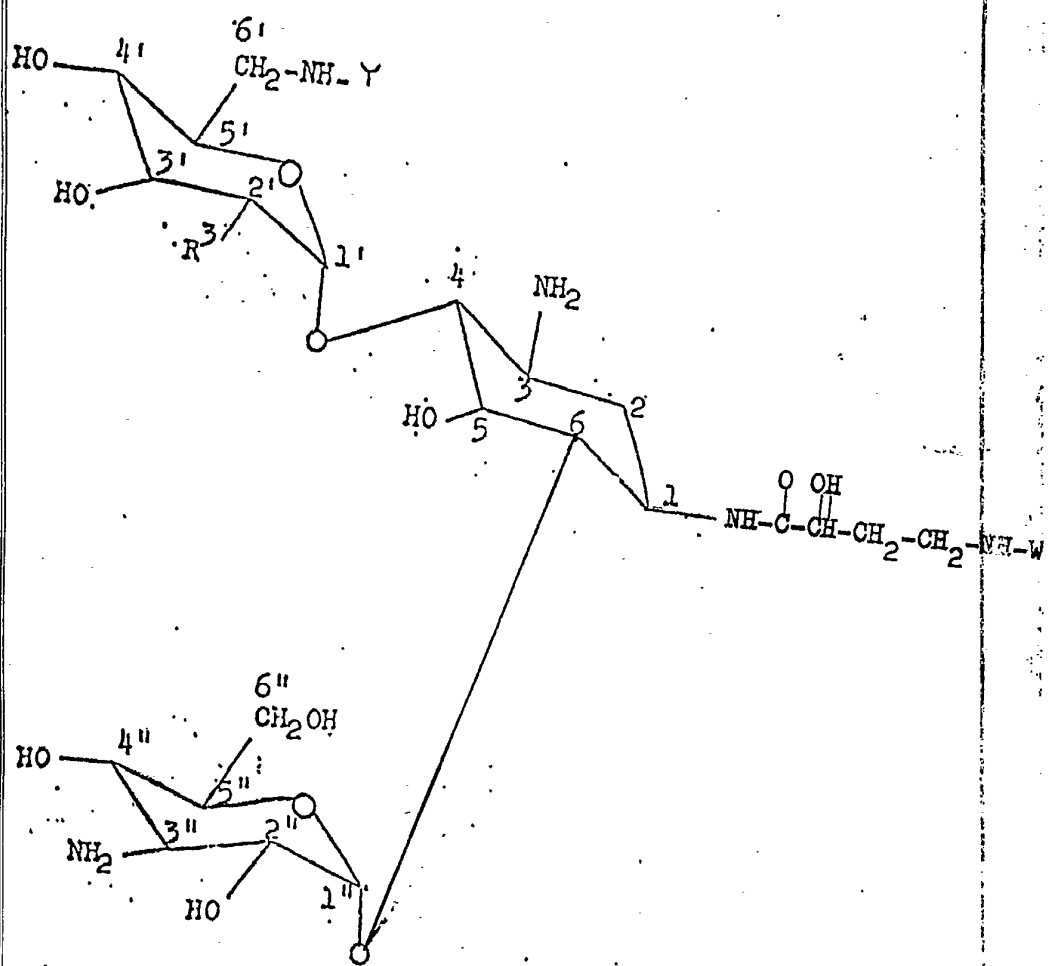
5

10

15

20

25



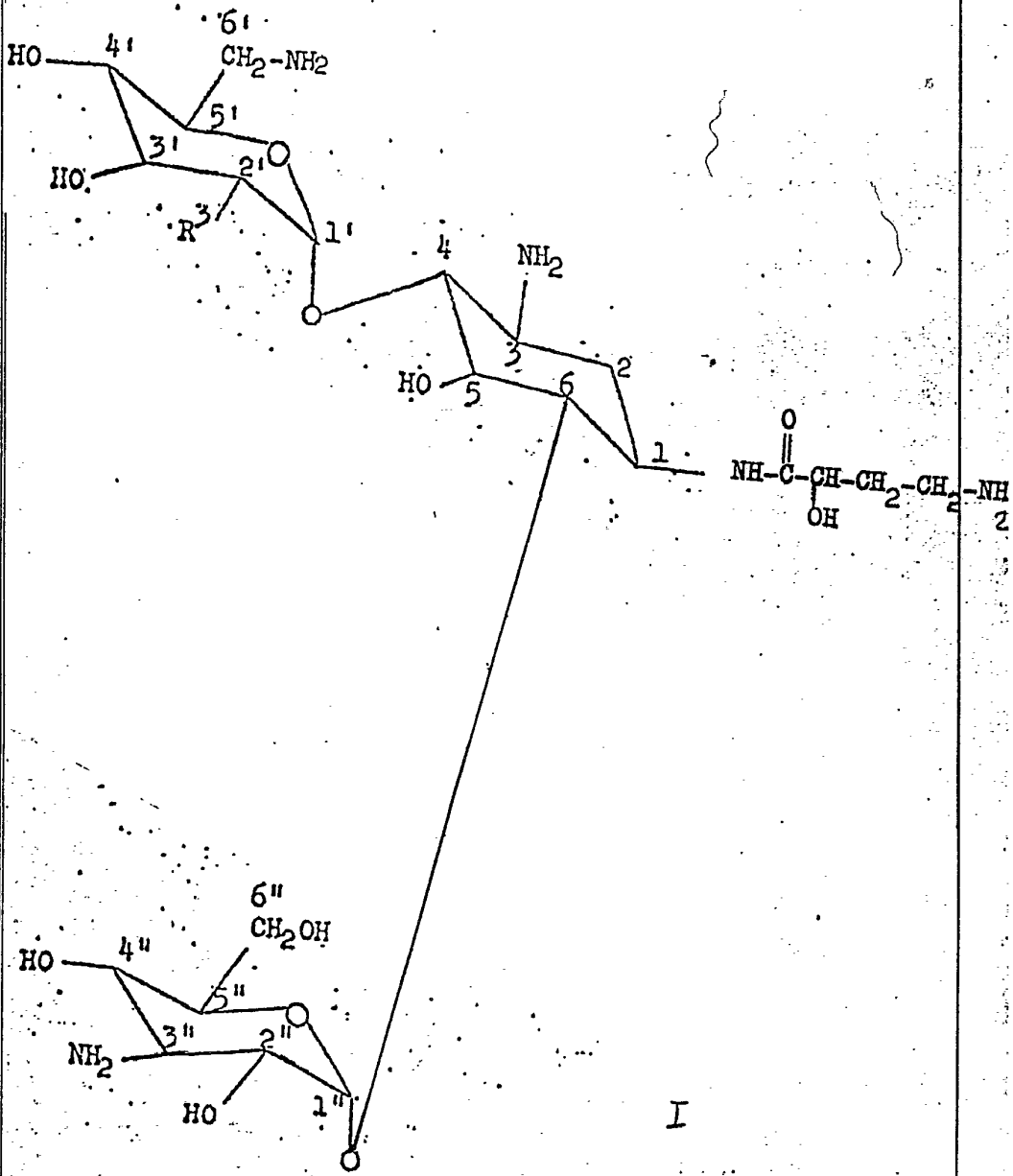
donde R^3 es el definido anteriormente y

c) separar por métodos conocidos los grupos Y y W protectores del amino para producir el compuesto de fórmula:

404747



1
5
10
15
20
25
30



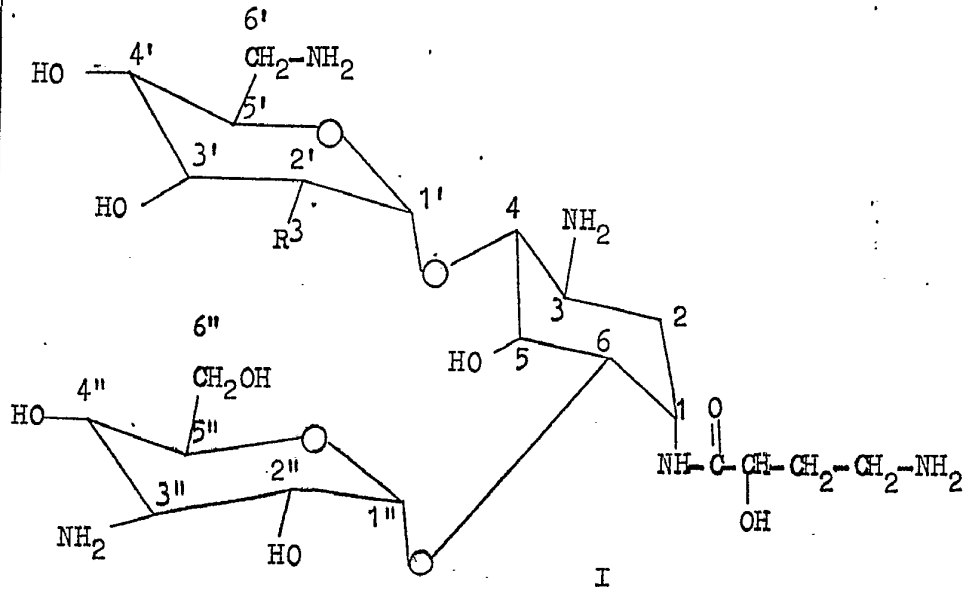
y, si se desea posteriormente convertir el producto anterior, por metodos conocidos, en una sal de adición de acido del mismo, no tóxica y farmacologicamente aceptable.

Handwritten signature
30

404747³¹

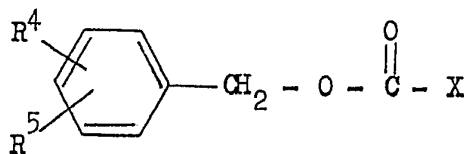
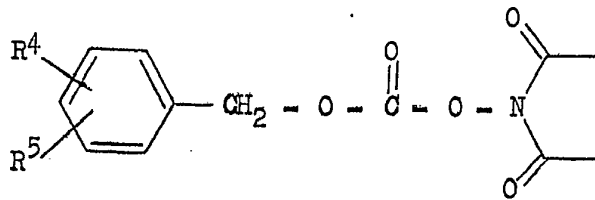


2. Un procedimiento según la reivindicación 1 para la preparación de un compuesto de fórmula:



donde R³ es OH; o NH₂; o sus sales de adición con ácidos no tóxicos y farmacéuticamente aceptables; cuyo procedimiento comprende las etapas consecutivas de:

A) acilar kanamicina A o kanamicina B con un agente acilante seleccionado entre los compuestos de fórmulas:

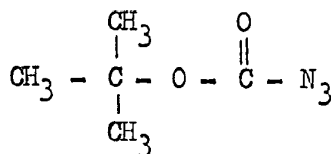


Handwritten signature
30

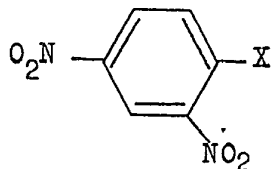
404747



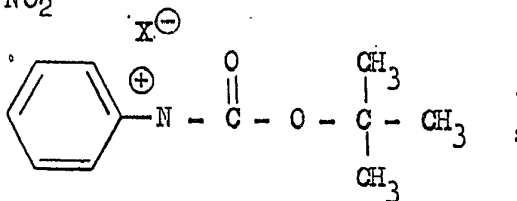
1



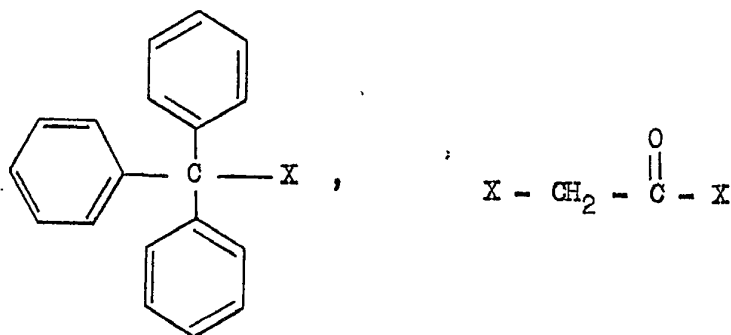
5



10

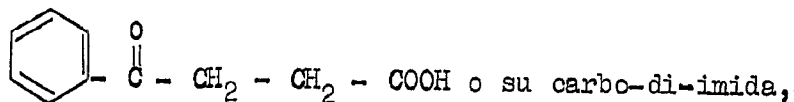


15



20

$\text{X}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$ o su carbo-di-imida o



25

donde R^4 y R^5 son iguales o diferentes y cada uno de ellos representa hidrógeno, flúor, cloro, bromo, NO_2 , OH , alquilo inferior o alcoxi inferior y X es cloro, bromo o yodo o con su equivalente funcional como agente acilante, en una proporción de un mol o menos de agente acilante por mol de kanamicina A o B, en un disolvente, a una temperatura inferior a unos 50°C , para producir el compuesto de fórmula:

Pe
30

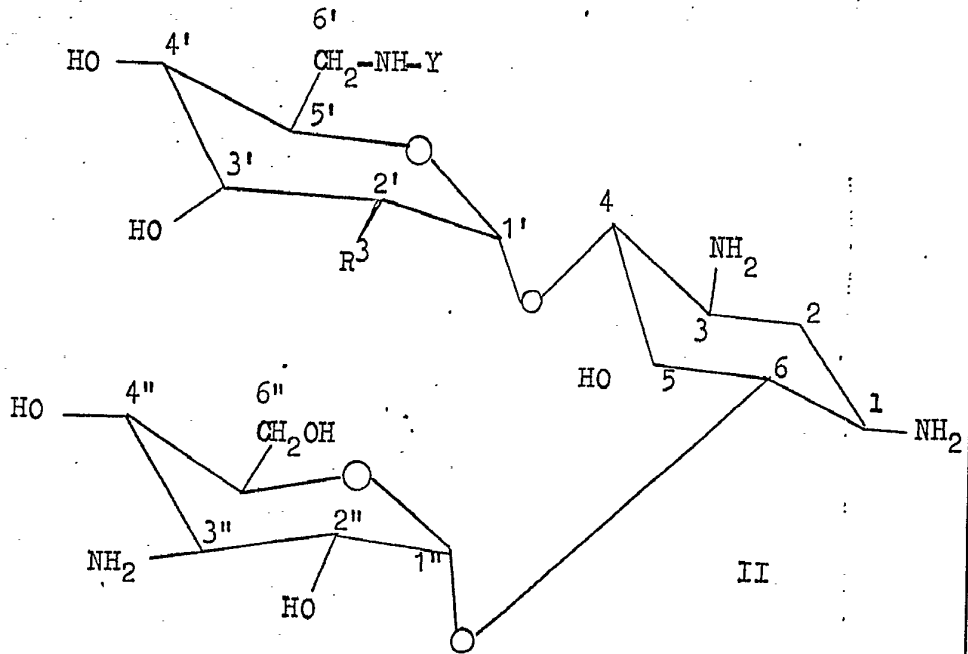
404747



1

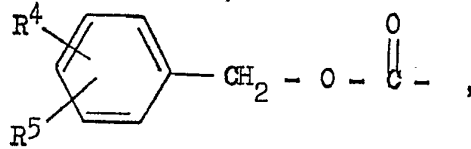
5

10

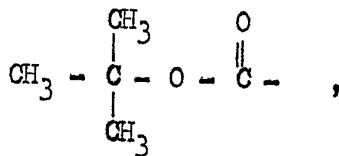


donde R³ es el definido anteriormente e Y es un radical de fórmula

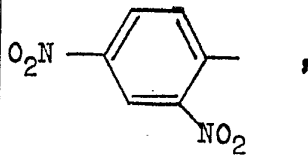
15



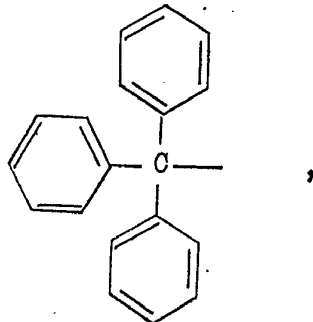
20




25

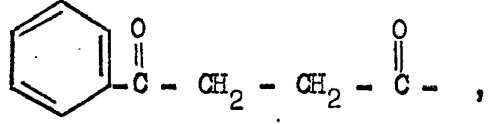
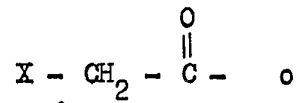


30



404747, 

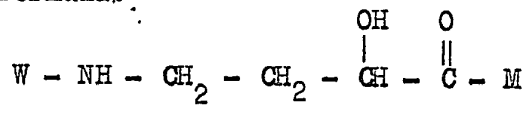
1



5

donde R⁴ y R⁵ son los definidos anteriormente;

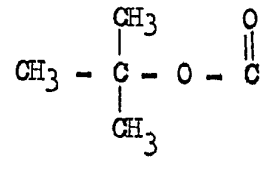
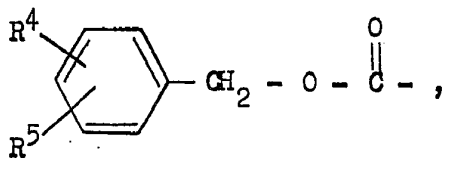
B) acilar el compuesto de fórmula II con un agente acilante de fórmula:



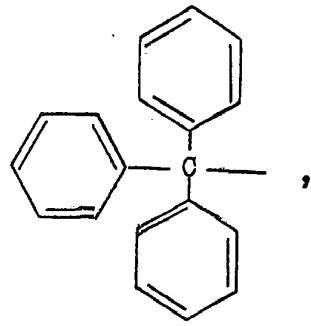
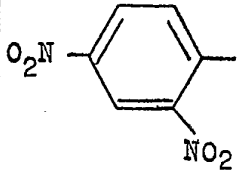
10

siendo dicho agente acilante un derivado del ácido L-(-)-γ-amino-α-hidroxi-butírico, donde W es un radical seleccionado entre el grupo formado por:

15



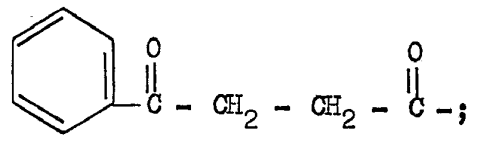
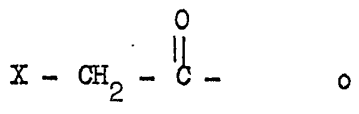
20



25

Handwritten signature

30



404747

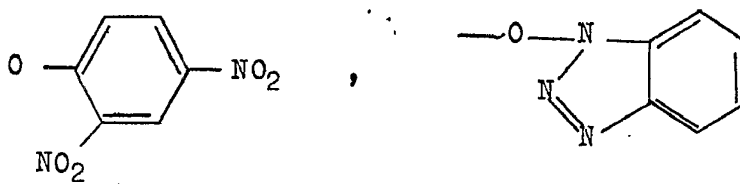


1 y M es un radical seleccionado entre el grupo formado por:

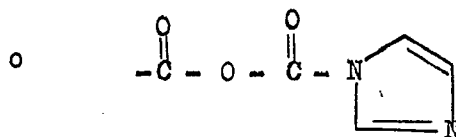
5



10



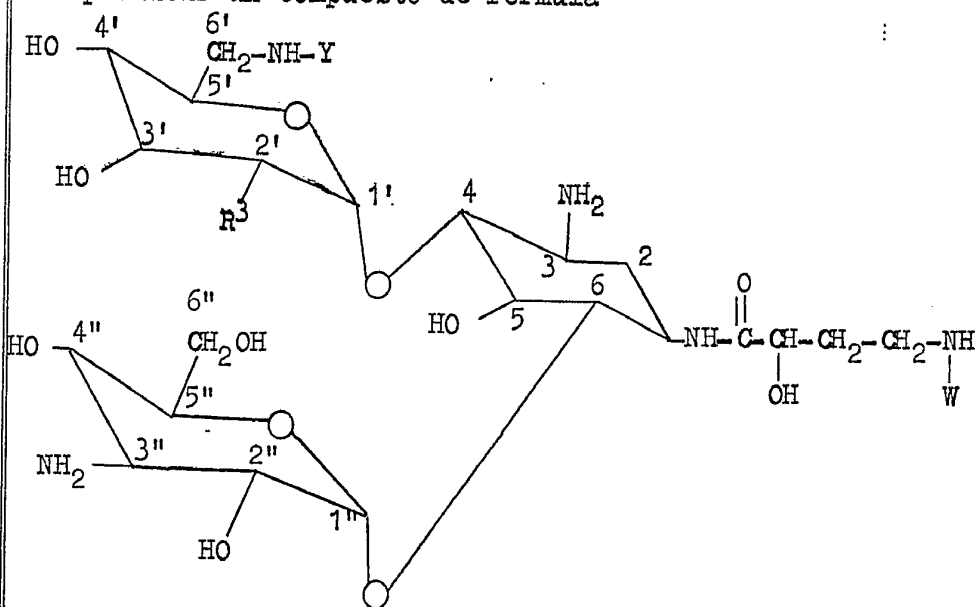
15



20

donde R^4 y R^5 son los definidos anteriormente, o con su equivalente funcional como agente acilante de una amina primaria, en una proporción de por lo menos 0,5 moles de agente acilante por mol del compuesto II, en un disolvente, para producir un compuesto de fórmula

25



30

404749



1

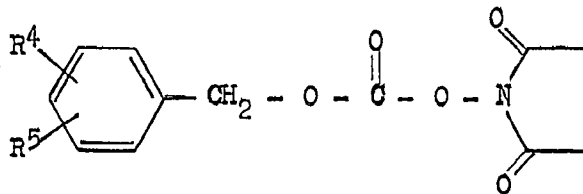
donde R³, Y y W son los descritos anteriormente y

5

C) separar los grupos bloqueantes W e Y por métodos conocidos para producir el compuesto de fórmula I y, si se desea, posteriormente convertir el producto por métodos ya conocidos en una de sus sales de adición con ácidos no tóxica y farmacéuticamente aceptable.

10

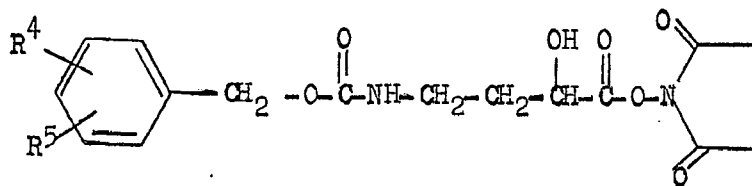
3. Un procedimiento según la Reivindicación 162 caracterizado porque: (1) en la etapa A la kanamicina A o B se hace reaccionar con un agente acilante de fórmula:



15

donde R⁴ y R⁵ son los definidos en la Reivindicación 1, en un disolvente seleccionado entre dimetilformamida, dimetilacetamida, tetrahidrofurano, dioxano, 1,2-dimetoxietano, metanol, etanol, agua, acetona, piridina o N-alkil(inferior)piperidinas o sus mezclas y (2) en la etapa B, un agente acilante de fórmula

20



25

donde R⁴ y R⁵ son los definidos en la Reivindicación 1, se hace reaccionar con el compuesto II en una proporción de alrededor de 0,5 a 1,4 moles de agente acilante por mol de compuesto II, en un disolvente seleccionado entre una mezcla de agua y éter dimetílico de etilenglicol, dioxano, dimetilacetamida, dimetilformamida, tetrahidrofurano o éter dimetílico de propilenglicol.

Handwritten signature or initials.

30

404747¹ EN



1 4. Un procedimiento según la Reivindicación 3,
caracterizado porque: (1) la etapa A se lleva a cabo en di-
metilformamida como disolvente, a una temperatura inferior
5 a 25°C y (2) la reacción de acilación de la etapa B se lle-
va a cabo en una mezcla 1:1 de agua y éter dimetílico de
etilenglicol como disolvente, en una relación molar de alre-
dedor de 0,8 a 1,1 moles de agente acilante por mol de com-
puesto II.

10 5. Un procedimiento según las Reivindicaciones
3 o 4, caracterizado porque los grupos bloqueantes W e Y
son separados en la etapa C por hidrogenación del compues-
to III con hidrógeno, en presencia de un catalizador metá-
lico, en un sistema formado por agua y un disolvente misci-
ble con agua.

15 6. Un procedimiento según la Reivindicación 5,
caracterizado porque los grupos bloqueantes W e Y son sepa-
rados por hidrogenación del compuesto III con hidrógeno,
en presencia de un catalizador metálico seleccionado entre
20 paladio, platino, níquel Raney, rodio, rutenio o níquel,
en un sistema formado por agua y un disolvente miscible
con agua seleccionado entre agua y dioxano, tetrahidrofura-
no, éter dimetílico de etilenglicol o éter dimetílico de
propilenglicol, en presencia de una cantidad catalítica de
25 ácido acético glacial.

30 7. Un procedimiento según la Reivindicación 6,
caracterizado porque los grupos bloqueantes W e Y son sepa-
rados por hidrogenación del compuesto III con hidrógeno, en
presencia de un catalizador de paladio en carbón, en un di-
solvente formado por agua y dioxano 1:1.

404747

10 JUN 1972



1

8. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la patente de invención que se solicita:
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE DERIVADOS DE ANTI-BIOTICO DE KANAMICINA.

5

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de cincuenta y una páginas mecanografiadas.

Madrid, 11 julio 1.972

BERNARDO UNGRIA

p.p.

10

15

20

25

30