

432.862

Int. Cl.² C12D//A61K//A61L

Nº 432.862

CONCEDIDA

20 OCT. 1976

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

RESIDENCIA: Ohtemachi Bldg., Ohtemachi,

Chiyoda-ku, TOKYO; Japón

ENUNCIADO: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION

DE DERIVADOS SEMISINTETICOS DEL

ANTIBIOTICO XK-62-2"

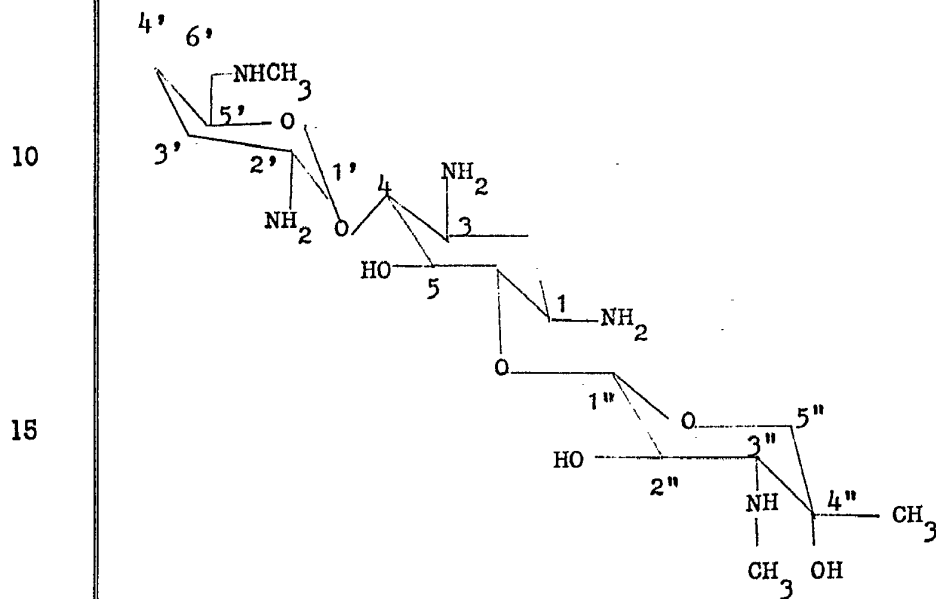
Prioridad: Patente Japonesa n.º 137827/1973 del 12-12-73

RK.

1 en etanol y acetona e insoluble en cloroformo, benceno, acetato de etilo y n-hexano.

COMPENDIO DE LA INVENCION

5 De acuerdo con esta invención, se producen nuevos compuestos antibacterianos modificando químicamente el antibiótico XK-62-2 que tiene la siguiente fórmula estructural:



20 Los derivados de XK-62-2 de esta invención presentan una intensa actividad antibacteriana contra diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y especialmente presentan una actividad antibacteriana notablemente intensa contra las bacterias que son resistentes a los antibióticos aminoglicosidos conocidos. Por consiguiente, los antibióticos de

25 la invención son útiles para limpiar y esterilizar el material de vidrio de laboratorio y los instrumentos quirúrgicos y también pueden ser utilizados en combinación con diversos jabones con fines de esterilización y en la limpieza y esterilización de habitaciones de hospitales y zonas utilizadas

30

1 para la preparación de alimentos. Además, se espera que los
derivados sean eficaces para el tratamiento de diversas in-
fecciones tales como infecciones urinarias e infecciones res-
piratorias, inducidas por diversas bacterias flogógenas.

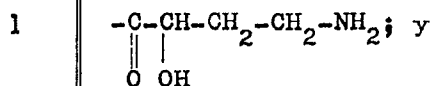
5 Más específicamente, los nuevos derivados semisin-
téticos de XK-62-2, o sus sales de adición de ácidos no tóxi-
cas y farmacéuticamente aceptables, se preparan introducién-
do uno [en el caso de los siguientes (1) y (2)] o dos [en
10 el caso de (3) y (4)] grupos acilo, es decir, grupos 2-hi-
droxi-3-aminobutirilo entre los tres grupos amino libres que
posee el XK-62-2: (1) el grupo amino unido al átomo de car-
bono en la posición 2'; (2) el grupo amino unido al átomo de
carbono en la posición 1; (3) los grupos amino unidos a los
15 átomos de carbono en las posiciones 2' y 1, respectivamente;
y (4) los grupos amino unidos a los átomos de carbono en las
posiciones 2' y 3, respectivamente. Es decir, los nuevos de-
rivados de XK-62-2 comprenden:

(1) el compuesto (I) en el que uno de los átomos
de hidrógeno del grupo amino unido al átomo de carbono en la
20 posición 2' del XK-62-2 está sustituido con $\begin{array}{c} \text{-C-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2 \\ \parallel \quad | \\ \text{O} \quad \text{OH} \end{array}$;

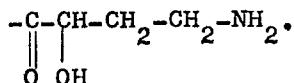
(2) El compuesto (II) donde uno de los átomos de
hidrógeno del grupo amino unido al átomo de carbono en la po-
sición 1 del XK-62-2 está sustituido con $\begin{array}{c} \text{-C-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2 \\ \parallel \quad | \\ \text{O} \quad \text{OH} \end{array}$;

(3) El compuesto (III) donde uno de los átomos de
hidrógeno del grupo amino unido al átomo de carbono en la po-
sición 2' y uno de los del grupo amino unido al átomo de car-
bono en la posición 1 del XK-62-2 están sustituidos con

30



(4) El compuesto (IV) donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo amino unido al átomo de carbono en la posición 2' y uno de los del grupo amino unido al átomo de carbono en la posición 3 del XK-62-2 están sustituidos por



BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

10 La Fig. 1 ilustra el espectro de absorción infrarrojo del 2'-N-[L-(-)- α -hidroxi- γ -aminobutiril]-XK-62-2 (compuesto I);

la Fig. 2 ilustra el espectro RMN del 2'-N-[L-(-)- α -hidroxi- γ -aminobutiril]-XK-62-2;

15 la Fig. 3 ilustra el espectro de absorción infrarrojo del 1-N-[L-(-)- α -hidroxi- γ -aminobutiril]-XK-62-2 (compuesto II);

la Fig. 4 ilustra el espectro RMN del 1-N-[L-(-)- α -hidroxi- γ -aminobutiril]-XK-62-2;

20 la Fig. 5 ilustra el espectro de absorción infrarrojo del 1-N-2'-N-bis-[L-(-)- α -hidroxi- γ -aminobutiril]-XK-62-2 (compuesto III);

la fig. 6 ilustra el espectro RMN del 1-N-2'-N-bis-[L-(-)- α -hidroxi- γ -aminobutiril]-XK-62-2;

25 la Fig. 7 ilustra el espectro de absorción infrarrojo del 3-N-2'-N-bis-[L-(-)- α -hidroxi- γ -aminobutiril]-XK-62-2 (compuesto IV); y

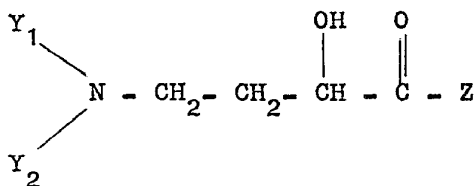
30 la Fig. 8 ilustra el espectro RMN del 3-N-2'-N-bis-[L-(-)- α -hidroxi- γ -aminobutiril]-XK-62-2.

1

DESCRIPCION DEL INVENTO

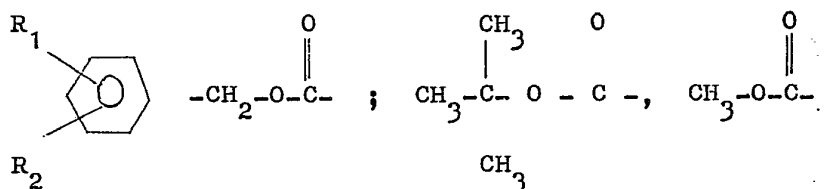
De acuerdo con esta invención, los grupos amino libres del XK-62-2 son acilados con un agente acilante representado por la fórmula:

5

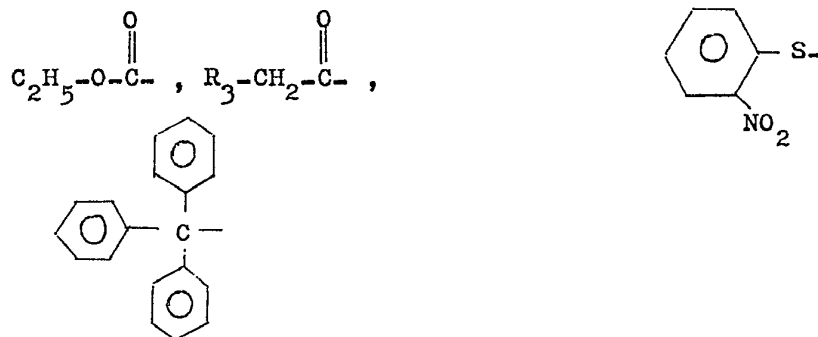


10

donde Y_1 es H e Y_2 es:



15

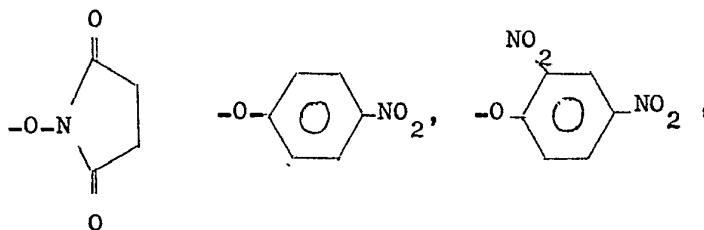


20

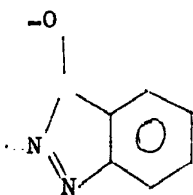
25

donde R_1 y R_2 pueden ser iguales o diferentes y representan H, OH, NO_2 , Cl, Br, I, grupos alquilo de 1 a 5 átomos de carbono o grupos alcoxi y R_3 es Cl, Br o I); o bien Y_1 e Y_2 forman un grupo ftaloilo; y Z es :

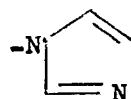
30



1



5



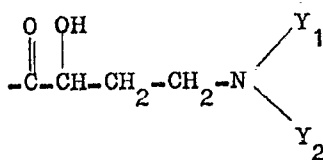
, Cl, Br, I u OH

(estos agentes acilantes pueden derivar de ácido α -hidroxi- γ -aminobutírico) o un compuesto funcionalmente equivalente a dicho agente acilante, para preparar:

10

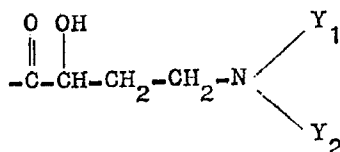
(1) el compuesto (IA) donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo amino unido al átomo de carbono en la posición 2' del XK-62-2 está sustituido por

15



(2) El compuesto (IIA) donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo amino unido al átomo de carbono en la posición 1 del XK-62-2 está sustituido por

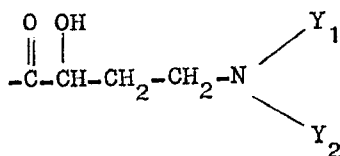
20



25

(3) el compuesto (IIIA) donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo amino unido al átomo de carbono en la posición 2' y uno de los del grupo amino unido al átomo de carbono en la posición 1 del XK-62-2 están sustituidos por

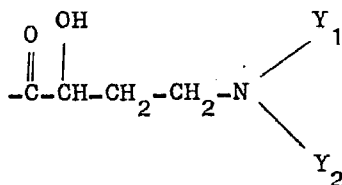
30



y

1 (4) el compuesto (IVA) donde uno de los átomos de hidrógeno del grupo amino unido al átomo de carbono en la posición 2' y uno de los del grupo amino unido al átomo de carbono de la posición 3 del XK-62-2 están sustituidos por

5



(donde Y_1 e Y_2 tienen el significado dado anteriormente),

10

Los agentes acilantes antes mencionados son compuestos que derivan del ácido α -hidroxi- γ -aminobutírico. Resultará evidente para los expertos en la técnica que para preparar los compuestos (IA-), (IIA), (IIIA) y (IVA) pueden utilizarse compuestos que son funcionalmente equivalentes al agente acilante antes mencionado para introducir un grupo α -hidroxi- γ -aminobutirilo en un grupo amino libre, conteniendo diversos grupos distintos de Z.

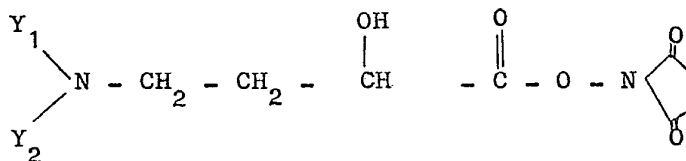
15

Los métodos de acilación en los que se utilizan estos compuestos que son funcionalmente equivalentes a los agentes acilantes, están descritos por M. Bodansky y colaboradores en Synthesis, pag. 453 (1972) y por M. Bodansky y colaboradores en Peptide Synthesis, pags. 75-135 (1966) (John Wiley & Sons, Inc., Estados Unidos)

20

La reacción de acilación se lleva a cabo preferiblemente empleando un agente acilante de fórmula:

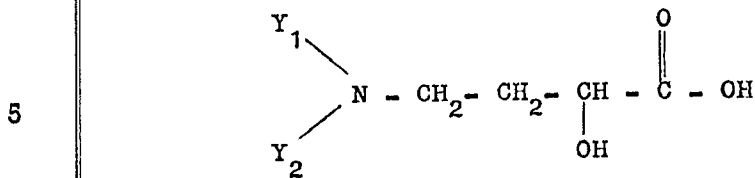
25



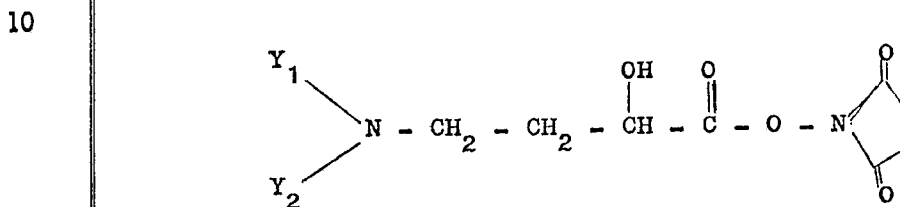
30

donde Y_1 e Y_2 tienen el significado dado anteriormente. En

1 este caso, puede hacerse reaccionar preliminarmente un com-
puesto de fórmula:

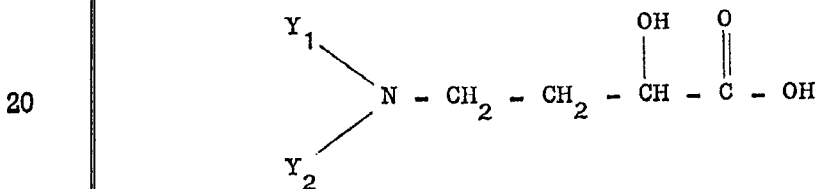


donde Y_1 e Y_2 tienen el significado dado anteriormente, con N-hidroxisuccinimida en presencia de dicitclohexilcarbodiimida para preparar un compuesto de fórmula:



15 y el compuesto resultante puede ser aislado para hacerlo reaccionar con XK-62-2.

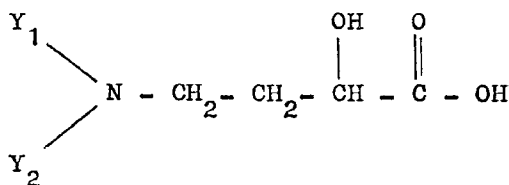
Alternativamente, se hacen reaccionar un compuesto de fórmula:



25 (donde Y_1 e Y_2 tienen el significado dado anteriormente, N-hidroxisuccinimida y dicitclohexilcarbodi-imida y la mezcla de reacción resultante se hace reaccionar con XK-62-2.

En otra realización, la reacción de acilación puede llevarse a cabo agregando dicitclohexilcarbodi-imida a una mezcla de XK-62-2 y un compuesto de fórmula:

30



5 Debe entenderse que las reacciones antes mencionadas son aplicables cuando la reacción de acilación de XK-62-2 se lleva a cabo por cualquier otro método y puede seleccionarse una forma adecuada según el agente acilante específico empleado.

10 Habitualmente, se emplean de 0,4 a 2,5 moles y preferiblemente de 0,7 a 1,5 moles del agente acilante por cada mol de XK-62-2. La reacción se efectúa entre -50°C y 50°C, preferiblemente entre -20°C y 20°C, durante 15 minutos a 24 horas, preferiblemente durante 5 a 15 horas.

15 Los disolventes adecuados para la reacción pueden seleccionarse entre uno cualquiera o una mezcla de dos o más de los compuestos tetrahidrofurano, dimetilacetamida, dimetilformamida, alcoholes, alcoholes inferiores, dioxano, éter dimetílico de etilenglicol, piridina y agua. Preferiblemente se usa una mezcla de alcohol etílico y agua (2:1).

20 Los compuestos intermedios IA, IIA, IIIA y IVA preparados en la forma descrita pueden ser aislados y purificados, respectivamente, para uso en la segunda reacción. Sin embargo, es preferible que la mezcla de reacción se utilice tal como está, sin aislar y purificar los compuestos acilados. Después de la subsiguiente reacción, los compuestos I, II, III y IV, preparados a partir de la mezcla de compuestos intermedios, son aislados y purificados. Este último método es ventajoso para simplificar el procedimiento y aumentar el rendimiento de recuperación.

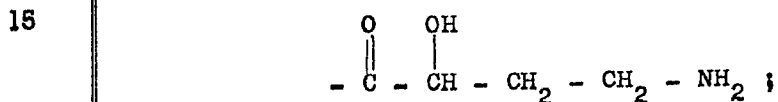
25

30

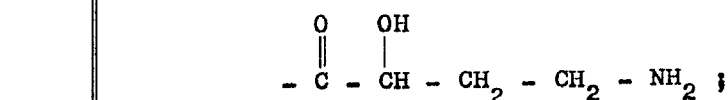
1 Si es necesario, los compuestos IA, IIA, IIIA y
IVA pueden ser fácilmente aislados y purificados por cual-
quiera de los métodos conocidos. por ejemplo cromatografía
5 en columna empleando un adsorbente tal como resinas cambia-
doras de ión, gel de sílice, alúmina, celulosa, etc. y cro-
matografía en capa fina empleando gel de sílice, alúmina,
celulosa, sephadex, etc., como observarán fácilmente los
expertos en la técnica.

10 Después los compuestos IA, IIA, IIIA y IVA (aisla-
dos o en mezcla) se hacen reaccionar para eliminar los gru-
pos protectores Y₁ e Y₂, de forma conocida, para preparar:

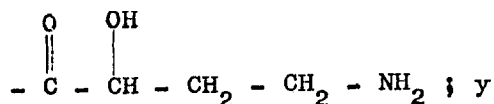
(1) el compuesto (I) donde uno de los átomos de
hidrógeno del grupo amino unido al átomo de carbono en la
posición 2' del XK-62-2 está sustituido por:



(2) el compuesto (II) donde uno de los átomos de
hidrógeno del grupo amino unido al átomo de carbono en la
posición 1 del XK-62-2 está sustituido por

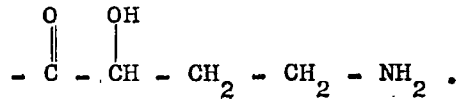


(3) el compuesto (III) donde uno de los átomos de
hidrógeno del grupo amino unido al átomo de carbono en la
posición 2' y uno de los del grupo amino unido al átomo de
25 carbono en la posición 1 del XK-62-2 está sustituido por



30 (4) el compuesto (IV) donde uno de los átomos de

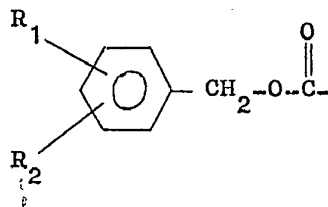
1 hidrógeno del grupo amino unido al átomo de carbono de la
posición 2' y uno de los del grupo amino unido al átomo de
carbono en la posición 3 del XK-62-2 está sustituido por



La eliminación de los grupos protectores puede rea-
lizarse por un método conocido. Por ejemplo, cuando los gru-
pos protectores forman un grupo ftaloilo, la eliminación se
realiza con hidrazina; cuando el grupo protector es un grupo
10 carbometoxi o carboetoxi, la eliminación se realiza con hi-
dróxido bórico; cuando el grupo protector es un grupo terc-
butoxicarbonilo, la eliminación se realiza con ácido fórmico
o ácido trifluoracético; cuando el grupo protector es un gru-
15 po ortonitrofenilsulfenilo, la eliminación se realiza con
ácido acético o ácido clorhídrico; y cuando el grupo protec-
tor es un grupo cloroacetilo, la eliminación se realiza con
3-nitropiridin-2-tiona [descrita por K. Undheim y colaborado-
res, Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions,
20 Parte I, pag. 829 (1973)].

En una realización preferida, el grupo protector

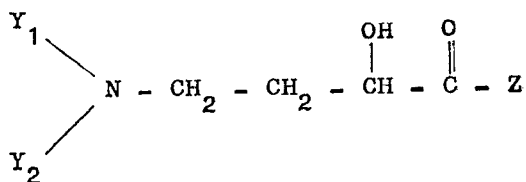
es



donde R₁ y R₂ tienen el significado dado anteriormente, y la
eliminación se realiza por hidrogenólisis en presencia de un
catalizador metálico seleccionado entre paladio, platino, ro-
30 dio y níquel Raney, preferiblemente catalizador de paladio

1 sobre un portador de carbón activo, en un disolvente como
mínimo, seleccionado entre el grupo formado por tetrahidro-
furano, dimetilacetamida, dimetilformamida, alcoholes infe-
5 y agua, preferiblemente una mezcla de agua y metanol (1:1);
en presencia de una pequeña cantidad de ácido clorhídrico,
ácido bromhídrico, ácido yodhídrico o ácido acético, prefe-
riblemente ácido acético, y a la temperatura ambiente y a la
presión atmosférica.

10 Como se ha descrito antes, en esta invención se
utiliza un agente acilante de fórmula:



15 donde Y_1 , Y_2 y Z tienen el significado dado anteriormente,
para la preparación de los compuestos intermedios (IA), (IIA),
(IIIA) y (IVA). De acuerdo con esta invención, se sobreentien
de que también pueden utilizarse compuestos que son funcional
20 mente equivalentes al agente acilante antes mencionado para
introducir un grupo α -hidroxi- γ -aminobutirilo en un grupo
amino, como agente acilante para preparar los compuestos in-
termedios. La introducción de grupos protectores distintos de
 Y_1 e Y_2 en un grupo amino y la eliminación de los mismos para
25 preparar dicho agente acilante han sido descritas por M. B o
dansky y colaboradores, Peptide Synthesis, pags. 21-41 (1966)
(John Wiley & Sons, Inc., Estados Unidos) y por A. Kapoor,
Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 59, pags. 1-27 --
(1970).

30 Los compuestos I, II, III y IV así preparados, ya

1 se hayan obtenido a partir de compuestos intermediarios ais-
lados y purificados, IA, IIA, IIIA y IVA, respectivamente, o
a partir de una mezcla de compuestos IA, IIA, IIIA y IVA,
son aislados de la mezcla de reacción y purificados por un
5 método conocido. Por ejemplo, los compuestos son aislados y
purificados por cromatografía en columna empleando un adsor-
bente tal como resinas cambiadoras de ión, gel de sílice,
alúmina, celulosa, sephadex, etc., y cromatografía en capa
fina utilizando gel de sílice, alúmina, celulosa, etc.

10 En esta invención, los compuestos (I), (II), (III)
y (IV) pueden encontrarse en forma D, L o DL pero se prefieren
los compuestos en forma L.

15 Si se desea, los compuestos I, II, III y IV prepa-
rados de acuerdo con lo anterior pueden ser convertidos en
sales de adición de ácido, no tóxicas y farmacéuticamente
aceptables (monosales, disales, trisales, tetrasales o penta-
sales por métodos convencionales. En esta invención, los á-
cidos no tóxicos comprenden ácido inorgánicos como clorhídri-
co, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, fósforico, carbónico,
20 etc. y ácidos orgánicos como acético, fumárico, málico, cí-
trico, mandélico, tartático, ascórbico, etc. Los métodos para
la producción de las sales de adición de ácidos son muy cono-
cidos en la técnica.

25 Los derivados semisintéticos I, II, III y IV del
XK-62-2 poseen excelente actividad antibacteriana. Es espe-
cialmente notable que los derivados presenten un intensa ac-
tividad antibacteriana contra las variedades de Escherichia
coli con un factor R que indica resistencia a los antibióti-
cos aminoglicosidos conocidos..

30 La Tabla I ilustra el espectro antibacteriano de

1 la kanamicina A, gentamicina C_{1a}, XK-62-2 y 2'-N-[L(-)-α-
hidroxi-γ-aminobutiril]XK-62-2 (compuesto I), 1-N-[L(-)-α-
5 hidroxi-γ-aminobutiril]XK-62-2 (Compuesto II), 1-N-2'-N-bis-
[L(-)-α-hidroxi-γ-aminobutiril]XK-62-2 (compuesto III) y
3-N-2'-N-bis-[L(-)-α-hidroxi-γ-aminobutiril]XK-62-2 (com-
puesto IV) contra diversas bacterias Gram-positivas y Gram-
negativas, medido por el método de dilución en agar a pH 8,0.

Comparando las concentraciones mínimas de inhibi-
ción indicadas en la Tabla I, resulta evidente que los com-
10 puestos I, II, III y IV poseen una intensa actividad anti-
bacteriana. Característicamente, estos compuestos presentan
intensa actividad antibacteriana en especial contra Escheri-
chia coli KY 8327 y 8348.

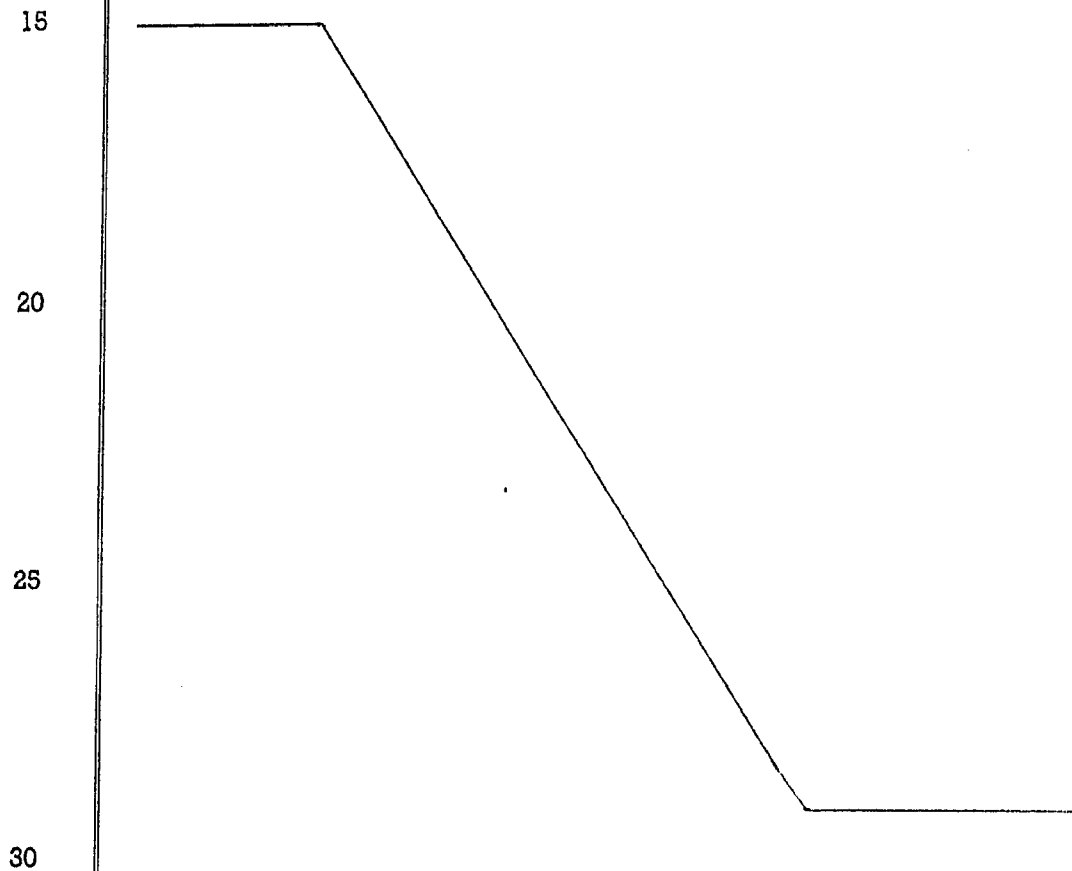


TABLA I

Espectro antibacteriano (concentración mínima de inhibición, mcg/ml)

Variedades	Kanamicina A	Gentamicina C _{1a}	Compuestos				
			XK-62-2	I	II	III	IV
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> BH 1	5,2	0,13	0,52	25	2,08	8,34	8,34
<u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 6538P	0,021	0,004	0,038	0,05	0,016	0,065	0,130
<u>Bacillus subtilis</u> NR 10707	0,021	0,004	0,044	0,05	0,004	0,008	0,016
<u>Proteus vulgaris</u> ATCC 6897	0,16	0,033	0,033	0,39	0,065	0,521	0,521
<u>Shigella sonnei</u> ATCC 9290	0,16	0,033	0,033	0,39	0,033	0,260	0,260
<u>Salmonella typhosa</u> ATCC 5992	0,088	0,016	0,008	0,20	0,008	0,065	0,130
<u>Klebsiella pneumoniae</u> ATCC 10031	0,042	0,016	0,004	0,10	0,008	0,065	0,065
<u>Escherichia coli</u> ATCC 26	0,16	0,033	0,016	0,39	0,004	0,065	0,130
<u>Escherichia coli</u> KY 8327	1,04	2,08	1,04	3,10	0,016	0,065	0,260
<u>Escherichia coli</u> KY 8348	0,041	1,04	1,04	0,05	0,004	0,065	0,130

1

5

10

15

20

25

30

1

TABLA I

Espectro antibacteriano (concentración mínima)

	<u>Variedades</u>	<u>Kanamicina A</u>	<u>Gentamicina C_{1a}</u>	<u>XK-62</u>
5	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> BMH 1	5,2	0,13	0,52
	<u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 6538P	0,021	0,004	0,08
	<u>Bacillus subtilis</u> Nº 10707	0,021	0,004	0,04
10	<u>Proteus vulgaris</u> ATCC 6897	0,16	0,033	0,03
	<u>Shigella sonnei</u> ATCC 9290	0,16	0,033	0,03
	<u>Salmonella typhosa</u> ATCC 9992	0,088	0,016	0,00
15	<u>Klebsiella pneumoniae</u> ATCC 10031	0,042	0,016	0,00
	<u>Escherichia coli</u> ATCC 26	0,16	0,033	0,01
	<u>Escherichia coli</u> KY 8327	1,04	2,08	1,04
20	<u>Escherichia coli</u> KY 8348	0,041	1,04	1,04

25

30

TABLA I

centración mínima de inhibición, mcg/ml)

tamicina C _{1a}	XK-62-2	Compuestos			
		I	II	III	IV
0,13	0,52	25	2,08	8,34	8,34
0,004	0,088	0,05	0,016	0,065	0,130
0,004	0,044	0,05	0,004	0,008	0,016
0,033	0,033	0,39	0,065	0,521	0,521
0,033	0,033	0,39	0,033	0,260	0,260
0,016	0,008	0,20	0,008	0,065	0,130
0,016	0,004	0,10	0,008	0,065	0,065
0,033	0,016	0,39	0,004	0,065	0,130
2,08	1,04	3,10	0,016	0,065	0,260
1,04	1,04	0,05	0,004	0,065	0,130

1 En la tabla anterior, el Escherichia coli KY 8327
y KY 8348, respectivamente, producen gentamicin-adenililtrans-
ferasa y gentamicin-acetiltransferasa intracelularmente. La
5 primera bacteria inactiva a la kanamicina y a las gentamici-
nas por adenilación y la última inactiva a las gentamicinas
por acetilación.

 El especto antibacteriano del 1-N-[L-(-)- α -hidroxi-
- γ -aminobutiril]-XK-62-2 (compuesto II) en comparación con la
kanamicina A, el complejo de gentamicina (C₁, C_{1a} y C₂) y el
10 XK-62-2, medido por el método de dilución en agar a pH 7,2
se encuentra en la siguiente Tabla II.

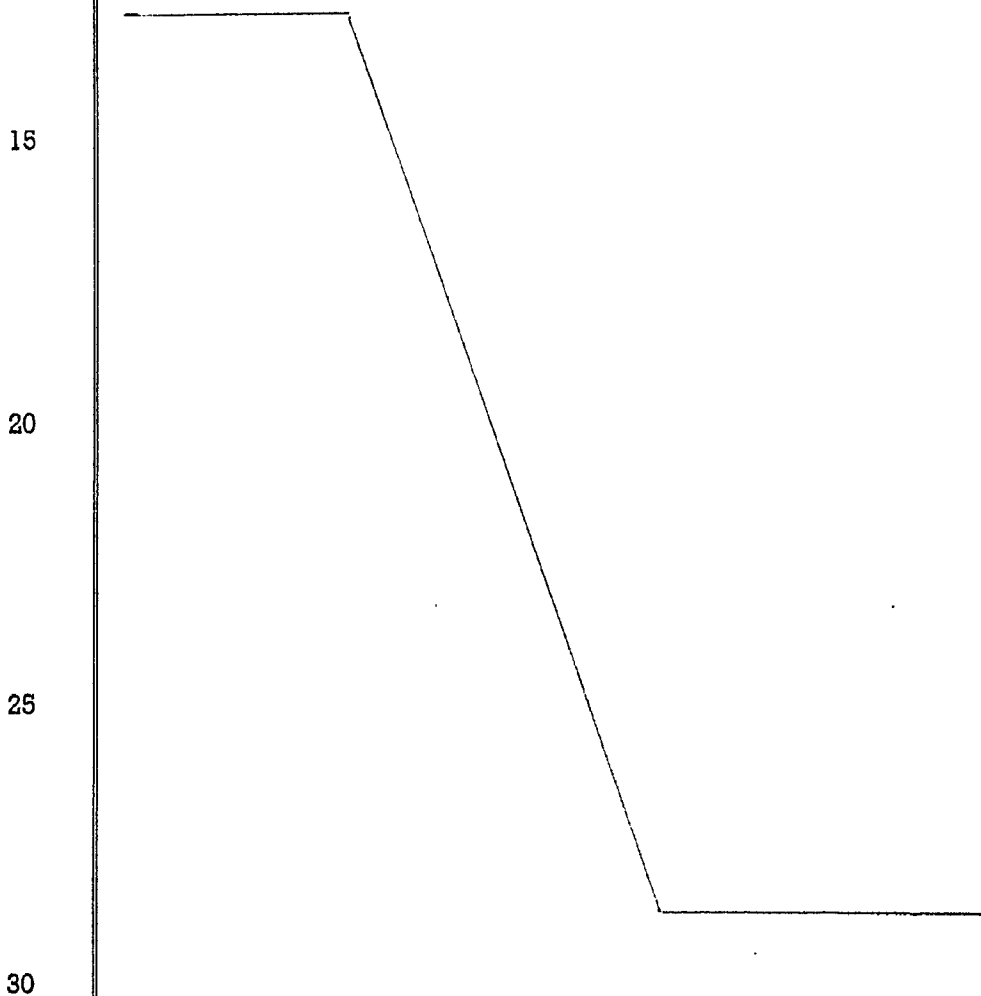


TABLA II

Espectro antibacteriano del 1-N-[L-(-)- α -hidroxioxi- γ -aminobutiril]-XK-62-2

Variedades	Concentración mínima de inhibición (mcg/ml)		Compuesto II (tipo L)
	Kanamicina A	Complejo de gentamicina (C ₁ , C _{1a} y C ₂)	
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	0,2	< 0,05	0,1
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	0,2	< 0,05	0,1
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0,2	< 0,05	0,1
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	6,25	0,2	0,4
<i>Escherichia coli</i> T-2	1,56	0,4	0,4
<i>Escherichia coli</i> T-5	1,56	0,4	0,4
<i>Escherichia coli</i> KY 8327 ¹	50	12,5	12,5
<i>Escherichia coli</i> KY 8321 ²	100	6,25	3,12
<i>Escherichia coli</i> KY 8348 ³	0,78	3,12	12,5
<i>Escherichia coli</i> KY 8349 ⁴	> 100	0,2	0,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BmH n° 1	12,5	0,4	0,78
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KY 8510 ⁵	100	3,12	1,56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KY 8511 ⁶	100	50	3,12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KY 8512 ⁷	12,5	0,4	0,78
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KY 8516 ⁸	> 100	3,12	3,12
<i>Providencia</i> SP 164 ⁹	> 100	50	12,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> N° 8045	0,4	0,2	0,2
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	6,25	1,56	3,12
<i>Proteus vulgaris</i> 6897	3,12	0,78	3,12
<i>Proteus rettgeri</i> KY 4288	0,78	0,78	0,78
<i>Proteus morgani</i> KY 4298	1,56	6,78	0,78

1: produce gentamicin-adenil-transferasa (GAD)
 2: produce GAD y neomicin-Kanamycin-fosfotransferasa tipo II
 3: produce gentamicin-acetil-transferasa tipo I
 4: produce neomicin-Kanamycin-fosfotransferasa tipo I
 5: produce Kanamicin-acetil-transferasa
 6: produce gentamicin-acetiltransferasa tipo I y neomicin-Kanamycin-fosfotransferasa tipo I
 7: produce neomicin-Kanamycin-fosfotransferasa tipo I y tipo II y estreptomycin-fosfotransferasa
 8: probablemente produce Kanamicin-acetiltransferasa
 9: produce gentamicin-acetil-transferasa tipo II
 Los enzimas anteriores son producidos intracelularmente y con los enzimas, las bacterias inactivas.

POOR QUALITY

TABLA II

Espectro antibacteriano del 1-N-(L-(-)-α-hidro:

	Variedades	Co:	
		Kanamicina A	
1	<u>Staphylococcus aureus</u> 209 P	0,2	
5	<u>Staphylococcus aureus</u> Smith	0,2	
	<u>Bacillus subtilis</u> ATCC 6633	0,2	
	<u>Sarcina lutea</u> ATCC 9341	6,25	
	<u>Escherichia coli</u> T-2	1,56	
	<u>Escherichia coli</u> T-5	1,56	
10	<u>Escherichia coli</u> KY 8327 ¹	50	
	<u>Escherichia coli</u> KY 8321 ²	100	
	<u>Escherichia coli</u> KY 8348 ³	0,78	
	<u>Escherichia coli</u> KY 8349 ⁴	>100	
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> BmH n° 1	12,5	
15	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> KY 8510 ⁵	100	
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> KY 8511 ⁶	100	
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> KY 8512 ⁷	12,5	
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> KY 8516 ⁸	>100	
	<u>Providencia</u> SP 164 ⁹	>100	
20	<u>Klebsiella pneumoniae</u> N° 8045	0,4	
	<u>Proteus mirabilis</u> 1287	6,25	
	<u>Proteus vulgaris</u> 6897	3,12	
	<u>Proteus rettgeri</u> KY 4288	0,78	
	<u>Proteus morganii</u> KY 4298	1,56	
25	_____		
	1: produce gentamicin-adenil-transferasa (GAD)		6
	2: produce GAD y neomicin-Kanamycin-fosfotransferasa tipo II		7
	3: produce gentamicin-acetil-transferasa tipo I		8
	4: produce neomicin-Kanamycin-fosfotransferasa tipo I		9
	5: produce kanamicin-acetil-transferasa		9
30			Lo la ti

POOR QUALITY

A II

-(-)-α-hidroxi-γ-aminobutiril]-XK-62-2

Concentración mínima de inhibición (mcg/ml)			
gentamicina A	Complejo de gentamicina (C ₁ , C _{1a} y C ₂)	XK-62-2	Compuesto II (tipo L)
0,2	< 0,05	0,1	0,1
0,2	< 0,05	< 0,05	0,1
0,2	< 0,05	< 0,05	0,1
6,25	0,2	0,4	0,4
1,56	0,4	0,4	0,4
1,56	0,4	0,4	0,4
50	12,5	12,5	0,2
100	6,25	3,12	0,2
0,78	3,12	12,5	0,1
100	0,2	0,4	0,2
12,5	0,4	0,78	1,56
100	3,12	1,56	3,12
100	50	100	3,12
12,5	0,4	0,78	0,78
100	3,12	3,12	3,12
100	50	100	12,5
0,4	0,2	0,1	0,2
6,25	1,56	0,78	3,12
3,12	0,78	0,78	3,12
0,78	0,78	0,4	0,78
1,56	6,78	0,4	0,78

- tipo II
- 6: produce gentamicin-acetiltransferasa tipo I y neomicin-Kanamycin-fosfotransferasa tipo I
 - 7: produce neomicin-kanamicin-fosfotransferasa tipo I y tipo II y estreptomycin-fosfotransferasa
 - 8: probablemente produce kanamicin-acetiltransferasa
 - 9: produce gentamicin-acetiltransferasa tipo II
- Los enzimas anteriores son producidos intracelularmente y, con los enzimas, las bacterias inactivan a los antibióticos.

1 Se advierte en la Tabla II que el compuesto
1-N-[L-(-)- α -hidroxi- γ -aminobutiril]XK-62-2 de esta inven-
ción presenta una intensa actividad antibacteriana contra
diversas bacterias que son resistentes por lo menos a uno
5 de los antibióticos de gentamicina y XK-62-2, que producen
gentamicin-adeniltransferasa y/o gentamicin-acetiltransfera-
sa tipo I y tipo II intracelularmente, inactivando con ello
a los antibióticos de gentamicina y al XK-62-2.

10 Además, mediante diversos ensayos sobre la pro-
tección contra las infecciones inducidas por cepas de las
bacterias resistentes antes mencionadas, se ha descubierto
que los compuestos de la invención conservan el grupo α -hi-
droxi- γ -aminobutirilo in vivo y presentan una actividad an-
tibacteriana mucho mayor que los antibióticos de gentamicina
15 y el XK-62-2.

20 En las tablas anteriores es evidente que los com-
puestos I, II, III y IV presentan una notable actividad an-
tibacteriana contra diversas bacterias Gram-positivas y Gram
negativas, incluidas las resistentes a los antibióticos ami-
noglicosidos. Por lo tanto, se espera que sean eficaces para
el tratamiento de diversas infecciones en seres humanos y en
animales inducidas por estas bacterias flogógenas. Por ejem-
plo, se espera que los compuestos sean eficaces para el tra-
tamiento de las infecciones del tracto urinario y de las in-
25 fecciones respiratorias inducidas por Staphylococcus aureus,
Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa y variedades del
género Proteus.

30 Cuando se administran los compuestos o sus sales
de adición de ácido, se prefiere la administración parente-
ral con una dosis efectiva de 1,6-6 mg/kg al día.

1 La toxicidad aguda (DL_{50}) del 1-N-[L-(-)- α -hidroxi- γ -aminobutiril]-XK-62-2 (compuesto II) en ratones es de
250 mg/kg por inyección intravenosa, mientras que la del
XK-62-2 y la del complejo de gentamicina (una mezcla de C_1 ,
5 C_{1a} y C_2) son 93 mg/kg y 72 mg/kg, respectivamente.

La práctica de ciertas realizaciones específicas de esta invención es ilustrada mediante los siguientes ejemplos representativos.

10 EJEMPLO 1

Producción de 2'-N-[L-(-)- α -hidroxi- γ -carbобензоxiaminobutiril]-XK-62-2 (compuesto IA), 1-N-[L-(-)- α -hidroxi- γ -carbобензоxiaminobutiril]-XK-62-2 (compuesto IIA), 1-N-2-N-bis-[L-(-)- α -hidroxi- γ -carbобензоxiaminobutiril]-XK-62-2 (compuesto IIIA) y 3-N-2'-N-bis-[L-(-)- α -hidroxi- γ -carbобензоxiaminobutiril]-XK-62-2 (compuesto IVA)

15 En este ejemplo, se disuelven 2,778 g (6,0 milimoles) de XK-62-2 en 30 ml de tetrahidrofurano acuoso al 50%. A la solución se añade una solución de éster de N-hidroxisuccinimida del ácido L-(-)- α -hidroxi- γ -carbобензоxiaminobutírico [la producción de este compuesto a partir del ácido L-(-)- α -hidroxi- γ -aminobutírico está descrita en el Journal of Antibiotics, Vol. XXV, pags. 695-708 (1972). La producción del ácido L-(-)- α -hidroxi- γ -aminobutírico está descrita en
20 Tetrahedron Letters, pags. 2625-2628 (1971)] (2,94 g, 84 milimoles) en 20 ml de tetrahidrofurano, con agitación, mientras se mantiene la temperatura entre -5° y $0^{\circ}C$. La adición es completa en 1 hora y la mezcla se deja reaccionar durante la noche.

30 Por cromatografía en capa fina de gel de sílice

1 (desarrollador: isopropanol/amoniaco acuoso concentrado/clo-
roformo = 2:1:1; agente colorante: ninhidrina), se confirma
la presencia de los compuestos IA (Rf: 0,75), IIA (Rf: 0,81),
IIIA (Rf: 0,86) y IVA (Rf: 0,92) y una pequeña cantidad de
5 XK-62-2 que no ha reaccionado. La mezcla de reacción se con-
centra a presión reducida para obtener un residuo ligeramente
amarillento que es una mezcla de compuesto IA, IIA, IIIA y
IVA.

EJEMPLO 2

10 Producción de 2'-N-[L-(-)- α -hidroxi- γ -aminobutiril]-XK-62-2
(compuesto I)

En este ejemplo, la mezcla de compuestos IA, IIA,
IIIA y IVA obtenida en el Ejemplo 1 anterior se disuelve en
40 ml. de metanol acuoso al 50%. A la solución se añaden 0,3
15 ml de ácido acético y la mezcla se somete a hidrogenolisis en
presencia de 250 mg de paladio al 5% en carbón activo, a la
temperatura ambiente y a la presión atmosférica, durante 6
horas. Por cromatografía en capa fina de gel de sílice (bajo
las mismas condiciones que en el Ejemplo 1), se confirma la
20 presencia de los compuestos I (Rf: 0,52), II (Rf: 0,40), III
(Rf: 0,31) y IV (Rf: 0,45) además de una pequeña cantidad de
XK-62-2 que no ha reaccionado. Se separa el catalizador por
filtración y el filtrado se concentra a presión reducida. Al
25 residuo resultante se añaden 15 ml de agua para disolver el
residuo y la solución se pasa por una columna (diámetro, 2,5
cm) de Amberlite CG-50 (forma amónica, 150 ml) (producto de
Rohm and Haas Co., Estados Unidos). La columna se lava con
200 ml de agua. Después se realiza la elución con amoniaco
acuoso 0,2 N y el eluato se recoge por fracciones en porcio-
30 nes de 10 ml. Como resultado de ello, se recuperan 0,81 g de

1 XK-62-2 de las fracciones núms. 118-124. Después se realiza
la elución con amoniaco acuoso 0,4 N y el compuesto I se
eluye en las fracciones núms. 144-174. Se combinan estas frac-
ciones y se concentran a sequedad bajo presión reducida. Co-
5 mo resultado de ello, se obtienen 1,42 g del compuesto I en
forma de producto incoloro.

El análisis del compuesto I revela lo siguiente:

Punto de fusión: 135-140°C (descomposición a 143°C)

Rotación específica: $[\alpha]_D^{25} = +131,6^\circ$ (c = 0,098, agua).

10 Espectro de absorción infrarrojo (KBr) (cm^{-1}): 3700-3100,
2950, 1640, 1535, 1490, 1385, 1340, 1287, 1147, 1110, 1055,
1028, 958, 820, 600 (Fig. 1).

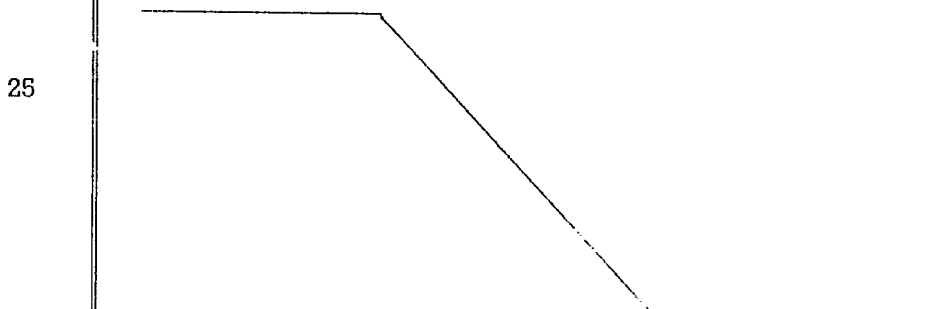
15 Espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) (en óxido de
deuterio) δ (en ppm de DSS): 1,18 (3H, singlete), 2,41 (3H,
singlete), 2,60 (3H, singlete), 2,83 (2H, singlete), 5,33-
4,85 (multiplete superpuesto a la señal de OH) (Fig. 2).

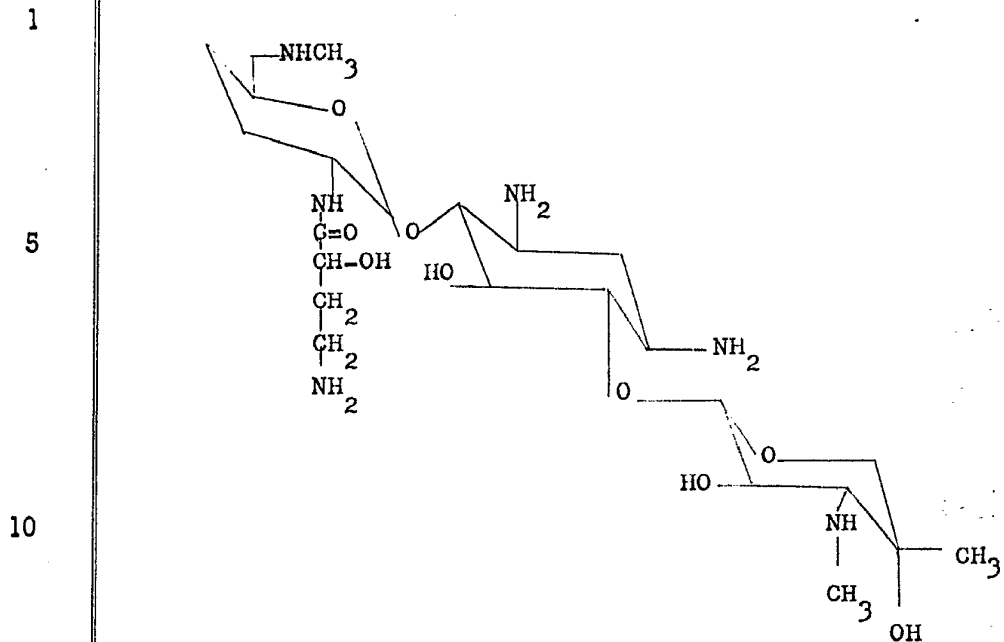
Análisis elemental para $\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_9 \cdot \text{H}_2\text{CO}_3$:

Calculado: C, 47,91%; H, 8,04%; N, 13,41%

20 Encontrado: C, 47,97%; H, 8,27%; N, 13,51%

Todo lo anterior confirma que el compuesto I tie-
ne la siguiente fórmula estructural:





EJEMPLO 3

Producción de 1-N-[L-(-)-α-hidroxi-γ-aminobutiril]-XK-62-2

(Compuesto II)

15

En este ejemplo, después de la elución del compuesto I del Ejemplo 2, se eluye el compuesto II en las fracciones núms. 225-250. Estas fracciones se combinan y concentran a sequedad bajo presión reducida para obtener 0,69 g del compuesto II como producto incoloro.

20

El análisis del compuesto II revela lo siguiente:

Punto de fusión: 120-124°C

Rotación específica: $[\alpha]_D^{29} = +99,0^\circ$ (c = 0,10, agua)

25

Espectro de absorción infrarrojo (KBr) (cm⁻¹): 3700-3100, 2490, 1640, 1565, 1480, 1385, 1340, 1282, 1111, 1054, 1022, 973, 816, 700-600 (Fig. 3).

30

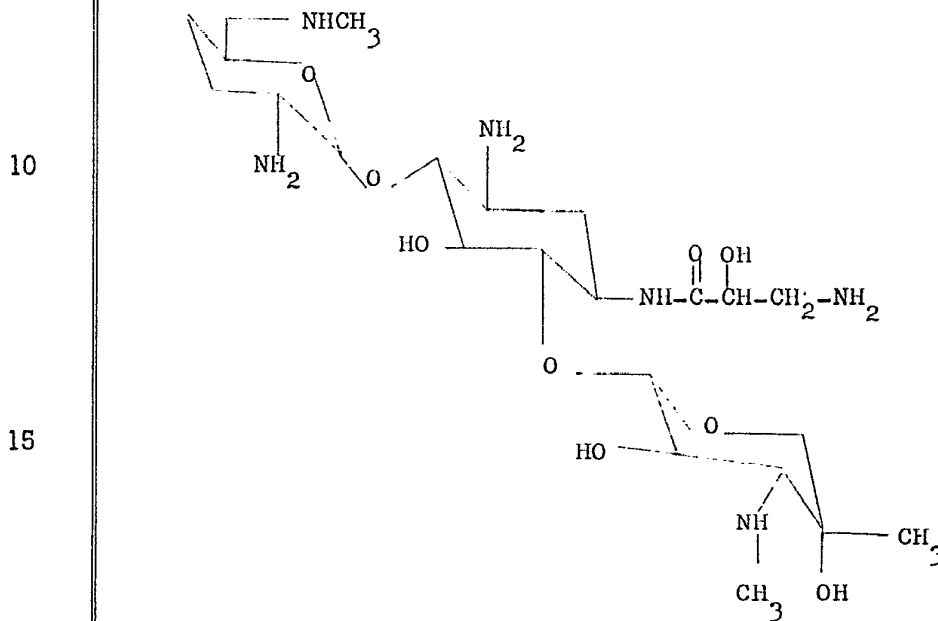
Espectro RMN (en óxido de deuterio) δ (en ppm de DSS): 1,20 (3H, singlete), 2,36 (3H, singlete), 2,52 (3H, singlete), 5,14 (1H, doblete, J = 4,0 Hz), 5,22 (1H, doblete, J=4,0 Hz) (Fig. 4).

1 Análisis elemental para $C_{24}H_{48}N_6O_9 \cdot \frac{1}{2}H_2CO_3$:

Calculado: C, 49,39%; H, 8,29%; N, 14,11%

Encontrado: C, 48,96%; H, 8,37%; N, 13,95%.

5 Basándose en lo que antecede, se confirma que el
compuesto II tiene la siguiente fórmula estructural:



EJEMPLO 4

20 Producción de 3-N-2'-N-bis-[L-(-)- α -hidroxi- γ -aminobutiril]-

XK-62-2 (compuesto IV)

25 En este ejemplo, después de la elución del compuesto II en el Ejemplo, 3 se eluye el compuesto IV en las fracciones núms. 273-291. Estas fracciones se combinan y concentran a sequedad bajo presión reducida para obtener 0,53 g del compuesto IV como producto incoloro.

El análisis del compuesto IV revela lo siguiente:

Punto de fusión: 157-160°C (descomposición a 167°C).

Rotación específica: $[\alpha]_D^{14,4} = +56,1^\circ$ (c = 0,11, agua)

30 Espectro de absorción infrarrojo (KBr) (cm^{-1}): 3700-3000,

1 2930, 1640, 1525, 1470, 1384, 1320, 1140, 1110, 1050, 1020,
953, 870, 815, 600 (Fig. 7).

Espectro RMN (en óxido de deuterio) δ (en ppm de
DSS): 1,22 (3H, singlete), 2,36 (3H, singlete), 2,54 (3H,
5 singlete), 5,12 (1H, doblete, $J = 4,0$ Hz), 5,35 (1H, doblete
 $J = 3,9$ Hz) (Fig. 8).

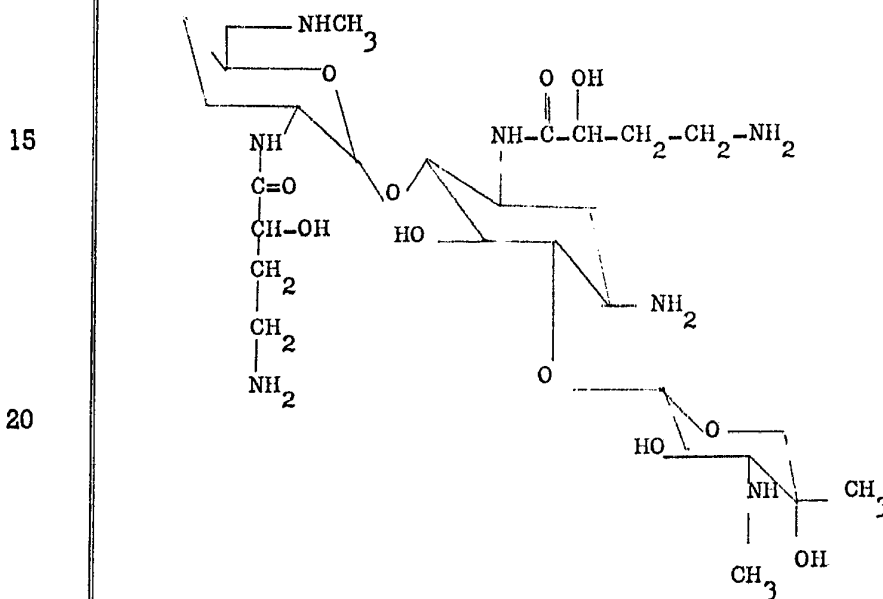
Análisis elemental para $C_{28}H_{55}N_7O_{11} \cdot 3H_2CO_3 \cdot H_2O$:

Calculado: C, 42,81%; H, 7,52%; N, 11,28%

Encontrado: C, 42,79%; H, 7,30%; N, 11,20%.

10

De todo lo que antecede, se confirma que el com-
puesto IV tiene la siguiente fórmula estructural:



20

EJEMPLO 5

25

Producción de 1-N-2'-N-bis[L-(-)- α -hidroxi- γ -aminobutiril]-
XK-62-2 (compuesto III)

30

En este ejemplo, después de la elución del com-
puesto IV en el Ejemplo 4, se eluye el compuesto III en las
fracciones núms. 315-341. Estas fracciones se combinan y con-
centran a sequedad bajo presión reducida para obtener 0,72 g

1 del compuesto III como producto incoloro.

El análisis del compuesto III revela lo siguiente:

Punto de fusión: 152-156°C (descomposición a 160°C)

5 Rotación específica: $[\alpha]_D^{25} = +91,7^\circ$ (c = 0,11, agua)

Espectro de absorción infrarrojo (KBr) (cm^{-1}): 3700-3000, 2960, 1650, 1540, 1490, 1387, 1330, 1150, 1115, 1060, 1023, 960, 820, 600 (Fig. 5).

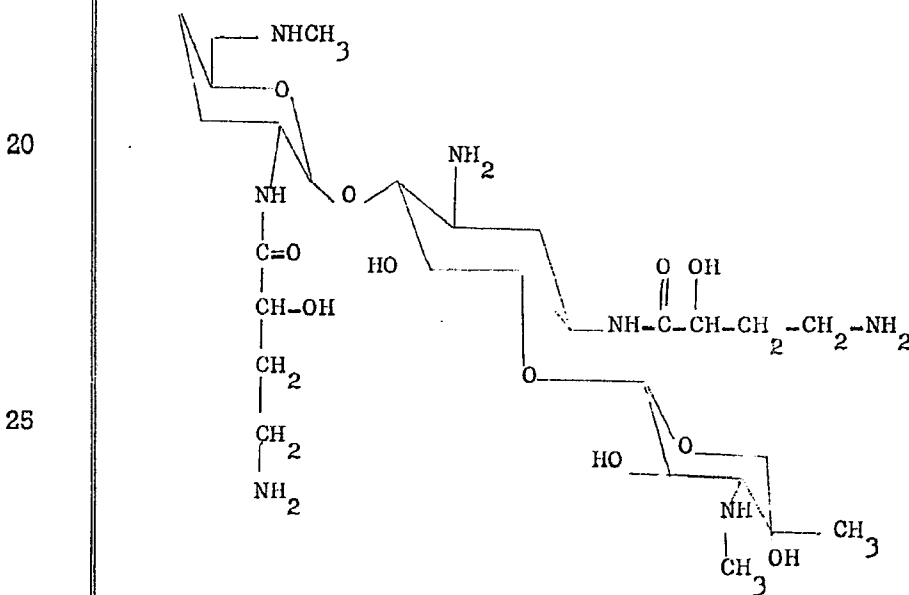
10 Espectro RMN (en óxido de deuterio) δ (en ppm de DSS): 1,22 (3H, singlete), 2,57 (3H, singlete), 2,73 (3H, singlete), 5,40-5,10 (multiplete superpuesto a la señal de OH) (Fig. 6).

Análisis elemental para $\text{C}_{28}\text{H}_{55}\text{N}_7\text{O}_{11} \cdot 2\text{H}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$:

Calculado: C, 44,61%; H, 7,56%; N, 12,14%

Encontrado: C, 44,86%; H, 7,29%; N, 12,31%.

15 Por todo lo anterior, se confirma que el compuesto III tiene la siguiente fórmula estructural:



EJEMPLO 6

30 Producción de los monosulfatos de los compuestos I, II, III

y IV

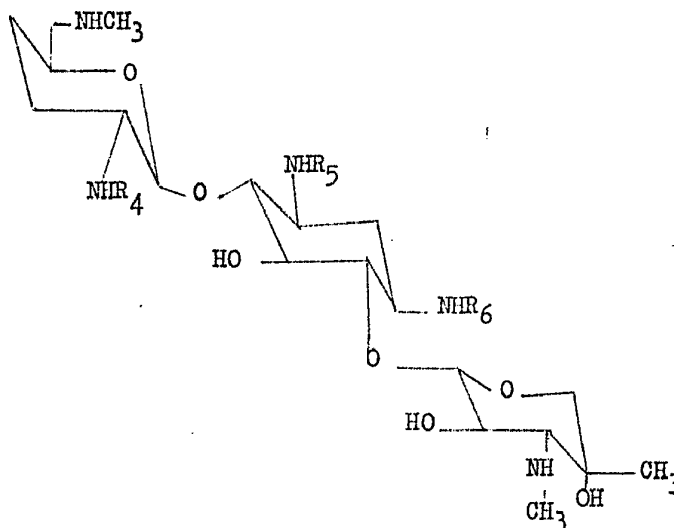
1 En este ejemplo, se disuelve 1 mol de 2'-N-[L-(-)
- α -hidroxi- γ -aminobutiril]-XK-62-2 (compuesto I) en 2 litros
agua. A la solución se añade una solución de 1 mol de ácido
5 sulfúrico en 500 ml de agua, con enfriamiento. Al cabo de
30 minutos, se agrega etanol frío a la solución para formar
un precipitado, hasta que la precipitación es completa. El
precipitado se separa por filtración para obtener el monosul-
fato del compuesto I deseado.

10 Los monosulfatos de los compuestos II, III, y IV
se preparan de la misma manera.

En resumen, la Patente de Invención que se soli-
cita deberá recaer sobre las siguientes

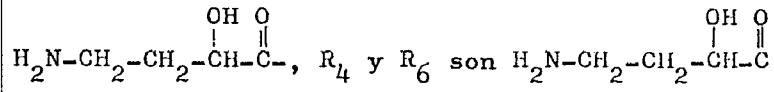
REIVINDICACIONES:

15 1. Un procedimiento para la producción de deri-
vados semisintéticos del antibiótico XK-62-2 de fórmula ge-
neral I:



30 (donde R_4 es $H_2N-CH_2-CH_2-\overset{OH}{\underset{||}{C}}-O$ y R_5 y R_6 son hidrógeno, R_4 y
 R_5 son hidrógeno y R_6 es

1



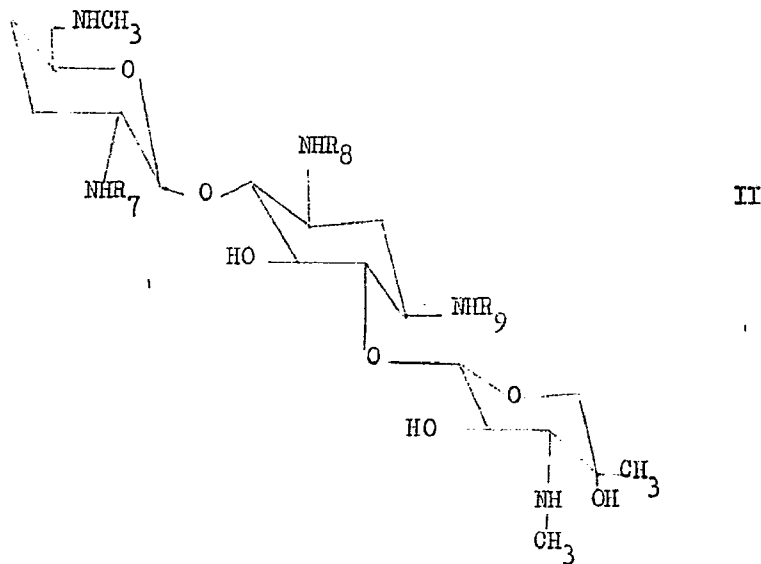
5

y R_5 es hidrógeno, o R_4 y R_5 son $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\underset{|}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$, y R_6 es hidrógeno), o la mezcla de compuestos de fórmula general I, o sales de adición de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables o una sal del mismo que comprende

10

(1) separar los grupos protectores o un grupo de compuestos de fórmula general II:

15



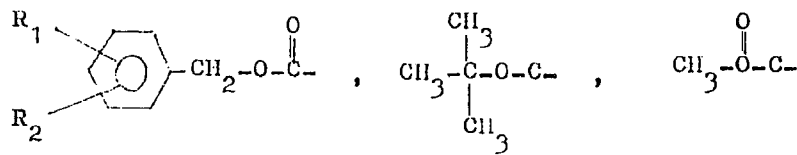
20

(donde R_7 es hidrógeno y $\begin{matrix} \text{Y}_1 \\ \text{Y}_2 \end{matrix} \text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{OH}}{\underset{|}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$ (donde Y_1 es

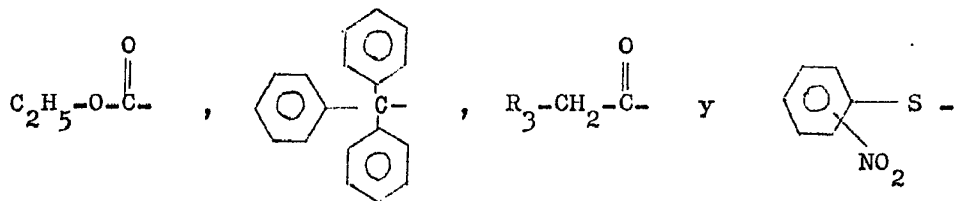
25

hidrógeno e Y_2 es un grupo protector seleccionado entre el grupo que consiste en:

30



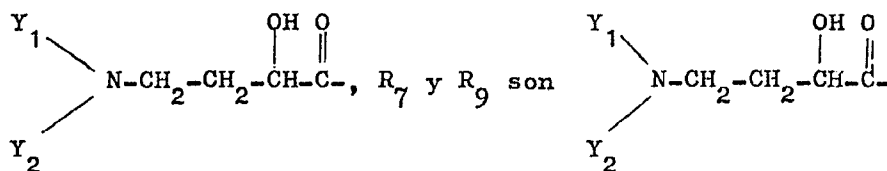
1



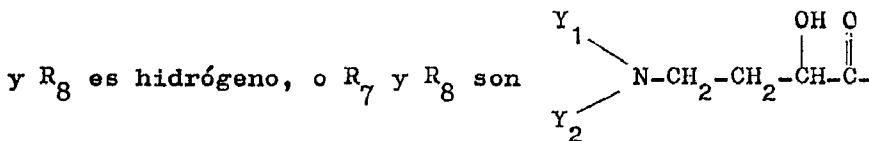
5

donde R_1 y R_2 pueden ser iguales o diferentes y son H, OH, NO_2 , Cl, Br, I, y grupos alquilo que tienen de 1 a 5 átomos de carbono o grupos alcoxi con 1 a 5 átomos de carbono y R_3 es Cl, Br o I, o Y_1 e Y_2 forman un grupo ftaloilo como grupo protector) y R_8 y R_9 son hidrógeno, R_7 y R_8 son hidrógeno y R_9 es

10



15



20

y R es hidrógeno) o de un compuesto aislado de los compuestos de fórmula general II para preparar compuestos o un compuesto de fórmula general I,

25

(2), si es necesario aislar un compuesto de los compuestos de fórmula general I, y (3), si es necesario, hacer reaccionar además compuestos o un compuesto de fórmula general I con un ácido no tóxico farmacéuticamente aceptable para preparar sales o una sal de mismo.

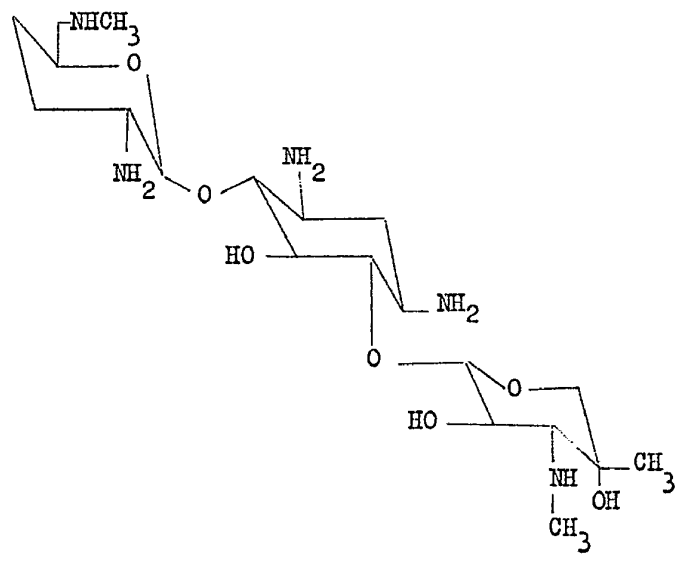
30

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, caracterizado porque los compuestos de fórmula general II son producidos por el método que comprende la acilación de los grupos amino libres de XK-62-2 representados por la fórmula

1

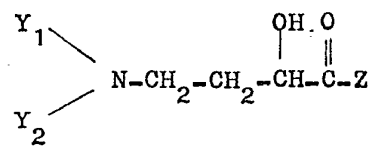
5

10



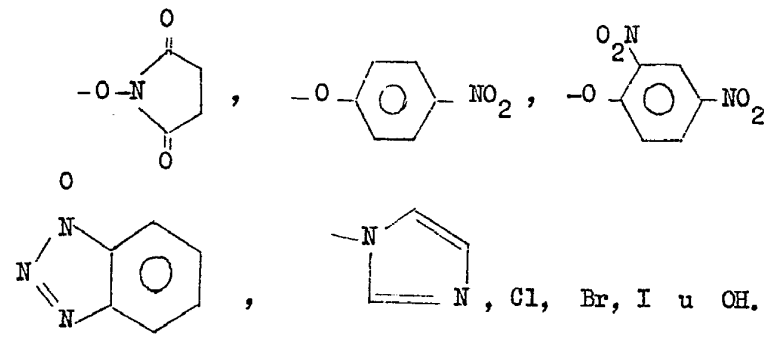
con un agente acilante de fórmula general:

15



donde Y_1 e Y_2 tienen el mismo significado que el definido en la Reivindicación 1, y Z es:

20



25

3. Un procedimiento según la Reivindicación 1, caracterizado porque dicho grupo protector Y es un grupo carbobenziloxi y es separado mediante hidrogenolisis.

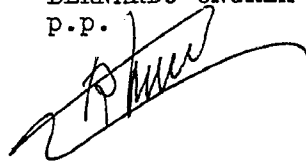
30

1 4. Se reivindica por último, como objeto sobre
el que ha de recaer la Patente de Invención que se solici-
ta: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE DERIVADOS SEMI
5 SINTETICOS DEL ANTIBIOTICO XK-62-2".

5 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente memoria descriptiva que consta de treinta-y-una
páginas mecanografiadas y dibujos que se acompañan.

Madrid, 12 Diciembre 1974

BERNARDO UNGRIA
P.P.

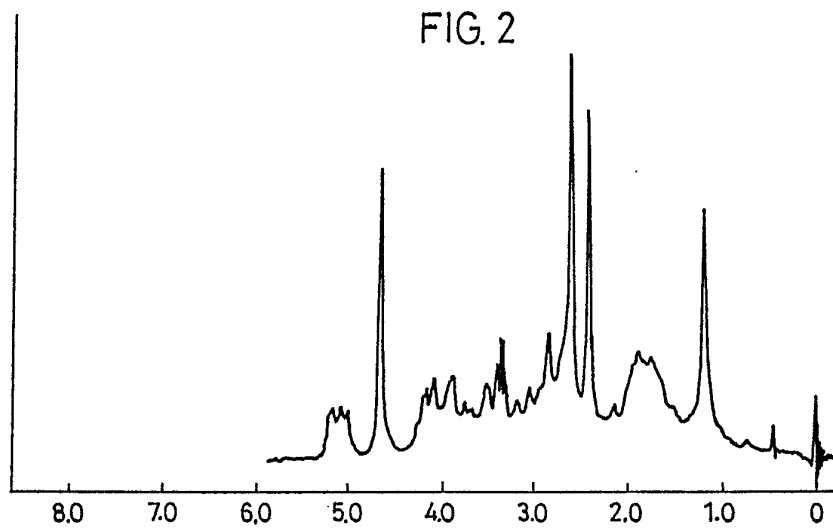
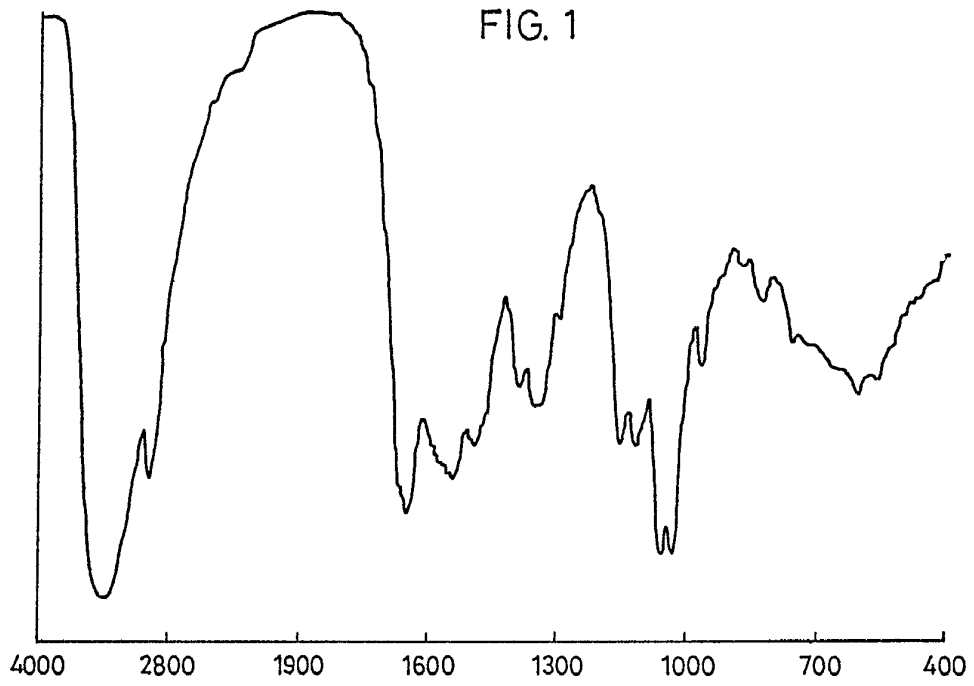
10 

15

20

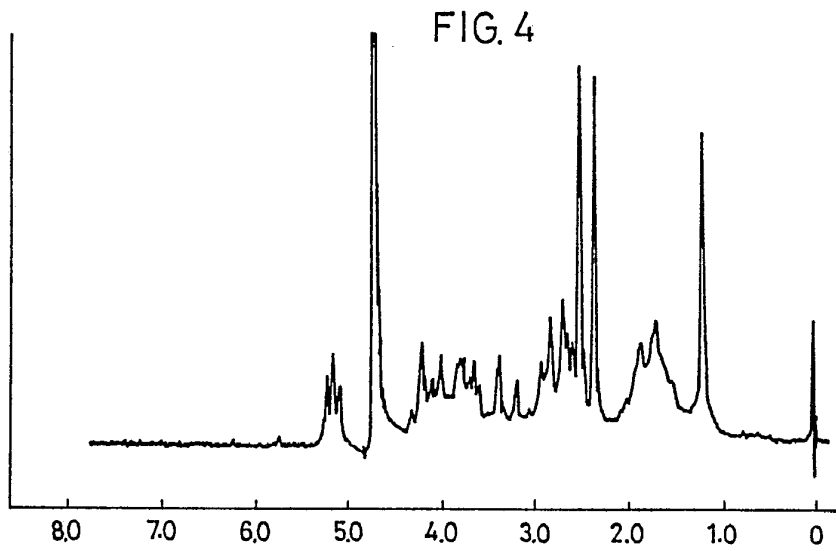
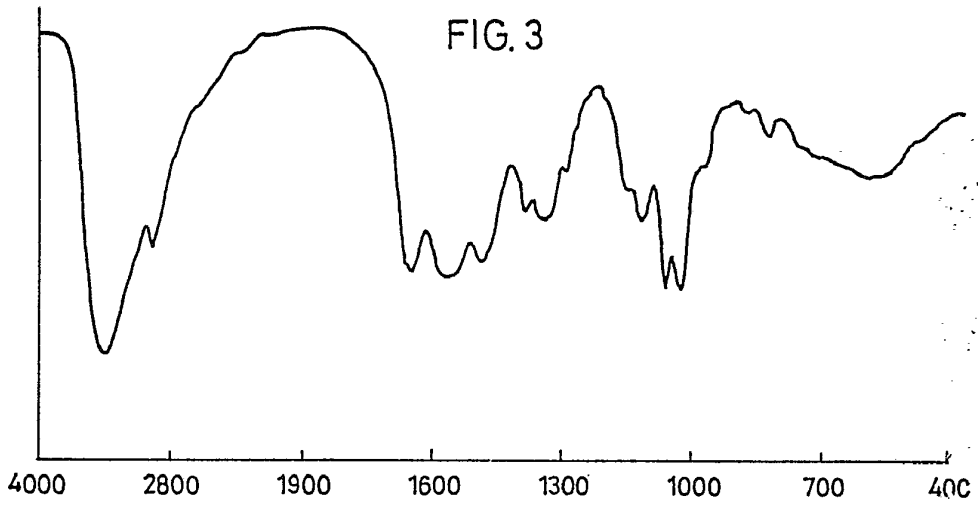
25

30

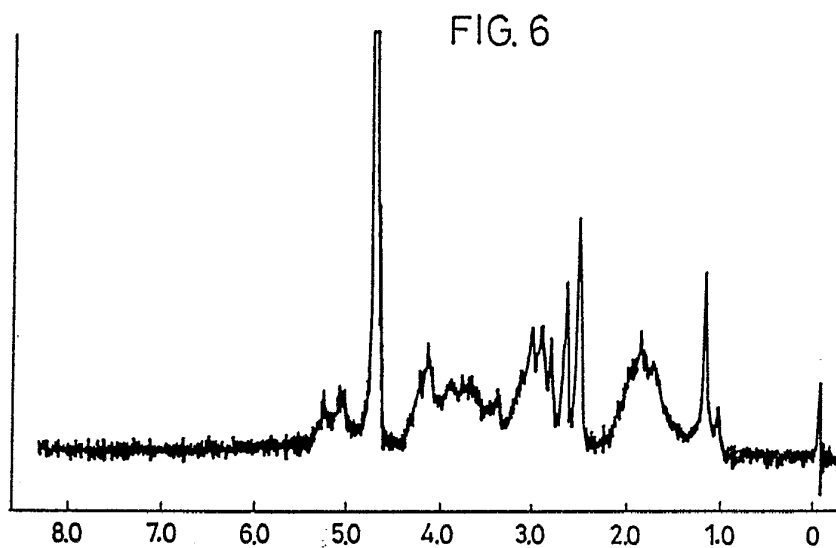
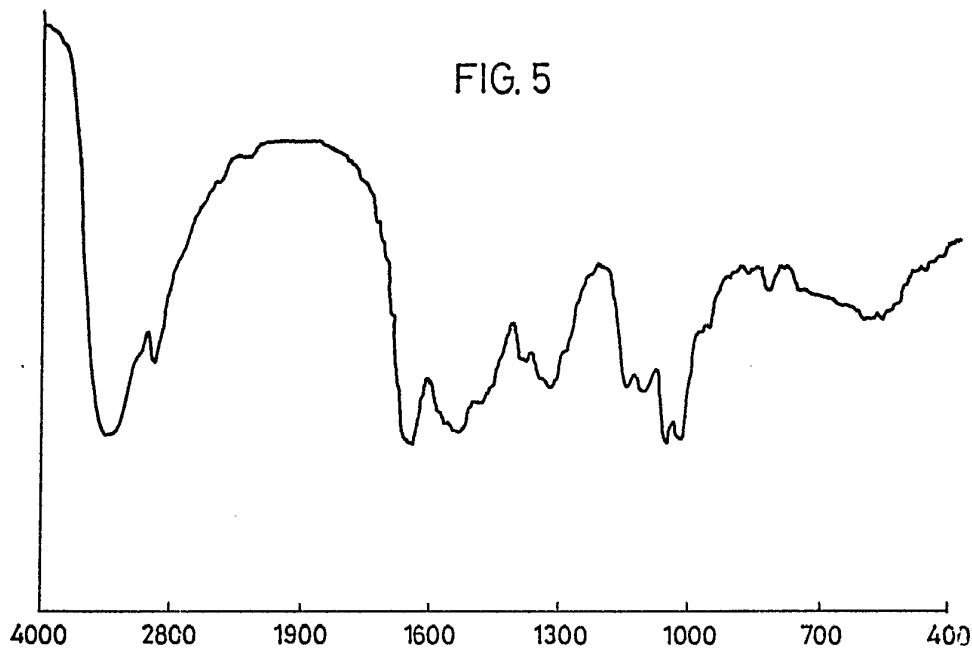


ESCALA VARIABLE
Madrid, 12 diciembre 1.974
BERNARDO UNGRIA

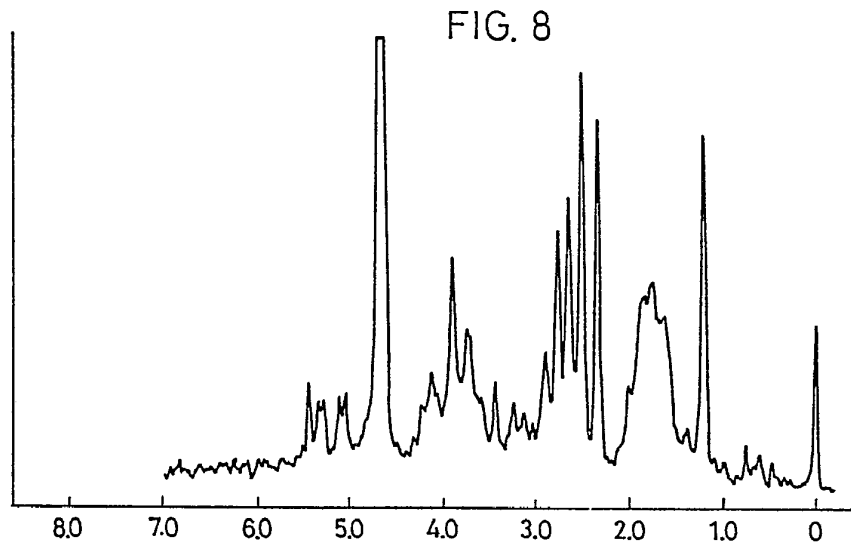
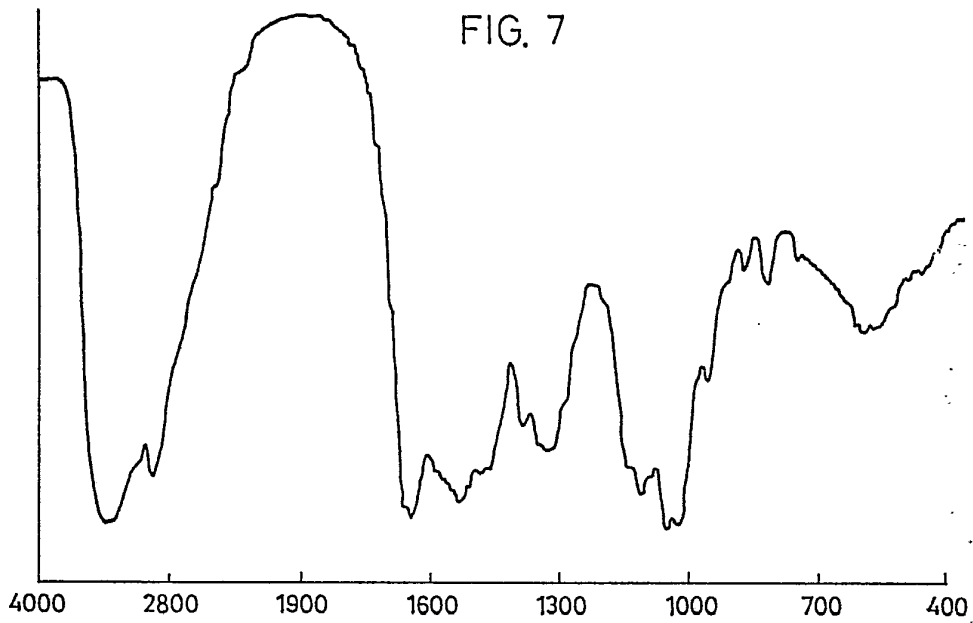
p.p.



ESCALA VARIABLE
Madrid, 12 diciembre 1.974
BERNARDO UNGERIA
p.p.



ESCALA VARIABLE
Madrid, 12 diciembre 1.974
BERNARDO UNGRIA
p.p.



ESCALA VARIABLE
Madrid, 12 diciembre 1.974
BERNARDO UNGRIA
P.P.