



170
Int. Cl.: AGAK; C07D

NUMERO 432.863

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un a

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

RESIDENCIA: Ohtemachi Bldg., Ohtemachi Chiyoda-ku.

TOKYO, Japón.

ENUNCIADO: PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UN

NUEVO ANTIBIOTICO.

Prioridad: Patente japonesa n.º 137828/1973 del 12-12-73
l.a.



ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1
5
Esta invención se refiere a la producción de un derivado semisintético del antibiótico XK-62-2 y más específicamente al derivado identificado como 1-N-[L-(-)-α-hidroxi-γ-aminobutirilo]XK-62-2.

10
El método para la producción y las propiedades físico-químicas del nuevo antibiótico XK-62-2, que se utiliza como material de partida en esta invención, están descritos con detalle en la solicitud de patente estadounidense número de serie 364.058, presentada el 25 de Mayo de 1973.

15
20
25
En pocas palabras, el XK-62-2 se produce fácilmente cultivando actinomicetes como Micromonospora sagamiensis, Micromonospora echinospora y Micromonospora purpurea por los métodos habitualmente empleados en el cultivo de actinomicetes. Más específicamente, se inoculan unas variedades de los microorganismos antes mencionados en un medio líquido que contiene una fuente de carbono que pueda ser utilizada por el microorganismo, tal como azúcares, hidrocarburos, alcoholes, ácidos orgánicos, etc.; fuentes de nitrógeno orgánico o inorgánico y adicionalmente sales inorgánicas y factores promotores del crecimiento y se cultivan a 25-40°C durante 2 a 12 días. El aislamiento y la purificación del XK-62-2 se llevan a cabo mediante una combinación apropiada de adsorción y desorción de resinas cambiadoras de ión y carbón activo y cromatografía en columna utilizando celulosa, Sephadex alumina y gel de sílice. De esta forma, puede obtenerse el XK-62-2 en forma del sulfato o en forma libre.

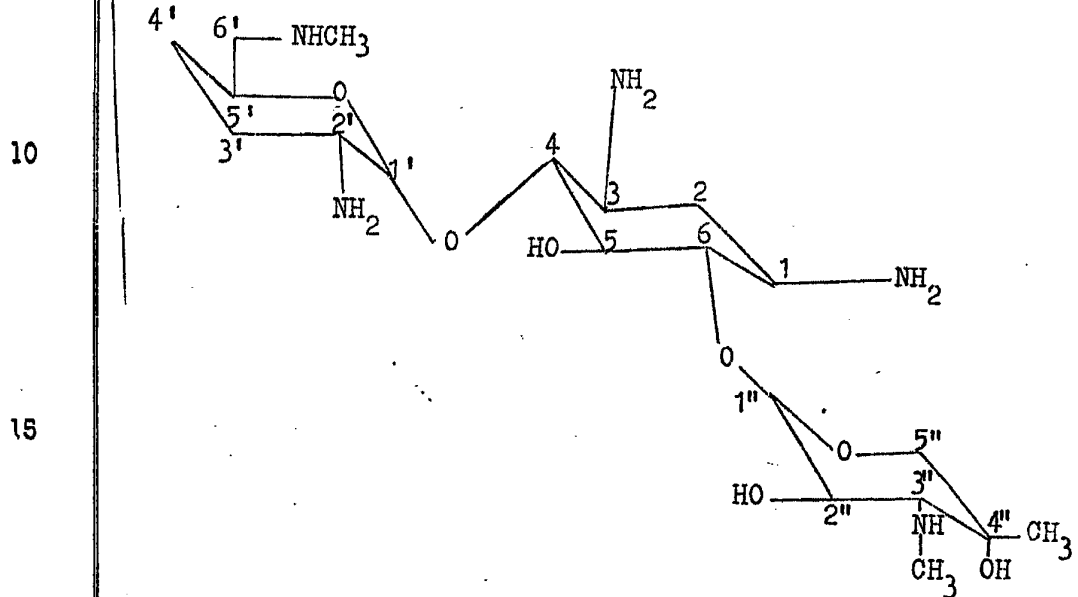
30
El XK-62-2 es una sustancia básica y se obtiene en forma de polvo blanco. El XK-62-2 responde a la fórmula molecular $C_{20}H_{41}N_5O_7$ y su peso molecular es 463. La sustancia es



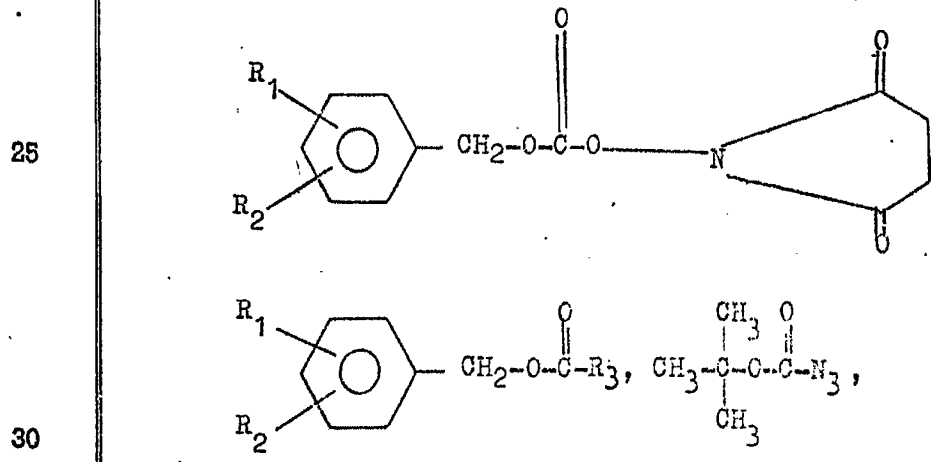
1 muy soluble en agua y metanol, ligeramente soluble en etanol y acetona e insoluble en cloroformo, benceno, acetato de etilo y n-hexano.

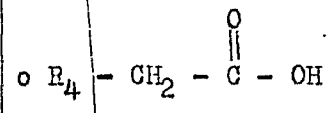
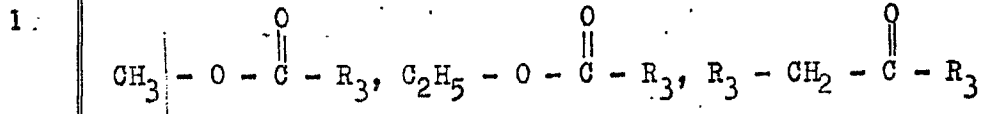
5 COMPENDIO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a la producción de un nuevo derivado de un antibiótico por modificación química del nuevo antibiótico XK-62-2 de fórmula:

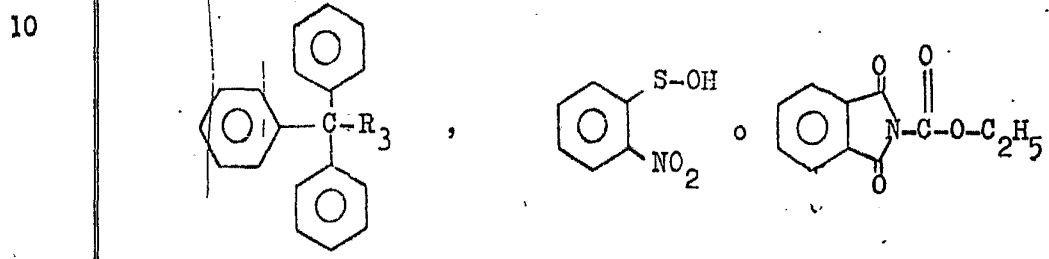


20 La modificación se lleva a cabo acilando el compuesto de la estructura anterior con un agente acilante representado por la fórmula:

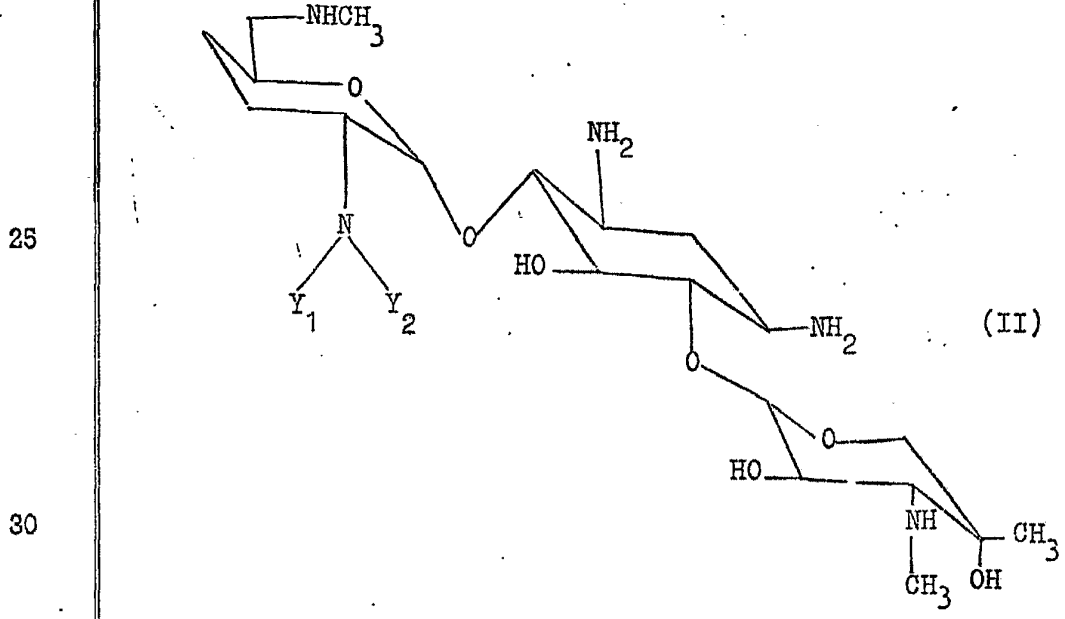




5 (donde R_1 y R_2 pueden ser iguales o diferentes y representan H, OH, NO_2 , Cl, Br, I, grupos alquilo de 1 a 5 átomos de carbono o grupos alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono y R_3 es Cl, Br o I y R_4 es H, Cl, Br ó I un reactivo protector del grupo amino representado por las fórmulas:

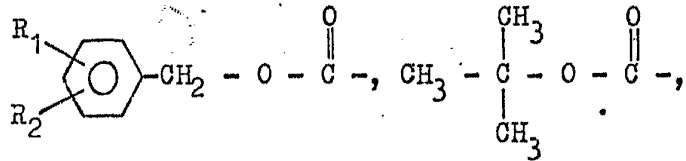


15 donde R_3 tiene el significado dado anteriormente, o un compuesto funcionalmente equivalente a dicho agente acilante o a dicho reactivo protector del grupo amino en lo que se refiere a la introducción de un grupo protector fácilmente eliminable en un grupo amino, para preparar un compuesto representado por la fórmula:

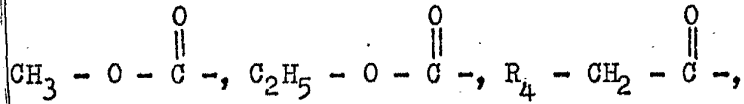




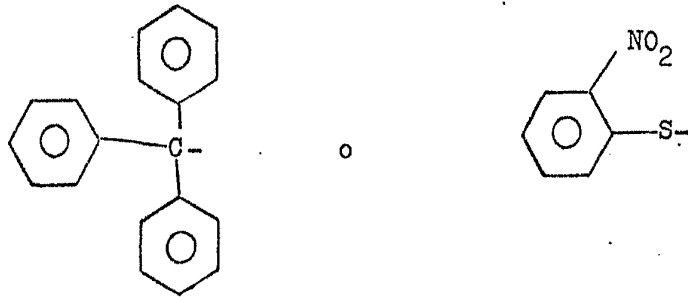
1 donde Y₁ es H e Y₂ es:



5

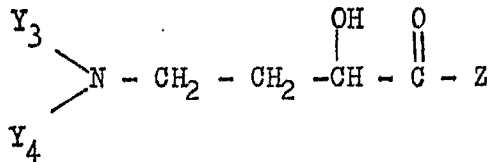


10



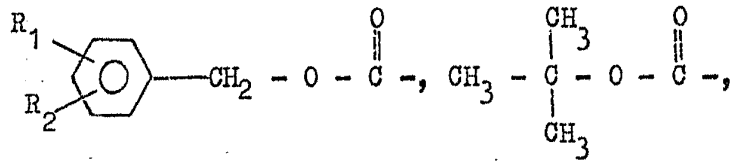
15

donde R₁, R₂ y R₄ tienen el significado dado anteriormente o bien Y₁ e Y₂ forman un grupo italcilo, acilando el compuesto resultante con un agente acilante representado por la fórmula:

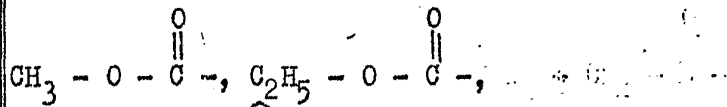


20

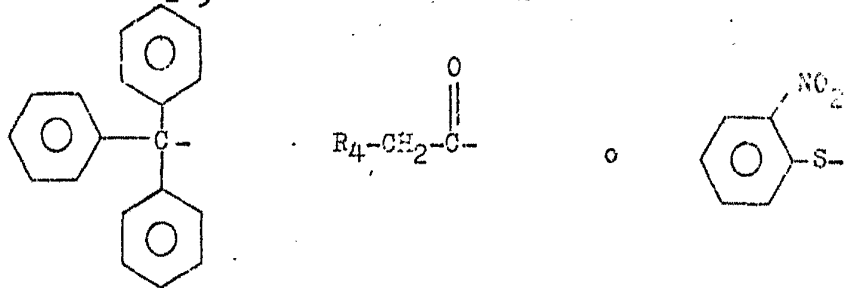
donde Y₃ es H e Y₄ es:



25

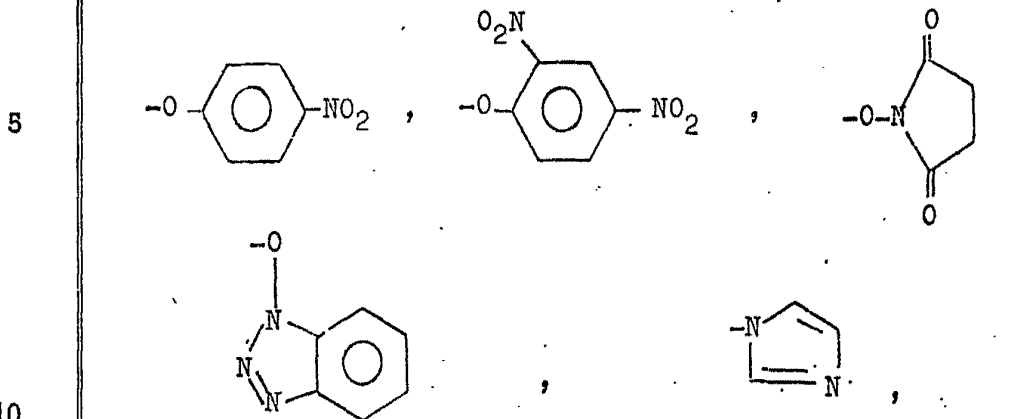


30

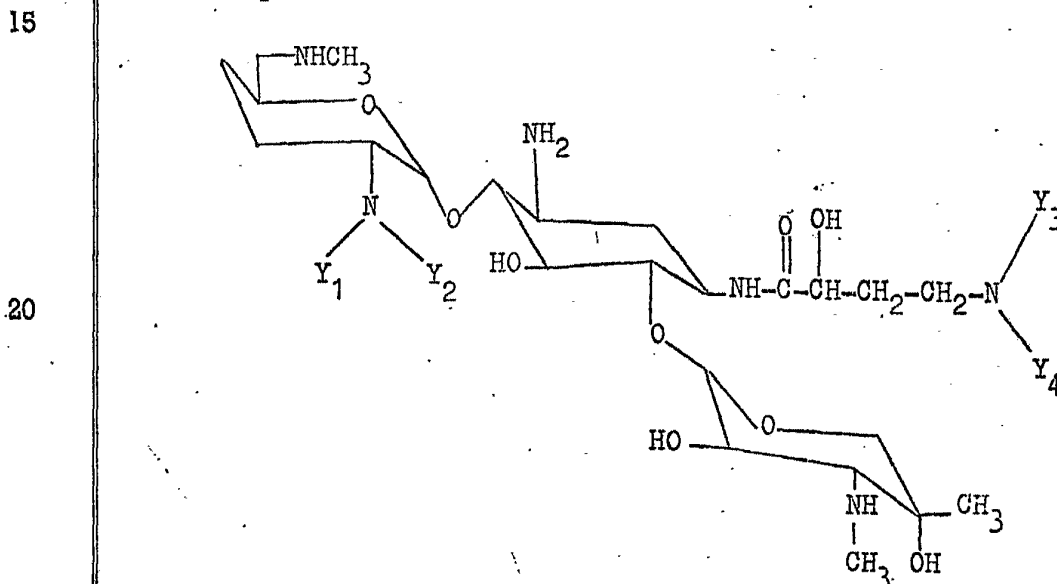




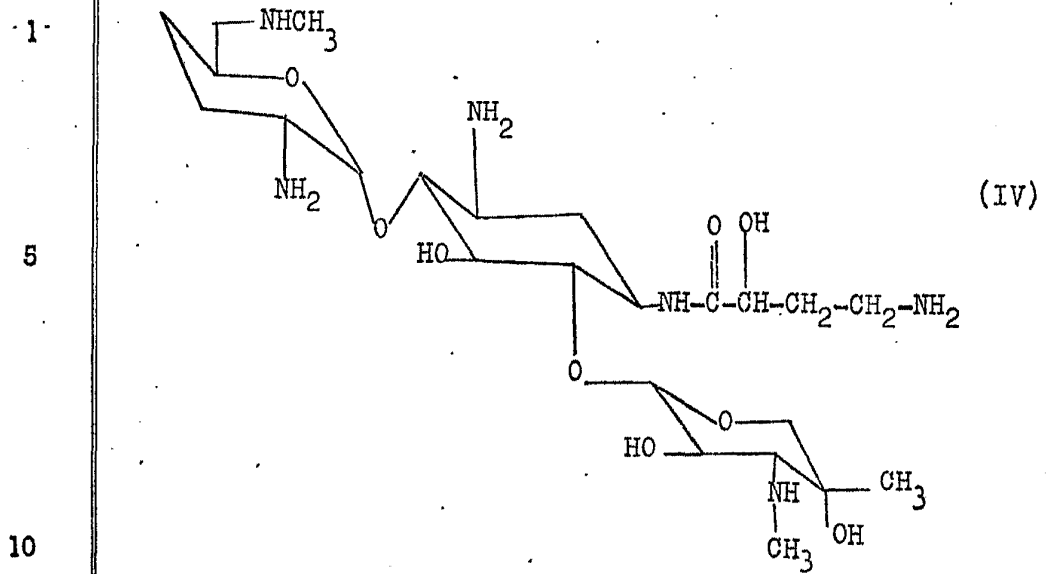
1 donde R_1 , R_2 o R_4 tienen el significado dado anteriormente,
o bien Y_3 e Y_4 forman un grupo ftaloilo y Z es:



15 Cl, Br, I u OH, o un compuesto funcionalmente equivalente
a dicho agente acilante, para preparar un compuesto repre-
sentado por la fórmula:



30 donde Y_1 , Y_2 , Y_3 e Y_4 tienen el significado dado anterior-
mente, y eliminar los grupos protectores Y_1 , Y_2 , Y_3 e Y_4 se-
gún un método conocido, para preparar un compuesto de fór-
mula:



y, si se desea, convertir después el compuesto de la fórmula anterior en sales de adición de ácidos, no tóxicas y farmacéuticamente aceptables, por métodos conocidos.

15 El derivado de XK-62-2 de esta invención presenta una intensa actividad antibacteriana contra diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y en especial presenta una actividad antibacteriana notablemente intensa contra las bacterias que son resistentes a los antibióticos aminoglicosidos conocidos. Por consiguiente, el antibiótico de la invención es útil para limpiar y esterilizar el material de vidrio de laboratorio y los instrumentos quirúrgicos y también puede ser utilizado en combinación con diversos jabones con fines sanitarios y en la limpieza y esterilización de habitaciones de hospitales y zonas utilizadas para la preparación de alimentos. Además, se espera que el derivado sea eficaz para el tratamiento de diversas infecciones tales como infecciones urinarias e infecciones respiratorias inducidas por diversas bacterias flogógenas.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

30 La Figura 1 ilustra el espectro de absorción infrarro-



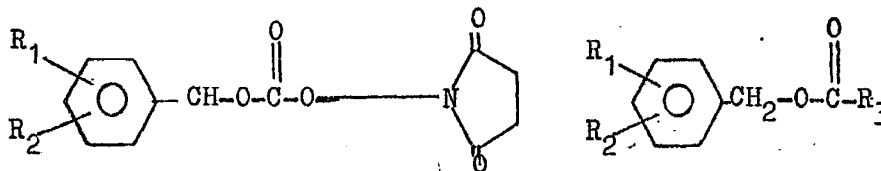
1 jo del compuesto de la invención y

La Figura 2 ilustra el espectro RMN del compuesto de la invención.

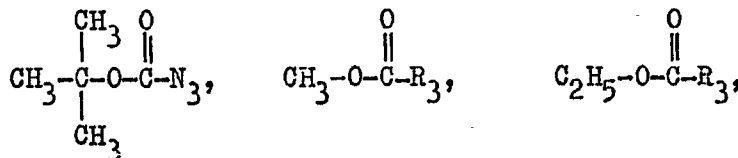
DESCRIPCION DEL INVENTO

5 De acuerdo con esta invención, se prepara 1-N-[L-(-)- α -hidroxi- γ -aminobutiril]XK-62-2 por acilación selectiva, entre los tres grupos amino libres del XK-62-2, del grupo amino libre unido al átomo de carbono de la posición 1 con un grupo α -hidroxi- γ -aminobutirilo.

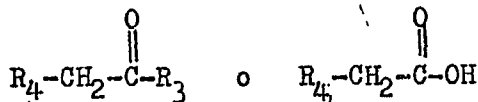
10 En primer lugar, el grupo amino libre unido al átomo de carbono en la posición 2', que es el más reactivo entre los tres grupos amino libres del XK-62-2, se protege utilizando la diferencia de reactividades de estos tres grupos amino libres. Para este fin, el XK-62-2 se hace reaccionar con un agente acilante representado por la fórmula:



20



25



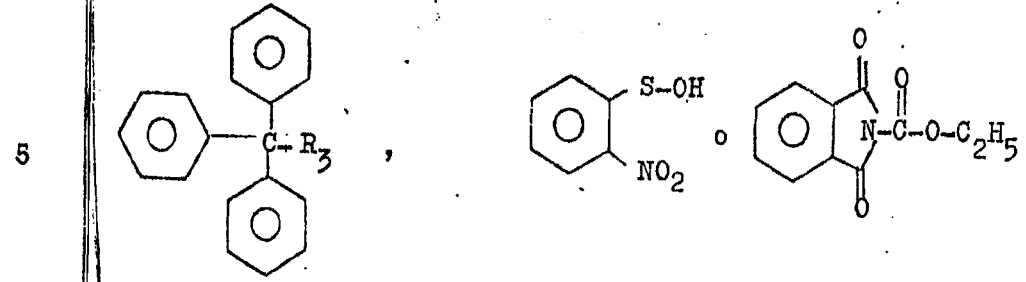
(donde R_1 y R_2 pueden ser iguales o diferentes y representan H, OH, NO_2 , Cl, Br, I, grupos alquilo de 1 a 5 átomos de carbono y R_3 es Cl, Br o I, y R_4 es H, Cl, Br ó I) un reactivo protector del grupo amino representado por la fórmula:

30

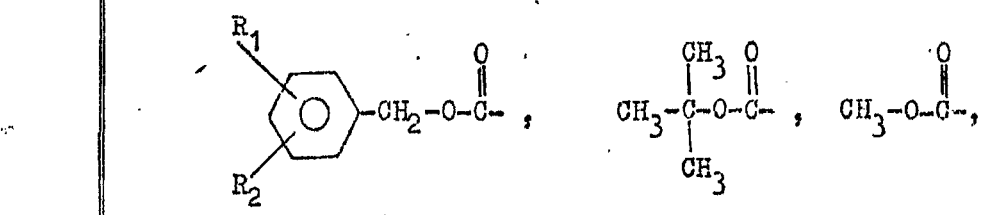
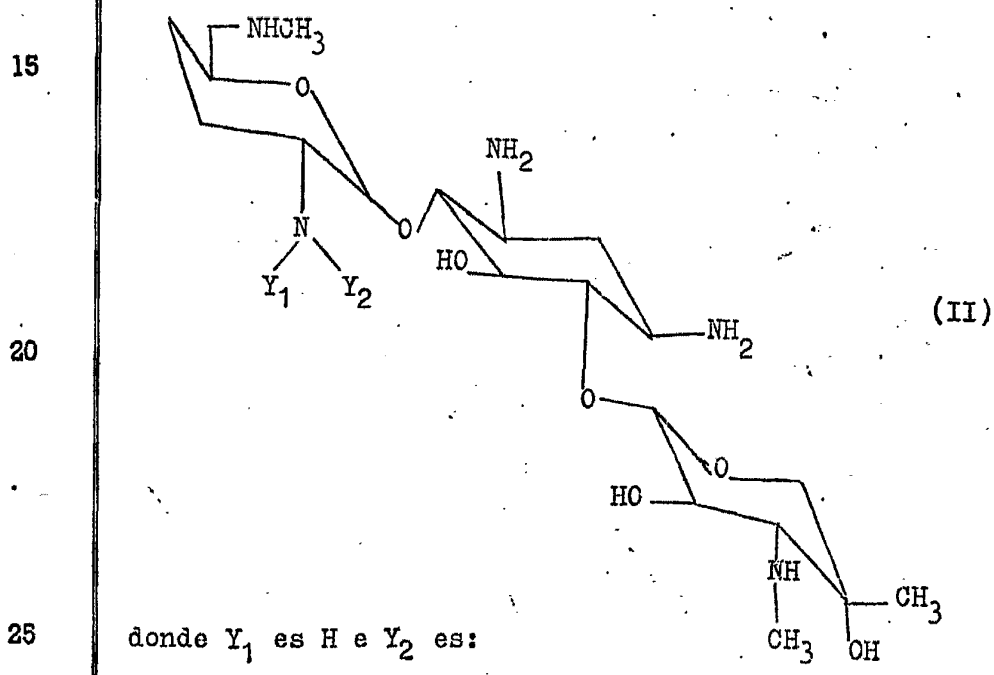


1975

1- tado por la fórmula:



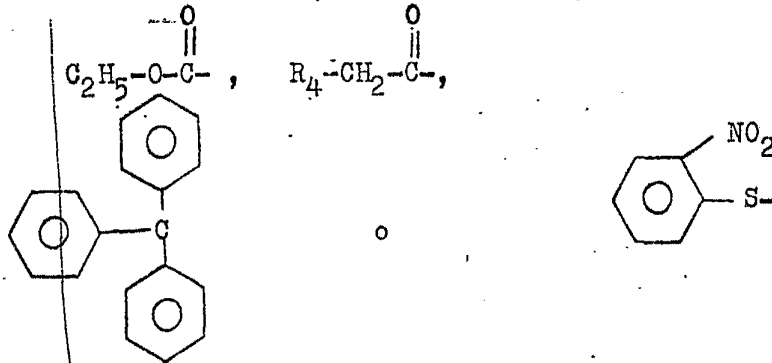
10 donde R₃ tiene el significado dado anteriormente, o un compuesto funcionalmente equivalente a dicho agente acilante o a dicho reactivo protector del grupo amino en lo relativo a la introducción de un grupo protector fácilmente eliminable en un grupo amino, para preparar un compuesto representado por la fórmula:





1

5



donde R_1 , R_2 y R_4 tienen el significado dado anteriormente, o bien Y_1 e Y_2 forman un grupo ftaloilo.

10

15

20

25

30

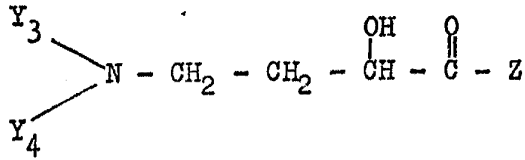
En este caso, la protección del grupo amino puede efectuarse en la forma habitual. Sin embargo, con objeto de proteger selectivamente el grupo amino ligado al átomo de carbono en la posición 2', es conveniente utilizar de 0,5 a 1,5 moles, preferiblemente de 0,7 a 1,2 moles, de sustancia protectora por cada mol de XK-62-2. La temperatura de reacción está comprendida entre -50 y $50^{\circ}C$, preferiblemente entre -20 y $20^{\circ}C$, durante 15 minutos a 24 horas, preferiblemente durante 5 a 15 horas. Cuando se utiliza una cantidad mayor de sustancia protectora, por ejemplo 3 moles, o cuando la reacción se lleva a cabo a temperatura elevada, por ejemplo $100^{\circ}C$, puede producirse la reacción pero la selectividad de la posición en la cual es introducido el grupo protector se reduce considerablemente. Por consiguiente, disminuye la relación de formación de compuesto II en la mezcla de reacción.

El disolvente para la reacción puede ser por lo menos uno seleccionado entre el grupo formado por tetrahydrofurano, dimetilacetamida, dimetilformamida, alcoholes inferiores, dioxano, éter dimetílico de etilenglicol, piridina y agua.

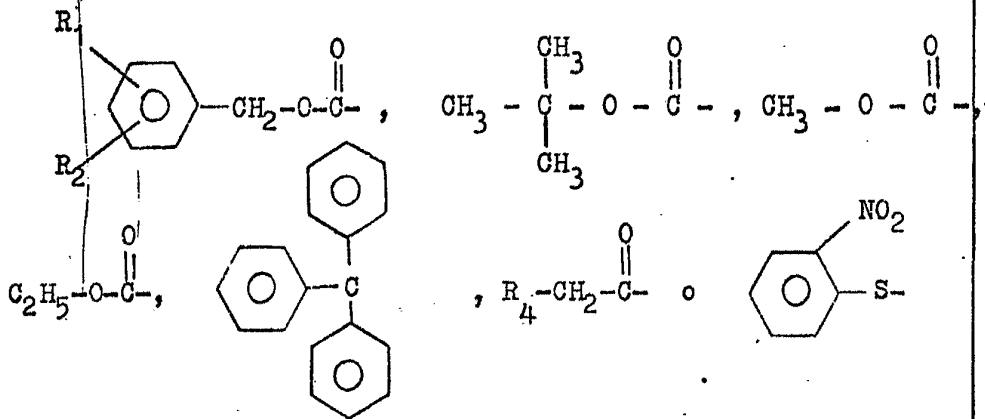


1973

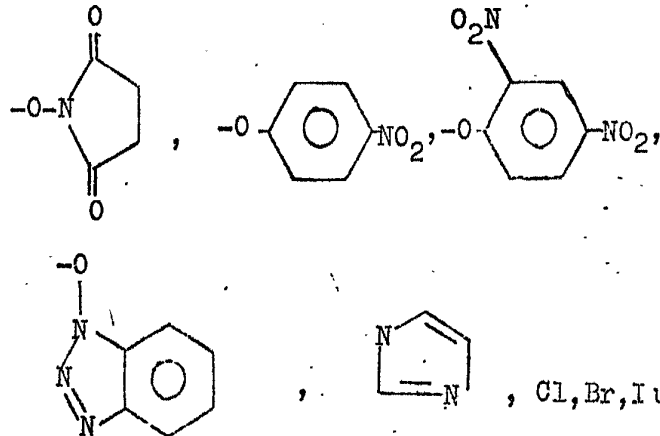
El compuesto II así preparado es después acilado con un agente acilante representado por la fórmula:



donde Y_3 es H e Y_4 es:



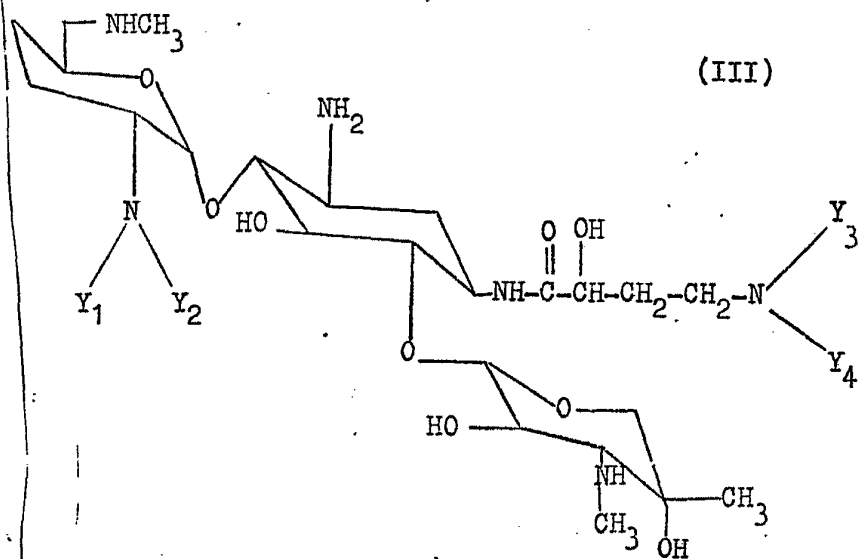
donde R_1 , R_2 y R_4 tienen el significado dado anteriormente, o bien Y_3 e Y_4 forman un grupo ftaloilo y Z es



(el agente acilante deriva del ácido α -hidroxi- γ -aminobutírico) o un compuesto funcionalmente equivalente a dicho agente



1 te acilante, para preparar un compuesto representado por la
fórmula:



15 donde Y_1 , Y_2 , Y_3 e Y_4 tienen el significado dado anterior-
mente.

20 Los agentes acilantes antes mencionados son compues-
tos que derivan del ácido α -hidroxi- γ -aminobutírico. Resulta-
rá evidente a los expertos en la técnica que para preparar
el compuesto III pueden emplearse compuestos que son funcio-
nalmente equivalentes a los agentes acilantes antes menciona-
dos en la introducción de un grupo α hidroxi- γ -aminolutinico
en un grupo amino libre, que contenga varios grupos diferen-
tes de Z.

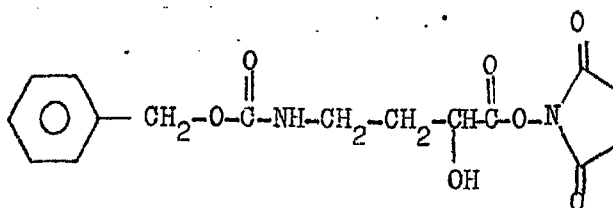
25 Los métodos de acilación, cuando se utilizan los com-
puestos que son funcionalmente equivalentes a los agentes aci-
lantes, están descritos por M. Bodansky y colaboradores:
Synthesis, pág. 435 (1972) y por M. Bodansky y colaboradores:
Peptide Synthesis, págs., 75-135 (1966) (John Wiley & Sons,
Inc., Estados Unidos). La reacción de acilación antes mencio-
nada se lleva a cabo, preferiblemente empleando un agente
30 acilante de fórmula:



SEP. 1975

1

5



10

en uno cualquiera o en una mezcla de dos o más de los disolventes seleccionados entre tetrahidrofurano, dimetilacetamida, dimetilformamida, alcoholes inferiores, dioxano, éter dimetílico de etilenglicol, piridina y agua, preferiblemente en una mezcla de etanol y agua (2:1), entre -50° y 50°C, preferiblemente entre -20° y 20°C, durante 15 minutos a 24 horas, preferiblemente durante 5 a 15 horas.

15

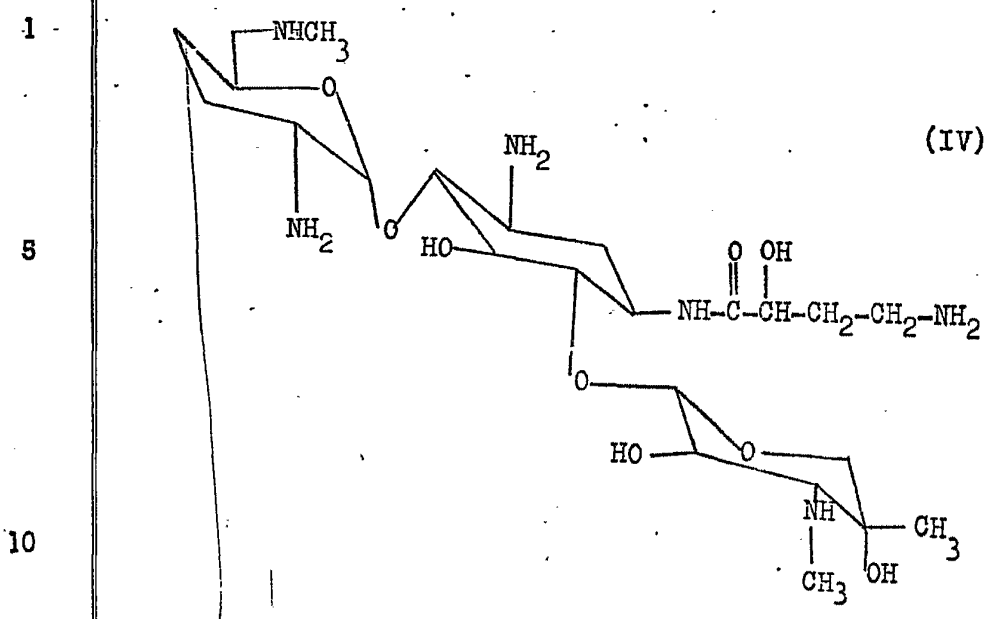
En este caso, es conveniente utilizar de 0,5 a 1,5 moles, preferiblemente de 0,7 a 1,2 moles de agente acilante por cada mol de compuesto II. Cuando se emplea una cantidad mayor, por ejemplo tres moles del agente acilante o cuando la reacción se lleva a cabo a temperatura elevada, por ejemplo 100°C, puede producirse la reacción pero disminuye considerablemente la selectividad de la posición en la que es introducido el grupo protector, o, de otra forma, se descompone el agente acilante. Por consiguiente, disminuye la relación de formación del compuesto III en la mezcla de reacción.

20

25

Los grupos protectores del compuesto III son eliminados después de forma conocida para preparar un compuesto de fórmula:

30



15

20

25

La eliminación se lleva a cabo por métodos convencionales. Por ejemplo, cuando los grupos protectores forman un grupo ftaloilo, la eliminación se realiza con hidrazina; cuando los grupos protectores son grupos carbometoxi o carboetoxi, la eliminación se realiza con hidróxido bórico; cuando los grupos protectores son grupos terc-butoxicarbonilo, la eliminación se realiza con ácido fórmico o ácido trifluoracético; cuando los grupos protectores son grupos tritilo, la eliminación se realiza con ácido acético o ácido trifluoracético; cuando los grupos protectores son grupos ortonitrofenilsulfenilo, la eliminación se realiza con ácido acético o ácido clorhídrico; y cuando los grupos protectores son grupos cloroacetilo, la eliminación se realiza con 3-nitropiridin-2-tion [indicado por K. Undheim y colaboradores: Journal of the Chemical Society, Parkin Transactions, Parte I, pág. 829 (1973)].

30

En una realización preferida, Y_1 e Y_3 son H e Y_2 e Y_4 son grupos benciloxicarbonilo y la eliminación se lleva a cabo por hidrogenólisis en presencia de un catalizador



1914

1 - metálico seleccionado entre el grupo formado por paladio, pla-
tino, rodio y níquel Raney, preferiblemente un catalizador de
paladio sobre un portador de carbón activo; en un disolvente
5 como mínimo seleccionado entre el grupo formado por agua, te-
trahidrofurano, dimetilacetamida, dimetilformamida, alcoho-
les inferiores, dioxano y éter dimetílico de etilenglicol,
preferiblemente en una mezcla 1:1 de agua y metanol, en pre-
sencia de una pequeña cantidad de ácido clorhídrico, ácido
bromhídrico o ácido yodhídrico, preferiblemente ácido acéti-
10 co y a la temperatura ambiente y a la presión atmosférica.

Si se desea, el compuesto IV así preparado puede ser
convertido en sales de adición de ácidos no tóxicas y farmacéu-
ticamente aceptables (monosales, disales, trisales, tetrasa-
les o pentasales). En esta invención, los ácidos no tóxicos
15 comprenden los ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico,
ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido
fosfórico, ácido carbónico, etc. y los ácidos orgánicos como
ácido acético, ácido fumárico, ácido málico, ácido cítrico,
ácido mandélico, ácido tartárico, ácido ascórbico, etc. Los
20 métodos para la producción de las sales de adición de ácidos
son muy conocidos en la técnica.

En esta invención, se sobreentiende que, en el pro-
cedimiento antes descrito, los compuestos que no han sido des-
critos también pueden ser utilizados para preparar el compues-
to intermediario II. Esta técnica resultará evidente a los
25 expertos.

Los compuestos comprenden agentes acilantes distintos
de los descritos anteriormente y los reactivos protectores
del grupo amino habitualmente utilizados para introducir gru-
30 pos protectores fácilmente eliminables en los grupos amino.



1 La introducción de un grupo protector fácilmente eliminable
 es una técnica frecuentemente utilizada en la síntesis de
 péptidos. La protección de grupos amino con estos grupos
 protectores y la eliminación de los mismos están descritos
 5 en: M. Bodansky y colaboradores: Peptide Synthesis, págs.
 21-41 (1966) (John Wiley & Sons, Inc., Estados Unidos); y
 A. Kappor: Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 59,
 págs. 1-27 (1970).

10 El derivado semisintético IV de XK-62-2 de esta in-
 vención tiene una excelente actividad antibacteriana . Es
 especialmente notable que el derivado posea una intensa ac-
 tividad antibacteriana contra las variedades de Escherichia
coli que poseen un factor R que presenta resistencia a los
 antibióticos aminoglicosidos conocidos.

15 La Tabla I ilustra el espectro antibacteriano de la
 kanamicina A, gentamicina C₁₂, XK-62-2 y compuestos IV contra
 diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, medido
 por el método de dilución en agar a pH 8,0.

20 Comparando la concentración mínima de inhibición mos-
 trada en la Tabla I, es evidente que el compuesto IV ejerce
 una intensa actividad antibacteriana. Característicamente,
 el compuesto presenta una intensa actividad antibacteriana
 en particular contra el Escherichia coli KY 8327 y 8348.

TABLA I

Espectro antibacteriano (concentración mínima de inhibición,

mcg/ml)

Variedades	Kanemici na A	Gentami cina C ₁₂	XK-62-2	Compuesto IV
<u>Pseudomonas aerugi-</u> <u>nosa</u> BMH 7	5,2	0,13	0,52	2,08
30 <u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 6538P	0,021	0,004	0,008	0,016



1

TABLA I (continuación)

Variedades	Kanamici na A	Gentami cina C _{1a}	XK-62-2	Compuesto IV
<u>Bacillus subtilis</u> Nº 10707	0,021	0,004	0,044	0,004
5 <u>Proteus vulgaris</u> ATCC 6897	0,16	0,033	0,033	0,065
<u>Shigella sonnei</u> ATCC 9290	0,16	0,033	0,033	0,033
<u>Salmonella typhosa</u> ATCC 9992	0,081	0,016	0,008	0,008
10 <u>Klebsiella pneumoniae</u> ATCC 10031	0,042	0,016	0,004	0,008
<u>Escherichia coli</u> ATCC 26	0,16	0,034	0,016	0,004
<u>Escherichia coli</u> KY 8327	1,04	2,08	1,04	0,016
15 <u>Escherichia coli</u> KY 8348	0,041	1,04	1,04	0,004

10

15

En la tabla anterior, Escherichia coli KY 8327 y KY 8348 producen respectivamente gentamicin-adenil-transferasa y gentamicin-acetil-transferasa tipo I intracelularmente. La primera bacteria inactiva a la kanamicina y a las gentamicinas por adenilación y la última inactiva a las gentamicinas por acetilación.

20

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

25

30





TABLA II

Espectro antibacteriano del 1-N-[L-(-)-α-hidroxi-γ-aminobu-
tiril] XK-62-2

Concentración mínima de inhibición
(mcg/ml)

	Varietades	Kanami- cina A	Complejo de gentamicina (C ₁ , C _{1a} y C ₂)	XK-62-2	Compues- to IV (tipo L)
1	<u>Staphylococcus aureus</u> 209 P	0,2	<0,05	0,1	0,1
5	<u>Staphylococcus aureus</u> Smith	0,2	<0,05	<0,05	0,1
10	<u>Bacillus subtilis</u> ATCC 6633	0,2	<0,05	<0,05	0,1
	<u>Sarcina lutea</u> ATCC 9341	6,25	0,2	0,4	0,4
15	<u>Escherichia coli</u> T-2	1,56	0,4	0,4	0,4
	<u>Escherichia coli</u> T-5	1,56	0,4	0,4	0,4
	<u>Escherichia coli</u> KY 8327 ¹	50	12,5	12,5	0,2
20	<u>Escherichia coli</u> KY 8321 ²	100	6,25	3,12	0,2
	<u>Escherichia coli</u> KY 8348 ³	0,78	3,12	12,5	0,1
	<u>Escherichia coli</u> KY 8349 ⁴	>100	0,2	0,4	0,2
25	<u>Pseudomonas aeru- ginosa</u> BmH n° 1	12,5	0,4	0,78	1,56
	<u>Pseudomonas aeru- ginosa</u> KY 8510 ⁵	100	3,12	1,56	3,12
	<u>Pseudomonas aeru- ginosa</u> KY 8511 ⁶	100	50	100	3,12
	<u>Pseudomonas aeru- ginosa</u> KY 8512 ⁷	12,5	0,4	0,78	0,78
30	<u>Pseudomonas aeru- ginosa</u> KY 8516 ⁸	>100	3,12	3,12	3,12



TABLA II (continuación)

Concentración mínima de inhibición
mcg/ml

Variedades	Kanami- cina A	Complejo de gentamicina (C ₁ , C _{1a} y C ₂)	XK-62-2	Compues to IV (tipo L)
<u>Providencia</u> SP 164 ⁹	>100	50	100	12,5
<u>Klebsiella pneumoniae</u> Nº 8045	0,4	0,2	0,1	0,2
<u>Proteus mirabilis</u> 1287	6,25	1,56	0,78	3,12
<u>Proteus vulgaris</u> 6897	3,12	0,78	0,78	3,12
<u>Proteus rettgeri</u> KY 4288	0,78	0,78	0,4	0,78
<u>Proteus morgani</u> KY 4298	1,56	6,78	0,4	0,78

- 1: produce gentamicin-adenil-transferasa (GAD)
- 2: produce GAD y neomicin-kanamicin-fosfotransferasa tipo 2 (NKP 2)
- 3: produce gentamicin-acetil-transferasa tipo 1 (GC 1)
- 4: NKP 1
- 5: produce kanamicin-acetil-transferasa (KA)
- 6: GC 1 y NKP 1
- 7: NKP 1 y 2 y estreptomycin-fosfotransferasa
- 8: probablemente KA 9: GC 2 6,78 a 0,78
- 9: produce gentamicin-acetil-transferasa tipo II

Los enzimas anteriores son producidos intracelularmente y, con el enzima, las bacterias inactivan a los antibióticos.

De la tabla 2 anterior; se reduce que el 1-N-[L-(-)-d-hidroxi-γ-aminobutiril XK-62-2 de la presente invención posee una fuerte actividad antibacteriana contra varias bacterias teniendo una resistencia a por lo menos uno de los antibióticos de gentamicina y XK-62-2 los cuales producen gentamicin-adenil-transferasa Tipo I y Tipo II intracelularmente, haciendo así inactivos los antibioticos de gentamicina y XK-62-2.

Ademas a través de varias pruebas sobre la protección contra infecciones producidas por las cepas de las bacterias



1 resistentes mencionadas antes, el compuesto de la invención se ha revelado como mantenedor del grupo α -hidroxi- γ -amino-
lenteril in vivo y por escribir una actividad antibacteriana
mucho más elevada que los antibioticos de gentamicina y XK-62-2.

5 De las tablas anteriores se deduce que los derivados de esta invención presentan una actividad antibacteriana notablemente intensa contra diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, incluidas las resistentes a los antibióticos aminoglicosidos. Por lo tanto, se espera que sean efectivas para el tratamiento de diversas infecciones en los seres
10 humanos y en los animales, inducidas por esas bacterias flogógenas. Por ejemplo, se espera que los compuestos sean eficaces para el tratamiento de las infecciones del tracto urinario y de las infecciones respiratorias inducidas por
15 Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa y variedades del género Proteus.

Para administrar los compuestos o sus sales de adición de ácidos, se prefiere la administración parenteral con una dosis efectiva de 1,6-6 mg/kg por día.

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

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

EJEMPLO I

Producción de 2'-N-carbobenzoxi-XK-62-2 (Compuesto II)

30 En este ejemplo, se disuelven 2,778 g (6,0 milimoles)



SEP. 1975

1 de XK-62-2 en 30 ml de dimetilformamida acuosa al 50 %. A la
solución se añade gota a gota otra solución de 2,56 g (1,03
milimoles) de N-(benciloxycarboniloxi)succinimida en 25 ml de
5 dimetilformamida, con agitación, mientras se mantiene la tem-
peratura entre -10º y -5ºC. La adición es completa en 2 horas
La mezcla se deja en reposo a la misma temperatura durante
la noche. Por cromatografía en capa fina de gel de sílice
(desarrollador: isopropanol/amoniaco acuoso concentrado/clo-
roformo = 2:1:1, agente colorante: ninhidrina), se confirma
10 la presencia de XK-62-2 que no ha reaccionado además del pro-
ducto principal II (Rf: 0,86). Después la mezcla de reacción
se diluye con 30 ml de agua y se pasa por una columna (diáme-
tro: 2,5 cm) de resina cambiadora de ión, Amberlite CG-50
(forma amónica, 150 ml) (producida por Rohm & Haas Co.,
15 Estados Unidos). Después se pasan 200 ml de agua por la colum-
na seguidos de 300 ml de amoniaco acuoso 0,05 N, 300 ml de
amoniaco acuoso 0,10 N y finalmente amoniaco acuoso 0,15 N.
El eluato se comprueba por cromatografía en capa fina y las
20 fracciones que contienen el compuesto II como único componen-
te se combinan y evaporan a sequedad bajo presión reducida.
Como resultado de ello, se obtiene el producto principal
(compuesto II) (1,82 g, rendimiento: 47,2 %) en forma de sólido
no cristalino, incoloro y amorfo. La muestra así obtenida
puede ser utilizada directamente como materia prima de parti-
25 da para la reacción subsiguiente. Sin embargo, es posible puri-
ficar todavía más el producto por cromatografía en columna uti-
lizando el tratamiento antes mencionado con resina cambiadora
de ión.

30 El análisis del producto (compuesto II) revela lo
siguiente:



1 Punto de fusión: 107-110°C
Rotación óptica $[\alpha]_D^{25} = +87,7$ (c = 0,10, agua)
Espectro de absorción infrarrojo (KBr) (cm⁻¹): 3700-3100,
2930, 1702, 1530, 1451, 1310, 1255, 1141, 1053, 1021, 960,
5 735, 697, 604.
Espectro de resonancia magnética nuclear (en metanol-d₄) ó
(en ppm de TMS): 1,13 (3H, singlete), 2,42 (3H, singlete),
2,60 (3H, singlete), 2,88 (2H, singlete), 5,33-4,90 (multiple
te superpuesto a la señal de OH), 7,43 (5H, singlete).
10 Análisis elemental para C₂₈H₄₇N₅O₉·2H₂O:
Calculado: C, 53,08; H, 8,06; N, 11,06 %
Encontrado: C, 53,19; H, 7,91; N, 10,02 %.

EJEMPLO 2

15 Producción de 1-N-[L-(-)-α-hidroxi-γ-carbobenzoxiaminobuti-
ril]-2'-N-carbobenzoxi-XK-62-2 (Compuesto III)

En este ejemplo, se disuelven 643 mg (1,0 milimoles)
de dihidrato de 2'-N-carbobenzoxi-XK-62-2 en 20 ml de tetra-
hidrofurano acuoso al 50 %. A la solución se añade gota a go-
ta una solución de éster de N-hidroxisuccinimida del ácido
20 L-(-)-α-hidroxi-γ-carbobenzoxiaminobutírico. [La producción
del compuesto a partir de ácido L-(-)-α-hidroxi-γ-aminobutí-
rico está descrita en el Journal of Antibiotics, Vol. XXV,
págs. 695-708 (1972). La producción de ácido L-(-)-α-hidroxi-
25 γ-aminobutírico está descrita en Tetrahedron Letters, págs.
2625-2628 (1971)] (385 mg, 1,1 milimoles) en 10 ml de tetra-
hidrofurano, con agitación y enfriamiento entre 0°C y -5°C.
La adición es completa en 1 hora. Después la mezcla se deja
reaccionar durante la noche. Por cromatografía en capa fina
30 de gel de sílice (bajo las mismas condiciones que en el Ejem-
plo 1), se detecta la presencia de una pequeña cantidad de



1 un subproducto y compuesto II que no ha reaccionado además
del producto principal III (Rf: 0,91). La mezcla de reacción
se comenta a presión reducida para obtener 1,05 g de un
residuo ligeramente amarillento. El residuo contiene N-hidro-
5 xisuccinimida y ácido L-(-)- α -hidroxi- γ -carbобензоxiamino-
butírico además de los componentes anteriores. Sin embargo,
el residuo se utiliza para la subsiguiente reacción sin pu-
rificación. Si se desea, el compuesto III puede ser aislado
y purificado por cromatografía de intercambio de ión de la
10 misma manera que en el Ejemplo 1.

EJEMPLO 3

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

(Compuesto IV)

15 En este ejemplo, el producto crudo obtenido en el
Ejemplo 2, conteniendo el compuesto III como componente prin-
cipal, se disuelve en 20 ml de metanol acuoso al 20 %. A la
solución se añaden 2 ml de ácido acético y la mezcla se so-
mete a hidrogenolisis en presencia de 150 mg de un cataliza-
dor de paladio al 5 % en carbón activo, a la temperatura am-
20 biente y a la presión atmosférica, durante 6 horas. Por cro-
matografía en capa fina de gel de sílice (en las mismas con-
diciones que en el Ejemplo 1), se confirma la presencia del
compuesto IV (Rf: 0,40) como componente principal, una peque-
ña cantidad de XK-62-2 (debida al compuesto II que no ha reac-
25 cionado en el Ejemplo 2) y los isómeros de posición del com-
puesto IV. Se separa el catalizador por filtración y el fil-
trado se concentra a presión reducida. Después el residuo se
disuelve en 10 ml de agua y la solución se somete a cromato-
30 grafía de cambio de ión empleando Amberlite CG-50 (forma amó-
nica, 80 ml, diámetro de la columna: 1,5 cm) (producto de



1 Rohm & Haas, Co., Estados Unidos), como en el Ejemplo 1.

5 Después la columna se lava con 150 ml de agua y después se hace pasar por la columna amoniaco acuoso 0,2 N para recuperar 63 mg de XK-62-2. La elución se realiza con amoniaco acuoso 0,4 N mientras se controla el eluato por cromatografía en capa fina. Se recogen las fracciones de eluato que contienen el compuesto IV como único componente y se evaporan a sequedad bajo presión reducida para obtener un sólido no cristalino incoloro y amorfo, (459 mg, rendimiento a partir del compuesto II: 64 %).

10

El análisis del producto revela lo siguiente:

Punto de fusión: 120-124°C

Rotación óptica: $[\alpha]_D^{29} = +99,02$ (c = 0,10, agua)

15

Espectro de absorción infrarrojo (KBr, cm^{-1}): 3700-3100, 2940, 1640, 1565, 1480, 1385, 1340, 1282, 1111, 1054, 1022, 973, 816, 700-600 (Fig. 1).

20

Espectro RMN (en óxido de deuterio) ó (en ppm de DS): 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. 2).

Análisis elemental para $\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_9 \cdot \frac{1}{3}\text{H}_2\text{CO}_3$:

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

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

25

EJEMPLO #

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

(Compuesto IV)

30

En este ejemplo, se disuelven en 20 ml de tetrahydrofurano 113 mg (0,97 milimoles) de N-hidroxisuccinimida y 242 mg (0,97 milimoles) de ácido L(-)- α -hidroxi- γ -ftalimidobutírico, [El compuesto es utilizado en The Journal of



1 Antibiotics, Vol. XXV, págs. 741-742 (1972)] .A la solución
se añaden 200 mg (0,97 milimoles) de dicitclohexilcarbodi-imida,
5 da, agitando y enfriando con hielo. Al cabo de 1 hora, se eli-
mina por filtración la dicitclohexilurea separada y el filtra-
do se agrega a una solución de 482 mg (0,75 milimoles) de
dihidrato de 2'-N-carbobenzoxi-XK-62-2 en 10 ml de tetrahidro-
furanu acuoso al 50 %. La adición es completa en 30 minutos.
La mezcla se deja en reposo durante la noche. Después la mez-
cla de reacción se concentra a presión reducida y la dicitclo-
10 hexilurea separada se elimina por filtración. El residuo se
disuelve en 10 ml de etanol acuoso al 50 % conteniendo 10 %
de hidrazina y la solución se deja reaccionar a 60°C durante
3 horas para eliminar el grupo ftaloilo. A la mezcla de reacción
resultante se añaden 5 ml de ácido acético, 10 ml de etanol y
15 200 mg de catalizador de paladio al 5 % en carbón activo y
la mezcla se somete a hidrogenolisis a la temperatura ambien-
te y a la presión atmosférica para eliminar el grupo carbo-
benzoxi. Después el catalizador se separa por filtración.
El filtrado se trata de la forma descrita en el Ejemplo 3
20 y se somete a cromatografía de columna empleando Amberlite-
CG-50 (forma amónica, 200 ml, diámetro de la columna: 2,5
cm). La elución se realiza controlando el eluato por cromatografía
en capa fina de gel de sílice. Se recogen las frac-
ciones eluidas que contienen el compuesto IV deseado como úni-
25 co componente y se evaporan a sequedad bajo presión reducida.
Como resultado, se obtiene 226 mg de un producto incoloro
(rendimiento a partir del compuesto II: 42,1 %).

EJEMPLO 5

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

(Compuesto IV)

30



1 En este ejemplo, se disuelven 2,778 g (6,0 milimoles)
de XK-62-2 en 30 ml de una mezcla de agua, piridina y trie-
tilamina (10:10:1). A la mezcla se añade gota a gota una so-
lución de 1,04 g (7,2 milimoles) de terc-butiloxicarbonil-
5 azida en 10 ml de piridina acuosa al 50 %, agitando y mante-
niendo la temperatura entre -10° y -5°C. La adición es comple-
ta en 2 horas. Después la mezcla se deja reaccionar durante
la noche a la misma temperatura. La mezcla de reacción resul-
tante se concentra a presión reducida para obtener un resi-
10 duo ligeramente amarillento que contiene 2'-N-terc-butiloxi-
carbonil-XK-62-2, como componente principal. El residuo se ;
disuelve en 30 ml de dimetilformamida acuosa al 50 %. A la
solución se añade gota a gota una solución de 2,52 g (7,2 mi-
15 limoles) de éster de N-hidroxisuccinimida de ácido L-(-)-α-
hidroxi-γ-carbobenzociaminobutírico en 15 ml de dimetilforma-
mida, agitando y manteniendo la temperatura entre -10° y -5°C.
La adición es completa en 1 hora. Después la mezcla se deja
reaccionar durante la noche. Por cromatografía en capa fina
de gel de sílice. (bajo las mismas condiciones que en el Ejem-
20 plo 1), se detecta la presencia de 1-N-[L-(-)-α-hidroxi-γ-
carbobenzoxiaminobutiril]-2'-N-terc-butiloxicarbonil-XK-62-2
como componente principal y una pequeña cantidad del isómeros
de posición y XK-62-2 que no ha reaccionado. La mezcla de
reacción se concentra a presión reducida. El residuo se di-
25 suelve en una mezcla de 5 ml de ácido trifluoracético y 7 ml
de metanol. Después la solución se somete a hidrogenólisis en
presencia de 160 ml de catalizador de paladio al 5 % en car-
bón activo, a la temperatura ambiente y a la presión atmos-
férica, durante 3 horas, para eliminar el grupo terc-butil-
30 oxycarbonilo y el grupo benciloxicarbonilo. Por cromatogra-



1 fía en capa fina de gel de sílice (bajo las mismas condicio-
nes que en el Ejemplo 1), se detecta la presencia del compues-
to IV como componente principal, una pequeña cantidad del
isómeros de posición del mismo y el XK-62-2 que no ha reaccio-
3 nado (debido al XK-62-2 que no ha reaccionado en este ejem-
plo y al 2'-N-terc-butiloxicarbonil-XK-62-2 que no ha reac-
cionado). El catalizador se separa por filtración y el fil-
trado se concentra a presión reducida. El residuo se disuel-
ve en 30 ml de agua y la solución se trata de la misma mane-
10 ra que en el Ejemplo 3. Es decir, la solución se somete a cro-
matografía en columna empleando Amberlite CG-50 (forma amó-
nica, 150 ml, diámetro de la columna: 2,5 cm). Después se rea-
liza la elución mientras se controla el aluato por cromato-
15 grafía en capa fina de gel de sílice (bajo las mismas condi-
ciones que en el Ejemplo 1). El eluato se recoge en fraccio-
nes y se reúnen y concentran a sequedad bajo presión reduci-
da las fracciones que contienen el compuesto IV como único
componente. Como resultado, se obtienen 1,95 g del producto
IV incoloro.
20 (Rendimiento a partir del compuesto II: 45,3 %).

El producto así obtenido coincide con el producto
obtenido en el ejemplo 3 en el punto de fusión, la rotación
óptica, el espectro de absorción infrarrojo, el espectro
25 NMR y el análisis elemental.

EJEMPLO 6

Producción de monosulfato de 1-N-[L-(-)- α -hidroxi- \sqrt -amino-
30 butiril]-XK-62-2 (Compuesto IV)

En este ejemplo, se disuelven 7,06 g (10 milimoles)
de compuesto IV en 20 ml de agua. A la solución se añade una
solución de 0,99 g (10 milimoles) de ácido sulfúrico en 5,0

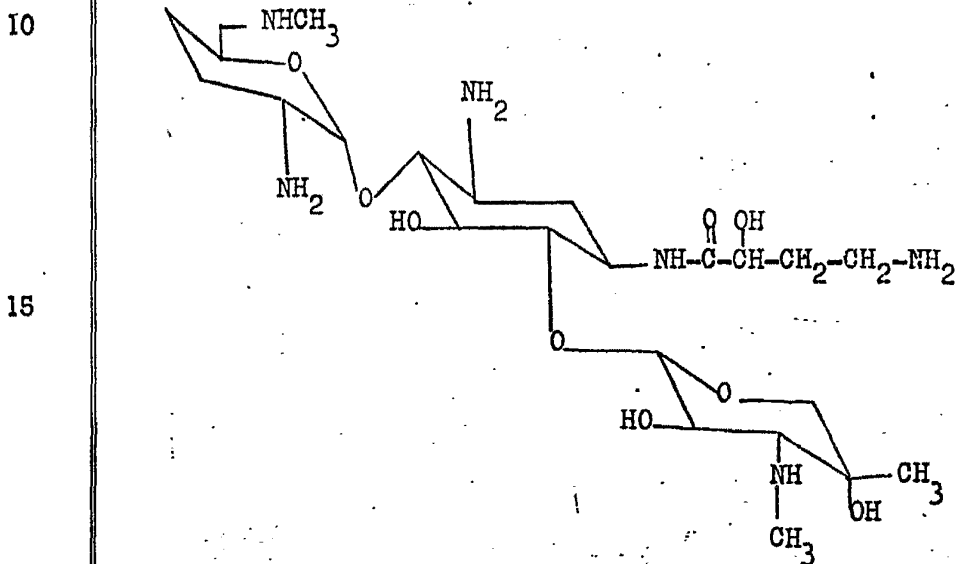


1 ml de agua, con enfriamiento. Al cabo de 30 minutos, se añá-
de etanol frío a la solución hasta que la precipitación es
completa. El precipitado blanco se separa por filtración
para obtener el monosulfato del compuesto IV.

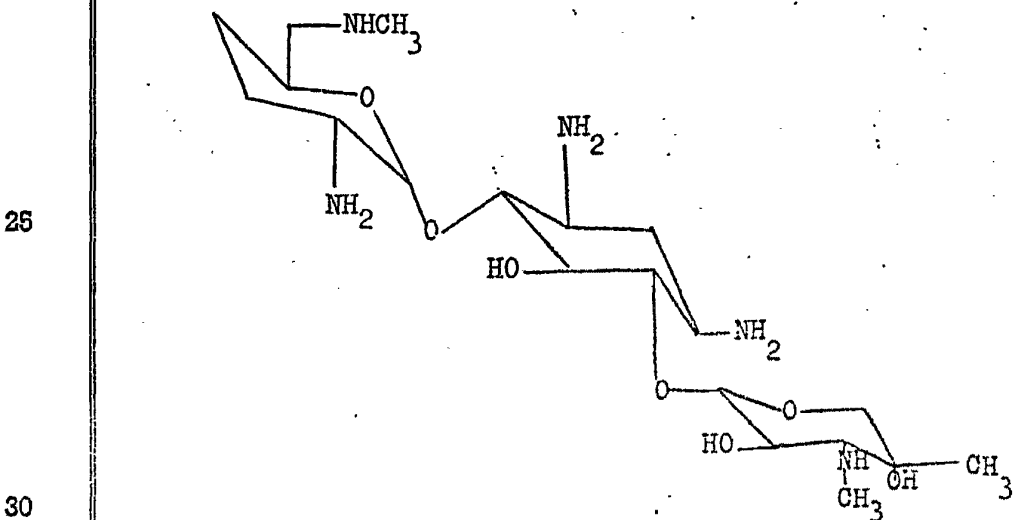
5 En resumen, la Patente de Invención que se solicita
deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de un nuevo
antibiótico de fórmula:

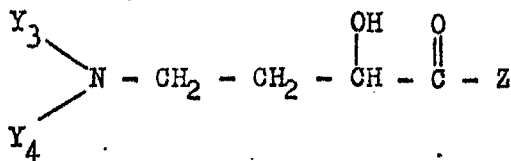


20 que consiste en hacer reaccionar un compuesto de fórmula:

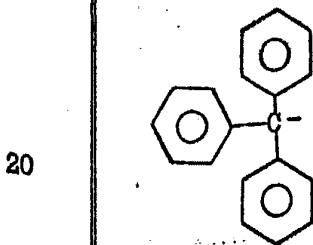
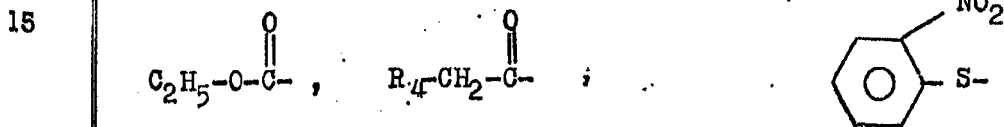
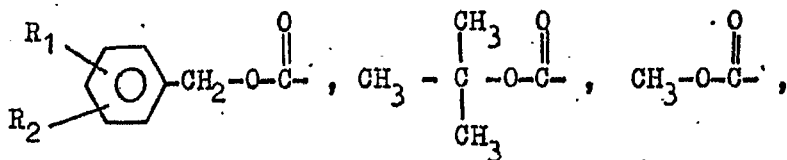




1 con un agente acilante o con un reactivo protector del grupo
 amino para introducir un grupo protector eliminable en el
 grupo amino libre ligado al átomo de carbono en la posición
 2'; acilar el grupo amino libre ligado al átomo de carbono
 5 en la posición 1 con un agente acilante representado por la
 fórmula:



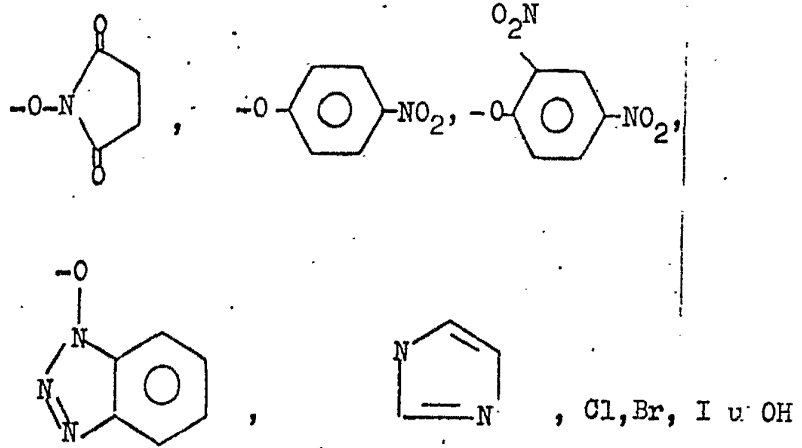
10 donde Y_3 es H e Y_4 es:



25 donde R_1 y R_2 pueden ser iguales o diferentes y H, OH, NO_2 ,
 Cl, Br, I, grupos alquilo de 1 a 5 átomos de carbono o gru-
 pos alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono y R_4 es Cl, Br, o I y
 Z es

30

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

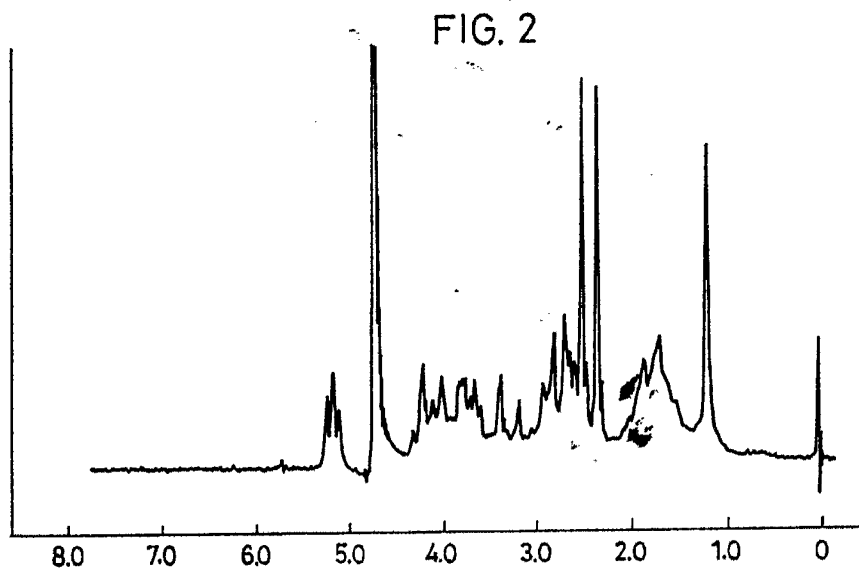
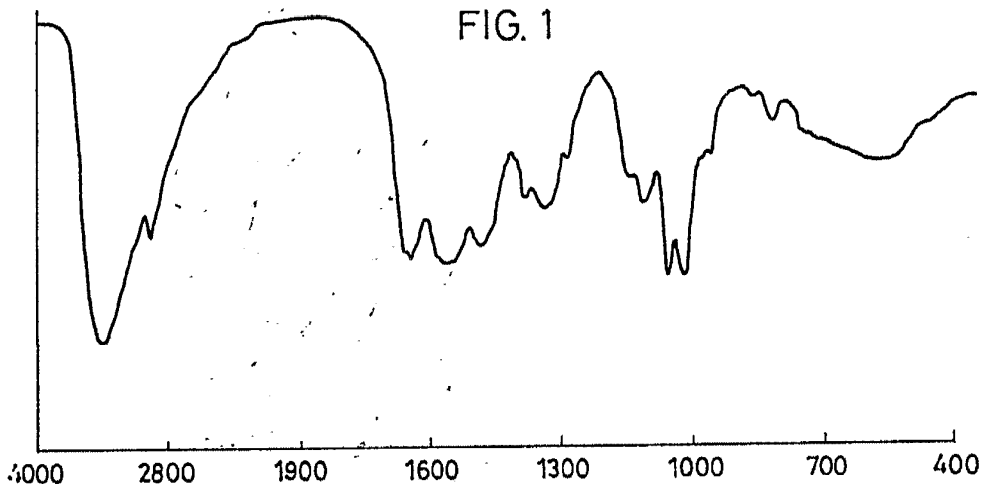


y después separar dichos grupos protectores.

2. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la patenté de invención que se solicita por PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UN NUEVO ANTIBIOTICO.

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de treinta páginas mecanografiadas. y dibujos adjuntos.

Madrid, 12 Diciembre 1.974
BERNARDO UNGRIA
P.P.



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