MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

ESPAÑA

(19) ES (11) NUMERO (21) 433.990 (10) A1

(22) FECHA DE PRESENTACION 21-1-1975

P.- 59.350
2070X

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES:

(31) NUMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
452.586	19-3-74	E.U.A.
452.571	19-3-74	"
10601/74	31-7-74	Suiza

(47) FECHA DE PUBLICIDAD

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL C07D, A61L

(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA

CADUCADA
19 OCT 1976

(54) TITULO DE LA INVENCION

"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE DERIVADOS DE DIAMINOCICLITOLES"

(71) SOLICITANTE (S)

SCHERICO LTD.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

Töpferstrasse 5, Lucerna, Suiza

(72) INVENTOR (ES)

John Jessen Wright y Peter John Lovell Daniels

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE

DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ

UNE A-4 MOD. 3106

UTILICESE COMO PRIMERA PAGINA DE LA MEMORIA

ZGG.

P - 59.350

Este invento se refiere a un procedimiento para preparar derivados de diaminociclitoles que son agentes antibacterianos.

En particular, este invento se refiere a un procedimiento para preparar derivados sustituidos en 1-N de 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitoles activos como agentes antibacterianos en los que el sustituyente en 1-N es un grupo aminohidroxiacilo, y sales de adición de ácido no tóxicas de dichos agentes.

En la patente de Estados Unidos Nº 3.780.018 se describe un procedimiento por medio del cual se preparan 1-[L-(-)-gamma-amino-alfa-hidroxibutiril]gentamicina C_1 y 2'-[L-(-)-gamma-amino-alfa-hidroxibutiril]gentamicina C_1 haciendo reaccionar gentamicina C_1 con el éster activo bloqueado del ácido L-(-)-gamma-amino-hidroxibutírico seguido por desbloqueo por métodos conocidos en la técnica y separación de la mezcla de reacción por medios cromatográficos. En la patente de Estados Unidos Nº 3.796.698 se describe un procedimiento para la preparación de 1-[L-(-)-gamma-amino-alfa-hidroxibutiril]gentamicina C_2 y en la patente de Estados Unidos Nº 3.796.699 se describe un procedimiento para

la preparación de 1-[L-(-)-gamma-amino-alfa-hidroxibutiril]gentamicina C_{1a}.

Los nuevos agentes antibacterianos preparados de acuerdo con el procedimiento de este invento tienen propiedades sorprendentemente inesperadas. Generalmente, estos nuevos compuestos son activos contra cepas bacterianas y/o protozoarias. Además, son activos contra muchas bacterias que han llegado a ser sustancialmente insensibles a antibióticos no derivados de otros.

Específicamente, este invento se refiere a la preparación de derivados sustituidos en 1-N de los 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitoles: gentamicina A, gentamicina B, gentamicina B_1, gentamicina C_1, gentamicina C_{1a}, gentamicina C_2, gentamicina C_{2a}, gentamicina X_2, sisomicina, verdacina, Antibiótico G-418, Antibiótico 66-40B, Antibiótico 66-40D, Antibiótico JI-20A, Antibiótico JI-20B, y Antibiótico G-52, en los que el sustituyente en 1-N es un miembro seleccionado del grupo que consiste en S-3-amino-2-hidroxipropionilo y S-4-amino-2-hidroxibutirilo con la condición de que en el caso de la gentamicina C_1, la gentamicina C_{1a} y la gentamicina C_2 el sustituyente en 1-N es S-3-amino-2-hidroxipropionilo, y de las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Un grupo preferido de compuestos de aminoglicosido de la clase anteriormente definida consiste en derivados sustituidos en 1-N de los 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitoles:gentamicina A, gentamicina B, gentamicina B_1, gentamicina X_2, sisomicina, verdamicina, Antibiótico G-418, Antibiótico 66-40B, Antibiótico 66-40D, Antibiótico JI-20A, Antibiótico JI-20B, y Antibiótico G-52, en donde el sustituyente en 1-N es un miembro seleccionado del grupo que consiste en S-3-amino-2-hidroxipropionilo y S-4-amino-2-hidroxibutirilo, y las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Otro grupo preferido de compuestos consiste en derivados sustituidos en 1-N de los 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminoglicitoles:gentamicina B, gentamicina B_1, gentamicina C_1, gentamicina C_{1a}, sisomicina, verdamicina y Antibiótico JI-20B, en los que el sustituyente en 1-N es un miembro seleccionado del grupo que consiste en S-3-amino-2-hidroxipropionilo y S-4-amino-2-hidroxibutirilo con la condición de que en el caso de la gentamicina C_1 y la gentamicina C_{1a}, el sustituyente en 1-N es S-3-amino-2-hidroxipropionilo, y las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Un grupo especialmente preferido de com-

19-12-74.

puestos consiste en derivados sustituidos en 1-N de los 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitoles:gentamicina B, gentamicina B_1, sisomicina y verdamicina, en los que el sustituyente en 1-N es un miembro del grupo que consiste en S-3-amino-2-hidroxipropionilo y S-4-amino-2-hidroxibutirilo, y las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los mismos.

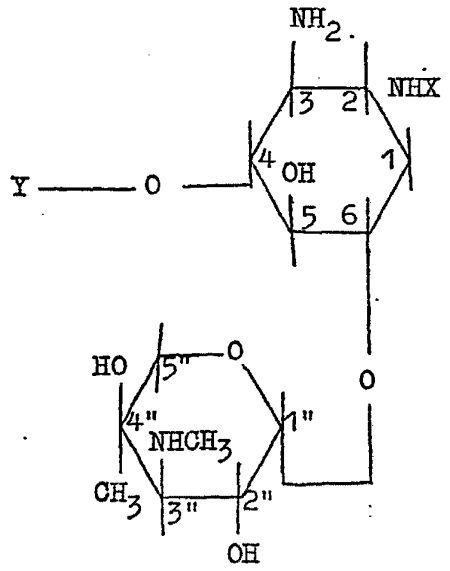
Dentro de este grupo de compuestos se prefieren los compuestos siguientes denominados: 1-N-(S-3--amino-2-hidroxibutiril)gentamicina B, 1-N-(S-3-amino--2-hidroxipropionil)gentamicina B, 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)gentamicina B_1, 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)sisomicina, 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)verdamicina y las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Los compuestos 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)gentamicina B, 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)gentamicina B, 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)sisomicina, 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)verdamicina y las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los mismos representan un grupo especialmente preferido de compuestos y los compuestos 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)gentamicina B, 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)gentamicina B y las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los mismos son los más prefe

19-12-74.

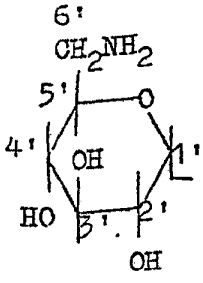
ridos.

Los compuestos de este invento se definen por las siguientes fórmulas estructurales I, II y III, en las que X es el sustituyente en 1-N tal como se ha definido en lo que antecede.

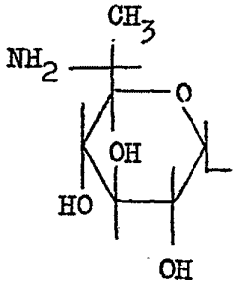


I

en donde Y es una función aminoglicosilo seleccionada del grupo que consiste en:

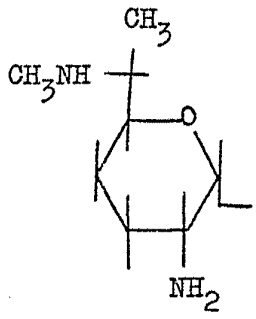


(en 1-N-X-gentamicina B)

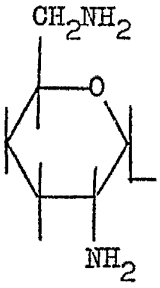


(en 1-N-X-gentamicina B_1)

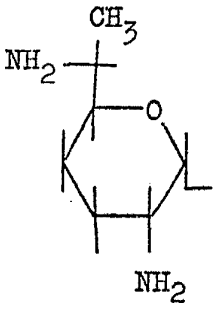
19-12-74.



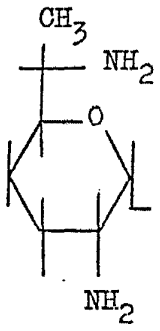
(en 1-N-X-gentamicina C_1)



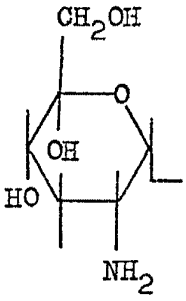
(en 1-N-X-gentamicina C_{1a})



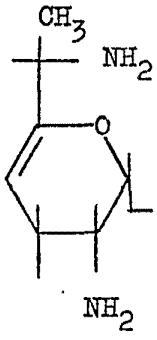
(en 1-N-X-gentamicina C_2)



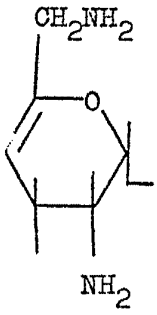
(en 1-N-X-gentamicina C_{2a})



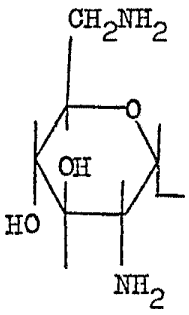
(en 1-N-X-gentamicina X_2)



(en 1-N-X-verdamicina)

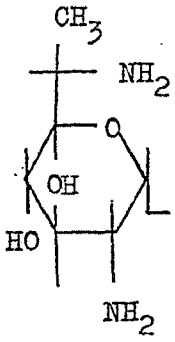


(en 1-N-X-sisomicina)

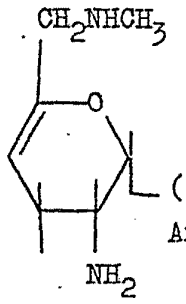


(en 1-N-X-Antibiótico JI-20A)

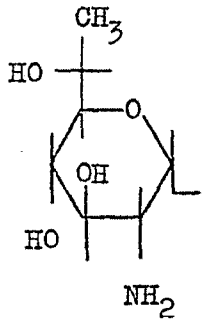
19-12-74.



(1-N-X-Antibiótico JI-20B)

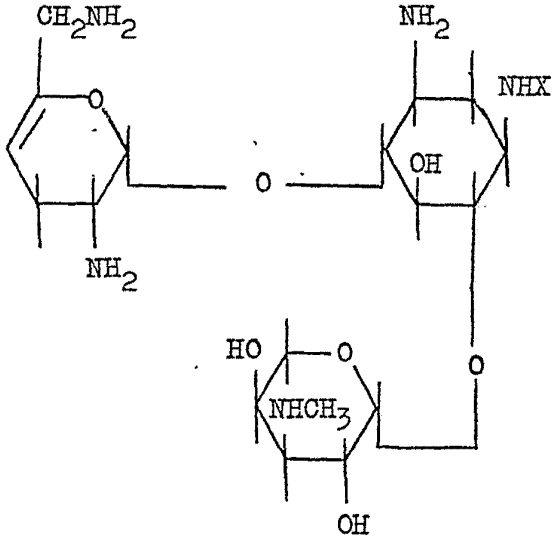


(1-N-X-Antibiótico G-52) y,



(1-N-X-Antibiótico G-418)

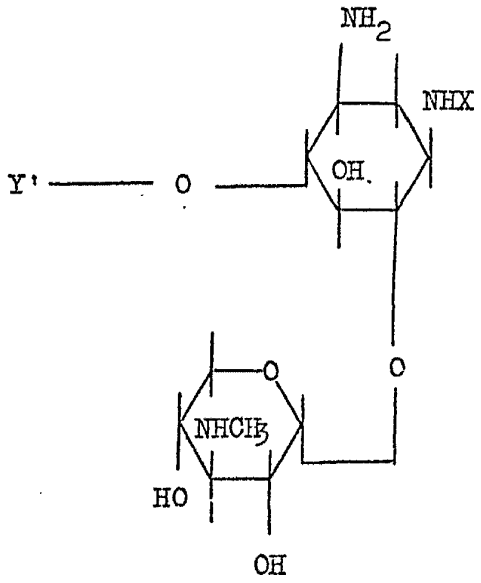
1-N-X-Antibiótico 66-40D de la fórmula II siguiente



II

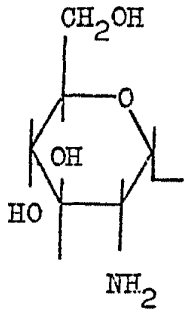
19-12-74.

y 1-N-X-gentamicina A y 1-N-X-Antibiótico 66-40B de la fórmula III siguiente:



III

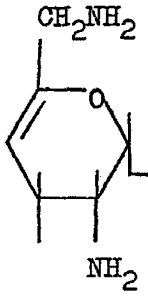
en donde Y' es



en 1-N-X-gentamicina A

19-12-74.

e Y' es



en 1-N-X-Antibiótico 66-40B.

Los antibióticos (originales) no derivados (definidos por las fórmulas estructurales anteriores I, II y III, en las que X es hidrógeno) son bien conocidos en la técnica excepto la gentamicina C_{2a}. La gentamicina C_{2a} puede prepararse del siguiente modo:

Se disuelven 96 g de gentamicina base (preparada a partir de la sal sulfato obtenida por el método del Ejemplo 4 de la patente de Estados Unidos 3.091.572) en 400 ml de la fase superior que resulta cuando se mezclan en la relación en volumen de 1:2:1 metanol, cloroformo, e hidróxido amónico al 17%. Se añade un décimo de la solución a cada uno de los primeros diez tubos en un extractor en contracorriente de 500 tubos de 80 ml. Se llenan todos los tubos, incluyendo los diez primeros, hasta su capacidad total con la fase inferior de la mezcla de disolventes anteriormente descrita. Se ajusta el depósito de disolvente para que

19-12-74.

suministre 40 ml de fase superior al tubo uno (1) para cada transferencia. Se ajusta el aparato para 500 transferencias. Cuando se han completado las transferencias, se toman muestras de cada octavo tubo para cromatografía (en duplicado) sobre papel de Schleicher y Schuell Nº 589 utilizando la fase inferior de la mezcla de disolventes anteriormente descrita. Se permite que los cromatogramas se desarrollen durante aproximadamente 16 horas y luego se secan los papeles. Se coloca un papel sobre una placa de agar sembrada con Staphylococcus aureus (A.T.C.C. 6538P), se rocía al duplicado con solución de ninhidrina convencional y se calienta para que se revele. Se incuba la placa de agar a 37ºC durante una noche y se combina la solución de los tubos que contienen el material que emigra analógamente a la gentamicina C_1 (es decir, los tubos 290-360).

Se reemplazan los tubos 290-360 con tubos nuevos que contienen 40 ml de fase superior y 40 ml de fase inferior. Se reajusta el aparato para 2800 transferencias adicionales y se repite el método cromatográfico anteriormente realizado. Se combinan los tubos 1-16 y se concentran a vacío para obtener 1,3 g de gentamicina C_{2a}, que tiene las siguientes propiedades:

(a) Un peso molecular de 463 según se determina por espectrometría de masas, el cual es consis-

tente con una fórmula empírica de $C_{20}H_{41}N_5O_7$;

(b) una rotación óptica específica medida por la línea D del sodio a 26ºC de + 114º ± 5º en agua y 0,3% de concentración; y

(c) un espectro de resonancia magnética protónica (RMP) como sigue: RMP (ppm) (D_2O): δ 0,99 (3H, d, J=6,5Hz, CH-CH_3); 1,17 (3H, s, C-CH_3); 2,47 (3H, s, N-CH_3); 2,51 (1H, d, J=10,5Hz, H-3"); 3,75 (1H, q, J=10,5, 4Hz, H-2"); 4,00 (1H, d, J=12Hz, H-5"eq); 5,04 (1H, d, J=4Hz, H-1"); 5,13 (1H, d, J=3,5Hz, H-1').

La irradiación del grupo metilo secundario a δ 0,99 ppm revela H-6' como un doblete (J=6,5 Hz) a δ 2,81 ppm.

Los Antibióticos 66-40B y 66-40D se producen conjuntamente con la sisomicina, el principal producto de fermentación de Micromonospora inyoensis (descrito en la patente británica 1.274.518). Los Antibióticos 66-40B y 66-40D pueden separarse del medio de fermentación por aplicación de técnicas de separación cromatográfica especiales tal como se describe en la patente belga 811.370.

El compuesto al que se hace alusión en la presente memoria descriptiva con el nombre de gentamicina X_2 también es conocido en la técnica como genta-

19-12-74.

micina X.

Los productos intermedios útiles en el procedimiento de este invento son 4,6-di-(aminoglicosil)--1,3-diaminociclitoles seleccionados del grupo que consiste en gentamicina B, Antibiótico JI-20A, Antibiótico 66-40B, Antibiótico 66-40D, y sisomicina, en los que el grupo amino en posición 6' está protegido, y las sales de adición de ácido de los mismos. Los grupos protectores del grupo amino típicos son trifluoroacetilo y t-butoxicarbonilo. Ilustrativos de tales productos intermedios son 6'-N-trifluoroacetil-gentamicina B, 6'--N-trifluoroacetil-Antibiótico JI-20A, 6'-N-trifluoroacetil-Antibiótico 66-40B, y 6'-N-trifluoroacetil-Antibiótico 66-40D, y 6'-N-t-butoxicarbonil-sisomicina.

Otros productos intermedios valiosos son 6'--N-trifluoroacetil-gentamicina C_{1a}, y, además gentamicina C_1 que tiene un grupo protector del grupo amino en la posición 2' o en las posiciones 2' y 3, y las sales de adición de ácido de tales compuestos. Ilustrativos son 2'-N-trifluoroacetil-gentamicina C_1 y 2,3-di--N-trifluoroacetil-gentamicina C_1.

El procedimiento para la preparación de derivados sustituidos en 1-N de los 4,6-di-(aminoglicosil)--1,3-diaminociclitoles: gentamicina A, gentamicina B, gentamicina B_1, gentamicina C_1, gentamicina C_{1a}, genta-

micina C_2, gentamicina C_{2a}, gentamicina X_2, sisomicina, verdamicina, Antibiótico G-418, Antibiótico 66-40B, Antibiótico 66-40D, Antibiótico JI-20A, Antibiótico JI-20B y Antibiótico G-52, en los que el sustituyente en 1-N se designa por X, que representa,

S-3-amino-2-hidroxipropionil o S-4-amino-2-hidroxibutiril con la condición de que, en el caso de la gentamicina C_1, la gentamicina C_{1a}, y la gentamicina C_2, X es S-3-amino-2-hidroxipropionil;

y de las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los mismos; comprende tratar uno de los 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitoles anteriormente mencionados que pueden tener grupos protectores de grupos amino en cualquier posición distinta de la posición 1; con un ácido de la fórmula:

HO - X'

en donde X' es un grupo tal como se ha definido anteriormente para X, y en donde el grupo amino y/o el grupo hidroxi pueden estar protegidos,

en presencia de una carbodiimida, tal como diciclohexil carbodiimida, o con un derivado reactivo del ácido ante

riormente citado, eliminar todos los grupos protectores presentes en la molécula y aislar el derivado como tal o como sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable.

Generalmente, se prefeire emplear aquellos compuestos de partida que tengan un grupo 6'-CH_2-NH_2 en forma de sus derivados protegidos en 6'-N. Ilustrativos de estos grupos protectores preferidos son trifluoroacetilo y t-butoxicarbonilo. La gentamicina C_1 puede utilizarse ventajosamente como derivado protegido en 2',3-di-N. La gentamicina A, la gentamicina B_1, la gentamicina C_2, gentamicina C_{2a}, la gentamicina X_2, la verdamicina, el Antibiótico G-418 y el Antibiótico JI-20B y el Antibiótico G-52 pueden emplearse en su forma protegida pero también pueden emplearse ventajosamente en su forma libre.

En la modificación inventiva del procedimiento de este invento la acilación específica del grupo amino en la posición 1 en lugar de la acilación al azar se consigue utilizando un 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitol que está parcialmente neutralizado por formación de una sal de adición de ácido.

La protonación de un grupo amino proporciona el mismo efecto que la presencia de un grupo de bloqueo "químico usual". Sorprendentemente se ha descubierto que el grupo amino en la posición 1 de un 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitol es el último que

se protona por adición de ácido o, si se trata la sal de adición por ácido con una base, el primero que se desprotona. Por consiguiente los "grupos de bloqueo" (en la forma de protones) pueden introducirse fácilmente en la molécula añadiendo simplemente una cantidad deseada de ácido al aminoglicosido o añadiendo una cantidad deseada de base a la sal de adición por ácido del mismo. El procedimiento se aprovecha de estos descubrimientos y proporciona por tanto un método conveniente para la preparación de derivados de 1-N-acilo de los 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitoles utilizando compuestos de partida parcialmente neutralizados y por consiguiente parcialmente bloqueados.

Tal como se emplea en la presente memoria descriptiva, la expresión "parcialmente neutralizado por formación de una sal de adición de ácido" significa que cada mol de 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitol tiene asociado con él menos del número estequiométrico de moles de ácido que se requiere para formar la sal de adición por ácido. Además, esta expresión significa que cada mol de 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitol tiene al menos un mol de ácido asociado con él.

Por ejemplo, un equivalente de gentamicina C_1 que tiene cinco grupos amino requeriría cinco

19-12-74.

equivalentes de ácido para formar la sal de adición por ácido. El procedimiento inventivo se efectúa sobre una sal de adición de ácido de gentamicina C_1 que tiene menos de cinco equivalentes y al menos un equivalente de ácido (por ejemplo 4,5, 4,0, 3,5, 3,0, 2,5, 2,0, 1,5 ó 1,0 equivalentes de ácido).

En el aspecto preferido de este procedimiento el compuesto de partida se neutraliza con (n-1) equivalentes de ácido, siendo n el número de grupos amino de la molécula. Así, se neutralizan (n-1) grupos amino por formación de una sal de adición de ácido. Sin embargo, se comprenderá que el procedimiento también puede efectuarse ventajosamente sobre compuestos de partida parcialmente neutralizados, en los que más o menos de (n-1) equivalentes de ácido darán lugar a la formación de la sal de adición de ácido dentro de los límites anteriormente dados. En términos de intervalos de pH el procedimiento se efectúa en un intervalo de aproximadamente 5,0 a 9,0, preferiblemente de 5,0 a 8,0. El intervalo más preferido del medio de reacción es un pH de 6,5 a 7,5, especialmente 6,8 a 7,2.

La expresión "sal de adición de ácido" abarca sales tales que pueden formarse entre el 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitol básico y un ácido independientemente de que dicho ácido pueda ser conside

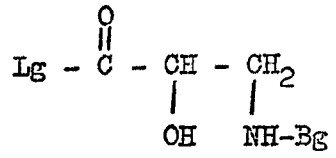
19-12-74.

rado inorgánico u orgánico. Ilustrativos de los ácidos abarcados por el término son sulfúrico, clorhídrico, fosfórico, nítrico, acético, propiónico, succínico, oxálico, ciclopropilcarboxílico, trimetilacético, maleico, benzoico, fenilacético, trifluoracético o similares. Si se desea emplear como material de partida una sal de adición de ácido, en la que estén protonados (n-1) grupos amino, este compuesto se produce ventajosamente in situ para lo cual se hace reaccionar una sal de adición por ácido con un equivalente de una base fuerte, por ejemplo trietilamina.

También es posible emplear compuestos de partida parcialmente neutralizados que tienen grupos de bloqueo químico. Sin embargo, generalmente esto no es necesario.

Los agentes de acilación de hidroxiamino empleados en el procedimiento de este invento se utilizan preferentemente en forma de derivados reactivos, por ejemplo en forma de ésteres activos, anhídridos, azidas o derivados de imidazol. Además, se prefiere que el grupo amino esté bloqueado en el agente de acilación de hidroxiamino. Así, cuando el producto de hidroxiaminoacilo deseado es el derivado de iso-serinilo el agente de acilación preferido tomaría la forma de.

19-12-74.



en la que la función carboxilo está preferiblemente activada en forma de un éster activo (grupo saliente Lg) y el grupo amino está bloqueado preferiblemente (grupo de bloqueo Bg) por un grupo benciloxicarbonilo que se elimina fácilmente por hidrogenólisis o por un grupo t-butoxicarbonilo o un grupo trifluoroacetilo siendo el primero eliminado convenientemente con ácido y el segundo con base.

Si se desean sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables de los compuestos de este invento, pueden prepararse ajustando una solución acuosa de dicho agente a un pH de 4,0 seguido por liofilización. Las sales producidas de este modo son los equivalentes funcionales de la base nitrogenada libre. Ilustrativos de los ácidos que pueden emplearse para la formación de sales son sulfúrico, clorhídrico, fosfórico, nítrico, acético, propiónico, succínico, oxálico o maleico.

Tal como se emplea en la presente memoria descriptiva, las expresiones "grupo de bloqueo" o "grupo protector" se refieren a grupos que hacen a los grupos

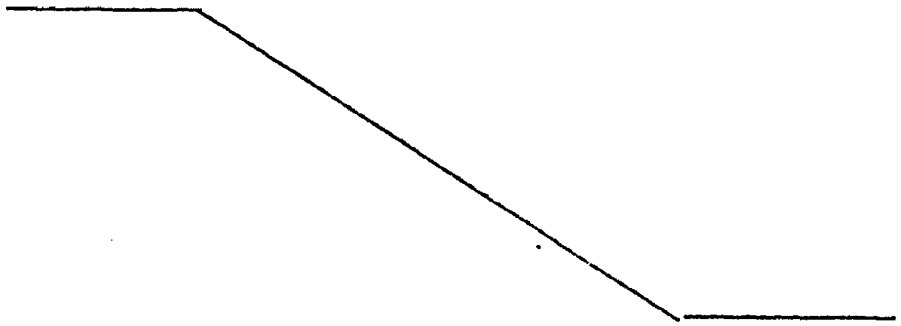
19-12-74.

amino bloqueados o protegidos inertes para las manipulaciones químicas deseadas subsiguientes, pero que pueden eliminarse fácilmente al final de la secuencia de síntesis sin escindir el grupo N-aminohidroxiacilo de-
5 deseado.

Los grupos protectores de los grupos amino generalmente son conocidos en la técnica. Sin embargo, para este invento están entre los preferidos los siguientes grupos: trifluoroacetilo, 2,2,2-tricloro
10 etoxicarbonilo, t-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo y 4-metoxi-benciloxicarbonilo. De los anteriores son particularmente preferidos los grupos trifluoroacetilo, t-butoxicarbonilo y benciloxicarbonilo.

En el procedimiento de bloqueo, el grupo
15 protector se emplea usualmente en forma de un derivado de imidazol ácido, una azida de ácido o como ésteres activos tales como el etiltioltrifluoroacetato, la azida de t-butoxicarbonilo, la N-benciloxicarboniloxisuccinimida, el carbonato de p-nitrofenilticloroetilo.
20 Por consiguiente, pueden describirse los grupos de bloqueo como derivados de un compuesto de BgLg en donde Bg llega a ser el grupo de bloqueo tal como una parte de ácido de un éster activo y Lg es un grupo saliente tal como un imidazol.

25



Los siguientes ejemplos ilustran el invento.

Ejemplo 1

1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)sisomicina

A. Acido S-4-trifluoroacetamido-2-hidroxibutírico

Se disuelven 5 g de ácido S-4-benciloxi-carbonilamino-2-hidroxibutírico en una mezcla de 80 ml de dioxano y 20 ml de agua. Se añaden 200 mg de paladio sobre carbón al 30% y se hidrogena a temperatura ambiente y 3,4 atmósferas durante 3 horas. Se separa el catalizador por filtración y se concentra el filtrado hasta un residuo a vacío. Se seca el residuo a alto vacío durante 72 horas. El residuo seco se disuelve con agitación en 30 ml de anhídrido trifluoroacético frío. Se agita la solución durante 3 horas a temperatura ambiente y luego se concentra a vacío hasta un residuo. Se tritura el residuo con benceno y se obtiene un sólido

gris que se aisla por filtración, se lava con benceno y se seca para dar el producto de esta etapa.

B. N-(S-4-trifluoroacetamido-2-hidroxibutiriloxi)succinimida

Se disuelven 20 milimoles del producto de la etapa A en 50 ml de acetato de etilo, se añaden 2,31 g de N-hidroxisuccinimida con agitación y se enfría la solución resultante en un baño de hielo. Se añaden a la solución 4,3 g de diciclohexilcarbodiimida y se agita la mezcla de reacción durante 3 horas a temperatura ambiente. Se filtra para separar el precipitado y se concentra el filtrado hasta sequedad con lo cual se obtiene el producto del epígrafe que se seca a alto vacío y se emplea en la etapa D.

C. 6'-N-Trifluoroacetilsisomicina

Se disuelven 20 g de sisomicina en 1,2 litros de metanol anhidro y se añade gota a gota una solución de 6 ml de tioltrifluoroacetato de etilo en 60 ml de metanol durante un período de 3 horas con agitación. Se deja que la reacción prosiga durante 18 horas a temperatura ambiente y el disolvente se separa a vacío para dar un residuo de 23,8 g del producto de aproximadamente 95% de pureza que tiene las propiedades físicoquímicas siguientes: datos de la masa espectral: m/e 543 M+, otros picos definitos a m/e 413, 395, 385, 362, 223 y

19-12-74.

126.

RMN (60MHz, D_2O) δ 5,37 doblete, J=2Hz, H-1'; 5,12 doblete, J=4Hz, H-1"; 4,96 singlete ancho, H-4'; 2,57, singlete, N-CH_3; 1,26 singlete, C-CH_3.

D. 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)sisomicina

Se disuelven 814 mg (1,5 milimoles) de 6'--N-trifluoroacetilsisomicina en 12 ml de metanol acuoso al 50% y se añade gota a gota con agitación una solución de 1,5 milimoles del producto de la etapa B disuelto en 3 ml de dimetilformamida. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 18 horas y se concentra a vacío hasta obtener un residuo. Se disuelve el residuo en 10 ml de hidróxido de amonio concentrado y se deja reposar durante 2 horas (para separar los grupos trifluoroacetilo). Se evapora el disolvente para obtener el producto del epígrafe como residuo. Se cromatografía el residuo en una columna de gel de sílice empleando la fase inferior de un sistema disolvente de cloroformo:metanol:hidróxido de amonio (2:1:1) como eluyente. Se reunen las fracciones que contienen el producto del epígrafe y se concentra hasta obtener un residuo que se disuelve en agua y liofiliza para obtener un sólido blanco amorfo.

De forma similar a la descrita antes se trata cada uno de los antibióticos siguientes con tioltri-

19-12-74.

fluoroacetato de etilo en metanol: gentamicina C_{1a}, gentamicina B, Antibiótico JI-20A, Antibiótico 66-40B y Antibiótico 66-40D.

Se aislan los productos resultantes de forma similar a la descrita en la etapa C para obtener, respectivamente: 6'-N-trifluoroacetil-gentamicina C_{1a}, 6'-N-trifluoroacetil-gentamicina B, 6'-N-trifluoroacetil-Antibiótico JI-20A, 6'-N-trifluoroacetil-Antibiótico 66-40B, y 6'-N-trifluoroacetil-Antibiótico 66-40D.

Se someten los productos intermedios de 6'-N-trifluoroacetil anteriores al procedimiento de la etapa D y se obtienen con ello los productos siguientes: 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)gentamicina B, 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)Antibiótico JI-20A, 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)Antibiótico 66-40B, y 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)Antibiótico 66-40D.

De forma análoga, por sustitución de una cantidad equivalente del ácido S-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxibutírico por el ácido S-3-benciloxicarbonilo-2-hidroxipropiónico, y siguiendo el procedimiento de este ejemplo, fueron preparados los compuestos siguientes:

1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)sisomicina, $[\alpha]_D^{26}$ + 139º (C, 0,3 en agua). Análisis calculado para $C_{22}H_{42}O_9N_6 . 1/2\ H_2CO_3$; C = 47,74; H = 7,66; N = 14,85;

19-12-74.

Encontrado C = 47,39; H = 7,14; N = 15,16 RMP. 100 MHz D_2O δ 1,22 (S), C-Me, 2,60 (S) N-Me 4,22 (Q), J = 4Hz, 7,5Hz; δ 5,09 (d), $H_{1"}$, $J_{1",2"}$ = 4,0 Hz; δ 5,34 (d), $H_{1'}$, $J_{1',2'}$ = 2Hz

1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)gentamicina C_{1a}, RMP 100 MH_z, D_2O; δ 1,22 C-Me; 2,59 N-Me; $[\alpha]_D^{26}$ + 115,4º (C, 0,3 en agua); 5,09 H-1", $J_{1",2"}$ = 4Hz, 5,17 H-1', $J_{1',2'}$ = 3,5Hz. Análisis calculado para $C_{22}H_{44}O_9N_6.H_2O.CO_2$; C=45,01; H=7,39; N=13,70; Encontrado C=44,98; H=7,81; N=13,68%.

1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)gentamicina B, RMP 100 MHz, D_2O + DCl; δ 1,18 C-Me (S); 2,77 N-Me (S); δ 4,35 (Q), J=4,5, 8,0; H-1', δ 5,01 (d), $J_{1',2'}$ = 4,0 Hz; H-1", 5,43 (d), $J_{1",2"}$ = 3,5 Hz.

1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)antibiótico JI-20A, 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)antibiótico 66-40B, y 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)antibiótico 66-42D.

Ejemplo 2

1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)sisomicina

Se disuelven 1,6 g de 6'-N-trifluoroacetilsisomicina (preparado como se describe en el Ejemplo 1, etapa C) en una mezcla que consiste en agua (10 ml) y metanol (5 ml). Se añade una solución de N-(S-4--ftalimido-2-hidroxibutiriloxi)succinimida (3 milimoles) en dimetilformamida (3 ml). La mezcla se agita a tempe-

19-12-74.

ratura ambiente durante 3 horas. Se evapora a vacío el disolvente, se disuelve el residuo en etanol (15 ml) y se añaden hidrato de hidrazina (0,3 g). La solución se calienta a reflujo durante 3 horas y luego se evapora a vacío la solución hasta obtener un residuo. Se cromatografía el residuo sobre gel de sílice (50 g) empleando la fase inferior de un sistema disolvente de cloroformo:metanol:hidróxido de amonio concentrado (2:1:1) como eluyente. Se controlan las fracciones por CCD y se reunen las fracciones que contienen el componente principal puro con movilidad menor que la sisomicina. Rendimiento 250 mg.

Ejemplo 3

1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)gentamicina B

A. 6'-N-t-butoxicarbonilgentamicina B

Se disuelve 1 g de gentamicina B en 30 ml de metanol acuoso al 50% y se enfría a 5ºC. Se añade gota a gota con agitación 0,297 g de azida de t-butoxi carbonil seguido por 0,186 ml de trietilamina y se agita la solución resultante durante 18 horas. La mezcla de reacción se evapora a vacío hasta obtener un residuo y se cromatografía el residuo sobre 100 g de gel de sílice empleando la fase inferior de un sistema de disolvente de cloroformo:metanol:hidróxido de amonio concentrado 2:1:1 como eluyente. Se recogen fracciones de 2 ml y

19-12-74.

se controla el efluente de la columna por CCD. Se combinan las fracciones que contienen materiales similares (fracciones 180-230) y se evapora para obtener 0,830 g de 6'-N-t-butoxicarbonil-gentamicina B que tiene las constantes físicas siguientes: RMP (60MHz, D_2O) δ 1,21 (3H,s, C-CH_3), 1,42 (9H,s,C(CH_3)$_3$), 2,53 (3H, s, N-CH_3), 5,2 (1H, d, J=4,5Hz, H-1") 5,23 (1H, d, J=3,0 Hz, H-1') PPM, Calculado para $C_{24}H_{46}N_4O_{12}.CO_2.H_2O$; C = 46,57; H = 7,51; N = 8,69%; Encontrado C = 46,80; H = 7,82; N = 8,54% $[\alpha]_D^{26}$ + 124º (C, 1 en metanol).

B. 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)-6'-N-t-butoxicarbonil-gentamicina B.

Se disuelven 0,582 g de 6'-N-t-butoxicarbonil-gentamicina B en 25 ml de metanol:agua (1:3). Se añade gota a gota con agitación una solución de 0,334 g de N-(S-4-carbobenciloxiamino-2-hidroxibutiriloxi)succinimida en 5 ml de dimetilformamida. La mezcla de reacción se agita a 5ºC durante 5 horas y luego se evapora a vacío hasta sequedad. El residuo se cromatografía sobre 60 g de gel de sílice empleando la fase inferior de un sistema de disolvente de cloroformo:metanol:hidróxido de amonio 2:1:1 como eluyente. Se recogen fracciones de 3 ml y se controla su contenido por CCD. Se combinan las fracciones 160-235 y se evapora hasta obtener un residuo de 0,280 g que emigra en forma de una mancha

19-12-74.

única en CCD. Se disuelve el residuo en 8 ml de metanol y 10 ml de agua y se hidrogena a 3,7 atmósferas sobre 60 mg de catalizador de paladio al 5% sobre carbón vegetal. Se separa el catalizador por filtración, se evapora el filtrado hasta obtener un residuo y se cromatografía sobre 20 g de gel de sílice empleando la fase inferior de un sistema disolvente de cloroformo:metanol:hidróxido de amonio 1:1:1 como eluyente. Se combinan las fracciones 79-127 (2 ml cada una) que consisten en 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)-6'-N-t-butoxicarbonil-gentamicina B. Rendimiento 86 mg. RMP δ 1,21 (3H, s, C-CH_3), 1,43 (9H, s, C-$(CH_3)_3$), 2,51 (3H, s, N-CH_3), 5,08 (1H, a, J=4Hz, H-1"), 5,25 (1H, d, J=3,5 Hz, H-1') PPM.

C. 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)gentamicina B.

Se disuelve el producto de la etapa B en 0,3 ml de ácido trifluoroacético y después de 5 minutos se añaden 30 ml de éter etílico. Se forma un precipitado del compuesto de este Ejemplo en forma de su sal trifluoroacetato y se recupera por filtración. El precipitado se disuelve en agua y se pasa la solución a través de una columna de resina de cambio iónico básica en forma de ion hidróxido para convertir la sal de adición ácido en la base libre. Se liofiliza el efluente de la columna para obtener el compuesto de este Ejemplo en forma de un sólido blanco amorfo. Rendimiento 72 mg.

19-12-74.

RMP D_2O 100 MHz: δ 1,14 C-metilo (S), 2,45 (S) N-metilo, 5,04 (d), H-1", $J_{1",2"}$=4,0 Hz; 5,30 (d), H-1', $J_{1',2'}$ =3,5Hz.

De forma similar, por sustitución de una cantidad equivalente de otros antibióticos de aminoglicosido-aminociclitol, tales como gentamicina C_{1a}, o Antibiótico JI-20A, y por el procedimiento siguiente de la etapa A, pueden prepararse los compuestos siguientes: 6'-N-t-butoxicarbonilgentamicina C_{1a}, y 6'-N-t-butoxicarbonil-Antibiótico JI-20A.

De forma similar, al someter el último de los compuestos anteriores a los procedimientos de las etapas B y C, pueden prepararse 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)antibiótico JI-20A.

De forma análoga, por sustitución de una cantidad equivalente de N-(S-4-carbobenciloxiamino-2-hidroxibutiriloxi)succinimida por N-(S-3-carbobenciloxiamino-2-hidroxipropioniloxi)succinimida en la etapa B, por reacción de 6'-N-t-butoxicarbonil-antibióticos con el último compuesto citado y sometiendo los productos así obtenidos al procedimiento de la etapa C, se pueden preparar los siguientes compuestos: 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)gentamicina B, 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)gentamicina C_{1a} y 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)antibiótico JI-20A.

19-12-74.

Ejemplo 4

1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)gentamicina C_1

A. 1-N-(S-3-carbobenciloxiamino-2-hidroxipropionil)--2'-3-di-N-trifluoroacetilgentamicina C_1

Se disuelven 0,84 g de 2',3-di-N-trifluoroacetil-gentamicina C_1 en 40 ml de tetrahidrofurano y se añade gota a gota con agitación una solución de 1,19 g de N-(S-3-carbobenciloxiamino-2-hidroxipropioniloxi)-succinimida en 24 ml de tetrahidrofurano. La mezcla de reacción se agita durante 24 horas y luego se evapora hasta obtener un residuo. El residuo se cromatografía sobre gel de sílice empleando la fase inferior de un sistema de disolvente cloroformo:metanol:hidróxido de amonio concentrado: agua (2:1:0,2:0,8) V/V como eluyente. Se controla el cromatograma por CCD y se combinan las fracciones que contienen productos similares para obtener el producto principal de la reacción que tiene las constantes siguientes: P. de F. 125º-131ºC, $[\alpha]_D^{26º}$ = +93º (CH_3OH) Anal: Calc. (para dihidrato) C=47,47; H=6,20; N=9,23% Encontrado: C=47,85; H=6,67; N=9,08%.

B. 1-N-(S-3-carbobenciloxiamino-2-hidroxipropionil)--gentamicina C_1

Se disuelven 0,55 g del producto de la etapa A en 55 ml de metanol y se añaden con agitación 25 ml de hidróxido de amonio concentrado. Se agita durante

19-12-74.

3 días, en cuyo momento la CCD sobre placas de gel de sílice que emplea como revelador la fase inferior de una mezcla 1:1:1 del sistema disolvente cloroformo:metanol:hidróxido de amonio concentrado indica la separación sustancialmente completa de los grupos de bloqueo de trifluoroacetilo. La solución se evapora a vacío hasta sequedad. Rendimiento 0,2 g; P. de F. 109º-112ºC.; $[\alpha]_D^{26º}$ = + 73º (H_2O).

C. 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)rentamicina C_1

Se disuelven 0,153 g del residuo de la etapa B en 8 ml de ácido acético y se añade 0,05 g del catalizador paladio sobre carbono al 10%. La solución se hidrogena a 4,0 atmósferas y a 25ºC hasta que la CCD (empleando el sistema disolvente usado en la etapa B) indica la conversión completa al producto del epígrafe, (por ejemplo 16 horas ⟶ 3 días). Se separa el catalizador por filtración y la solución se evapora a vacío hasta obtener un residuo. Se cromatografía el residuo sobre 7 gramos de gel de sílice empleando como eluyente la fase inferior de una mezcla de cloroformo:metanol:hidróxido de amonio 2:1:1. La columna se controla empleando CCD, se combinan los materiales similares y se obtienen con ello el producto de este Ejemplo. Rendimiento 112 mg. P. de F. 109º-119ºC, $[\alpha]_D^{26º}$ = +98º (H_2O) Anal. Calc: (monohidrato) C=49,47; H=8,65; N=14,42% Encon-

19-12-74.

trado: C=49,24; H=8,53; N=14,10%.

Ejemplo 5

1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)verdamicina.

A. 1-N-(S-4-ftalimido-2-hidroxibutiril)verdamicina

Se disuelven 4,61 g de verdamicina en 50 ml de una solución metanol:agua (1:3) y se enfría a 0º-5ºC. Se añade gota a gota con agitación una solución de 3,81 g de N-(S-4-ftalimido-2-hidroxibutiriloxi)succinimida en 20 ml de dimetilformamida a la solución de antibiótico. Se agita durante 16 horas adicionales y luego se concentra a vacío hasta obtener un residuo. Se cromatografía al residuo sobre una columna de gel de sílice de 250 g empleando como eluyente la fase inferior de una mezcla de cloroformo:metanol:hidróxido de amonio concentrado 2:1:1. El eluato se controla por CCD y se combinan las fracciones que contienen materiales similares. Se evaporan las fracciones combinadas que contienen el producto principal para obtener con ello la 1-N-(S-4-ftalimido-2-hidroxibutiril)verdamicina, y un isómero de la misma.

B. 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)verdamicina

Se disuelven 4,0 g del producto de la etapa anterior en 35 ml de etanol y se añade 1,0 g de hidrato de hidrazina. La solución se lleva a reflujo durante 3 horas, y luego se evapora a vacío hasta seque-

19-12-74.

dad. El residuo se cromatografía sobre 160 g de gel de sílice, eluyendo con la fase inferior de una mezcla de cloroformo:metanol:hidróxido de amonio concentrado 1:1:1 (V/V). Se combinan y evaporan las fracciones que contienen el componente principal de la reacción como se demuestra por CCD para obtener el compuesto de este Ejemplo como un sólido blanco amorfo.

De forma similar, se someten al procedimiento descrito en este Ejemplo los antibióticos siguientes: gentamicina A, gentamicina B_1, gentamicina C_{2a}, gentamicina X_2, Antibiótico G-418, Antibiótico JI-20B, y Antibiótico G-52.

Los productos resultantes se aislan de la forma descrita para obtener respectivamente: 1-N--(S-4-amino-2-hidroxibutiril)gentamicina A, 1-N-(S-4--amino-2-hidroxibutiril)gentamicina B_1, 1-N-(S-4-amino--2-hidroxibutiril)gentamicina C_{2a}, 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)gentamicina X_2, 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)antibiótico G-418, 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)antibiótico JI-20B, y 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)antibiótico G-52.

De forma análoga, por sustitución de una cantidad equivalente del N-(S-ftalimido-2-hidroxibutiriloxi)succinimida por N-(S-ftalimido-2-hidroxipropioniloxi)succinimida y siguiendo el procedimiento descrito

19-12-74.

en este Ejemplo, se pueden preparar los derivados de 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil) de los antibióticos anteriores. Por consiguiente, empleando N-(S-3-ftalimido-2-hidroxipropioniloxi)succinimida en la etapa A, se someten al procedimiento de este Ejemplo los antibióticos siguientes: verdamicina, gentamicina A, gentamicina B_1, gentamicina C_2, gentamicina C_{2a}, gentamicina X_2, Antibiótico G-418, Antibiótico JI-20B, y Antibiótico G-52.

Los productos resultantes se aislan de la forma descrita en este Ejemplo para obtener, respectivamente, 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)verdamicina, 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)gentamicina A, 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)gentamicina B_1, 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)gentamicina C_2, 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)gentamicina C_{2a}, 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)gentamicina X_2, 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)antibiótico G-418, 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)antibiótico JI-20B, y 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)antibiótico G-52.

Ejemplo 6

1. N-(S-3-t-butoxicarbonilamino-2-hidroxipropioniloxi)-succinimida

A. Acido S-3-t-butoxicarbonilamino-2-hidroxipropiónico

Se disuelven 8,0 g del ácido S-3-carboben

19-12-74.

ciloxiamino-2-hidroxipropiónico en 110 ml de dioxano--agua (4:1). Se añaden 200 mg de catalizador de paladio sobre carbono y se hidrogena a 3,4 atmósferas durante 3 horas. El catalizador se separa por filtración y se evapora el filtrado hasta obtener un residuo que comprende ácido S-3-amino-2-hidroxipropiónico. El ácido se disuelve en metanol (40 ml) y trietilamina (8,5 ml), se enfría la solución en un baño de hielo y se añade la azida de t-butoxicarbonilo (4,76 g). La mezcla se deja reposar toda la noche con calentamiento gradual hasta la temperatura ambiente. Se evapora la mayor parte del metanol, se diluye con agua y acidifica con ácido clorhídrico diluido hasta pH 3. La mezcla acuosa se extrae varias veces con acetato de etilo, se combinan y secan los extractos de acetato de etilo y se evaporan a vacío hasta obtener un residuo. El residuo se recristaliza en acetato de etilo-hexano para dar el compuesto del epígrafe de este Ejemplo. Rendimiento 3,5 g. P. de F. 92 - 94º, $[\alpha]_D^{26º}$; + 14,9º, (c = 0,68, H_2O), calculado para $C_8H_{15}NO_5$ requiere: C = 46,82; H = 7,37; N = 6,83%. Encontrado C = 46,81; H = 7,61; N = 6,63%.

B. N-(S-3-t-butoxicarbonilamino-2-hidroxipropionilo-xi)succinimida

Se disuelven 2,3 g del ácido S-3-t-butoxicarbonilamino-2-hidroxipropiónico en una mezcla de te

19-12-74.

trahidrofurano (25 ml) y acetato de etilo (60 ml). Se añaden con agitación 1,42 g de N-hidroxisuccinimida, seguido de una solución de diciclohexil-carbodiimida (2,51 g) en acetato de etilo (10 ml). La mezcla se deja con agitación durante 16 horas y luego se separan por filtración los sólidos precipitados. El filtrado se evapora para obtener el producto de este Ejemplo. Rendimiento 3,56 g.

De forma similar se sustituye una cantidad equivalente del ácido S-3-carbobenciloxiamino-2-hidroxipropiónico por el ácido S-4-carbobenciloxiamino-2-hidroxibutírico en la etapa A. Este ácido se somete al procedimiento de este Ejemplo y se obtiene N-(S-4-d-butoxicarbonilamino-2-hidroxibutiriloxi)succinimida.

2. 2',3-di-N-trifluoroacetil-gentamicina C_1

A. 2'-N-trifluoroacetil-gentamicina C_1

Se disuelven 1,7 g de gentamicina C_1 en 20 ml de metanol, la mezcla se enfría a 4ºC y se añaden con agitación 0,46 ml (0,563 g) de tioltrifluoroacetato de etilo. La reacción se deja que continue durante 2 horas y se concentra la solución a vacío hasta obtener un residuo. Se cromatografía el producto sobre 80 g de gel de sílice G empleando como eluyente en la fase inferior de una mezcla de cloroformo:metanol:agua:hidróxido amónico en la proporción en volumen de 10:5:4:1. Se combi-

19-12-74.

nan las fracciones que contienen el componente principal y se concentran para obtener 1,4 g del compuesto del epígrafe, P. de F. 108-111ºC, $[\alpha]_D^{26º}$ + 128º (c=0,3%, H_2O). Análisis para $C_{23}H_{42}N_5O_8F_3.H_2O$ requiere C = 46,69%. H = 7,50%; N = 11,84%; F = 9,63%; Encontrado: C = 46,66%; H = 7,65%; N = 11,60%; F = 9,24%.

B. 2',3-di-N-trifluoroacetil-gentamicina C_1

Se disuelven 0,66 g del producto de la etapa A en 10 ml de metanol, la mezcla se enfría a 4ºC y se añade 0,148 ml (0,182 g) de tioltrifluoroacetato de etilo disuelto en 3 ml de metanol. La mezcla de reacción se agita durante aproximadamente 16 horas y se concentra a vacío hasta obtener un residuo. El producto se cromatografía en 30 g de gel de sílice como se ha descrito en la etapa A. La columna se controla por cromatografía en capa delgada, y se combinan las fracciones apropiadas y se concentran para obtener 0,32 g del compuesto del epígrafe, P. de F. 121-129ºC, $[\alpha]_D^{26º}$ = 121º (c = 0,3%; H_2O). Análisis para $C_{25}H_{41}N_5O_9F_6$ requiere C = 44,84%; H = 6,17%; N = 10,46%. Encontrado: C = 44,94%; H = 6,35%; N = 10,17%.

C. Alternativamente, las etapas 2A y 2B de este Ejemplo pueden combinarse como sigue: se disuelven 4,95 g de gentamicina C_1 en 100 ml de metanol a aproximadamente 25ºC y se añaden gota a gota con agitación 4,05 g de

19-12-74.

tioltrifluoroacetato de etilo. Se continua la agitación toda la noche, la mezcla se concentra a vacío hasta obtener un residuo y se cromatografía como se describe en la etapa 2B para obtener el compuesto del epígrafe de la etapa 2B.

Ejemplo 7

1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)gentamicina C_{1a}

A. 1-N-(S-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxibutiril)gentamicina C_{1a}

Se disuelven 2,8 g (4 milimoles) de sulfato de gentamicina C_{1a} en 30 ml de agua y se añaden 15 ml de metanol. Se añaden 0,56 ml (4 milimoles) de trietilamina y se agita durante 10 minutos. Se añade gota a gota con agitación una solución que contiene 4 milimoles de N-(S-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxibutirilo xi)succinimida en 20 ml de dimetilformamida anhidra a la solución del antibiótico. La mezcla se agita durante toda la noche (16 horas) a temperatura ambiente. La cromatografía en capa delgada de la mezcla de reacción por CCD en gel de sílice empleando la fase inferior de un sistema de disolvente que consiste en cloroformo:metanol: hidróxido de amonio (1:1:1) muestra la presencia de una pluralidad de componentes secundarios y un componente principal. La mezcla de reacción se concentra a vacío

19-12-74.

hasta obtener un residuo y el residuo se tritura con metanol para obtener 3,2 g de sólidos blancos que contienen todos los componentes previamente observados por cromatografía.

Se cromatografían 150 mg del producto sobre 50 g de gel de sílice empleando la fase inferior de un sistema de disolvente que consiste en cloroformo:metanol:hidróxido de amonio (2:1:1). Se reunen las fracciones que contienen el componente principal y se liofilizan para dar 1-N-(S-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxibutiril)gentamicina C_{1a}. Rendimiento 70 mg. RMN (D_2O) δ 1,15 (3H, s, C-CH_3); 2,49 (3H, s, NCH_3); 4,10 (1H, dd, J=8,0, 4,0 Hz, cadena lateral H-2); 7,36 (5H, m, fenilo).

B. 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)gentamicina C_{1a}

Se disuelve el producto de la etapa A en una mezcla que consiste en 12 ml de metanol y 3 ml de agua, se añaden 20 mg de paladio sobre carbono al 10% y se hidrogena a 4,0 atmósferas a la temperatura ambiente. Después de 3 horas la reacción es esencialmente completa. El catalizador se separa por filtración y el filtrado se liofiliza y se obtienen 46 mg de 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)gentamicina C_{1a}. RMN (D_2O) δ 1,17 (3H, s, C-CH_3); 2,48 (3H, s, NCH_3); 4,22 (1H, dd, J=9,5Hz, 4,0 Hz, cadena lateral C<u>H</u>OH); 5,04 (2H, m, H-1', y H-1"). datos del Espectro de Masas: (M-H_2O) m/e 532.

19-12-74.

Ejemplo 8

1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)gentamicina B

A. 1-N-(S-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxibutiril)-gentamicina B

Se disuelven 3,39 g de sulfato de gentamicina B en 48,4 ml de agua y se diluyen con 23,7 ml de metanol. Se añaden gota a gota con agitación 0,7 ml de trietilamina. Se disuelven 1,67 g de N-(S-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxibutiriloxi)succinimida en dimetilformamida y la solución se añade gota a gota con agitación a la solución de antibiótico. La solución resultante se agita a temperatura ambiente durante 18 horas y luego se concentra a vacío hasta obtener un residuo. El residuo se disuelve con agitación en agua y se trata con una solución de hidróxido de bario diluida, hasta que el pH se eleva a aproximadamente 8,0. Se separa el sulfato de bario precipitado por filtración empleando un coadyuvante de filtración. El precipitado se lava con agua, se juntan los filtrados y se lava y concentra a vacío hasta sequedad. El residuo se cromatografía en una columna que contiene 600 g de gel de sílice empleando como eluyente la fase inferior de un sistema de disolvente que consiste en cloroformo:metanol:hidróxido de amonio (1:1:1). Se reune el material que se eluye inmediatamente antes de la gentamicina B y se concentran las

fracciones reunidas hasta sequedad y con lo cual se obtiene 1-N-(S-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxibutiril)--gentamicina B en forma de un sólido amorfo. Rendimiento 0,2 g. RMN (D_2O): δ 1,27 (3H, s, C-CH_3); 2,51 (3H, s, NCH_3); 5,08 (1H, d, J=4Hz); 5,25 (1H, d, J=3,5Hz).

B. 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)gentamicina B.

Se disuelve el producto de la etapa A en una mezcla que consiste en 200 ml de agua y 8 ml de metanol. Se hidrogena el producto en presencia de 60 mg de paladio sobre carbono al 5% a 3,4 atmósferas y a la temperatura ambiente durante 3 horas. El catalizador se separa por filtración a través de un coadyuvante de filtración. Se lava la almohadilla de filtración con agua y los filtrados se reunen y lavan. Los filtrados reunidos se concentran y lavan a vacío hasta sequedad. El residuo se cromatografía sobre una columna de gel de sílice que contiene 10 g de gel de sílice empleando como eluyente una solución que consiste en cloroformo:metanol:hidróxido de amonio (1:2:1). Las fracciones que contienen la mayor parte del componente polar se reunen, concentran y liofilizan para dar 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)gentamicina B. Rendimiento 12 mg.

De forma similar, se trata una cantidad equivalente de los siguientes antibióticos de 4,6-di-(aminoglicosil)aminociclitol para este procedimiento: gentami

19-12-74.

cina C_1, gentamicina C_2, gentamicina C_{2a}, gentamicina A, gentamicina X_2, Antibiótico G-418, Antibiótico JI-20A, Antibiótico JI-20B, y gentamicina B_1.

Los productos respectivos se aislan en la forma descrita en este Ejemplo y se obtienen así los siguientes: 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)gentamicina C_1, 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)gentamicina C_2, 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)gentamicina C_{2a}, 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)gentamicina A, 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)gentamicina X_2, 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)antibiótico G-418, 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)antibiótico JI-20A, 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)antibiótico JI-20B, y 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)gentamicina B_1.

De forma análoga, por sustitución de una cantidad equivalente de N-(S-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxibutiril)succinimida por N-(S-3-benciloxicarbonilamino-2-hidroxipropionil)succinimida, y por tratamiento de los antibióticos antes mencionados para este procedimiento, pueden obtenerse los productos siguientes: 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)gentamicina C_1, 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)gentamicina C_2, 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)gentamicina C_{2a}, 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)gentamicina X_2, 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)gentamicina A, 1-N-(S-3-ami

19-12-74.

no-2-hidroxipropionil)-antibiótico G-418, 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)antibiótico JI-20A, 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)antibiótico JI-20B, y 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)gentamicina B_1.

Ejemplo 9

1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)verdamicina

A. 1-N-(S-4-ftalimido-2-hidroxibutiril)verdamicina

Se disuelven 5,00 g de sulfato de verdamicina en 50 ml de agua y se añaden 25 ml de metanol. Se añaden 0,50 ml de trietilamina y se agitan durante 10 minutos. Se añade gota a gota con agitación una solución que contiene 2,5 g de N-(S-4-ftalimido-2-hidroxibutiriloxi)succinimida en 10 ml de dimetilformamida. La mezcla se agita toda la noche a temperatura ambiente y luego se concentra a vacío hasta obtener un residuo. El residuo se cromatografía sobre 160 g de gel de sílice, eluyendo con la fase inferior de una mezcla de disolvente de cloroformo:metanol:hidróxido de amonio concentrado (1:1:1). Se combinan y evaporan las fracciones que contienen el componente principal de la reacción (determinado por CCD en placas de gel de sílice) y se obtiene con ello el compuesto de este Ejemplo como un sólido blanco amorfo.

B. 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)verdamicina

Se disuelve el producto de la etapa A en

19-12-74.

40 ml de etanol y se añaden 0,2 g de hidrato de hidrazina. La solución se lleva a reflujo durante 3 horas, y luego se evapora a vacío hasta sequedad. El residuo se cromatografía sobre 160 g de gel de sílice, eluyéndose con la fase inferior de una mezcla de disolvente de cloroformo:metanol:hidróxido de amonio concentrado (1:1:1). Se combinan y evaporan las fracciones que contienen el componente principal de la reacción (determinado por CCD en placas de gel de sílice) y se obtiene con ello el compuesto de este Ejemplo como un sólido blanco amorfo.

De forma similar, se somete a este procedimiento una cantidad equivalente de los antibióticos siguientes: sisomicina, Antibiótico G-52, Antibiótico 66-40B, y Antibiótico 66-40D.

Los productos respectivos se aislan en la forma descrita y se obtienen con ello los siguientes: 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)sisomicina, 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)antibiótico G-52, 1-N-(S-4-amino)-2-hidroxibutiril)antibiótico 66-40B, y 1-N-(S-4-amino-2-hidroxibutiril)antibiótico 66-40D.

De forma análoga, por sustitución de una cantidad equivalente de N-(S-4-ftalimido-2-hidroxibutiriloxi)succinimida por N-(S-3-ftalimido-2-hidroxipropioniloxi)succinimida, y por tratamiento de los antibióti-

19-12-74.

cos antes mencionados para este procedimiento pueden obtenerse los productos siguientes: 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)sisomicina, 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)antibiótico G-52, 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)antibiótico 66-40B, y 1-N-(S-3-amino-2-hidroxipropionil)antibiótico 66-40D.

Los compuestos de este invento son agentes antibacterianos de amplio espectro que exhiben ventajosamente actividad contra muchos organismos, y que son resistentes a sus precursores no sustituidos en 1-N. Así, los compuestos de este invento pueden emplearse solos o en combinación con otros agentes antibióticos para impedir el desarrollo o reducir el número de bacterias en diversos ambientes. Los compuestos de este invento son más activos contra muchos organismos que inactivan los antibióticos originales por acetilación del grupo 3-amino y/o por adenilación del grupo 2"-hidroxilo. Así, los compuestos de este invento tienen el potencial de llegar a ser agentes antibacterianos y pueden emplearse para los mismos usos que sus antibióticos (originales) no derivados de otros, por ejemplo pueden emplearse como líquido de enjuague bacteriostático para materiales de vidrio de hospitales, instrumentos quirúrgicos, tubos de baño o para limpiar zonas en donde están alojados los animales de laboratorio, o similares.

Además de su utilidad como agentes antibacterianos, los compuestos de este invento se usan como intermedios en la preparación de una nueva clase de compuestos que poseen también actividad antibacteriana inesperadamente mejorada. La prueba de esta utilidad puede encontrarse en la patente belga Nº 818.431. Comprendidos en esta patente están los 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitoles sustituidos en 1-N en donde el sustituyente en 1-N es, entre otros, S-4-amino-2-hidroxibutilo o S-3-amino-2-hidroxipropilo. Estos compuestos pueden obtenerse por reducción de los compuestos del presente invento de acuerdo con procedimientos típicos. Los agentes de reducción preferidos son los hidruros y los borohidruros de aluminio.

En general, la dosificación administrada de los compuestos de este invento dependerá de la edad y del peso de la especie de animales que han de ser tratados, del modo de administración, y del tipo y gravedad de la infección bacteriana que ha de ser evitada o reducida. En general, la dosificación de los derivados de los 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitoles empleados para combatir una infección bacteriana será similar a los requisitos de dosificación de los correspondientes 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitoles no sustituidos en 1-N.

19-12-74.

Los compuestos de este invento pueden administrarse por vía oral. También pueden aplicarse por vía tópica en forma de ungüentos, tanto hidrófilos como hidrófobos, en forma de lociones que pueden ser acuosas, no acuosas o del tipo emulsión o en forma de cremas. Excipientes farmacéuticos útiles en la preparación de tales formulaciones incluirán, por ejemplo, sustancias tales como agua, aceites, grasas, poliésteres, polioles y similares.

Para la administración por vía oral de los compuestos de este invento pueden ser formulados en forma de tabletas, cápsulas, elixires o similares o incluso pueden mezclarse con piensos para animales. Es en estas formas de dosificación en las que los agentes antibacterianos son más eficaces para el tratamiento de infecciones bacterianas del tracto gastrointestinal, las cuales infecciones causan diarrea.

En general los preparados para vía tópica contendrán desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3,0 g de los compuestos del invento por 100 g de ungüento, cremas o loción. Los preparados para vía tópica se aplican de forma usual moderadamente a lesiones, alrededor de 2 a 5 veces al día.

Los agentes antibacterianos de este invento pueden utilizarse en forma líquida tales como solu-

19-12-74.

ciones, suspensiones y similares para empleo ótico y óptico y pueden también administrarse parenteralmente por inyección intramuscular. La solución o la suspensión inyectable se administrará generalmente en cantidades de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 15 mg de agente antibacteriano por kilógramo de peso corporal por día dividida en aproximadamente 2 a 4 dosis. La dosis precisa depende de la fase y gravedad de la infección, la susceptibilidad de los organismos infecciosos al agente antibacteriano y las características individuales de la especie animal que ha de ser tratada.

REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

1ª.- Procedimiento para la preparación de derivados de diaminociclitoles, concretamente derivados sustituidos en 1-N de los 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diamino ciclitoles gentamicina A, gentamicina B, gentamicina B_1 gentamicina C_1, gentamicina C_{1a}, gentamicina C_2, gentamicina C_{2a}, gentamicina X_2, sisomicina, verdamicina, Antibiótico G-418, Antibiótico 66-40B, Antibiótico 66-40D, Antibiótico JI-20A, Antibiótico JI-20B y Antibiótico G-52, en donde el sustituyente en 1-N se designa por X, que representa: S-3-amino-2-hidroxipropionilo o S-4-amino-2-hidroxibutirilo con la condición de que, en el caso de la gentamicina C_1, gentamicina C_{1a} y gentamicina C_2, X es S-3-amino-2-hidroxipropionilo; y de sus sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables; que comprende tratar uno de los 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitoles antes mencionados que pueden tener grupos protectores del grupo amino en cualquier posición distinta de la posición 1 con un ácido de la fórmula

HO - X'

en donde X es un grupo como se ha definido para X anteriormente, en donde el grupo amino y/o el grupo hidroxi pueden estar protegidos, en presencia de una carbodiimida, o con un derivado reactivo de dicho ácido anterior,

eliminar todos los grupos protectores presentes en la molécula y aislar el derivado como tal o como una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable.

2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, en donde se emplea uno de los 4,6-di-(aminoglicosil)--1,3-diaminociclitoles siguientes: gentamicina A, gentamicina B, gentamicina B_1, gentamicina C_1, gentamicina C_{1a}, gentamicina C_{2a}, gentamicina X_2, sisomicina, verdamicina, Antibiótico G-418, Antibiótico 66-40B, Antibiótico 66-40D, Antibiótico JI-20A, Antibiótico JI-20B y Antibiótico G-52.

3ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª ó 2ª, en donde se emplea uno de los 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitoles siguientes: gentamicina A, gentamicina B, gentamicina B_1, gentamicina C_{2a}, gentamicina X_2, sisomicina, verdamicina, Antibiótico G-418, Antibiótico 66-40B, Antibiótico 66-40D, Antibiótico JI-20A, Antibiótico JI-20B, y Antibiótico G-52.

4ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª ó 2ª, en donde como uno de los compuestos de partida de 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitol se emplea gentamicina C_{1a}, gentamicina B, Antibiótico JI-20A, Antibiótico 66-40B, Antibiótico 66-40D y sisomicina que tiene un grupo protector del grupo 6'-amino.

5ª.- Procedimiento según la reivindicación 4ª,

en donde el grupo protector del grupo amino es trifluoroacetilo o t-butoxicarbonilo.

6ª.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª ó 2ª, en donde la gentamicina C_1 que tiene grupos protectores del grupo amino en posiciones 2' y 3 se emplea como compuesto de partida de 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitol.

7ª.- Procedimiento según la reivindicación 6ª, en donde los grupos protectores del grupo amino son trifluoroacetilo.

8ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, en donde como uno de los compuestos de partida de 4,6--di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitol se emplea gentamicina A, gentamicina B_1, gentamicina C_2, gentamicina C_{2a}, gentamicina X_2, verdamicina, Antibiótico G-418, Antibiótico JI-20B y Antibiótico G-52 que tienen grupos amino libres.

9ª.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 3ª, en donde el 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitol se neutraliza parcialmente por formación de una sal de adición de ácido.

10ª.- Procedimiento según la reivindicación 9ª, en donde el compuesto de partida de 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitol se neutraliza con (n-1) equivalentes de ácido, siendo n el mímero de grupos amino de

la molécula.

11ª.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 10ª, en donde como agente de acilación se emplea un derivado reactivo del ácido HO-X'.

12ª.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 11ª, en donde el derivado reactivo del ácido OH-X' es un éster, una azida, un derivado de imidazol o el anhídrido.

13ª.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 12ª, en donde el derivado reactivo del ácido HO-X' es el éster de N-hidroxisuccinimidilo.

14ª.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 13ª, en donde X' es S-3-amino-2-hidroxipropionilo o S-4-amino-2-hidroxibutirilo que tiene un grupo protector del grupo amino.

15ª.- Procedimiento para la preparación de derivados de diaminociclitoles.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de cincuenta y tres hojas

---

escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 01. SET. 1975

P.A.

Alberto de [illegible]
Por Poder.