

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

PATENTE DE INVENCION

CONCEDIDA  
9 DIC. 1975

435375

11) NUMERO	19) A.I.
21) 435.375	
22) FECHA DE PRESENTACION	
6.3.75	

30) PRIORIDADES: 31) NUMERO 25953/74	32) FECHA 7.3.74	33) PAIS Japón
--	---------------------	-------------------

47) FECHA DE PUBLICIDAD	51) CLASIFICACION INTERNACIONAL C07G; A61K	62) FAYENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
-------------------------	---	---------------------------------------

64) TITULO DE LA INVENCION  
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UN NUEVO DERIVADO DE ANTI  
BIOTICO XK - 62-2

71) SOLICITANTE (S)  
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE  
Ohtemachi Bldg., Ohtemachi Chiyoda-ku, TOKYO, Japón

72) INVENTOR (ES)  
Shinji Tomioka, Yasuki Mori, Kunikatsu Shireheta

73) TITULAR (ES)

74) REPRESENTANTE  
D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

POOR  
QUALITY

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1 Esta invención se refiere a un derivado del antibiótico XK-62-2 y más específicamente al derivado identificado como 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropionil)-XK-62-2 y a la producción del mismo. En esta invención, el derivado puede encontrarse en la forma D,L o DL.

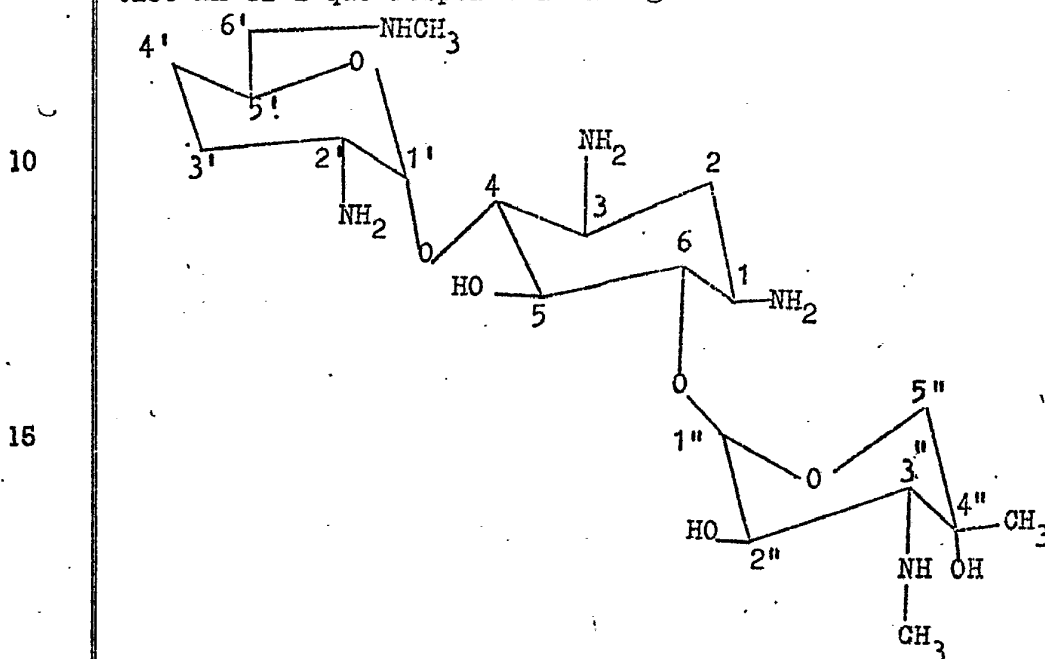
5 En pocas palabras, como se describe en la solicitud de patente estadounidense número de serie 364.058, el antibiótico XK-62-2 se produce cultivando actinomicetes tales como Micromonospora sagamiensis, Micromonospora echinospora y Micromonospora purpurea por los métodos habitualmente empleados en el cultivo de actinomicetes. Más específicamente, las cepas de los microorganismos antes mencionados, como Micromonospora sagamiensis ATCC 21826, ATCC 21827, ATCC 21803 y ATCC 21949, son inoculadas en un medio líquido que contiene una fuente de carbono que puede utilizar el microorganismo, tal como azúcares, hidrocarburos, alcoholes, ácidos orgánicos, etc; fuentes nitrogenadas orgánicas o inorgánicas y sales inorgánicas y factores promotores del crecimiento y se cultiva a 25-40°C durante 2 a 12 días, hasta que se detecta una actividad antibacteriana sustancial en el líquido de cultivo. El aislamiento y la purificación del XK-62-2 se realiza mediante una combinación de técnicas de adsorción y desorción de resinas cambiadoras de ión y de carbón activo y cromatografía en columna utilizando celulosa, Sephadex, alúmina y gel de sílice. De esta forma, puede obtenerse el XK-62-2 en forma de una sal o en forma de base libre.

25 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 tiene un peso molecular de 463. La sustancia es

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

COMPENDIO DE LA INVENCION

5 De acuerdo con esta invención, se produce un nuevo  
compuesto antibacteriano modificando químicamente el antibió-  
tico XK-62-2 que responde a la siguiente fórmula estructural:

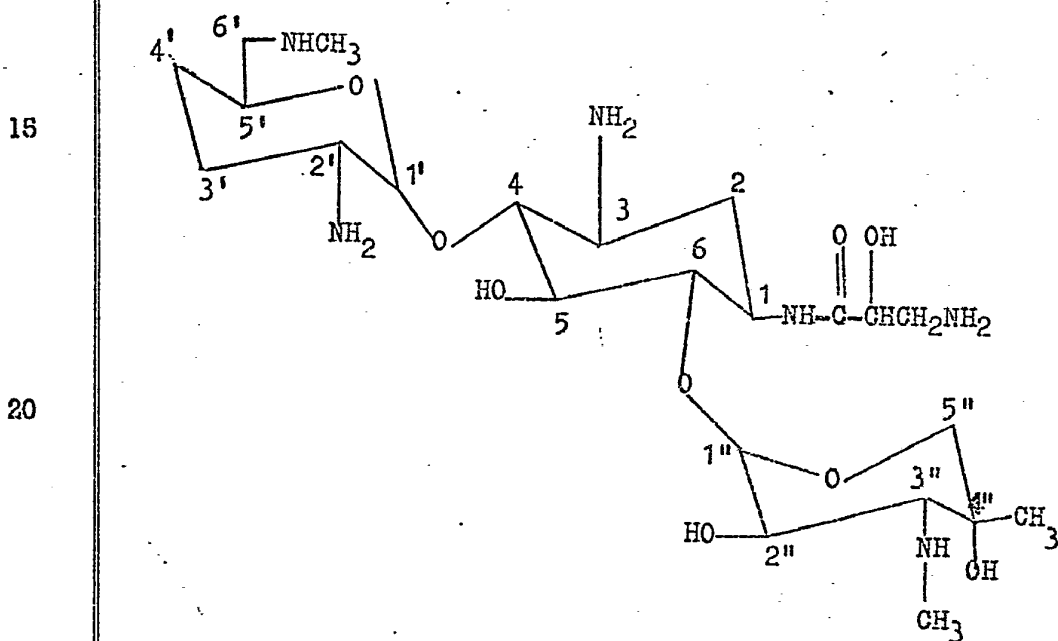


20 El derivado de XK-62-2 de esta invención presenta  
una intensa actividad antibacteriana contra diversas bacte-  
rias Gram-positivas y Gram-negativas y especialmente ejerce  
una actividad antibacteriana notablemente intensa contra las  
bacterias que son resistentes a los conocidos antibióticos  
aminoglicósidos incluidos el XK-62-2. Por consiguiente, el  
25 antibiótico de la invención es útil para limpiar y desinfectar  
el material de vidrio de laboratorio de los instrumentos  
quirúrgicos y también puede ser utilizado en combinación con  
diversos jabones con fines de esterilización y en la limpie-  
za y esterilización de salas de hospitales y zonas utilizadas  
30 para la preparación de alimentos. Además, se espera que el de-

1 rivado sea eficaz para el tratamiento de diversas infecciones  
tales como las del tracto urinario y las infecciones respira-  
torias, inducidas por diversas bacterias flogógenas, por ejem-  
plo Staphilococcus aureus, Sarcina lutea, Escherichia coli,  
5 Pseudomonas aeruginosa y Proteus.

Más específicamente, el nuevo derivado de XK-62-2 o  
sus sales de adición de ácidos, no tóxicas y farmacéuticamen-  
te aceptables, se preparan introduciendo un grupo  $\alpha$ -hidroxi-  
 $\beta$ -aminopropionilo en el grupo amino ligado al átomo de carbo-  
no de la posición 1 de XK-62-2.

Por lo tanto, de acuerdo con esta invención, se pre-  
para 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropionil)-XK-62-2 de fórmula:



25 acilando el XK-62-2 con un agente acilante capaz de introdu-  
cir un grupo  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -amino sustituido-propionilo en un gru-  
po amino, para preparar un compuesto intermedio y después eli-  
minar los grupos protectores sustituidos de forma conocida.  
Si se desea, el 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropionil)-XK-62-2 pue-  
30 de ser convertido después en sus sales de adición de ácidos,

1 no tóxicas, por métodos convencionales.

En un método más preferido, puede obtenerse un mayor rendimiento del compuesto de la invención protegiendo los grupos amino ligados a los átomos de carbono de las posiciones 2' y/o 6' del XK-62-2 con grupos protectores adecuados, antes de la reacción de acilación para introducir un grupo  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -amino sustituido-propionilo.

#### DESCRIPCION DE LA INVENCION

##### I. Acilación del XK-62-2

10 De acuerdo con esta invención, la base libre del compuesto XK-62-2 se hace reaccionar con un agente acilante, es decir, un compuesto capaz de introducir un grupo  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -amino sustituido-propionilo donde por lo menos uno de los átomos de hidrógeno del grupo  $\beta$ -amino ha sido sustituido por un grupo protector, en un disolvente adecuado, para preparar un compuesto intermedio con uno de los átomos de hidrógeno del grupo amino ligado al átomo de carbono en la posición 1 del XK-62-2 sustituido por dicho grupo acilo.

20 Como agente acilante, puede utilizarse el ácido  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -amino sustituido-propiónico y sus derivados con capacidad acilante. El agente acilante puede encontrarse en la forma D,L o DL.

25 La reacción se lleva a cabo en uno o más disolventes seleccionados, según la naturaleza del agente acilante, entre el grupo formado por tetrahidrofurano, dimetilformamida, dimetilacetamida, alcoholes inferiores, dioxano, éter dimetílico de etilenglicol, piridina y agua. Si es necesario, se añade un agente deshidratante y/o condensante como diciclohexilcarbodiimida. La temperatura de reacción está comprendida entre 30  $-50^{\circ}$  y  $+50^{\circ}$ C, preferiblemente entre  $-20$  y  $+20^{\circ}$ C.

1 Habitualmente, se emplean de 0,4 a 2,5 moles, prefe-  
riblemente de 0,7 a 1,5 moles, del agente acilante por cada  
mol de XK-62-2. Cuando se utiliza una cantidad mayor, por  
ejemplo 5 moles del agente acilante o cuando la reacción se  
5 lleva a cabo a temperatura elevada, por ejemplo 100°C, la  
reacción puede transcurrir pero se reduce considerablemente  
la selectividad de la posición en la cual se introduce el gru-  
po acilo o, si no, se descompone el agente acilante. Por con-  
siguiente, el rendimiento del compuesto intermedio en la mez-  
10 cla de reacción disminuye.

Como grupo protector del agente acilante puede utili-  
zarse cualquier grupo protector fácilmente eliminable, habi-  
tualmente empleado en la síntesis de péptidos. Este grupo  
protector y el correspondiente reactivo protector que puede  
15 introducir el grupo protector están descritos en M. Bodanszky  
y colaboradores: Peptide Synthesis, págs. 21-41 (1966) (John  
Wiley and Sons, Inc., Estados Unidos); y A. Kapoor: Journal  
of Pharmaceutical Sciences, vol. 59, págs. 1-27 (1970).

20 La Tabla I dada a continuación contiene ejemplos de  
los grupos protectores preferidos y de los correspondientes  
reactivos.

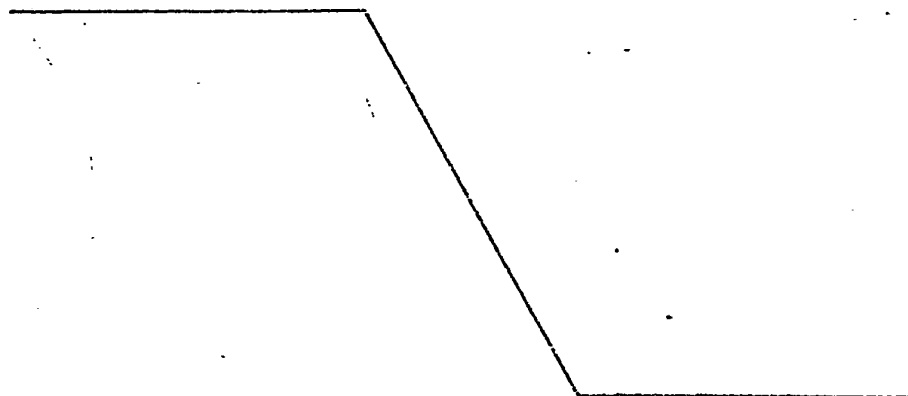


TABLA I

Grupo protector

Reactivo protector

1

5

10

15

20

25

30

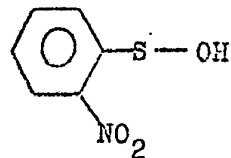
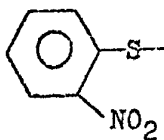
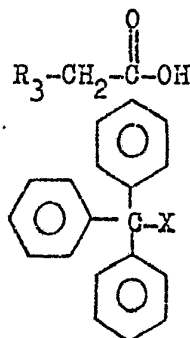
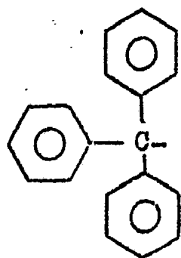
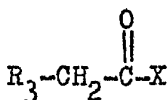
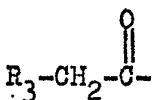
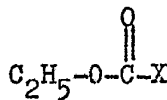
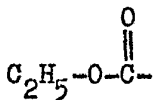
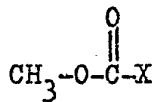
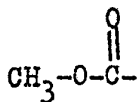
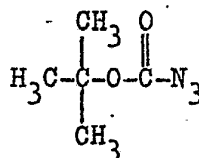
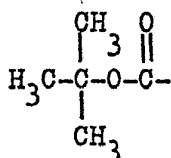
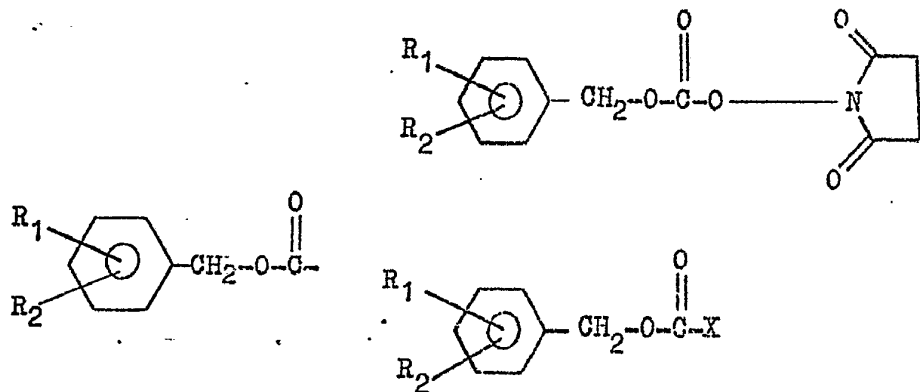
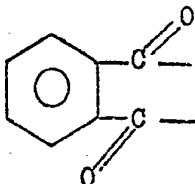
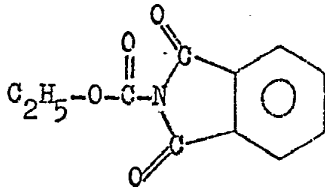


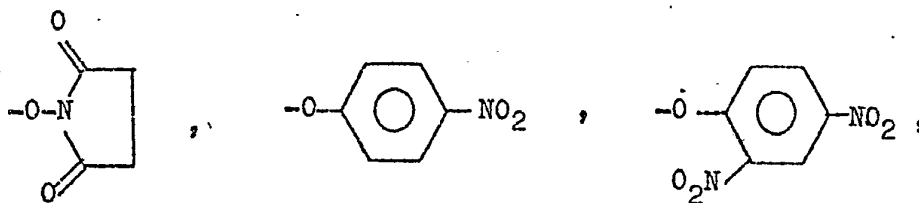
TABLA I (continuación)

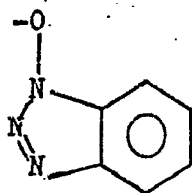
Grupo protector	Reactivo protector
	

En los grupos y en los reactivos protectores indicados en la Tabla I anterior,  $R_1$  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;  $R_3$  es H, F, Cl, Br, I o un grupo alquilo de 1 a 5 átomos de carbono y X es Cl, Br o I.

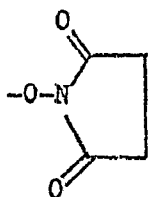
Como derivados de ácido  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -amino sustituido-propiónico que tienen la capacidad de acilar y que se utilizan como agente acilante, podemos mencionar los haluros de ácido, azida de ácido, anhídridos mixtos y ésteres reactivos. Estos derivados se utilizan habitualmente en la síntesis de péptidos. Se describen ejemplos de estos derivados en M. Bodanszky y colaboradores: Synthesis, pág. 453 (1972) y en M. Bodanszky y colaboradores: Peptide Synthesis, págs. 75-135 (1966) (John Wiley and Sons, Inc., Estados Unidos).

Como derivados preferidos, son apropiados los que tienen una estructura con el grupo hidroxilo del grupo carboxi del ácido  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -amino sustituido-propiónico sustituido por uno de los siguientes grupos:

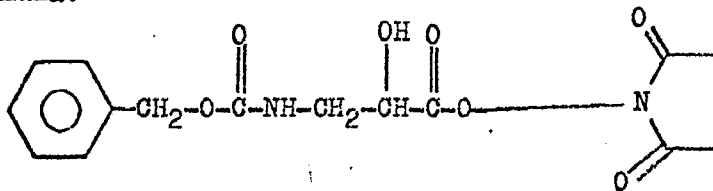




Cl, Br, I,  $-N_3$  o  $R_4OCCO-$ , donde  $R_4$  es un grupo alquilo de 1 a 7 átomos de carbono o un grupo fenilo. Especialmente preferidos son los derivados con una estructura cuyo grupo OH está sustituido con



Así, se proponen diversos agentes acilantes. Entre ellos, se recomienda como el más preferido el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -carbobenzoxiamino-propiónico de fórmula:



Este agente acilante se prepara por reacción de ácido  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -carbobenzoxiamino-propiónico con N-hidroxisuccinimida, en presencia de un agente deshidratante y condensante, por ejemplo dicitclohexilcarbodiimida. El agente acilante preparado de esta forma, naturalmente, puede ser aislado de la mezcla de reacción y después puede reaccionar con el XK-62-2 o bien la mezcla de reacción puede reaccionar directamente con el XK-62-2 sin aislar el agente acilante.

Debe entenderse que los derivados de ácido  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -amino sustituido-propiónico donde el grupo hidroxilo del grupo carboxi está sustituido con otros grupos distintos del des-

1 crito anteriormente, pueden ser preparados de forma conocida y son aceptables para la reacción de la invención.

5 El compuesto intermedio así preparado puede ser aislado de la mezcla de reacción, purificado y utilizado como material de partida para la reacción posterior. Sin embargo, se prefiere que, una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se utilice como material de partida para la reacción posterior, sin purificación. Este último método es ventajoso porque simplifica las etapas y aumenta el rendimiento de recuperación.

10 Si es necesario, el compuesto intermedio puede ser fácilmente aislado y purificado por métodos convencionales, por ejemplo por cromatografía en columna empleando adsorbentes tales como resinas cambiadoras, gel de sílice, alúmina y celulosa o cromatografía en capa fina empleando gel de sílice, alúmina y celulosa.

## 15 II. Eliminación del grupo protector

20 El grupo protector del grupo amino contenido en el compuesto intermedio preparado en la etapa I anterior es después eliminado para preparar el 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -amino-propionil)-XK-62-2.

25 La eliminación del grupo protector puede efectuarse por métodos convencionales. Por ejemplo, cuando los grupos protectores forman un grupo ftaloilo, la eliminación se realiza con hidrazina; cuando el grupo protector es un grupo carbometoxi o carboetoxi, la eliminación se realiza con hidróxido bórico; cuando el grupo protector es un grupo terc-butoxicarbonylo, la eliminación se realiza con ácido fórmico o ácido trifluoracético; cuando el grupo protector es un grupo tritilo, 30 la eliminación se realiza con ácido acético o ácido trifluor-

1 acético; cuando el grupo protector es un grupo ortonitrofenil  
sulfenilo, la eliminación se realiza con ácido acético o áci-  
do clorhídrico; y cuando el grupo protector es un grupo clo-  
roacetilo, la eliminación se realiza con 3-nitropiridin-2-  
5 tiona [citada por K. Undheim y colaboradores: Journal of the  
Chemical Society, Perkin Transactions, Parte I, pág. 829  
(1973)].

En una realización preferida, el grupo protector del  
compuesto intermedio es un grupo benciloxicarbonilo y la eli-  
10 minación se realiza por hidrogenólisis en presencia de un ca-  
talizador metálico, seleccionado entre paladio, platino, ro-  
dio y níquel Raney, preferiblemente catalizador de paladio so-  
bre un soporte de carbón activo, en por lo menos un disol-  
vente seleccionado entre el grupo formado por agua, tetrahi-  
15 drofurano, dimetilacetamida, dimetilformamida, alcoholes infe-  
riores, dioxano, éter dimetílico de etilenglicol y/o piridi-  
na, preferiblemente una mezcla de agua y metanol (1:1); en  
presencia de una pequeña cantidad de ácido clorhídrico, ácido  
bromhídrico, ácido yodhídrico o ácido acético, preferiblemen-  
20 te ácido acético, y a la temperatura ambiente y presión atmos-  
férica.

El 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropionil)-XK-62-2 así prepa-  
rado es aislado de la mezcla de reacción y purificado de for-  
ma conocida. Por ejemplo, el compuesto se aísla y purifica  
25 por cromatografía en columna utilizando un adsorbente tal co-  
mo resinas cambiadoras de ión, gel de sílice, alúmina, celulo-  
sa, Sephadex, etc, o cromatografía en capa fina empleando gel  
de sílice, alúmina, celulosa, etc.

Si se desea, el 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropionil)-XK-62-2  
30 preparado de acuerdo con lo anterior puede ser convertido en

1 sales de adición de ácidos, no tóxicas y farmacéuticamente  
aceptables (monosales, disales, trisales, tetrasales o pen-  
tasales), por métodos convencionales tales como la interacción  
de un mol del compuesto con 1 a 5 moles de un ácido no tóxi-  
5 co y farmacéuticamente aceptable. En esta invención, los áci-  
dos no tóxicos son los ácidos inorgánicos tales como clorhí-  
drico, bromhídrico, yodhídrico, sulfúrico, fosfórico, carbó-  
nico, etc, y los ácidos orgánicos como acético, fumárico,  
málico, cítrico, mandélico, tartárico, ascórbico, etc.

10 Aunque el método anterior cumple los objetivos de la  
invención, se ha encontrado que por bloqueo de grupos amino  
específicos del XK-62-2, puede aumentarse el rendimiento de  
compuesto de la invención.

15 Como ya se ha mencionado, el compuesto de la invención  
se prepara introduciendo un grupo  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropioni-  
lo en el grupo amino unido al átomo de carbono de la posición  
1 del XK-62-2. Se ha encontrado que entre los grupos amino que  
posee el XK-62-2, el grupo amino ligado al átomo de carbono  
de la posición 2' es más reactivo que el ligado al átomo de  
20 carbono de la posición 1. Por consiguiente, es preferible pro-  
teger el grupo amino ligado al átomo de carbono de la posición  
2' antes de la reacción de acilación para introducir el grupo  
 $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropionilo. También se ha encontrado que,  
aunque el grupo amino ligado al átomo de carbono en la posi-  
25 ción 3 es menos reactivo que el ligado al átomo de carbono en  
la posición 1, se vuelve mucho menos reactivo cuando el átomo  
de hidrógeno unido al átomo de nitrógeno del grupo amino liga-  
do al átomo de carbono de la posición 6' es sustituido por  
un grupo protector. Además, se ha encontrado que el grupo ami-  
30 no ligado al átomo de carbono en la posición 3" es mucho menos

1 reactivo que el ligado al átomo de carbono en la posición 1.  
Por consiguiente, es conveniente que ambos grupos amino liga-  
dos a los átomos de carbono en las posiciones 2' y 6' sean  
protegidos antes de la reacción de acilación.

5 Prácticamente, cuando se intenta la protección del gru-  
po amino ligado al átomo de carbono en la posición 2', se pro-  
duce una mezcla de un compuesto en el que está protegido el  
grupo amino ligado al átomo de carbono en la posición 2', un  
compuesto en el que están protegidos los grupos amino ligados  
10 a los átomos de carbono en las posiciones 2' y 6' y un com-  
puesto en el que está protegido el grupo amino ligado al áto-  
mo de carbono en la posición 6'.

A. Protección de los grupos amino ligados a los átomos de car-  
bono en las posiciones 2' y/o 6'

15 El XK-62-2 se hace reaccionar con un reactivo protector  
del amino, en un disolvente adecuado, para preparar por lo me-  
nos uno de los compuestos siguientes: un compuesto con una es-  
tructura en la que está sustituido el átomo de hidrógeno unido  
al átomo de nitrógeno del grupo metilamino ligado al átomo de  
20 carbono de la posición 6' del XK-62-2 (compuesto intermedio  
IIA); un compuesto con una estructura en la que está sustitui-  
do por lo menos uno de los átomos de hidrógeno del grupo ami-  
no ligado al átomo de carbono de la posición 2' del XK-62-2  
(compuesto intermedio IIB); y un compuesto con una estructura  
25 en la que está sustituido el átomo de hidrógeno unido al áto-  
mo de nitrógeno del grupo metilamino ligado al átomo de carbo-  
no de la posición 6' y por lo menos uno de los átomos de hidró-  
geno del grupo amino ligado al átomo de carbono de la posición  
30 2' del XK-62-2 (compuesto intermedio IIC). Habitualmente, es-  
tos compuestos intermedios se obtienen en forma de mezcla.

1           La reacción del XK-62-2 con el reactivo protector del  
amino se lleva a cabo bajo las condiciones habitualmente em-  
pleadas en los métodos convencionales de protección de los  
5           grupos amino, tal como se ha descrito anteriormente. En gene-  
ral, se utilizan de 0,5 a 4,5 moles del reactivo protector  
por cada mol de XK-62-2. La reacción se efectúa entre  $-50^{\circ}\text{C}$   
y  $+50^{\circ}\text{C}$ .

10           En este caso, no es conveniente utilizar una cantidad  
mayor del reactivo protector o efectuar la reacción a tempe-  
ratura elevada porque, bajo estas condiciones, el grupo pro-  
tector también es introducido en el grupo amino ligado al áto-  
mo de carbono de la posición 1. Con objeto de proteger selecti-  
vamente solo los grupos amino ligados a los átomos de carbono  
15           de las posiciones 2' y/o 6', se recomienda el uso de 0,7 a  
2,6 moles del agente protector por cada mol de XK-62-2 y efec-  
tuar la reacción a una temperatura comprendida entre  $-20^{\circ}$  y  
 $20^{\circ}\text{C}$ .

20           El disolvente para la reacción puede ser por lo menos  
uno seleccionado entre el grupo formado por tetrahidrofurano,  
dimetilacetamida, dimetilformamida, alcoholes inferiores, dio-  
xano, éter dimetílico de etilenglicol, piridina y/o agua.

25           Como reactivo protector del amino, puede utilizarse  
cualquiera de los reactivos protectores capaces de introducir  
grupos protectores fácilmente eliminables que son habitualmen-  
te empleados en la síntesis de péptidos. Los reactivos protec-  
tores preferidos son compuestos indicados en la Tabla I ante-  
rior.

30           Los compuestos intermedios IIA, IIB y IIC del XK-62-2  
pueden ser utilizados para la reacción posterior tal como es-  
tán, sin aislamiento ni purificación. Sin embargo, si se de-

1 sea, los compuestos intermedios pueden ser aislados y purificados por métodos convencionales.

B. Acilación del grupo amino ligado al átomo de carbono en la posición 1

5 Por lo menos uno de los compuestos intermedios IIA, IIB y IIC preparados en la anterior etapa A se hace reaccionar con un agente acilante, es decir, ácido  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -amino sustituido-propiónico o derivados del mismo con capacidad para acilar, en un disolvente adecuado, para preparar por lo menos 10 uno de los compuestos intermedios IIIA con una estructura en la que uno de los átomos de hidrógeno del grupo amino ligado al átomo de carbono en la posición 1 del compuesto intermedio IIA está sustituido por un grupo  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -amino sustituido-propionilo; un compuesto intermedio IIIB con una estructura 15 en la que uno de los átomos de hidrógeno del grupo amino ligado al átomo de carbono en la posición 1 del compuesto intermedio IIB está sustituido por un grupo  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -amino sustituido-propionilo; y un compuesto intermedio IIIC con una estructura en la que uno de los átomos de hidrógeno del grupo 20 amino ligado al átomo de carbono en la posición 1 del compuesto intermedio IIC está sustituido por un grupo  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -amino sustituido-propionilo.

25 La etapa de acilación y la de aislamiento de los compuestos intermedios IIIA, IIIB y IIIC puede ser llevada a cabo de la manera descrita en la etapa de acilación I de XK-62-2, descrita anteriormente, a excepción de que se utilizan 0,5-1,5 moles, preferiblemente 0,7-1,2 moles, del agente acilante por cada mol del compuesto IIA, IIB y IIC. Cuando se emplea una cantidad mayor, por ejemplo 3 moles del agente acilante o cuando la reacción se lleva a cabo a temperatura ele- 30

1 vada, por ejemplo 100°C, puede transcurrir la reacción pero  
se reduce la selectividad de la posición en la cual se intro-  
duce un grupo  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -amino sustituido-propionilo o bien  
5 se descompone el agente acilante. Por consiguiente, disminu-  
yen los rendimientos de producción de los compuestos inter-  
medios IIIA, IIIB y IIIC.

C. Eliminación del grupo protector

10 La eliminación de los grupos protectores de los com-  
puestos así preparados IIIA, IIIB y IIIC para preparar el  
1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropionil)-XK-62-2 se lleva a cabo en la  
forma descrita anteriormente. Además, la conversión de los  
compuestos resultantes en sales de adición de ácidos no tóxi-  
cos se realiza por métodos conocidos en la técnica.

15 Los productos obtenidos por eliminación del grupo  
protector de los compuestos intermedios presentan las mismas  
características en el espectro RMN, espectro de absorción  
infrarrojo, punto de fusión, rotación específica, análisis  
elemental y CIM contra diversas bacterias. Basándose en estos  
20 datos, los productos son identificados como 1-N-( $\alpha$ -hidroxi-  
 $\beta$ -aminopropionil)-XK-62-2.

25 El 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropionil)-XK-62-2 de esta  
invención presenta excelente actividad antibacteriana. Es es-  
pecialmente notable el hecho de que el compuesto ejerce una  
intensa actividad antibacteriana contra variedades de  
Escherichia coli con factores R que indican resistencia a los  
antibióticos aminoglicósidos conocidos.

30 La Tabla II ilustra el espectro antibacteriano de la  
kanamicina A, gentamicina C<sub>1a</sub>, XK-62-2 y las formas D, L y  
DL del 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropionil)-XK-62-2 contra diver-  
sas bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, determinadas

1 por el método de dilución en ágar a pH 8,0.

Comparando la concentración mínima de inhibición mos-  
trada en la Tabla II, es evidente que el compuesto de esta  
invención posee una intensa actividad antibacteriana. Es ca-  
5 racterístico que el compuesto presente una intensa actividad  
antibacteriana especialmente contra Escherichia coli KY 8327  
y 8348.

En la Tabla II, Escherichia coli KY 8327 y KY 8348 pro-  
ducen r e s p e c t i v a m e n t e . . . g e n t a m i c i -  
10 cin-adeniltransferasa y gentamicin-acetiltransferasa Tipo I,  
intracelularmente. La primera bacteria inactiva a las kanami-  
cinas y gentamicinas por adenilación y la última inactiva a  
las gentamicinas por acetilación.

Además, los espectros antibacterianos del 1-N-( $\alpha$ -hidro-  
15 xi- $\beta$ -aminopropionil)-XK-62-2 (en las formas D,L y DL) en com-  
paración con la kanamicina A, complejo de gentamicina C  
(C<sub>1</sub>, C<sub>1a</sub> y C<sub>2</sub>) y XK-62-2, medido por el método de dilución  
en ágar a pH 7,2 están indicados en la Tabla III dada a con-  
tinuación.

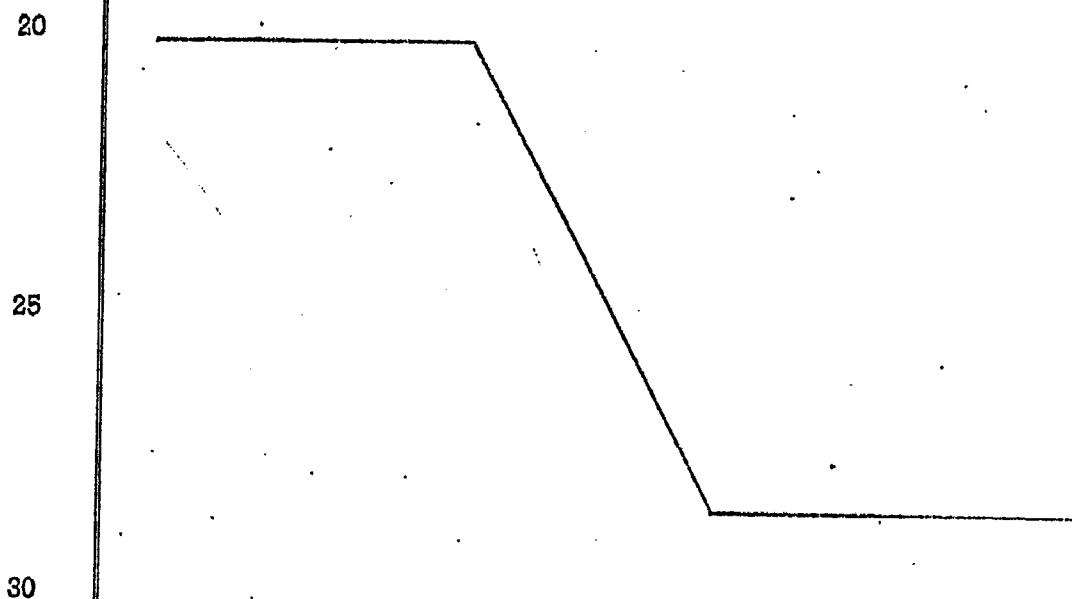


TABLE II

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

Cepas	Kanamicina A		Gentamicina <sub>1a</sub>		XK-62-2		1-N-(α-hidroxi-β-aminopropionil)-XK-62-2	
	Forma D	Forma L	Forma D	Forma L	Forma D	Forma L	Forma D	Forma L
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> BMH 1	5,2		0,13		0,52		2,08	1,04
<u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 6538P	0,021		0,04		0,008		0,004	0,065
<u>Bacillus subtilis</u> nº 10707	0,021		0,04		0,004		0,004	0,008
<u>Proteus vulgaris</u> ATCC 6897	0,16		0,33		0,033		0,033	0,033
<u>Shigella sonnei</u> ATCC 9290	0,16		0,33		0,033		0,008	0,016
<u>Salmonella typhosa</u> ATCC 9992	0,08		0,16		0,008		0,004	0,004
<u>Klebsiella pneumoniae</u> ATCC 10031	0,042		0,16		0,004		0,004	0,033
<u>Escherichia coli</u> ATCC 26	0,16		0,33		0,016		0,004	0,008
<u>Escherichia coli</u> KY 8327	1,04		2,08		1,04		0,004	0,004
<u>Escherichia coli</u> KY 8348	0,041		1,04		1,04		0,004	0,004

1

5

10

15

20

25

30

POOR QUALITY



TABLA II

concentración mínima de inhibición, mcg/ml)

Gentamicina A	Gentamicina <sub>1a</sub>	XK-62-2	1-N-(α-hidroxi-β-aminopropionil)-XK-62-2		
			Forma D	Forma L	Forma DL
2	0,13	0,52	2,08	1,04	1,04
021	0,004	0,008	0,004	0,004	0,065
021	0,004	0,004	0,004	0,004	0,008
16	0,033	0,033	0,033	0,033	0,033
16	0,033	0,033	0,008	0,008	0,016
08	0,016	0,008	0,004	0,004	0,004
042	0,016	0,004	0,004	0,004	0,033
16	0,033	0,016	0,004	0,004	0,008
04	2,08	1,04	0,004	0,004	0,004
041	1,04	1,04	0,004	0,004	0,004

TABLA III

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

Cepas	Kanamicina A (C <sub>1</sub> , C <sub>2</sub> y C <sub>3</sub> )	Complejo de Gentamicina C (C <sub>1</sub> , C <sub>2</sub> y C <sub>3</sub> )	XK-62-2	1-N-(α-hidroxi-β-aminopropionil)-XK-62-2	
				Forma D	Forma L
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	0,2	<0,05	0,1	0,05	0,1
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	0,2	<0,05	<0,05	-	0,05
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0,2	<0,05	<0,05	0,05	0,1
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 9341	6,25	0,2	0,4	-	0,4
<i>Escherichia coli</i> T-2	1,56	0,4	0,4	0,2	0,4
<i>Escherichia coli</i> T-5	1,56	0,4	0,4	-	0,4
<i>Escherichia coli</i> KY 8327 <sup>1</sup>	50	12,5	12,5	0,2	0,4
<i>Escherichia coli</i> KY 8321 <sup>2</sup>	100	6,25	3,12	0,2	0,2
<i>Escherichia coli</i> KY 8348 <sup>3</sup>	0,78	3,12	12,5	0,2	0,2
<i>Escherichia coli</i> KY 8349 <sup>4</sup>	>100	0,2	0,4	0,2	0,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BMH 1	12,5	0,4	0,78	1,56	1,56
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KY 8510 <sup>5</sup>	100	3,12	1,56	3,12	3,12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KY 8511 <sup>6</sup>	100	50	100	3,12	3,12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KY 8512 <sup>7</sup>	12,5	0,4	0,78	1,56	0,78
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KY 8516 <sup>8</sup>	>100	3,12	3,12	-	3,12
<i>Providencia</i> sp. 164 <sup>9</sup>	>100	50	100	6,25	12,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> n° 8045	0,4	0,2	0,1	0,2	0,2
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	6,25	1,56	0,78	3,12	3,12
<i>Proteus vulgaris</i> 6897	3,12	0,78	0,78	0,78	3,12
<i>Proteus rettgeri</i> KY 4288	0,78	0,78	0,4	-	0,78
<i>Proteus morgani</i> KY 4298	1,56	0,78	0,4	-	0,78

1: produce gentamicin-adeniltransferasa  
 2: produce gentamicin-adeniltransferasa y neomicin-kanamicin-fosfo-transferasa Tipo II  
 3: produce gentamicin-acetiltransferasa Tipo I  
 4: produce neomicin-kanamicin-fosfo-transferasa Tipo I  
 5: produce kanamicin-acetiltransferasa  
 6: produce gentamicin-acetiltransferasa Tipo I y neomicin-kanamicin-fosfo-transferasa Tipo I  
 7: produce neomicin-kanamicin-fosfo-transferasa Tipo I y Tipo II y streptomycin-fosfo-transferasa  
 8: probablemente produce kanamicin-acetiltransferasa.  
 9: produce gentamicin-acetiltransferasa Tipo II.

1

5

10

15

20

25

30

TABLA III

Espectro antibacteriano (concentración mínima)

	Cepas	Kanamicina A	Complejo de Gentamicina C (C <sub>1</sub> , C <sub>1a</sub> y C <sub>2</sub> )
5	<u>Staphylococcus aureus</u> 209 P	0,2	<0,05
	<u>Staphylococcus aureus</u> Smith	0,2	<0,05
	<u>Bacillus subtilis</u> ATCC 6633	0,2	<0,05
	<u>Sarcina lutea</u> ATCC 9341	6,25	0,2
10	<u>Escherichia coli</u> T-2	1,56	0,4
	<u>Escherichia coli</u> T-5	1,56	0,4
	<u>Escherichia coli</u> KY 8327 <sup>1</sup>	50	12,5
	<u>Escherichia coli</u> KY 8321 <sup>2</sup>	100	6,25
	<u>Escherichia coli</u> KY 8348 <sup>3</sup>	0,78	3,12
	<u>Escherichia coli</u> KY 8349 <sup>4</sup>	>100	0,2
15	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> BMH 1	12,5	0,4
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> KY 8510 <sup>5</sup>	100	3,12
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> KY 8511 <sup>6</sup>	100	50
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> KY 8512 <sup>7</sup>	12,5	0,4
	<u>Pseudomonas aeruginosa</u> KY 8516 <sup>8</sup>	>100	3,12
20	<u>Providencia sp.</u> 164 <sup>9</sup>	>100	50
	<u>Klebsiella pneumoniae</u> n° 8045	0,4	0,2
	<u>Proteus mirabilis</u> 1287	6,25	1,56
	<u>Proteus vulgaris</u> 6897	3,12	0,78
	<u>Proteus rettgeri</u> KY 4288	0,78	0,78
25	<u>Proteus morgani</u> KY 4298	1,56	0,78
	1: produce gentamicin-adeniltransferasa	2: produce gentamicin-adeniltransferasa Tipo II	
	3: produce gentamicin-acetiltransferasa Tipo I	4: produce neomicin-kanam	
30	5: produce kanamicin-acetiltransferasa	6: produce gentamicin-acetiltransferasa Tipo I	
	7: produce neomicin-kanamicin-fosfotransferasa Tipo I y Tipo II y streptomycin-fosfotransferasa	8: probablemente produce	
		9: produce gentamicin-ace	

TABLA III

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

	Kanamicina A	Complejo de Gentamicina C (C <sub>1</sub> , C <sub>1a</sub> y C <sub>2</sub> )	XK-62-2	1-N-(α-hidroxi-β-aminopro- pionil)-XK-62-2		
				Forma D	Forma L	Forma DL
	0,2	<0,05	0,1	0,05	0,05	0,1
	0,2	<0,05	<0,05	-	-	0,05
	0,2	<0,05	<0,05	0,05	0,05	0,1
	6,25	0,2	0,4	-	-	0,4
	1,56	0,4	0,4	0,2	-	0,4
	1,56	0,4	0,4	-	-	0,4
	50	12,5	12,5	0,2	0,2	0,4
	100	6,25	3,12	0,2	0,4	0,2
	0,78	3,12	12,5	0,2	0,2	0,2
	>100	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2
	12,5	0,4	0,78	1,56	1,56	1,56
	100	3,12	1,56	3,12	3,12	3,12
	100	50	100	3,12	3,12	3,12
	12,5	0,4	0,78	1,56	0,78	0,78
	>100	3,12	3,12	-	-	3,12
	>100	50	100	6,25	6,25	12,5
	0,4	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2
	6,25	1,56	0,78	3,12	3,12	3,12
	3,12	0,78	0,78	0,78	1,56	3,12
	0,78	0,78	0,4	-	-	0,78
	1,56	0,78	0,4	-	-	0,78

erasa 2: produce gentamicin-acetiltransferasa y neomicin-kanamicin-fos-  
fototransferasa Tipo II

erasa 4: produce neomicin-kanamicin-fosfotransferasa Tipo I

erasa 6: produce gentamicin-acetiltransferasa Tipo I y neomicin-kanami-  
cin-fosfotransferasa Tipo I

otransfo- 8: probablemente produce kanamicin-acetiltransferasa.

micin-fos 9: produce gentamicin-acetiltransferasa Tipo II.

1 Los enzimas anteriores son producidos intracelularmente  
y, con los enzimas, las bacterias inactivan a los antibió-  
ticos.

5 En la Tabla III se observa que el 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -ami-  
noproionil)-XK-62-2 de esta invención posee una actividad  
antibacteriana muy intensa frente a diversas bacterias que  
presentan resistencia por lo menos a uno de los antibióticos  
de gentamicina y al XK-62-2, que producen gentamicin-adenil-  
transferasa y/o gentamicin-acetiltransferasa Tipo I y Tipo II  
10 intracelularmente, inactivando con ello a los antibióticos de  
gentamicina y al XK-62-2.

15 La puesta en práctica de ciertas realizaciones especifi-  
cas de esta invención es ilustrada por los siguientes ejem-  
plos representativos. En los ejemplos, se emplea la forma  
DL del agente acilante.

EJEMPLO 1

Producción de 6'-N-carbobenzoxi-XK-62-2, 2'-N-carbobenzoxi-  
XK-62-2 y 2'-N,6'-N-dicarbobenzoxi-XK-62-2

20 Se disuelven 4,00 g (8,65 milimoles) de XK-62-2 en 92 ml  
de dimetilformamida acuosa al 50 %. A la solución se añade go-  
ta a gota una solución de 3,23 g (12,9 milimoles) de N-bencil-  
oxycarboniloxisuccinimida en 70 ml de dimetilformamida, con  
agitación, mientras se mantiene la temperatura entre 0° y 5°C.  
25 La adición es completa en 3 horas. La mezcla se deja en repo-  
so entre 0 y 5°C durante la noche. Por cromatografía en capa  
fina de gel de sílice (revelador: isopropanol/amoniaco acuoso  
concentrado/cloroformo 4:1:1, reactivo colorante: ninhidrina),  
se confirma la presencia de XK-62-2 que no ha reaccionado ade-  
más de 6'-N-carbobenzoxi-XK-62-2 (Rf: 0,71), 2'-N-carbobenzo-  
30 xi-XK-62-2 (Rf: 0,62) y 2'-N,6'-N-dicarbobenzoxi-XK-62-2

1 (Rf: 0,88).

EJEMPLO 2

Producción de 2'-N,6'-N-dicarbобенzoxi-XK-62-2

5 En este ejemplo, la mezcla de reacción obtenida en el  
Ejemplo 1 anterior se concentra a presión reducida. Al residuo  
resultante se añaden 70 ml de agua y 50 ml de acetato de etilo y la mezcla resultante se agita fuertemente. Después la mezcla se deja en reposo para separarla en dos capas (capa acuosa y capa de acetato de etilo). La capa acuosa se extrae dos veces con 30 ml de acetato de etilo. La capa de acetato de etilo y los extractos se combinan, se secan con sulfato sódico anhidro y se evaporan a sequedad. Como resultado de ello se obtienen 2,24 g de 2'-N,6'-N-dicarbобенzoxi-XK-62-2 en forma de sólido amorfo de color amarillo pálido. Rendimiento: 35,1 %. La muestra así obtenida puede ser directamente empleada como material de partida para la reacción subsiguiente. Sin embargo, si se desea, el producto puede ser purificado además por cromatografía en columna de gel de sílice (revelador: isopropanol/amoniaco acuoso concentrado/cloroformo 4:1:1).

15  
20 El análisis del 2'-N,6'-N-dicarbобенzoxi-XK-62-2 revela lo siguiente:

Punto de fusión: 93-95°C

Rotación específica:  $[\alpha]_D^{18} = +81,6^\circ$  (c = 0,12, metanol).

Espectro de absorción infrarrojo (KBr) ( $\text{cm}^{-1}$ ) [Fig.4]:

25 3800-3000, 2950, 1700, 1540, 1456, 1403, 1310, 1250, 1160, 1050, 1010, 960, 738, 700, 605.

Espectro de resonancia magnética nuclear (en metanol- $\text{d}_4$ )  $\delta$  (en ppm de TMS) [Fig. 1]: 1,13 (3H, singlete), 2,62 (3H, singlete), 3,01 (3H, singlete), 5,30-4,90 (6H, ancho, singlete), 7,43 (5H, singlete), 7,47 (5H, singlete).

30



1  $\delta$  (en ppm de TMS) [Fig. 2]: 1,16 (3H, singlete), 2,61 (3H, singlete), 3,01 (3H, singlete), 5,30-4,90 (4H, multiplete), 7,47 (5H, singlete).

Análisis elemental para  $C_{28}H_{47}N_5O_9 \cdot H_2O$ :

5 Calculado : C, 54,77; H, 7,84; N, 11,13 %

Encontrado: C, 54,91; H, 7,93; N, 10,90 %

#### EJEMPLO 4

##### Producción de 2'-N-carbobenzoxi-XK-62-2

10 Después de la elución del 6'-N-carbobenzoxi-XK-62-2 en el Ejemplo 3, se eluye el 2'-N-carbobenzoxi-XK-62-2 en las fracciones núms. 78-97. Estas fracciones se combinan y concentran a sequedad bajo presión reducida para obtener 1,43 g de 2'-N-carbobenzoxi-XK-62-2 en forma de sólido amorfo incoloro. Rendimiento: 26,7 %. La muestra así obtenida puede ser directamente utilizada como material de partida para la reacción

15 subsiguiente. Sin embargo, si se desea, el producto puede ser purificado más por tratamiento con una resina cambiadora de ión en la forma descrita en el Ejemplo 3.

20 El análisis del 2'-N-carbobenzoxi-XK-62-2 purificado revela lo siguiente:

Punto de fusión: 107-110°C

Rotación específica:  $[\alpha]_D^{25} = +87,80^\circ$  (c = 0,10, agua).

25 Espectro de absorción infrarrojo (KBr) ( $cm^{-1}$ ) [Fig. 6]: 3700-3100, 2930, 1702, 1530, 1451, 1310, 1255, 1141, 1053, 1021, 960, 735, 697, 604.

Espectro de resonancia magnética nuclear (en metanol- $d_4$ ):

30  $\delta$  (en ppm de TMS) [Fig. 3]: 1,13 (3H, singlete), 2,42 (3H, singlete), 2,60 (3H, singlete), 5,13 (4H, singlete ancho), 7,43 (5H, singlete).

Análisis elemental para  $C_{28}H_{47}N_5O_9 \cdot 2H_2O$ :

1           Calculado : C, 53,08; H, 8,06; N, 11,06 %

          Encontrado: C, 53,31; H, 8,16; N, 10,93 %

EJEMPLO 5

5           Producción de éster de N-hidroxisuccinimida del ácido  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -carbobenzoxiaminopropiónico

          Se disuelven 1,0 g (4,2 milimoles) de ácido  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -carbobenzoxiaminopropiónico [el compuesto está descrito en The Carbohydrate Research, Vol. 28, págs. 263-280 (1973)] y 0,48 g (4,2 milimoles) de N-hidroxisuccinimida en 35 ml de acetato de etilo. A la solución se añaden 0,86 g (4,2 milimoles) de dicitclohexilcarbodiimida, con agitación, mientras se mantiene la temperatura a 0-5°C. La mezcla se deja en reposo a la misma temperatura durante la noche. La dicitclohexilurea separada se elimina por filtración. El filtrado resultante se concentra a presión reducida para separar el acetato de etilo. Así se obtienen 1,30 g de éster de N-hidroxisuccinimida del ácido  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -carbobenzoxiaminopropiónico en forma de una materia oleosa transparente e incolora. Rendimiento: 92,0 %. El producto así obtenido puede ser utilizado tal como está para la reacción subsiguiente. Sin embargo, si es necesario, el producto puede ser purificado más por cromatografía en columna y otros métodos conocidos.

          El análisis del producto purificado revela lo siguiente:

          Espectro de absorción infrarrojo (película líquida,  $\text{cm}^{-1}$ ):

25           3700-3100, 2950, 1816, 1780, 1700, 1520, 1320, 1170, 1070, 992, 830-500.

          Espectro de resonancia magnética nuclear (en deuteriocloroformo)  $\delta$  (en ppm de TMS): 2,77 (4H, singlete), 3,67 (2H, multiplete), 4,64 (1H, multiplete), 5,11 (2H, singlete), 5,82 (1H, triplete,  $J = 3,0$  Hz), 7,33 (5H, singlete).

30

1           Análisis elemental para  $C_{15}H_{16}N_2O_7$ :  
          Calculado : C, 53,57; H, 4,76; N, 8,33 %  
          Encontrado: C, 53,42; H, 4,65; N, 8,39 %

EJEMPLO 6

5           Producción de 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -carbобензоxiaminopropionil)-  
          2'-N,6'-N-dicarbобензоxi-XK-62-2

          Se disuelven 740 mg (1,0 milimoles) de 2'-N,6'-N-dicarbo-  
benzoxi-XK-62-2 en 20 ml de dimetilformamida acuosa al 50 %.  
A la solución se añade gota a gota una solución de 403 mg  
10       (1,2 milimoles) de éster de N-hidroxisuccinimida del ácido  
           $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -carbобензоxiaminopropiónico en 15 ml de dimetil-  
formamida, con agitación, mientras se mantiene la temperatura  
entre  $-5^{\circ}$  y  $0^{\circ}C$ . La adición es completa en una hora. Después  
15       la mezcla se deja reaccionar durante la noche. Por cromatogra-  
fía en capa fina de gel de sílice (bajo las mismas condicio-  
nes que en el Ejemplo 1), se detecta la presencia de una pe-  
queña cantidad de subproductos y de 2'-N,6'-N-dicarbобензоxi-  
XK-62-2 que no ha reaccionado además de 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -car-  
bобензоxiaminopropionil)-2'-N,6'-N-dicarbобензоxi-XK-62-2  
20       (Rf: 0,95). La mezcla de reacción se concentra a presión redu-  
cida para obtener un residuo ligeramente amarillento. El resi-  
duo se utiliza para la reacción subsiguiente sin purificación.  
Si se desea, el producto puede ser purificado por cromatogra-  
fía en columna de gel de sílice de la misma forma que en el  
25       Ejemplo 1.

EJEMPLO 7

Producción de 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -carbобензоxiaminopropionil)-2'-  
          N-carbобензоxi-XK-62-2

          Se disuelven 633 mg (1,0 milimoles) de 2'-N-carbобензо-  
30       xi-XK-62-2 en 20 ml de dimetilformamida acuosa al 50 %. A la

1 solución se añade gota a gota una solución de 403 mg (1,2 milimoles) de éster de N-hidroxisuccinimida del ácido  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -carbобензоxiaminopropiónico en 15 ml de dimetilformamida, con agitación, mientras se mantiene la temperatura entre  
5  $-5^{\circ}$  y  $0^{\circ}\text{C}$ . La adición es completa en una hora. Después la mezcla se deja reaccionar durante la noche. Por cromatografía en capa fina del gel de sílice (bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo 1), se detecta la presencia de una pequeña cantidad de subproductos y 2'-N-carbобензоxi-XK-62-2 que no ha  
10 reaccionado además de 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -carbобензоxiaminopropionil)-2'-N-carbобензоxi-XK-62-2 (Rf: 0,83). La mezcla de reacción se concentra a presión reducida para obtener un residuo ligeramente amarillento. El residuo se utiliza para la reacción subsiguiente sin purificación. Si se desea, el producto  
15 puede ser purificado por cromatografía en columna de gel de sílice de la misma manera que en el Ejemplo 1.

EJEMPLO 8

Producción de 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -carbобензоxiaminopropionil)-6'-N-carbобензоxi-XK-62-2

20 Se disuelven 615 mg (1,0 milimoles) de 6'-N-carbобензоxi-XK-62-2 en 20 ml de dimetilformamida acuosa al 50 %. A la solución se añade gota a gota una solución de 403 mg (1,2 milimoles) de éster de N-hidroxisuccinimida del ácido  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -carbобензилoxiaminopropiónico en 15 ml de dimetilformamida,  
25 con agitación, mientras se mantiene la temperatura entre  $-5^{\circ}$  y  $0^{\circ}\text{C}$ . La adición es completa en una 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 Ejemplo 1), se detecta la presencia de una pequeña cantidad  
30 de subproductos y 6'-N-carbобензоxi-XK-62-2 que no ha reaccio-

1 nado además de 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -carbобензоxiaminopropionil)-  
6'-N-carbобензоxi-XK-62-2 (Rf: 0,87). La mezcla de reacción  
se concentra a presión reducida para obtener un residuo lige-  
ramente amarillento. El residuo se utiliza para la reacción  
5 subsiguiente sin purificación. Si se desea, el producto pue-  
de ser purificado por tratamiento con una resina cambiadora  
de ión en la forma descrita en el Ejemplo 3.

EJEMPLO 9

Producción de 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropionil)-XK-62-2

10 El residuo obtenido en el Ejemplo 6 conteniendo 1-N-( $\alpha$ -  
hidroxi- $\beta$ -carbобензоxiaminopropionil)-2'-N,6'-N-dicarbобензо-  
xi-XK-62-2 como componente principal se disuelve en 20 ml de  
metanol acuoso al 20 %. A la solución se añaden 1,0 ml de  
ácido acético y la mezcla se somete a hidrogenolisis en pre-  
15 sencia de 120 mg de catalizador de paladio al 5 % en carbón  
activo, a la temperatura ambiente y a la presión atmosférica,  
durante 6 horas. Por cromatografía en capa fina de gel de sí-  
lice (revelador: isopropanol/amoniaco acuoso concentrado/clo-  
roformo 2:1:1. reactivo colorante: ninhidrina), se confirma  
20 la presencia de 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropionil)-XK-62-2 (Rf:  
0,42) como componente principal, sus isómeros de posición y  
una pequeña cantidad de XK-62-2 (debido al 2'-N,6'-N-dicarbo-  
benzoxi-XK-62-2 que no ha reaccionado en el Ejemplo 6). El  
catalizador se separa por filtración y el filtrado se concen-  
25 tra a presión reducida. El residuo se disuelve después en 10 ml  
de agua y la solución se carga en una columna (diámetro: 1,5  
cm) de 70 ml de resina cambiadora de ión, Amberlite CG-50  
(forma amónica). La columna se lava con 200 ml de agua y des-  
pués se hace pasar a través de la columna amoniaco acuoso 0,2N  
30 para recuperar XK-62-2 (58 mg). La elución se realiza con amo-

1 niaco acuoso 0,4N mientras se controlan los componentes por  
cromatografía en capa fina. Las fracciones que contienen 1-N-  
( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropionil)-XK-62-2 (Rf: 0,42) como único  
5 componente se combinan y evaporan a sequedad bajo presión re-  
ducida para obtener 371 mg de un sólido amorfo incoloro. Ren-  
dimiento: 58,1 % a partir de 2'-N,6'-N-dicarbobenzoxi-XK-62-2.

El análisis del producto revela lo siguiente:

Punto de fusión: 149-152°C (descompone a 160°C).

Rotación específica:  $[\alpha]_D^{18} = +91,5^\circ$  (c = 0,106, agua).

10 Espectro de absorción infrarrojo (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) [Fig. 7]:  
3800-3000, 2930, 1650, 1570, 1480, 1385, 1330, 1110, 1052,  
1020, 813.

Análisis elemental para  $\text{C}_{23}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_9 \cdot \text{H}_2\text{CO}_3 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ :

Calculado : C, 45,07; H, 7,98; N, 13,14 %

15 Encontrado: C, 45,21; H, 7,71; N, 13,32 %

#### EJEMPLO 10

#### Producción de 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropionil)-XK-62-2

El residuo obtenido en el Ejemplo 7 conteniendo 1-N-( $\alpha$ -  
hidroxi- $\beta$ -carbobenzoxiaminopropionil)-2'-N-carbobenzoxi-XK-62-2  
20 como componente principal se disuelve en 20 ml de metanol acu-  
so al 20 %. A la solución se añaden 1,0 ml de ácido acético y  
la mezcla se somete a hidrogenolisis en presencia de 110 mg  
de catalizador de paladio al 5 % en carbón activo, a la tempe-  
ratura ambiente y a la presión atmosférica, durante 6 horas.  
25 Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se tra-  
ta de la forma descrita en el Ejemplo 9 para obtener 397 mg  
de 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropionil)-XK-62-2. Rendimiento: 62,1%  
a partir de 2'-N-carbobenzoxi-XK-62-2.

EJEMPLO 11

Producción de 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropionil)-XK-62-2

El residuo obtenido en el Ejemplo 8 conteniendo 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -carbобензоxiaminopropionil)-6'-N-carbобензоxi-XK-62-2 como componente principal se disuelve en 20 ml de metanol acuoso al 20 %. A la solución se añaden 1,0 ml de ácido acético y la mezcla se somete a hidrogenólisis en presencia de 110 mg de catalizador de paladio al 5 % en carbón activo, a la temperatura ambiente y a la presión atmosférica durante 6 horas. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se trata de la misma forma que en el Ejemplo 9 para obtener 243 mg de 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropionil)-XK-62-2. Rendimiento: 38,1 % a partir de 6'-N-carbобензоxi-XK-62-2.

EJEMPLO 12

Producción de monosulfato de 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropionil)-XK-62-2

Se disuelven 6,39 g (10 milimoles) de 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropionil)-XK-62-2 en 20 ml de agua. A la solución se añade una solución de 0,98 g (10 milimoles) de ácido sulfúrico en 5,0 ml de agua, con enfriamiento. Al cabo de 30 minutos se añade etanol frío a la solución hasta que la precipitación es completa. El precipitado blanco se separa por filtración para obtener el monosulfato de 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropionil)-XK-62-2.

EJEMPLO 13

Producción de 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -carbобензоxiaminopropionil)-XK-62-2

Se disuelven 2,79 g (6,0 milimoles) de XK-62-2 en 50 ml de dimetilformamida acuosa al 50 %. A la solución se añade go-

1 ta a gota una solución de 2,82 g (8,4 milimoles) de éster de  
N-hidroxisuccinimida del ácido  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -carbобензоxiamino-  
propiónico en 20 ml de dimetilformamida, con agitación, man-  
5 teniendo la temperatura entre  $-5^{\circ}\text{C}$  y  $0^{\circ}\text{C}$ . La adición es com-  
pleta en una hora. La mezcla se deja reaccionar durante la  
noche. Por cromatografía en capa fina de gel de sílice (reve-  
lador: isopropanol/amoniaco acuoso concentrado/cloroformo  
4:1:1, reactivo colorante: ninhidrina), se detecta la presen-  
cia de 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -carbобензоxiaminopropionil)-XK-62-2  
10 (Rf: 0,63), subproductos y XK-62-2 que no ha reaccionado. La  
mezcla de reacción se concentra a presión reducida para obte-  
ner un residuo ligeramente amarillento que contiene 1-N-( $\alpha$ -hi-  
droxi- $\beta$ -carbобензоxiaminopropionil)-XK-62-2. El residuo se uti-  
liza para la reacción subsiguiente sin purificación.

15

EJEMPLO 14

Producción de 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropionil)-XK-62-2

Se disuelve el residuo obtenido en el Ejemplo 13 en 40 ml  
de metanol acuoso al 50 %. A la solución se añaden 0,6 ml de  
ácido acético y la mezcla se somete a hidrogenólisis en presen-  
20 cia de 250 mg de catalizador de paladio al 5 % en carbón acti-  
vo, a la temperatura ambiente y a la presión atmosférica, du-  
rante 6 horas. Por cromatografía en capa fina de gel de sílice  
(revelador: isopropanol/amoniaco acuoso concentrado/cloroformo  
2:1:1), se confirma la presencia de 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -ami-  
25 nopropionil)-XK-62-2, sus isómeros de posición y una pequeña  
cantidad de XK-62-2. El catalizador se separa por filtración  
y el filtrado se concentra a presión reducida. Al residuo se  
añaden 15 ml de agua y la solución se carga en una columna  
(diámetro: 2,5 cm) que contiene 150 ml de una resina cambiado-  
30 ra de ión, Amberlite CG-50 (forma amónica). La columna se lava

1 con 200 ml de agua y después se hace pasar a través de la columna amoniaco acuoso 0,2N para recuperar XK-62-2 (116 mg).  
La elución se realiza con amoniaco acuoso 0,4N mientras se controlan los componentes por cromatografía en capa fina. Se  
5 combinan las fracciones que contienen 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropionil)-XK-62-2 (Rf: 0,42) como único componente y se evapora a sequedad bajo presión reducida para obtener 586 mg de un sólido amorfo incoloro. Rendimiento: 15,3 %.

El análisis del producto revela lo siguiente:

10 Punto de fusión: 149-152°C (se descompone a 160°C).

Rotación específica:  $[\alpha]_D^{18} = +91,5^\circ$  (c = 0,106, agua).

Espectro de absorción infrarrojo (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3800-3000, 2930, 1650, 1570, 1480, 1385, 1330, 1110, 1052, 1020, 813.

Análisis elemental para  $\text{C}_{23}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_9 \cdot \text{H}_2\text{CO}_3 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ .

15 Calculado : C, 45,07; H, 7,98; N, 13,14 %

Encontrado: C, 45,31; H, 7,54; N, 13,13 %

#### EJEMPLO 15

##### Producción de 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropionil)-XK-62-2

20 Se disuelven 926 mg (2,0 milimoles) de XK-62-2 en 100 ml de dimetilformamida acuosa al 50 %. A la solución se añade gota a gota una solución de 1,18 g (5,4 milimoles) de N-etoxicarbonilftalimida en 10 ml de dimetilformamida, con agitación, mientras se mantiene la temperatura a 20-25°C. La adición es completa en 15 minutos. La mezcla se deja reaccionar  
25 durante la noche. La mezcla de reacción contiene 2'-N-ftaloil-XK-62-2 como componente principal y se utiliza para la reacción subsiguiente sin aislamiento ni purificación.

30 A la mezcla de reacción se añade gota a gota una solución de 1,05 g (3,2 milimoles) de éster de N-hidroxisuccini-

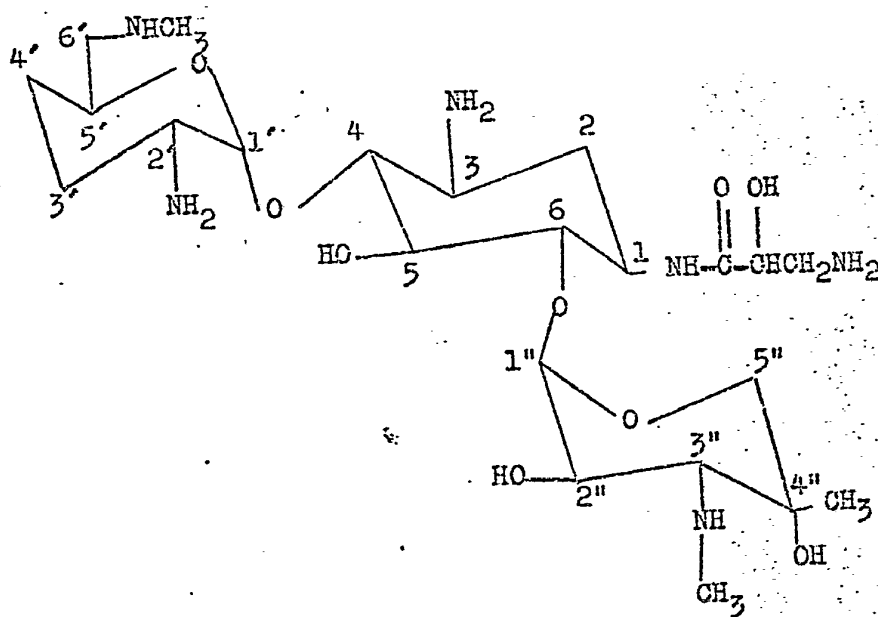
1 mida del ácido  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -N-ftaloilpropiónico en 10 ml  
de dimetilformamida, mientras se mantiene la temperatura  
a 20-25°C. La adición es completa en 15 minutos. La mez-  
5 cla se deja reaccionar durante la noche. Así se obtiene  
una mezcla de reacción que contiene 2'-N-ftaloil-1-N-( $\alpha$ -  
hidroxi- $\beta$ -N-ftaloilpropionil)-XK-62-2, como principal compo-  
nente.

10 A la mezcla de reacción se añade después gota a  
gota una solución de 12,9 g de hidrazina acuosa al 80 %  
en 70 ml de metanol, mientras se mantiene la temperatura  
15 a 10-15°C. La adición es completa en 30 minutos. La mez-  
cla se deja reaccionar durante la noche para eliminar el  
grupo ftaloilo. La mezcla de reacción se concentra a pre-  
sión reducida y el residuo resultante se disuelve en  
20 20 ml de agua. Por cromatografía en columna empleando  
Amberlite CG-50 (forma amónica) bajo las mismas con-  
diciones que en el Ejemplo 14, se obtienen  
25 685,5 mg del 1-N-( $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropionil)-  
XK-62-2 deseado. Rendimiento: 53,7 %.

En resumen, la Patente de Invención que se so-  
licita, deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento para la producción de un nuevo derivado de antibiótico XK -62-2 de fórmula:



que consiste en acilar un compuesto seleccionado del grupo formado por el antibiótico XK-62-2 de fórmula:

25

30

1

5

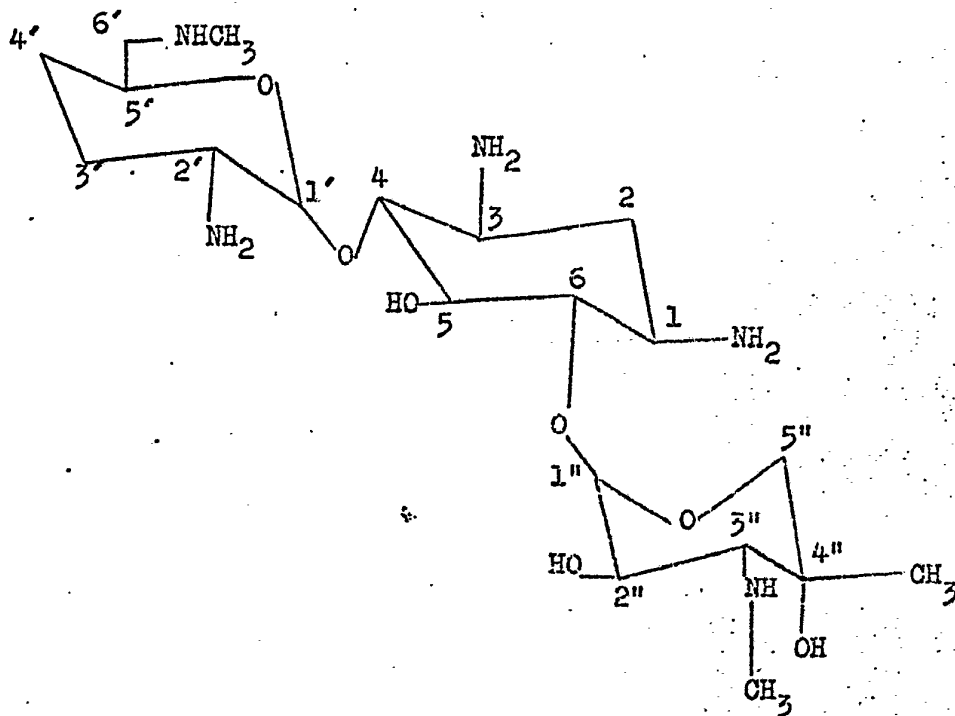
10

15

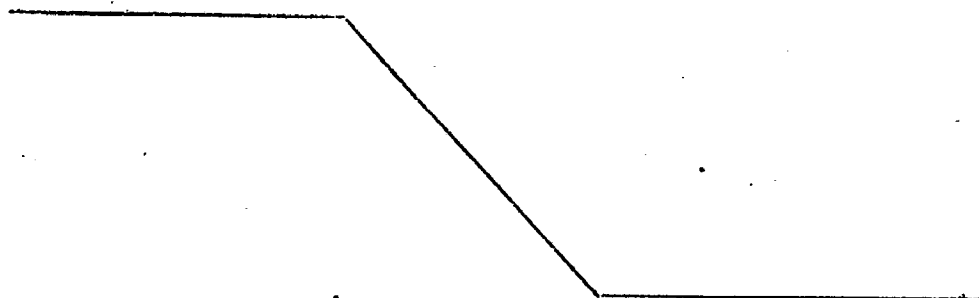
20

25

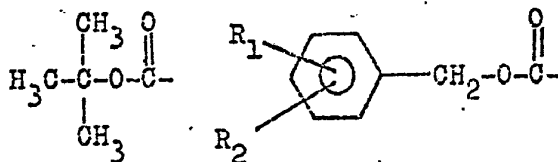
30



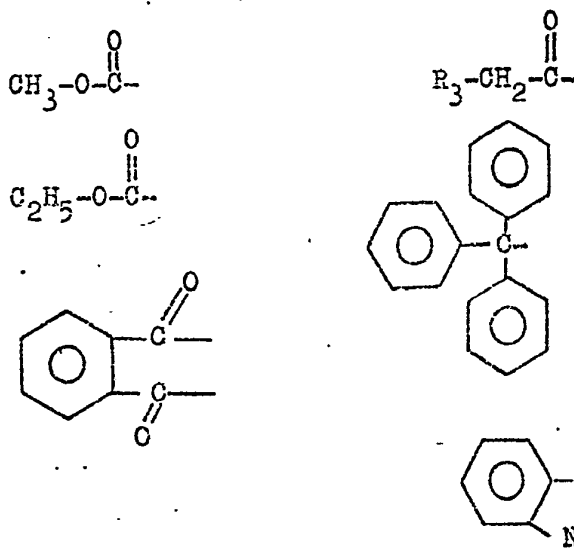
y los derivados del mismo cuando por lo menos unos de los grupos amino unidos a los átomos de carbono de las posiciones 2' y 6' está protegidos por un grupo protector de amino con 0,4 a 2,5 moles de un agente acilante por mol de compuesto de partida, capaz de introducir un grupo  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -amino sustituido-propionilo, donde dicho grupo  $\beta$ -amino está sustituido con un grupo protector seleccionado entre el grupo formado por:



1



5



10

15

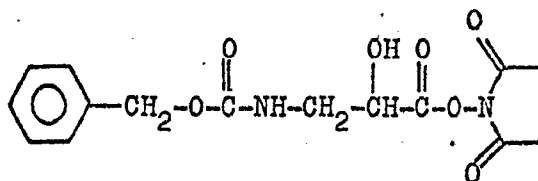
donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> pueden ser iguales o diferentes y representan H, OH, NO<sub>2</sub>, Cl, Br, I, grupos alquilos de 1 a 5 átomos de carbono o grupo alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono y R<sub>3</sub> es H, F, Cl, Br, I o un grupo alquilo de 1 a 5 átomos de carbono, en un disolvente a una temperatura de -50 a 50°C, para introducir dicho grupo α-hidroxi-β-amino sustituido-propionilo en el grupo amino ligado al átomo de carbono de la posición 1 de dicho compuesto de partida y después eliminar dicho grupo protector.

25

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, donde dicho agente acilante está seleccionado entre ácido α-hidroxi-β-amino sustituido-propiónico y sus derivados que poseen capacidad acilante.

30

3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, donde dicho agente acilante es:



5 4.- Un procedimiento según la reivindicación 1, donde dicha temperatura de reacción está comprendida entre -20° y 20°C y se emplean de 0,7 a 1,5 moles de agente acilante por mol de compuesto de partida.

10 5.- Un procedimiento según la reivindicación 1, donde dicho grupo protector es un grupo benciloxycarbonilo y la eliminación se lleva a cabo por hidrogenolisis.

15 6.- Un procedimiento según la reivindicación 1, donde dicho grupo protector es un grupo ftalcilo y la eliminación se realiza con hidrazina.

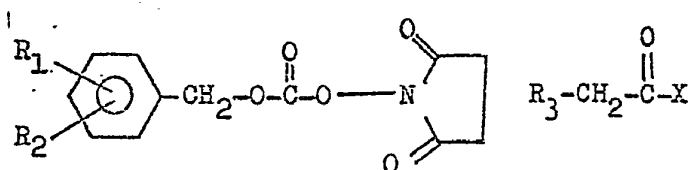
20 7.- Un procedimiento según la reivindicación 1, donde dicho disolvente de reacción está seleccionado entre el grupo formado por tetrahidrofurano, dimetilformamida, dimetilacetamida, alcoholes inferiores, dioxano, éter dimetilico de etilenglicol, piridina y agua.

25 8.- Un procedimiento según la reivindicación 1, donde dicho antibiótico XK-62-2 se hace reaccionar con un reactivo protector de amino en un disolvente adecuado para proteger los grupos amino unidos a los átomos de carbono de las posiciones 2' y/o 6' del XK 62-2.

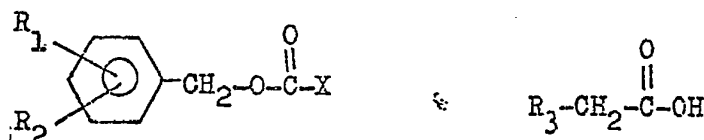
30 9.- Un procedimiento según la reivindicación 8, donde dicho reactivo protector del amino está seleccionado entre el grupo formado por:

---

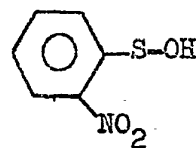
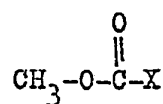
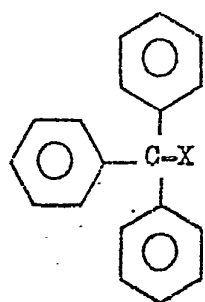
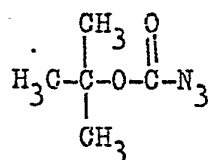
1



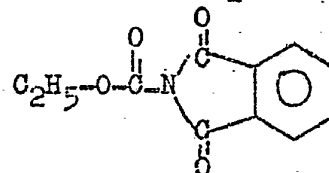
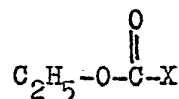
5



10



15



20

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, grupos alcoxi de 1 a 5 átomos de carbono;  $R_3$  es H, F, Cl, Br, I o un grupo alquilo es 1 a 5 átomos de carbono y X es Cl, Br o I.

25

10.- Un procedimiento según la reivindicación 8, donde dicho disolvente de la reacción de protección del grupo amino está seleccionado entre el grupo formado por tetra hidrofurano, dietilacetamida, dimetilformamida, alcoholes inferiores, dioxano, éter dimetilico de etilenglicol, piridina y agua.

30

1

11.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:  
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UN NUEVO DERIVADO DE ANTIBIOTICO XK-62-2.

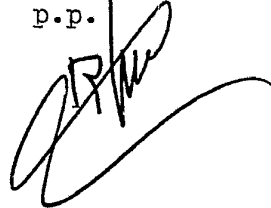
5

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

Madrid, 6 de Marzo de 1.975

BERNARDO UNGRIA

P.P.



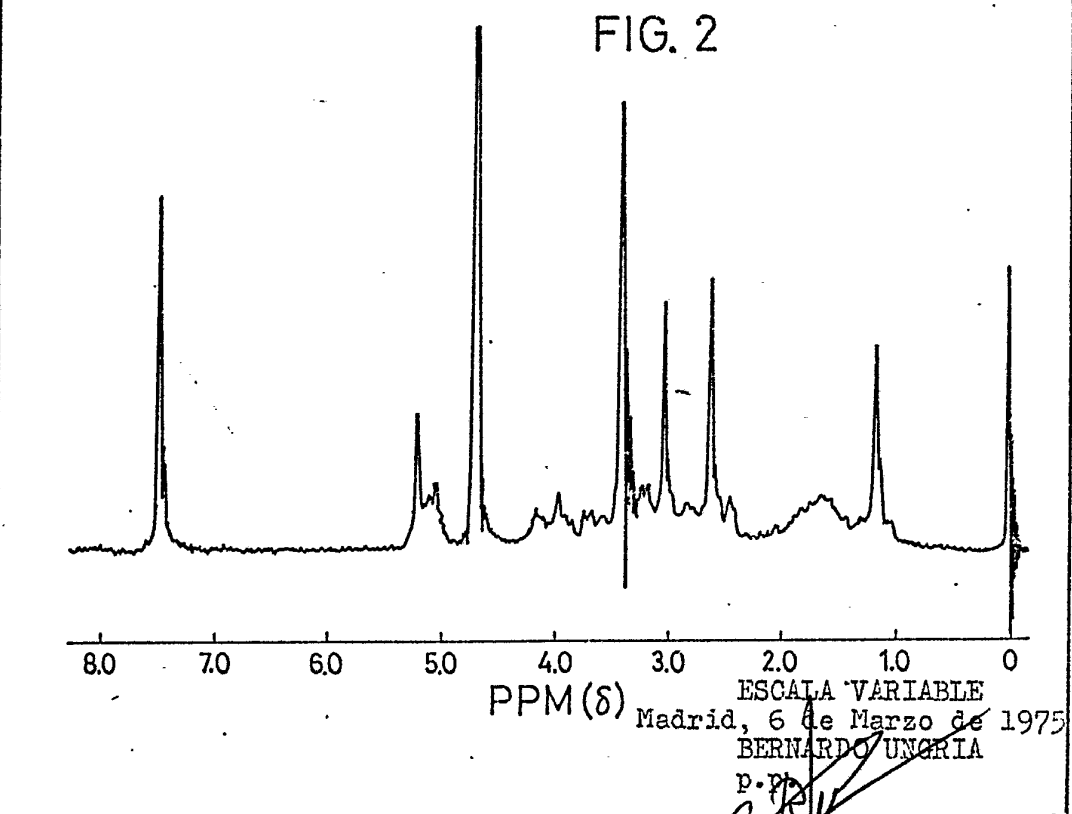
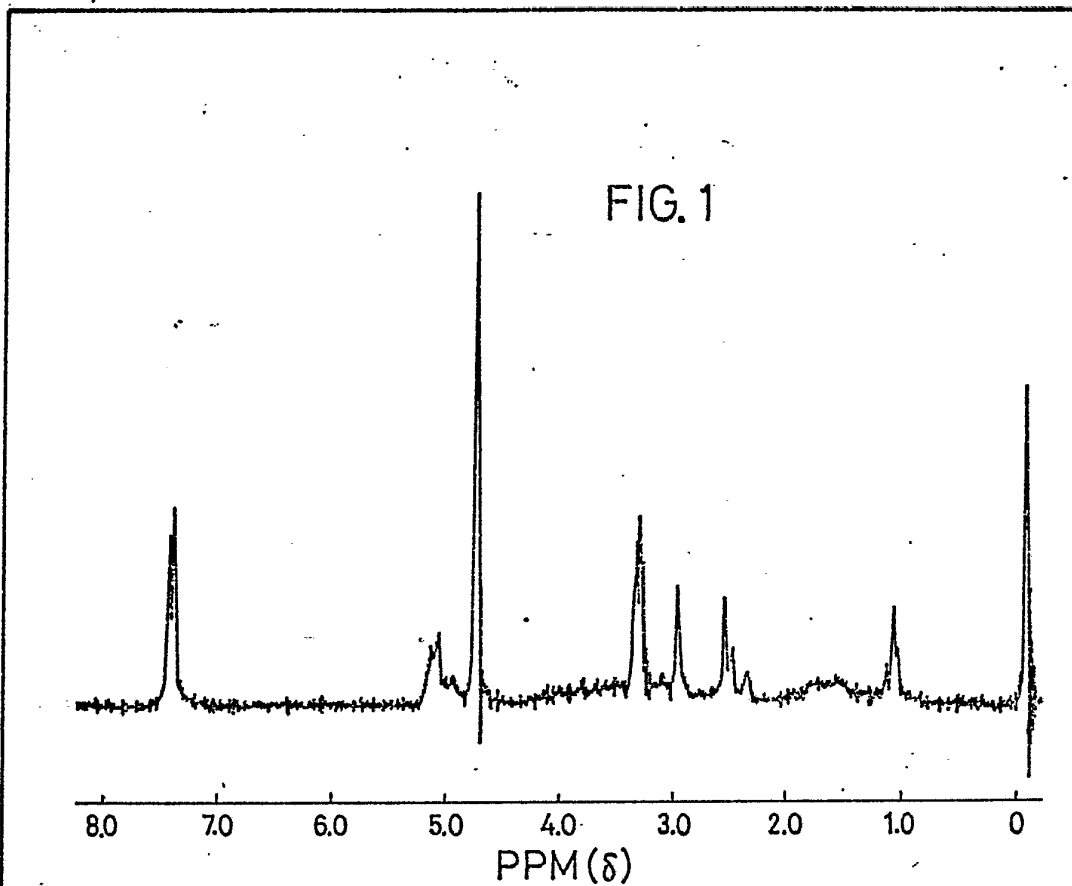
10

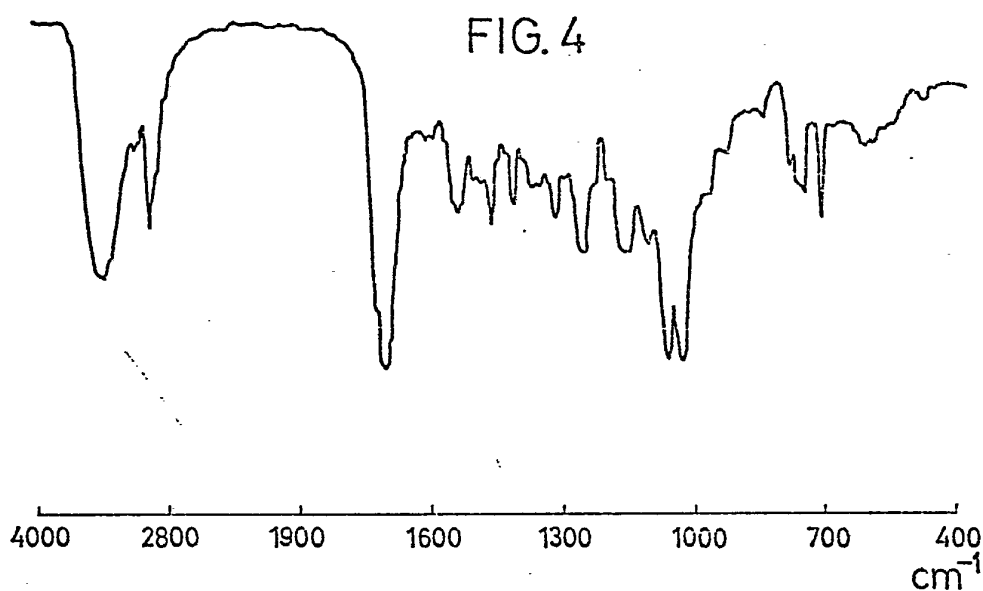
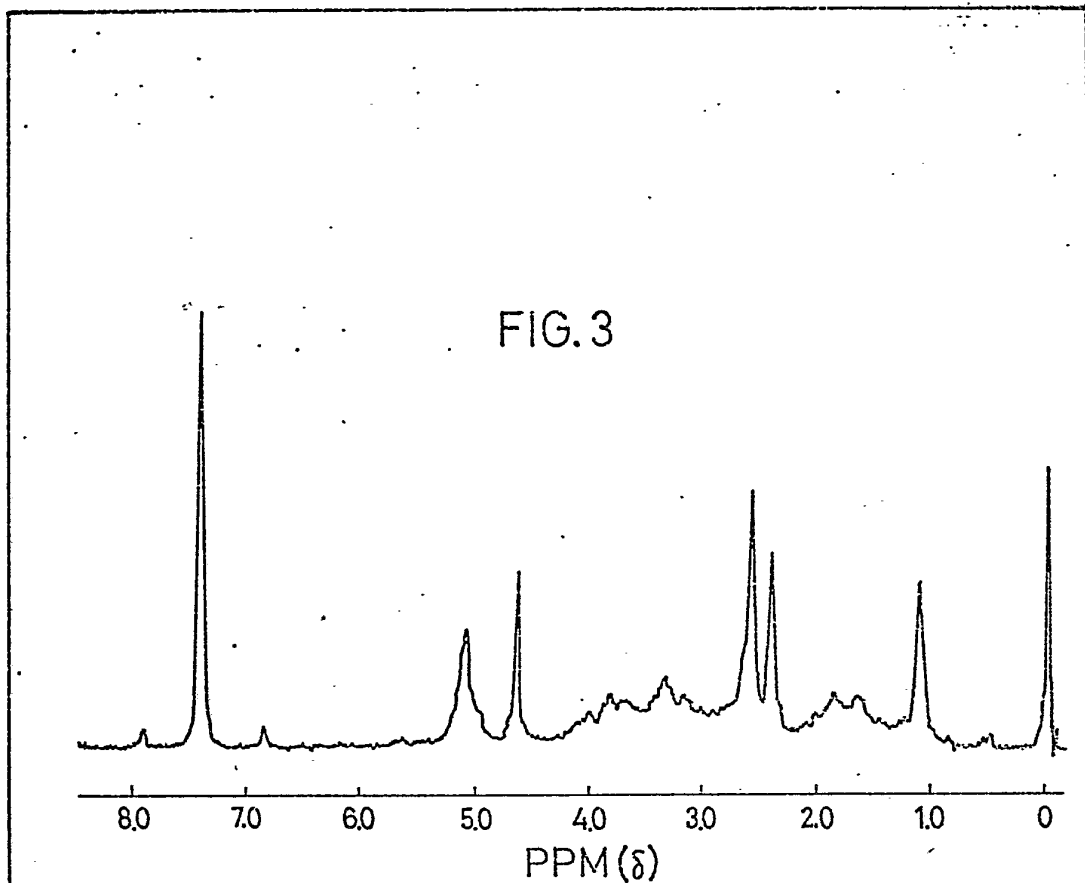
15

20

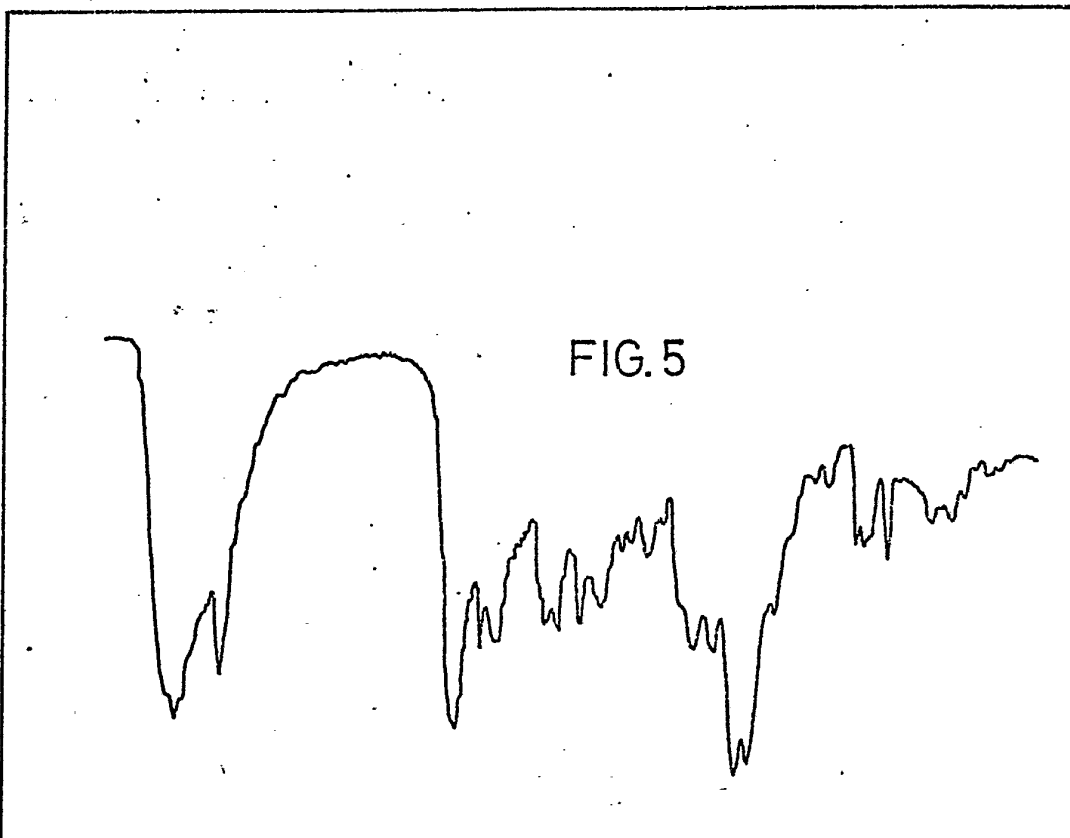
25

30

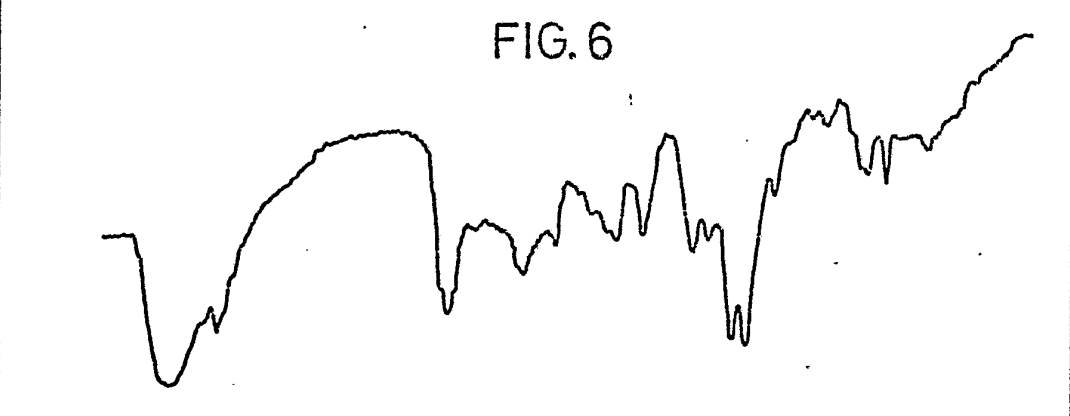




ESCALA VARIABLE  
Madrid, 6 de Marzo de 1975  
BERNARDO UNGRIA  
p.p.



4000 2800 1900 1600 1300 1000 700 400  $\text{cm}^{-1}$



4000 2800 1900 1600 1300 1000 700 400  $\text{cm}^{-1}$

ESCALA VARIABLE  
Madrid, 6 de Marzo de 1975  
BERNARDO UNGRIA  
p.p.

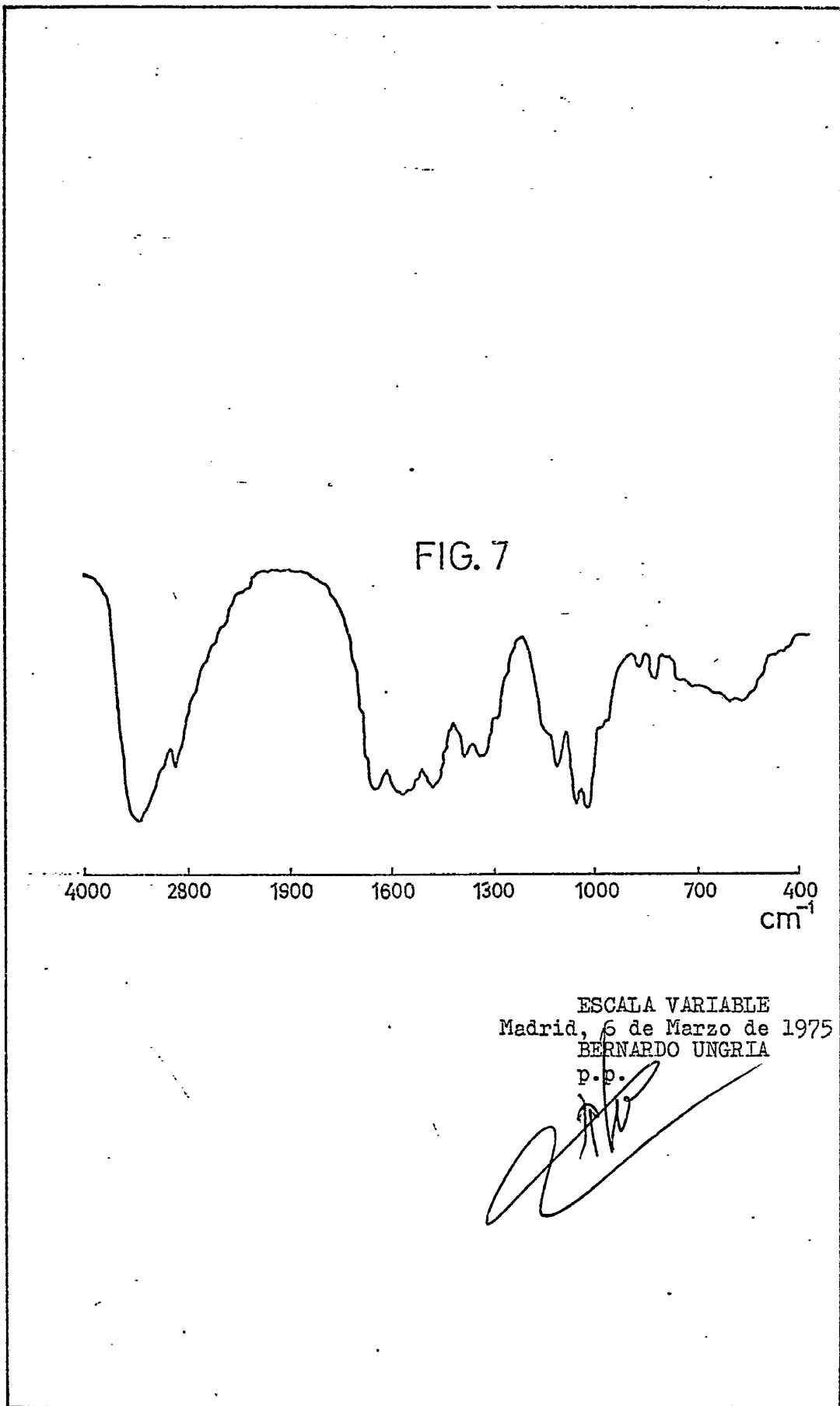


FIG. 7

ESCALA VARIABLE  
Madrid, 6 de Marzo de 1975  
BERNARDO UNGRIA  
p.p.