

442051

PATENTE DE INVENCION

PLC 220(PC.5643)

Int. Cl.: C07D//A61K

Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR AMINOGLICOSIDOS DE
2-DEOXIESTREPTANINA.

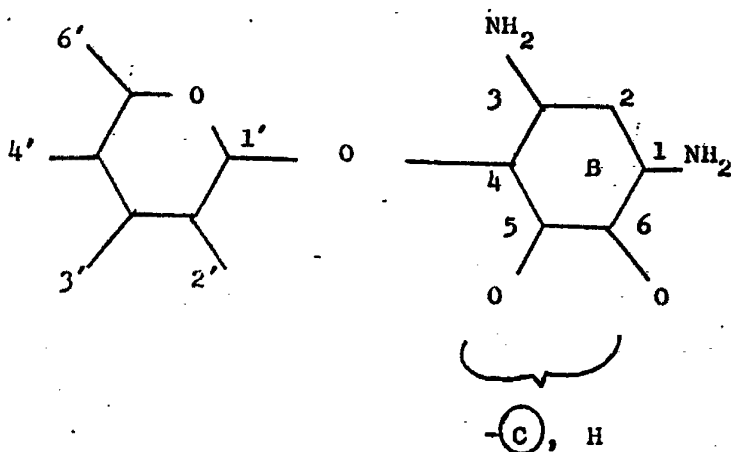
Solicitante: PFIZER CORPORATION, entidad panameña, residente
en Calle 15 1/2 Avenida de Santa Isabel, Colon,
República de Panama.

Esta invención se relaciona
con un procedimiento para preparar agentes anti-
bacteriales, en particular para preparar una nueva
clase de aminoglicosidos de 2-deoxiestreptamina
antibacteriales.

La mayoría de los amino glicosidos de 2-deoxiestreptamina de origen natural tienen en común una estructura de tres anillos que puede representarse por la siguiente fórmula general:

5

10



15

en donde el anillo A es el esqueleto de un grupo hexopiranososa que tiene un grupo amino en las posiciones 2' y/o 6', el anillo B es el grupo 2-deoxiestreptamina y el anillo C representa un grupo glicosilo unido por un enlace glicosidico a la posición 5 ó 6 del anillo estreptamina, estando ocupada la otra posición por un grupo hidroxilo.

20

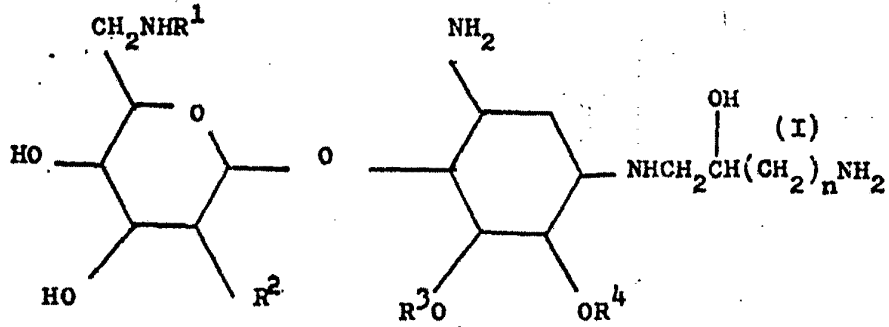
25

Los nuevos agentes antibacteriales de la invención son una serie de aminoglicosidos de 2-deoxiestreptamina que tiene un sustituyente β -hidroxi- ω -aminoalquilo en el grupo 1-amino y que tiene un grupo glicosilo unido a la posición 5 ó 6 del anillo estreptamina B. Tales compuestos son eficaces en el tratamiento de diversas infecciones bacteriales gram-positivas o gram-negativas, incluyendo infecciones del tracto urinario, en animales, incluyendo personas, y poseen ventajas, en su empleo, con respecto a los aminoglicósidos de 2-deoxiestreptamina que tienen un grupo

30

amino insustituido en la posición 1 del anillo 2-deoxis-treptamina B, tales como la canamicina A y B, de origen natu-
ral, neomicinas y ribostamicina.

Por consiguiente, según la invención,
se proporcionan nuevos compuestos de fórmula general:



en la que R^1 es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior; R^2 es un grupo amino o hidroxilo; uno de los grupos R^3 y R^4 es un átomo de hidrógeno, mientras que el otro representa un grupo glicosilo como mas adelante se define; y n es 1, 2 ó 3; y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables.

Cuando R^4 representa un grupo glicosilo, dicho grupo puede ser un grupo hexopiranosilo simple, conteniendo preferiblemente un grupo amino, por ejemplo un grupo 3-amino-3-deoxi- α -D-glucopiranosilo como se encuentra en la canamicina A y B. Cuando R^3 representa un grupo glicosilo, dicho grupo es generalmente un grupo pentofuranosilo, opcionalmente enlazado a otro grupo hexopiranosilo mediante un enlace glicosídico adicional. Por ejemplo, R^3 puede ser un grupo β -D-ribofuranosilo, como se encuentra en la ribostamicina.

El grupo alquilo inferior significa un grupo con 1 a 4 átomos de carbono que puede ser de cadena

POOR
QUALITY

recta o ramificada.

Un grupo particular de compuestos según la invención, comprende el grupo en el cual R^1 es un átomo de hidrógeno y n es 1 o 2.

5

Una clase preferida de compuestos según la invención, comprende aquellos compuestos en donde R^3 es un átomo de hidrógeno y R^4 es un grupo 3-amino-3-deoxi- α -D-glucopiranosilo, es decir derivados de canamicina A y B.

10

También se prefieren los compuestos en los cuales el grupo β -hidroxi- ω -aminoalquilo en la posición 1-N tiene la configuración (S) y n es 2 o 3. R^1 es preferiblemente un átomo de hidrógeno o un grupo metilo. Compuestos individuales particularmente preferidos, según la invención, incluyen 1-N- γ (S)-4-amino-2-hidroxi-butiril- γ -canamicina A y 1-N- γ (S)-5-amino-2-

15

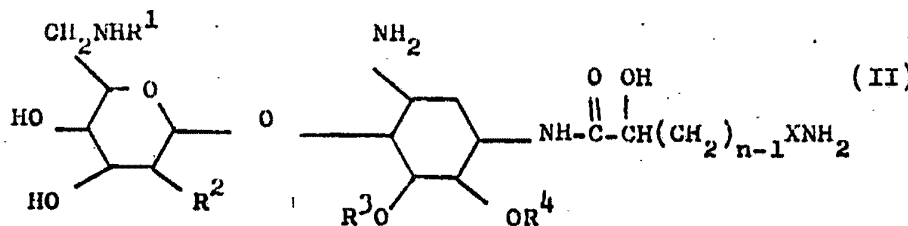
hidroxi-pentil- γ -canamicina A.

Las sales de adición farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención, son aquellas formadas a partir de ácidos que forman sales de adición de ácido no tóxicas, conteniendo aniones farmacéuticamente aceptables, tales como hidrocioruro, hidrobromuro, hidroyoduro, sulfato o disulfato, fosfato o fosfato ácido, acetato, maleato, fumarato, oxalato, lactato, tartrato, citrato, gluconato, sacarato, p-tolueno sulfonato y carbonato.

20

El procedimiento de la invención para preparar los nuevos compuestos de fórmula (I), comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula:

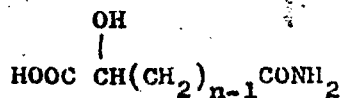
25



productos mediante una técnica cromatografica convencional.

Muchos de los compuestos de fórmula (II) en donde X es CH₂ son antibióticos conocidos ya descritos, por ejemplo N-1-(4-amino-2-hidroxi-butiril) canamicina A, que viene indicada tambien como BB-K8, se describe en la patente USA nº 3.781.268. Otros ejemplos se describen en las patentes USA nos. 3.781.268, 3.541.078 y 3.860.574 y en la solicitud de patente alemana publicada nº 2.350.203 y 2.322.576. Los derivados 1-N-(5-amino-2-hidroxi-valeril) y 1-N-(3-amino-2-hidroxi-propionil) de canamicina A y B se describen en la solicitud de patente alemana publicada nº 2.408.666 y en J. Antibiotics 1974, 27, 851. Los derivados 6'-N-alquilo se describen en la solicitud de patente alemana publicada nº 2.350.169 y en J. Antibiotics, 1975, 28, 583.

Los compuestos de fórmula (II) en donde X es CO, pueden prepararse por acilación del grupo 1-amino de aminoglicosidos de 2-deoxiestreptamina, por métodos analogos a los utilizados en la preparación de compuestos de fórmula (II) en donde X es CH₂, pero utilizando como agente acilante un derivado reactivo de un ácido de fórmula:



Los nuevos compuestos de fórmula (I), según la invención, pueden existir en diversas formas conformacionales, y la invención no se limita a cualquiera de tales formas.

Generalmente, los anillos A y B son cada uno del tipo "silla" y cada una de las mitades R², OR³ y OR⁴ y los grupos amino e hidroxilo, están dispuestos ecuatorialmente con respecto a los anillos A y B. Por otra

parte, el enlace glicosídico entre el anillo hexopiranosilo A y el anillo 2-deoxiestreptamina B, es mas normalmente un enlace alfa con respecto al primero, particularmente cuando los compuestos de fórmula (II) se derivan de aminoglicosidos de 2-deoxiestreptamina de origen natural. En adición, el grupo β -hidroxi-~~W~~aminoalquilo en N-1 puede existir en la configuración S o R o puede estar presente como una mezcla de ambos isómeros ópticos.

La evaluación in vitro de los compuestos de la invención como agentes antibacteriales, ha sido llevada a cabo determinando la concentración inhibitoria mínima (M.I.C.) del compuesto del ensayo en un medio adecuado en el cual deja de ocurrir el crecimiento del microorganismo particular. En la práctica, se inoculan placas de agar, en las cuales se ha incorporado un compuesto del ensayo, en una concentración particular, con un número convencional de células del microorganismo del ensayo y cada placa se incuba entonces durante 24 horas a 37°C. Entonces, las placas se observan en cuanto a la presencia o ausencia de crecimiento de bacterias y se anota el valor MIC adecuado. Los microorganismos usados en tales ensayos incluyen tipos de las cepas Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus y Streptococcus faecalis.

La evaluación in vivo de los compuestos, ha sido efectuada también para los compuestos mas activos, administrandolos subcutaneamente a ratones que estan expuestos a una cepa de Escherichia coli. Cada compuesto se administra en una serie de niveles de dosificación a grupos de ratones y se determina su actividad como el nivel en el cual proporciona una protección del 50% contra el efecto letal

del organismo Escherichia coli, en un periodo de 72 horas.

Para su empleo en personas, los compuestos antibacteriales de la invención pueden administrarse por sí solos pero en general se administrarán en mezcla con un vehículo farmacéutico elegido con respecto a la vía proyectada de administración y práctica farmacéutica convencional. Por ejemplo, se pueden administrar oralmente en forma de tabletas que contienen excipientes tales como almidón o lactosa, o en cápsulas bien solos o bien en mezcla con excipientes, o en forma de elixires o suspensiones que contienen agentes sazonantes o colorantes. También se pueden inyectar parenteralmente, por ejemplo intravenosa, intramuscular o subcutáneamente. Para la administración parenteral, se utilizan mejor en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otros solutos, por ejemplo sales o glucosa suficiente para hacer que la solución sea isotónica.

Para la administración a personas, se supone que el nivel de dosificación diario de los compuestos antibacteriales de la invención será comparable con aquel de los agentes antibacteriales de aminoglicósidos corrientemente en uso, por ejemplo de 0,1 a 50 mg/kg (en dosis divididas) cuando se administra por vía parenteral, o de 10 a 100 mg/kg (en dosis divididas) cuando se administra por vía oral. De este modo, se puede decir que las tabletas ó cápsulas de los compuestos pueden contener de 0,1 a 1 g de compuesto activo para su administración oral hasta 4 veces por día, mientras que las unidades de dosificación para la administración parenteral contendrán de 10 a 500 mg de compuesto activo. En cualquier caso, será el médico quien determine la dosis real que debe ser más adecuada para un paciente

en particular y variará con la edad, peso y respuesta de dicho paciente. Las dosis anteriores son ejemplificativas del sustrato medio. Naturalmente, existen casos individuales en donde se utilizaran dosis superiores o inferiores, cayendo dicha situación dentro del alcance de esta invención.

A continuación se mencionan ejemplos de la preparación de los nuevos compuestos de la invención. Las temperaturas se ofrecen en °C. "Amberlite" es una marca registrada.

EJEMPLO 1

Se disuelven 150 mg de 1-N-(S)-4-amino-2-hidroxi-butiril-7-canamicina A (BB-K8, preparado como se describe en la patente USA nº 3.781.268) en 10 ml de ácido trifluoroacético anhidro a 0°C. La solución se evapora hasta sequedad in vacuo y se seca bajo elevado vacío a 20°C durante 15 minutos, para producir un sólido vítreo. Este se recibe en 5 ml de tetrahidrofurano seco y se añade en porciones una solución 1M de diborano en 20 ml de tetrahidrofurano, bajo una atmósfera de nitrógeno. La solución clara resultante se calienta a 50° durante 3 horas, se deja reposar a temperatura ambiente durante 16 horas y se calienta durante 3 horas más a 50°. El exceso de diborano se destruye por la adición cuidadosa de unas cuantas gotas de agua y el disolvente orgánico se retira por evaporación bajo presión reducida. El residuo se recibe en 10 ml de agua y se basicifica con hidróxido sódico acuoso N/10. El pH de la solución resultante se ajusta a 5 por adición de ácido clorhídrico 2N. La solución se cromatografía entonces sobre una columna que contiene 50 ml de resina intercambiadora de iones Amberlite CG 50, en forma del ion amonio, eluyendo a su vez con agua destilada para

separar los sólidos inorgánicos, y luego con un gradiente de hidróxido amónico acuoso de concentración incrementada de 0,1 a 1 N. Las fracciones que contienen el producto (según se controla por cromatografía de capa delgada) se combinan y evaporan in vacuo para dar 1-N-(S)-4-amino-2-hidroxi-butil canamicina A (75 mg, rendimiento 50%).

Electroforesis de capa delgada. Rf = 0,6

El electrolito es una mezcla de partes iguales de ácido acético y ácido fórmico, proporcionando un valor pH de 2 y se aplica una diferencia de potencial de 900 voltios a través de los extremos de la placa revestida con sílice de 20 cm, durante 45 minutos. La detección se lleva a cabo secando la placa, pulverizando con una solución en ciclohexano de hipoclorito de terc-butilo y secando, enfriando y desarrollando la placa con una solución de almidón-yoduro potásico. Bajo estas condiciones, el BB-K8 standard de referencia proporciona un valor Rf de 1 y la canamicina A proporciona un valor Rf de 0,9.

El espectro infrarrojo confirma la pérdida de la banda de absorción amida-carbonilo observada en BB-K8 en 1635 cm^{-1} .

Rotación óptica $[\alpha]_D^{25} + 73^\circ$ (c 1,0, H₂O).

Espectrometría de masa (desorción de campo) muestra un pico fuerte P+1 en m/e 572.

Se convierte una muestra al derivado volátil penta-N-acetil-octa-O-trimetilsililo por tratamiento con anhídrido acético en metanol a temperatura ambiente durante 24 horas, seguido por reacción con una mezcla 2:1 de hexametil-disilazano y trimetilclorosilano a temperatura ambiente durante 24 horas. M⁺ encontrado $1357. \text{C}_{56} \text{H}_{119} \text{N}_5 \text{O}_{17} \text{Si}_8$ requiere

M⁺ 1357.

Análisis: Encontrado: C, 40,1; H, 6,7; N, 9,6 %
C₂₂H₄₅N₅O₁₂ · 2 $\frac{1}{2}$ H₂CO₃ Requiere : C, 40,5; H, 6,9; N, 9,6 %

EJEMPLO 2

5 A temperatura ambiente, se disuelven
100 ml de butirosina, (1-N- γ (S)-4-amino-2-hidroxi-butiril-7-
ribostamicina), como la base libre, en 5 ml de ácido trifluor
acético anhidro. El exceso de ácido se elimina por evapora-
ción hasta sequedad bajo vacío, para producir la sal trifluor
acetato como un cristal. Este se recibe en 10 ml de dietilen
glicol dimetil eter seco (diglima) y se añade una solución
1M de diborano en 10 ml de tetrahidrofurano, para proporcio-
nar una solución clara, que se deja reposar durante 18 horas
a temperatura ambiente. Se añaden 5 ml mas de solución de
15 diborano y la solución se mantiene a temperatura ambiente
durante 24 horas mas. El exceso de diborano se destruye por
la adición cuidadosa de unas cuantas gotas de agua y los
disolventes orgánicos se retiran bajo vacío a 50°. El residuo
se basifica con unas cuantas gotas de solución de hidroxido
20 sódico 2N y se ajusta el pH 5 por la adición de ácido clorhí-
drico 2N. El producto se aísla por cromatografía intercambia-
dora de iones sobre resina Amberlite CG 50, como se ha des-
crito en el ejemplo anterior. Las fracciones que contienen
el producto en forma pura se combinan y evaporan bajo vacío
25 para proporcionar 1-N- γ (S)-4-amino-2-hidroxi-butiril-7-ribos-
tamicina.

Electroforesis de capa delgada. Rf = 0,5.

30 Las condiciones fueron las descritas
anteriormente, se utilizó butirosina como standard de refe-
rencia con un valor Rf de 1.

EJEMPLO 3

Se convierten 0,35 g de 1-N- γ -(S)-5-amino-2-hidroxi-valerilo- γ -canamicina A a la sal trifluoracetato, se reduce y se cromatografía como se ha descrito en el ejemplo 1, para dar 0,12 g (35%) de 1-N- γ -(S)-5-amino-2-hidroxi-pentilo- γ -canamicina A.

Electroforesis de capa delgada. Rf = 0,7

Las condiciones son como las descritas en el ejemplo 1, utilizándose el material de partida como standard de referencia con un valor Rf de 1.

EJEMPLO 4

De un modo analogo se reducen 0,15 g de 1-N-(3-amino-2-hidroxi-propionilo)-canamicina A por el método del ejemplo 1, para dar 0,04 g (27%) de 1-N-(3-amino-2-hidroxi-propil)-canamicina A

Electroforesis de capa delgada. Rf = 0,6

Las condiciones son las descritas en el ejemplo 1, utilizándose el material de partida como standard de referencia con valor Rf de 1.

EJEMPLO 5

De forma análoga, se reduce 1-N- γ -(S)-4-amino-2-hidroxi-butiril- γ -canamicina B por el método del ejemplo 1, para producir 1-N- γ -(S)-4-amino-2-hidroxi-butiril- γ -canamicina B.

EJEMPLO 6

En la forma descrita en el ejemplo 1, se reduce 6'-N-metil-1-N- γ -(S)-4-amino-2-hidroxi-butiril- γ -canamicina A (preparada como describe H. Umezawa et. al. en J. Antibiotics, 1975, 28, 483) para producir 6'-N-metil-1-N- γ -(S)-4-amino-2-hidroxi-butiril- γ -canamicina A.

Electroforesis de capa delgada. Rf = 0,7

Las condiciones son como las descritas en el ejemplo 1, utilizándose el material de partida como standard de referencia con un valor Rf de 1 y la canamicina proporciona un valor Rf de 1,03.

En la siguiente tabla, se ofrecen los resultados del ensayo de los compuestos de los ejemplos con respecto a la actividad antibacterial in vitro, por los métodos anteriormente descritos:

TABLA: Actividad in vitro

| Ejem plo nº | M.I.C. µg/ml | | | | |
|-------------------|----------------|----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| | <u>E. Coli</u> | <u>Klebsiella pneumoniae</u> | <u>Proteus mirabi- lis</u> | <u>Pseudomonas aeruginosa</u> | <u>Staphylococcus aureus</u> |
| 1 | 6,2 | 3,1 | 3,1 | 1,6 | 1,6 |
| 2 | 6,2 | 6,2 | 25 | 12,5 | 12,5 |
| 3 | 6,2 | 3,1 | 12,5 | 3,1 | 1,6 |
| 4 | 12,5 | 6,2 | 12,5 | 3,1 | 3,1 |

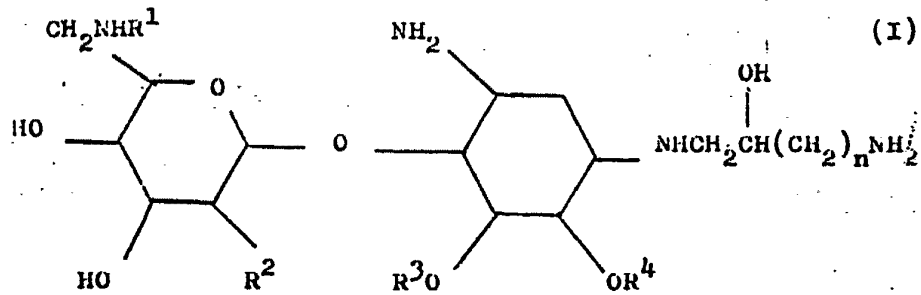
Adicionalmente, los compuestos del ejemplo 1 han sido ensayados en cuanto a la actividad in vivo por los métodos anteriormente descritos. El valor PD_{50} contra E. Coli en ratones es de 3,8 mg/kg.

NOTA .-

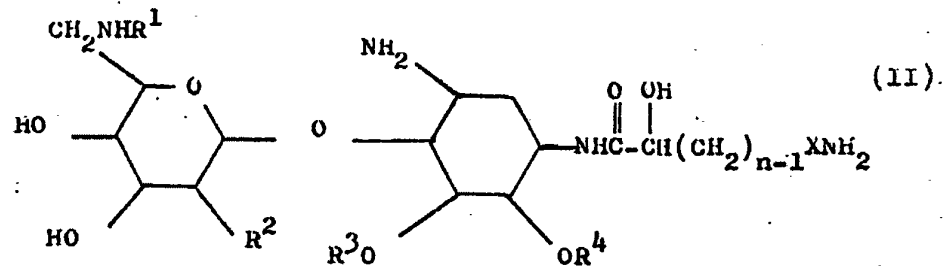
Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental; también se hace

constar, que el invento corresponde a una solicitud de patente, presentada en Inglaterra, bajo el número 56412/74, de fecha de 26 de octubre de 1.974, acogándose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR AMINOGLUCOSIDOS DE 2-DEOXIESTREPTAMINA, caracterizándose por lo siguiente:

1ª.- Procedimiento para preparar aminoglicósidos de 2-deoxiestreptamina, de fórmula general:



20 en la que R¹ es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior, R² es un grupo amino o hidroxilo, uno de los grupos R³ y R⁴ es un átomo de hidrógeno, mientras que el otro representa un grupo glicosilo, y n es 1, 2 o 3; y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables; caracterizado porque comprende reducir un compuesto de fórmula:



30 en la que R¹ a R⁴ y n se definen como anteriormente y X es

CH₂ o CO, y aislar el compuesto de fórmula (I).

2^a.- Procedimiento según la reivindicación 1^a, caracterizado porque se reduce el compuesto de fórmula (II) con diborano para dar el compuesto de fórmula (I).

3^a.- Procedimiento para preparar aminoglicósidos de 2-deoxiestreptamina; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 15 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 24 OCT. 1975

PFIZER CORPORATION.

J. GOMEZ ACEGU Y BARRAL
D. n. Fluzodol L. Costa Fondador

