

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



⑩ ES	⑪	NUMERO	⑩ A 1
	⑫	FECHA DE PRESENTACION	
	⑬	449.457	
	⑭	1-7-1976	

PATENTE DE INVENCION

P.- 63.402
2069X-23
Spain

③① PRIORIDADES:		
③② NUMERO	③③ FECHA	③④ PAIS
④⑦ FECHA DE PUBLICIDAD	⑤① CLASIFICACION INTERNACIONAL	⑤② PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07D/AG1K	
⑥④ TITULO DE LA INVENCION		
"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE NUEVOS PSEUDOTRISACARIDOS"		
⑦① SOLICITANTE (ES)		
SCHERICO LTD.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
Töpferstrasse 5, Lucerna, Suiza		
⑦② INVENTOR (ES)		
Marvin Joseph Weinstein, Peter John Lovell Daniels, Gerald Howard Wagman, Raymond Testa, Alan Keith Mallams, John Jessen Wright y Tattanahalli Lakshminarayan Nagabhushan		
⑦③ TITULAR (ES)		
⑦④ REPRESENTANTE		
DON ALBERTO DE EZABURU MARQUEZ		

Este invento se refiere a un procedimiento para la preparación de nuevos derivados sustituidos en 1-N de 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitoles activos como antibacterianos.

5 Se conocen en la técnica agentes antibacterianos de amplio espectro que pueden ser clasificados químicamente como 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitoles. Agentes antibacterianos valiosos de este grupo son aquellos en que el aminociclitol es 2-desoxi-estreptamina o un derivado de la misma que tiene funciones amino en las posiciones 1 y 3. Agentes antibacterianos particularmente valiosos de las 4,6-di-(aminoglicosil)-2-desoxiestreptaminas son aquellas en que el grupo aminoglicosilo en la posición 6 es un radical garosaminilo. Dentro de la clase de las 4-aminoglicosil-6-garosaminil-2-desoxiestreptaminas se encuentran antibióticos tales como gentamicinas B, B₁, C₁, C_{1a}, C₂, C_{2a}, C_{2b}, y X₂; sisomicina, verdamicina, Antibiótico G-418, Antibiótico G-52, Antibiótico JI-20A y Antibiótico JI-20B.

20 De acuerdo con este invento, se proporcionan compuestos en que el grupo amino en la posición 1 de la 2-desoxiestreptamina o de un derivado de ella en un 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitol está sustituido selectivamente en N. Los derivados sustituidos en 1-N de las 4,6-di-(aminoglicosil)-2-desoxiestreptaminas o derivados de las mismas son valiosos agentes antibacterianos de amplio espectro.

25 De acuerdo con el procedimiento de este invento, se preparan derivados sustituidos en 1-N de los 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitoles gentamicina A, gentamicina B, gentamicina B₁, gentamicina C₁, gentamicina C_{1a}, gentami-

micina C₂, gentamicina C_{2a}, gentamicina C_{2b}, gentamicina X₂, sisomicina, verdamicina, tobramicina, Antibiótico G-418, Antibiótico 66-40B, Antibiótico 66-40D, Antibiótico JI-20A, Antibiótico JI-20B, Antibiótico G-52, mutamicina 1, mutamicina 2, mutamicina 4, mutamicina 5 y mutamicina 6; en que el sustituyente es alcoholo de cadena recta con hasta cinco átomos de carbono, y las sales por adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los mismos.

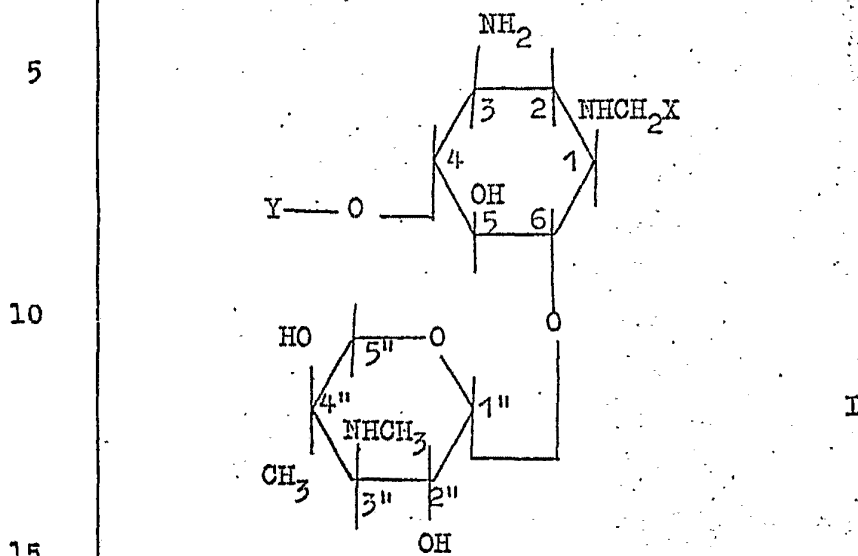
Entre los sustituyentes considerados en los nuevos compuestos están incluidos grupos alcoholo tales como etilo, n-propilo, n-butilo y n-pentilo.

Los compuestos son preferiblemente derivados de 1-N-alcoholo que contienen el radical garosaminilo en calidad de radical 6-aminoglicósido y que, en una característica más preferida, 2-desoxi-estreptamina como 1,3-diaminociclitol.

La 2-desoxi-estreptamina está presente en todos los compuestos del invento antes enumerados, excepto en las mutamicinas. El núcleo de 1,3-diaminociclitol en cada una de las 1-N-CH₂X-mutamicinas 1,2,4,5 y 6 son respectivamente estreptamina, 2,5-didesoxiestreptamina, 2-epi-estreptamina, 5-amino-2,5-didesoxiestreptamina y 5-epi-2-desoxiestreptamina.

Las 1-N-alcohol-4-aminoglicosil-6-garosaminil-2-desoxiestreptaminas de este invento son los derivados de gentamicina B, gentamicina B₁, gentamicina C₁, gentamicina C_{1a}, gentamicina C₂, gentamicina C_{2a}, gentamicina C_{2b}, gentamicina X₂, sisomicina, verdamicina, Antibiótico G-418, Antibiótico JI-20A, Antibiótico JI-20B y Antibiótico G-52, los cuales compuestos son definidos por la siguiente fórmula

estructural I:

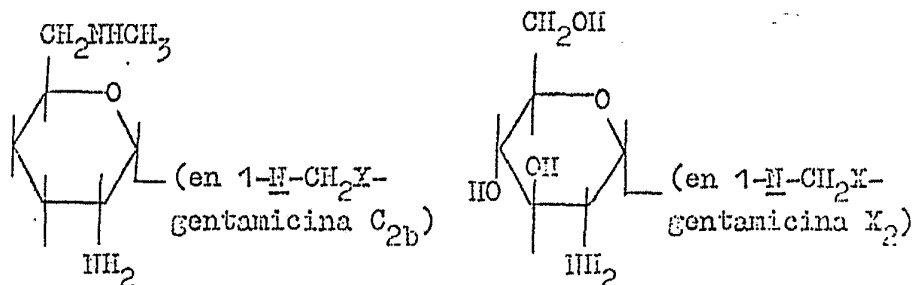
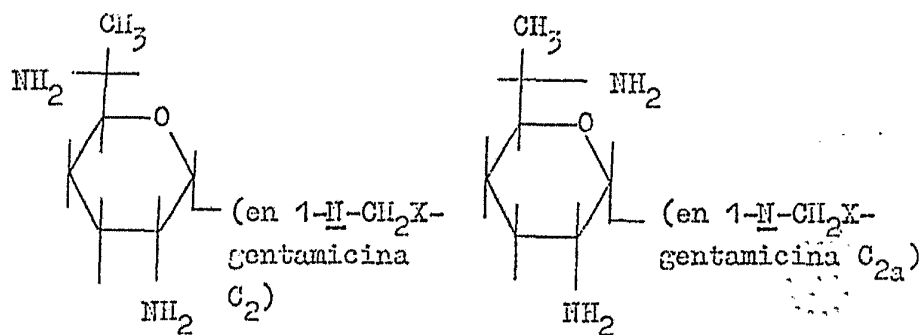
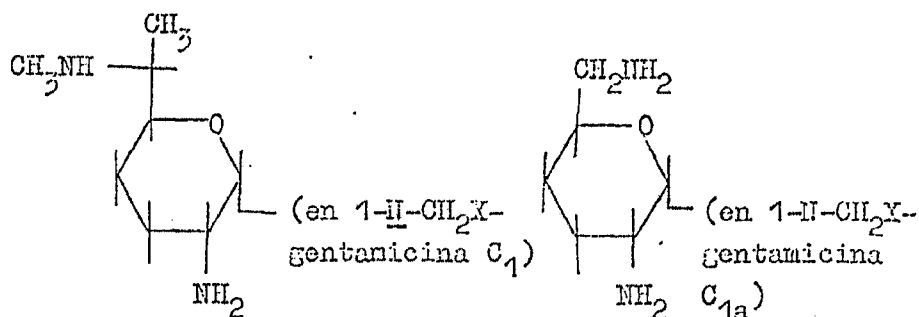
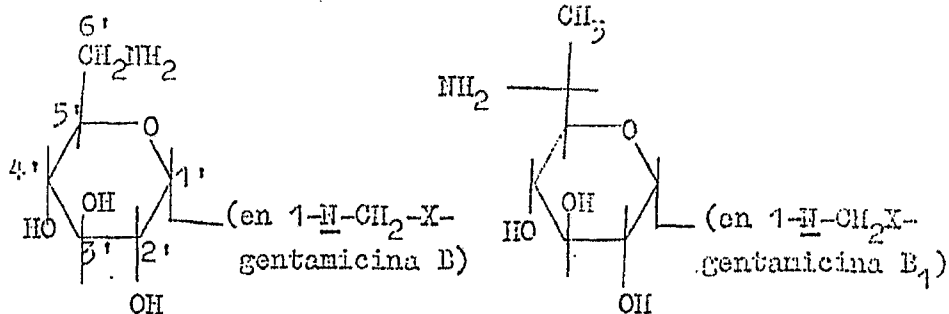


en que $-\text{CH}_2\text{X}$ es alcoholo de cadena recta con hasta cinco átomos de carbono y en que Y es una función aminoglicosilo seleccionada del grupo que consiste en:

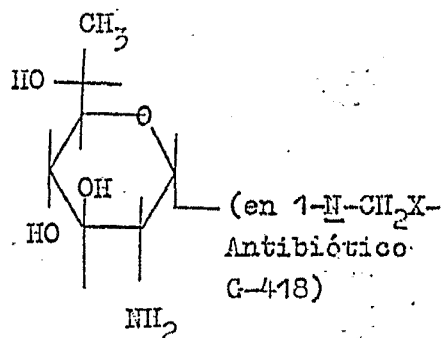
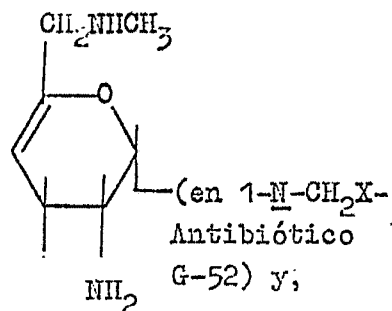
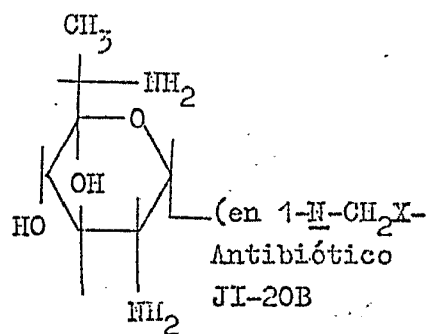
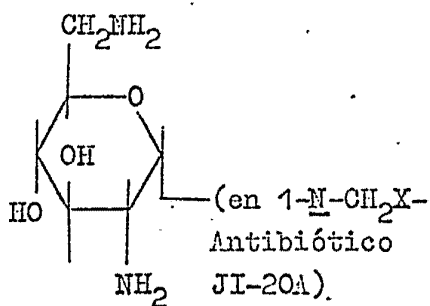
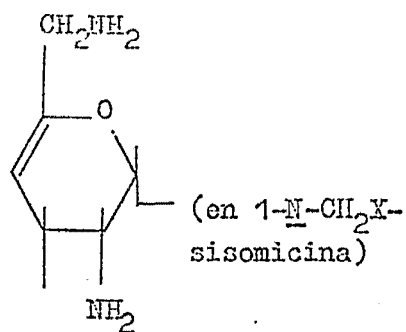
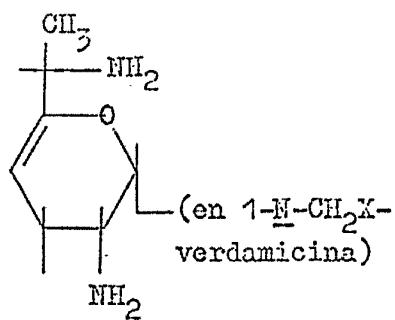
20

25

30

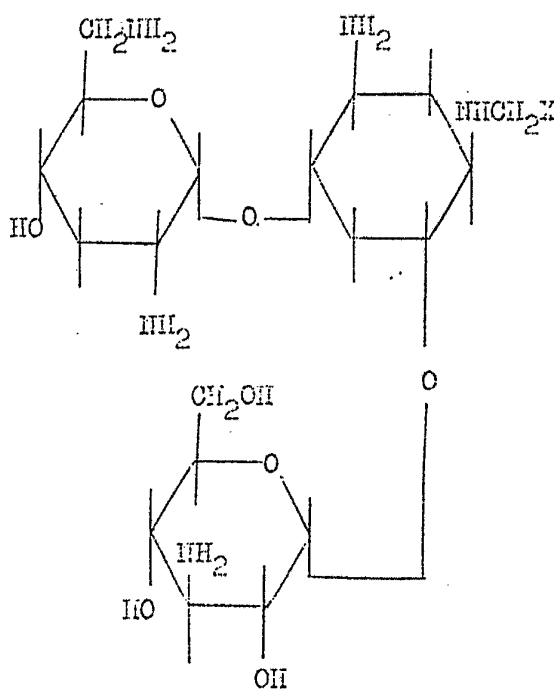


3-7-74.

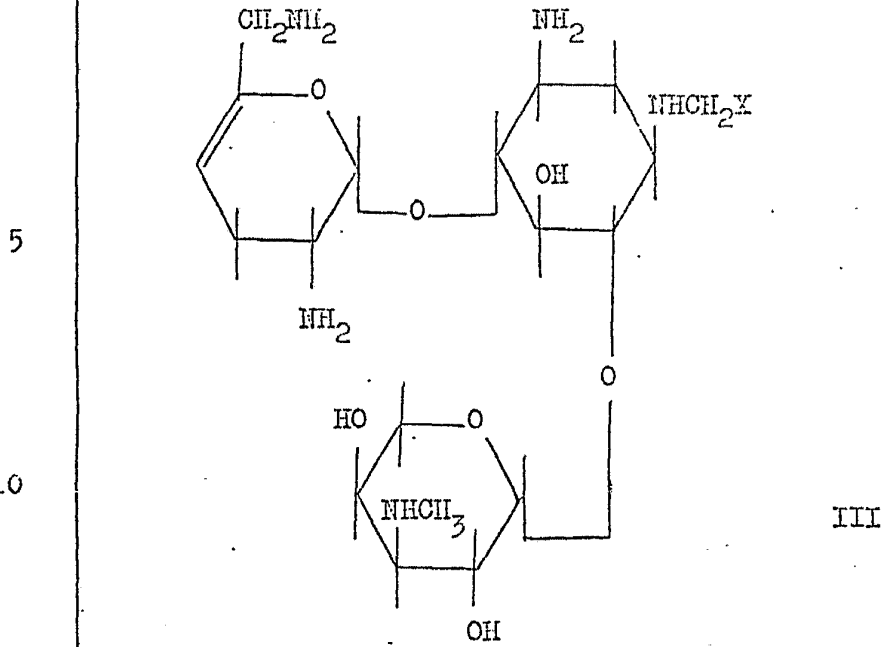


3-7-74.

Otras 1-N-CH₂X-4,6-di(aminoglicosil)-2-desoxi-estreptaminas útiles de este invento incluyen 1-N-CH₂X-tobramicina con la siguiente fórmula II:

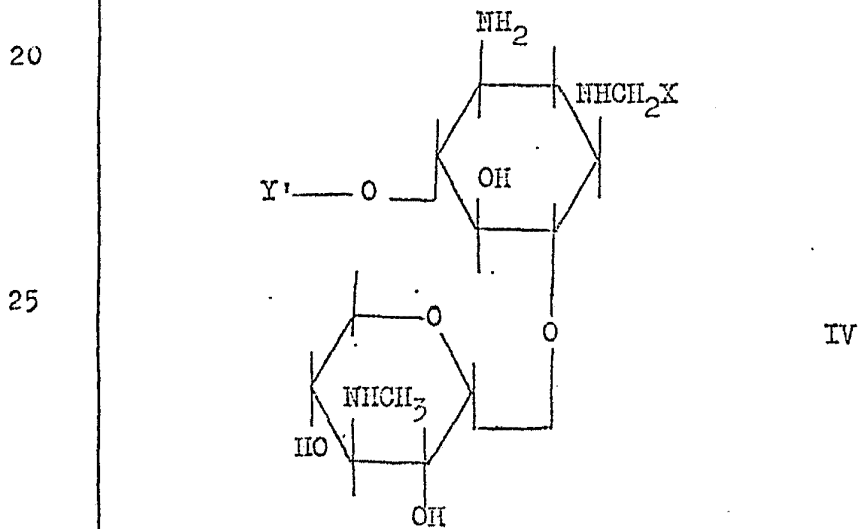


en que -CH₂X es como anteriormente se ha definido; 1-N-CH₂X-Antibiótico 66-40D con la siguiente fórmula III (que se encuentra entre los compuestos preferidos de este invento):



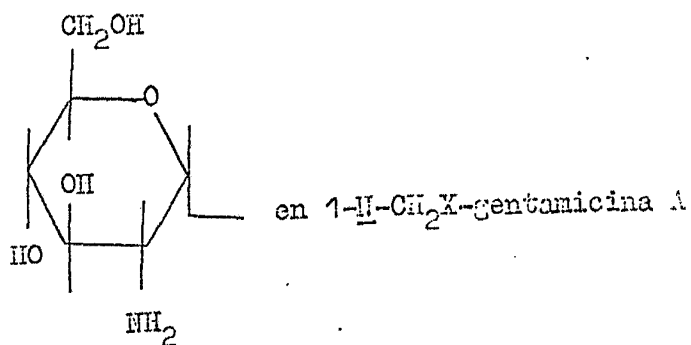
15

en que $-CH_2X$ es como anteriormente se ha definido; y l-N- $-CH_2X$ -gentamicina A y l-N- $-CH_2X$ -Antibiótico 66-40B con la siguiente fórmula IV:



en que $-\text{CH}_2\text{X}$ es como anteriormente se ha definido e Y' es

5

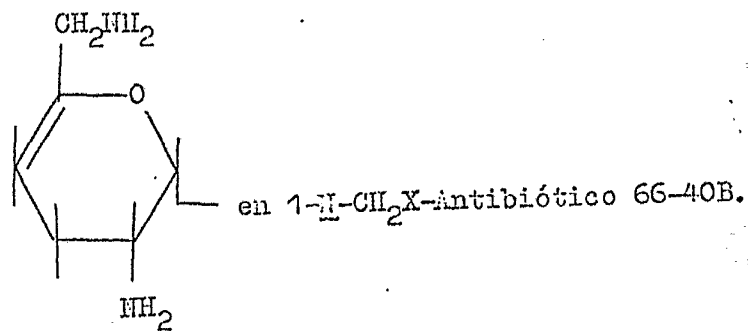


10

e Y' es

15

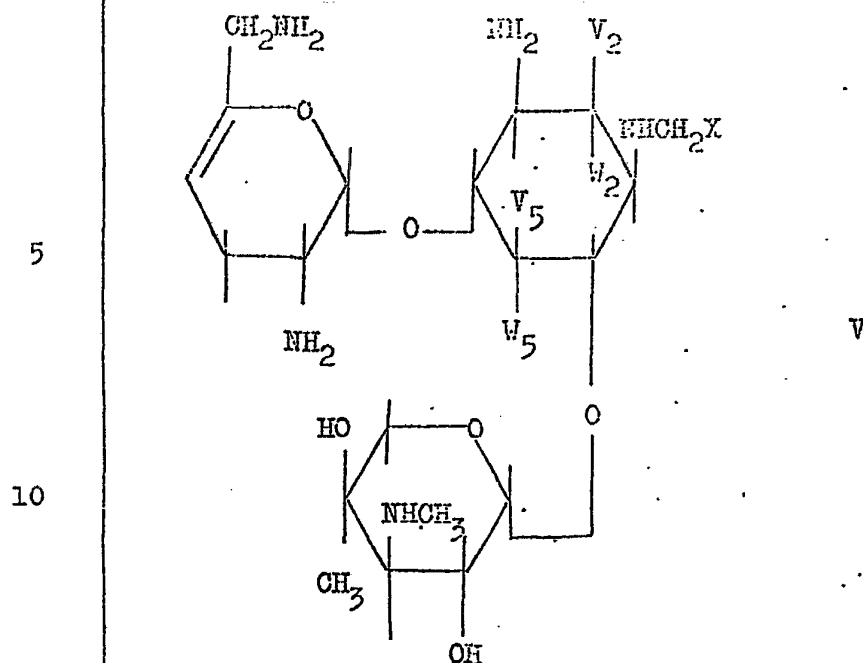
20



25

Las 1-N-CH₂X-mutamicinas de este invento incluyen 1-N-CH₂X-4-aminoglicosil-6-garosaminil-1,3-diaminociclitolos con la siguiente fórmula V:

30



15 en que $-\text{CH}_2\text{X}$ es como anteriormente se ha definido; y en $1-\underline{\text{N}}-\text{CH}_2\text{X}$ -mutamicina 1, V_2 y W_5 son hidrógeno y W_2 y V_5 son hidroxí;

en $1-\underline{\text{N}}-\text{CH}_2\text{X}$ -mutamicina 2, W_2 , V_2 , W_5 y V_5 son hidrógeno;

20 en $1-\underline{\text{N}}-\text{CH}_2\text{X}$ -mutamicina 4, W_2 y W_5 son hidrógeno y V_2 y V_5 son hidroxí;

en $1-\underline{\text{N}}-\text{CH}_2\text{X}$ -mutamicina 5, W_2 , V_2 y W_5 son hidrógeno y V_5 es amino; y

25 en $1-\underline{\text{N}}-\text{CH}_2\text{X}$ -mutamicina 6, W_2 , V_2 y V_5 son hidrógeno mientras que W_5 es hidroxí.

En las fórmulas estructurales aquí expuestas, se entiende que los sustituyentes no indicados en los terminales de enlace son átomos de hidrógeno.

30 También está incluida dentro del invento la preparación de sales por adición de ácido farmacéuticamente aceptables

de los 1-N-CH₂X-4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitoles tal como se definen por las fórmulas I, II, III, IV y V, las cuales sales son preparadas de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo por neutralización de la base libre con el ácido apropiado, usualmente a pH 5 aproximadamente. Acidos apropiados para este fin incluyen ácidos tales como los ácidos clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, bromhídrico, acético, propiónico, maleico, ascórbico, cítrico y similares. Las formas físicas de las sales por adición de ácido de los 1-N-CH₂X-4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitoles de este invento están caracterizadas por ser sólidos blancos que son solubles en agua, escasamente solubles en la mayor parte de los disolventes polares e insolubles en disolventes orgánicos no polares.

Los 1-N-CH₂X-4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitoles, tal como se definen por las fórmulas I, II, III, IV y V, y sus sales por adición de ácido farmacéuticamente aceptables no tóxicas, exhiben en general una actividad antibacteriana de amplio espectro. Particularmente los derivados con agrupación 1-N-alcoholo inferior poseen actividades antibacterianas mejoradas en comparación con los antibióticos afines, que se manifiesta específicamente en la actividad acrecentada de los compuestos contra organismos resistentes al compuesto afin. Así, por ejemplo, los compuestos son más activos contra organismos que inactivan a los antibióticos afines por acetilación del grupo 3-amino- y/o por adalilación del grupo 2"-hidroxilo. Entre estos, algunos exhiben también propiedades antiprotozoos, antiamebas y antihelmintos.

Un grupo preferido de compuestos preparados de acuer-

do con el procedimiento del invento son los derivados sustituidos en 1-N de las 4-aminoglicosil-6-garosaminil-2-desoxiestreptaminas gentamicina B, gentamicina B₁, gentamicina C₁, gentamicina C_{1a}, gentamicina C₂, gentamicina X₂, sisomicina, verdamicina, Antibiótico JI-20A, Antibiótico JI-20B, Antibiótico G-52 y Antibiótico G-418, de los cuales los más preferidos son los derivados de gentamicina C₁, gentamicina C_{1a}, sisomicina, verdamicina y Antibiótico G-52. Otros compuestos particularmente útiles son los derivados sustituidos en 1-N de Antibiótico 66-40D.

Compuestos particularmente útiles del invento son aquellos en que X es hidrógeno, metilo, etilo y propilo, y preferiblemente metilo y etilo. Un grupo particularmente valioso es el de las 1-N-CH₂X-4-aminoglicosil-6-garosaminil-2-desoxiestreptaminas de fórmula I en que X es un grupo alcohol inferior que tiene 1 a 3 átomos de carbono, particularmente los derivados de 1-N-alcohol inferior de gentamicina C₁, gentamicina C_{1a}, gentamicina C₂, gentamicina C_{2a}, gentamicina C_{2b}, sisomicina, verdamicina y Antibiótico G-52 así como 1-N-alcohol inferior Antibiótico 66-40D de fórmula III, los cuales derivados son agentes antibacterianos de espectro amplio, siendo activos contra bacterias gram-positivas (por ejemplo Staphylococcus aureus) y bacterias gram-negativas (por ejemplo Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa) según se determina por ensayos de dilución normalizados, incluyendo bacterias resistentes a los precursores que no están sustituidos en 1-N. Son particularmente útiles 1-N-etilverdamicina y 1-N-alcohol inferior-sisomicinas, por ejemplo 1-N-metilsisomicina, 1-N-(n-propil)-sisomicina, 1-N-(n-butyl)-sisomicina y, preferiblemente, 1-N-etilsisomi-

5 cina que exhiben actividad contra organismos gram-negativos que son resistentes a sus precursores que no están sustituidos en 1-N. Otros compuestos particularmente útiles son 1-N-etil-gentamicina C_{1a}, 1-N-etilgentamicina C₁, 1-N-etil-
-Antibiótico G-52, 1-N-(n-propil)-verdamicina, 1-N-metilverdamicina y 1-N-(n-butil)-verdamicina.

10 La mayor parte de los antibióticos de 4,6-di-(amino glicosil)-1,3-diaminociclitol no sustituidos en 1-N a partir de los cuales se pueden preparar los derivados sustituidos en 1-N del invento son conocidos. De las gentamicinas, el compuesto de partida aquí denominado gentamicina X₂ es conocido en la técnica también como gentamicina X. El compuesto de partida aquí denominado gentamicina C_{2a} es aislado y caracterizado tal como se menciona en la patente belga N^o 818.431.

15 El compuesto de partida aquí mencionado como gentamicina C_{2b} es aislado y caracterizado tal como se indica en la patente belga N^o 818.431, y teniendo la fórmula estructural aquí mostrada, es denominado en alguna técnica anterior como gentamicina C_{2a}.

20 El aislamiento, las propiedades y la configuración plana de la gentamicina C₂ se describen en la patente de los Estados Unidos 3.651.042.

25 Los Antibióticos 66-40B y 66-40D, su preparación, aislamiento, propiedades y configuración, se describen en la patente belga 811.370. Los antibióticos son producidos conjuntamente con la sisomicina, que es el producto principal de la fermentación de Micromonospora inyoensis (descrito en la patente británica número 1.274.518) y pueden ser separados del medio de fermentación empleando técnicas de separa
30

ción cromatográfica especiales.

Las mutamicinas 1, 2, 4, 5 y 6, cuya configuración se ha mostrado arriba, pueden ser preparadas cultivando una cepa mutante de Micromonospora inyoensis aquí designada como Micromonospora inyoensis cepa 1.550 F-1G en un medio nutricional acuoso. Esta cepa mutante es incapaz de producir un antibiótico cuando es cultivada en condiciones aerobias sumergidas en un medio nutricio acuoso cuando está ausente el bloque formador de 1,3-diaminociclitol. No obstante cuando se añaden ciertos de dichos compuestos al medio de fermentación, se producen las mutamicinas. Cuando se añade 2-desoxiestreptamina a la fermentación, se produce el antibiótico sisomicina conocido. La preparación de las mutamicinas se describe en la patente belga N.º 818.429.

El procedimiento para la preparación de derivados sustituidos en 1-N de los 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitoles arriba enumerados en que el sustituyente es alcohol de cadena recta que tiene hasta cinco átomos de carbono, y de las sales por adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los mismos, comprende hacer reaccionar uno de estos 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitoles, que posee grupos protectores de amino en cualquier posición diferente de la posición 1, y en que el grupo 1-amino puede estar activado, con un agente alcoholante que contiene el grupo alcohol de cadena recta que tiene hasta cinco átomos de carbono y un grupo activo, eliminar los grupos protectores y, si se requiere, el grupo o grupos activadores presentes en la molécula, y aislar el derivado tal como está o en forma de una sal por adición de ácido farmacéuticamente aceptable.

Ejemplos de agentes alcohilantes utilizados de modo ventajoso en este procedimiento son yoduro de alcoholo, bromuro de alcoholo, sulfato de dialcoholo, fluorosulfonato de alcoholo y para-toluensulfonato de alcoholo en que el grupo alcoholo es el grupo alcoholo de cadena recta requerido que tiene hasta cinco átomos de carbono. Otros agentes alcohilantes, en que el grupo alcoholo tiene preferiblemente uno o dos átomos de carbono son hidroxido de trialcoholanilinio, fluoroborato de trialcoholoxonio, fluoroborato de trialcoholisulfonio, o fluoroborato de trialcohol sulfoxonio. Todos estos agentes alcohilantes contienen un grupo bien activo tal como Br^- , I^- , OSO_2F^- , dialcoholanilina o dialcoholeter.

El grupo amino en posición 1 del 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitol puede estar libre o activado. Un ejemplo de un grupo activador es el grupo trifluorometilsulfonilo. Estos grupos pueden ser introducidos en la molécula haciendo reaccionar un 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitol que posee grupos protectores de amino en cualquier posición diferente de la posición 1, por ejemplo 3"-N-4"-O-carbonil-2',3,6'-tri-N-ter, butoxicarbonil-sisomicina, con un compuesto que proporciona el grupo activador, tal como cloruro de trifluorometilsulfonilo.

El grupo amino en posición 1 puede ser alcohilado también pasando por el correspondiente derivado di-(2-cianoetilico) que se obtiene mediante tratamiento con acrilonitrilo del 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitol que posee grupos protectores de amino en cualquier posición diferente de la posición 1. El derivado 1-N-di-(2-cianoetilico) así preparado es alcohilado luego con uno de los agentes de

alcoholación antes enumerados, seguido por la eliminación de los grupos cianoetilo.

El procedimiento de este invento se lleva a cabo en condiciones similares a las empleadas en los métodos bien conocidos de alcoholación directa de aminas.

Los ejemplos siguientes ilustran el invento.

EJEMPLO 1

A. 2',3,6'-tri-N-butoxicarbonil-3"-N-4"-O-carbonilsisomicina

1. Penta-N-carbobenzoxisisomicina

Se disuelven 25 g de sisomicina y 13 g de carbonato de sodio en 625 ml de agua destilada. Se añaden 100 ml de cloruro de carbobenzoxilo a la solución agitada a 25°C y se agita la mezcla durante dieciséis horas. Se separa por filtración el sólido, se lava a fondo con agua, se seca en vacío, y luego se lava con hexano para obtener penta-N-carbobenzoxisisomicina (62 g) en forma de un sólido amorfo incoloro. p. de f. = 165 - 173°C $[\alpha]_D^{26} + 96,2^\circ$ (CH₃OH). IR: ν_{\max} (CHCl₃) 3400, 1720, 1515, 1215, 1050, 695, cm⁻¹. RMN: δ (CDCl₃) 1,03 (3H, singulete ancho, 4"-C-CH₃); 3,02 (3H, singulete ancho, 3"-NCH₃); 5,02 (10H, singulete ancho, CH₂C₆H₅); 3,28, 3,30 ppm (25H, singuletes anchos, -CH₂C₆H₅).

2. Tetra-N-carbobenzoxi-3"-N-4"-O-carbonil-sisomicina

Se disuelven 5 g de penta-N-carbobenzoxi-sisomicina en 50 ml de dimetilformamida, se añaden 250 mg de hidruro de sodio a la solución agitada, y se agita la mezcla de reacción bajo argón a la temperatura ambiente durante dos horas. Se filtra y se añade ácido acético glacial (2 ml) al producto filtrado que luego es concentrado en vacío. Se extrae

el residuo con cloroformo (200 ml, hecho pasar previamente a través de alúmina básica), se lava el extracto con agua y se seca sobre sulfato de sodio. La solución es evaporada para dar tetra-N-carbobenzoxi-3"-N-4"-O-carbonil-sisomicina en forma de un polvo amorfo (3,5 g).

p. de f. = 210 - 213°C $[\alpha]_D^{26} + 68,8$ (C = 0,22)

IR: ν_{max} (Nujol) 3550, 1840, 1760, 1580 cm^{-1}

RMN: δ (CDCl_3) 1,34 (3H, singulete, 4"-CH₃); 2,68 (3H, singulete, 3"-N-Me); 5,04 (8H, singulete ancho, -CH₂C₆H₅).

10 3. 3"-N-4"-O-carbonil-sisomicina

A una solución de 1,3,2',6'-tetra-N-benciloxicarbonil-3"-N-4"-O-carbonil-sisomicina (10,1 g) en tetrahidrofurano (200 ml) se añade 1 litro de amoníaco líquido (redistilado a partir de sodio). A la solución agitada se añaden 6 g de sodio en pequeños trozos. Después de agitar durante 3 horas se destruye el exceso de sodio por adición de cloruro de amonio. Se deja que los disolventes se evaporen bajo una corriente de nitrógeno. Se disuelve el residuo en agua y se hace pasar a través de un medio de resina Amberlite IRC-50 (forma H⁺) y se lava bien la resina con agua y luego se eluye el producto con solución de hidróxido de amonio 2 N. Se evapora el eluato con amoníaco en vacío para dar el producto del título (3"-N-4"-O-carbonil-sisomicina).

Rendimiento: aproximadamente 4 g.

25 IR : ν_{max} (Nujol) 1.745 cm^{-1} . El producto puede ser utilizado en subsiguientes etapas sin purificación adicional. No obstante, puede obtenerse una muestra muy pura por cromatografía del producto sobre gel de sílice utilizando la fase inferior de un sistema de disolventes de cloroformo:metanol:hidróxido de amonio concentrado (1:1:1) en cali

30

dad de agente eluyente.

4. 2',3,6'-tri-N-ter-butoxicarbonil-3"-N-4"-O-carbonil-sisomicina

5 Se disuelve 3"-N-4"-O-carbonil-sisomicina (1,4 g, 3 milimoles) en 10 ml de metanol acuoso al 50% que contiene trietilamina (3,5 milimoles). Con agitación, se añade gota a gota ter.-butoxicarbonil-azida (3,5 milimoles). Se agita la mezcla durante dos días a la temperatura ambiente. Se añaden 5 ml de resina intercambiadora de iones Amberlite IRA-401S (OH⁻) junto con 5 ml de metanol y se agita durante 1/2 hora. Se elimina la resina por filtración y se lava con metanol. Se concentra el producto filtrado y se cromatografía el residuo sobre una columna de gel de sílice (malla 60-100, 20,0 g) utilizando cloroformo : metanol : hidróxido de amonio (30:10:0,4) como sistema de disolventes. Se reúnen las fracciones homogéneas que contienen el material de título y se elimina el disolvente por evaporación en vacío. Se disuelve el residuo en metanol y se precipita con éter en exceso. Se aísla por filtración el producto sólido y se seca.

10
15
20

B. 1-N-metilsisomicina a partir de 3"-N-4"-O-carbonil-2',3,6'-tri-ter-butoxicarbonil-sisomicina.

25 Se disuelve 3"-N-4"-O-carbonil-2',3,6'-tri-N-ter-butoxicarbonil-sisomicina (0,77 g) en tetrahidrofurano (20 ml) y se enfría en un baño de hielo. Se añade fluorosulfonato de metilo (0,12 g) y se deja calentar hasta la temperatura ambiente. Se elimina el disolvente y se disuelve el residuo en ácido trifluoroacético. Después de cinco minutos a la temperatura ambiente se elimina en vacío el ácido trifluoroacético y se trata el residuo con solución al 10% de

30

hidróxido de potasio a 100°C durante 5 horas.

Se hace pasar la solución enfriada por una columna de resina intercambiadora de iones Amberlite IRC 50 (H⁺) y se eluye con hidróxido de amonio acuoso 2 N. Se concentra el eluato y se liofiliza para obtener el producto bruto del título.

Se cromatografía el material bruto sobre gel de sílice en la fase inferior de una mezcla de disolventes de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 7% (2:1:1) para obtener 1-N-metil-sisomicina. $[\alpha]_D^{26} + 153^\circ$ (0,3%, H₂O);

Espectro de masas: (M + 1)⁺ m/e 462

también m/e 127, 140, 159, 160, 177, 187, 205, 256, 285, 303, 318, 331, 336(w), 346, 376, 386.

EJEMPLO 2

1-N-metilsisomicina

Se trata 2',3,6'-tri-N-ter.-butoxicarbonil-3"-N-4"-O-carbonilsisomicina (0,77 g) en tetrahidrofurano (25 ml) con metilamina (101 mg) y anhídrido de ácido trifluorometil sulfónico (290 mg) a 0°C durante 18 horas. Se reduce la solución a sequedad y se disuelve el residuo en dimetilformamida (10 ml) y se agita con yoduro de metilo (300 mg) y carbonato de potasio (130 mg) durante 18 horas adicionales. Se elimina el disolvente por evaporación y se trata el residuo con hidróxido de potasio acuoso al 10% a 100°C durante 12 horas. Se hace pasar la solución enfriada a través de una columna de resina intercambiadora de iones Amberlite IRC 50 (H⁺). El producto bruto es eluido con hidróxido de amonio acuoso 2 N. Los eluatos combinados son redu-

cidos hasta sequedad en vacío y el residuo es cromatografiado sobre gel de sílice (200 g) en la fase inferior de un sistema de disolventes de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 7% (2:1:1) para dar 1-N-metilsisomicina.

$$5 \quad [\alpha]_D^{26} + 153^\circ (0,3\%, \text{H}_2\text{O});$$

Espectro de masas: $(M + 1)^+$ m/e 462

También m/e 127, 140, 159, 160, 177, 187, 205, 256, 285, 303, 318, 331, 336(w), 346, 376, 386.

10

EJEMPLO 3

1-N-metilsisomicina

Se disuelve 2',3,6'-tri-N-ter.-butoxicarbonil-3"-N-
-4"-O-carbonil-sisomicina (0,77 g) en diclorometano (100 ml)
15 con acrilonitrilo (0,25 g) y se deja a la temperatura ambiente durante 24 horas. Se elimina el disolvente en vacío para dejar un residuo que es disuelto en dimetilformamida y se trata con yoduro de metilo (180 mg) a 50°C durante 12 horas. Se elimina el disolvente, y se trata el residuo
20 con hidróxido de potasio acuoso al 10% a 100°C durante 8 horas. La solución enfriada es hecha pasar por una columna de resina intercambiadora de iones Amberlite IRC 50 (H^+) y el producto bruto es eluido con hidróxido de amonio acuoso 2 N. Los eluatos combinados son reducidos hasta sequedad
25 en vacío y el residuo es cromatografiado sobre gel de sílice (200 g) en la fase inferior de un sistema de disolventes de cloroformo-metanol-hidróxido de amonio al 7% (2:1:1) para dar 1-N-metilsisomicina.

$$30 \quad [\alpha]_D^{26} + 153^\circ (0,3\%, \text{H}_2\text{O});$$

Espectro de masas: $(M + 1)^+$ m/e 462

también m/e 127, 140, 159, 160,
177, 187, 205, 256, 285, 303, 318, 331, 336(w), 346, 376,
386.

5 De una manera similar a la descrita en los ejemplos
1 - 3 anteriores se prepara uno de los compuestos siguientes:

1-N-(n-propil)-verdamicina:

10 $\int_{\infty}^{\infty} J_D^{26} + 122^\circ$ (c=0,3%, H₂O); rmp (ppm) (D₂O): δ 0,88
(3H, t, J=7Hz, CH₂CH₃); 1,19 (3H, s, C-CH₃); 1,16 (3H, d,
J=6Hz, CH-CH₃); 4,81 (1H, m, =CH-); 4,97 (1H, d, J=4,0Hz,
H₁""); 5,30 (1H, d, J=2,0Hz, =H₁'');

Espectro de masas: $(M + 1)^+$ m/e 528

15 también m/e 141, 160, 168, 187,
205, 215, 233, 270, 346, 355, 373, 504.

1-N-(n-butil)verdamicina:

20 $\int_{\infty}^{\infty} J_D^{26} + 121^\circ$ (c=0,3%, H₂O); rmp (ppm) (D₂O): δ 0,8
(3H, t, J=6,5Hz, CH₂-CH₃); 2,45 (3H, s, NCH₃); 4,8 (1H, m,
C=CH-); 4,92 (1H, d, J=4,0Hz, H₁""); 5,25 (1H, d, J=2,0Hz,
H₁'');

Espectro de masas: $(M + 1)^+$ m/e 518

25 también m/e 141, 160, 182, 201,
219, 229, 247, 270, 341, 360, 378, 387, 388, 418, 442,

1-N-(n-butil)-sisomicina;

30 $\int_{\infty}^{\infty} J_D^{26} + 129^\circ$ (0,3%, H₂O), rmp (ppm) (D₂O) δ 0,82
(3H, t, J=7Hz, -CH₂CH₃); 1,15 (3H, s, C-CH₃); 2,46 (3H, s,
-N-CH₃); 4,82 (1h, m, =CH-); 4,92 (1H, d, J=4Hz, H₁"");
5,29 (1H, d, J=2Hz, H₁'').

Espectro de masas: $(M + 1)^+$ m/e 504;

también m/e 127, 160, 182, 201,
219, 229, 247, 256, 327, 345, 360, 373, 388, 418, 428.

1-N-etilmutamicina G'

5 P. de F. 118-122°C (descomp.)

Espectro de masas $(M)^+$ m/e 475, $(M + 1)^+$ m/e 476

Monosacáridos: m/e 160, 127

2-Desoxiestreptaminas: m/e 219, 201, 191, 171

Disacáridos: m/e 355, 317, 299,

10 m/e 378, 350, 322

RMP (δ): D_2O

	5,14	d, J=2,5 Hz	1'-H
	5,00	d, J=4,1 Hz	1"-H
	4,9	singulete ancho	4'-H
15	4,38	singulete ancho	5-H
	3,93	d, J=12,5 Hz	5"e-H
	3,78	q.	2"-H
	3,38	d, J=12.5 Hz	5"a-H
	3,21 (1H)	singulete ancho	6'-H
20	2,65	d, J=11,0 Hz	3"-H
	2,52	singulete	3"-N-CH ₃
	1,22	singulete	4"-C-CH ₃
	1,07	triplete	1-N-CH ₂ -CH ₃

CMR (D_2O):

25 FPM: δ 149,8, 102,9, 97,4, 97,0, 83,9, 80,5, 73,2, 70,1,
69,6, 68,5, 63,9, 54,5, 47,1, 47,0, 43,1, 40,8, 37,5, 33,0,
25,6, 22,4, 14,6.

1-N-(n-propil)sisomicina:

$\left[\alpha \right]_D^{26} + 140^\circ$ (0,3%, H_2O);

30 rmp (ppm) (D_2O): δ 0,83 (3H, t, J=7Hz, -CH₂CH₃); 1,14

(3H, s, -C-CH₃); 2,45 (3H, s, -N-CH₃); 4,82 (1H, m, =CH-);
4,90 (1H, d, J=4Hz, H₁"); 5,78 (1H, d, J=2Hz, H₁');

Espectro de masas: (M + 1)⁺ m/e 490

también 127, 160, 168, 187, 205,

215, 233, 256, 313, 331, 346, 359, 364, 374, 404, 414.

1-N-etilverdamicina

Espectro de masas: (M + 1)⁺ m/e 490

también m/e 141, 154, 160, 173,

191, 201, 219, 270, 313, 317(w), 331, 332, 341, 350(w),

357, 359, 360, 378, 390, 414.

1-N-ethyl

Antibiótico G-52;

$\tau_{D}^{26} + 122,1^{\circ}$ (c=0,3%, H₂O), rpm (ppm) (D₂O): 1,06

(3H, t, J=6,5Hz, 1N-CH₂CH₃); 1,21 (3H, s, 4"-C-CH₃); 2,30

(3H, s, 3"-N-CH₃); 2,50 (3H, s, 6'-N-CH₃); 4,94 (1H, m,

H₄'); 4,97 (1H, d, J=4,0Hz H₁"); 5,34 (1H, d, J=2,5Hz, H₁').

Espectro de masas: (M + 1)⁺ m/e 490

también m/e 141, 154, 160, 173, 191,

201, 219, 270, 313, 317(w), 331, 332, 341, 350, 359, 360,
378, 390, 414.

1-N-etilmutamicina 2,

P. de F. 80-84°C

RMP (D₂O): 1,06 (t, J=7 Hz, 3, 1-N-CH₂CH₃), 1,19 (s, 3,
4"-CH₃), 2,50 (s, 3, 3"-N-CH₃), 2,53 (d, J_{2",3"} = 10,5 Hz,
1, H₃"), 3,75 (dd, J_{1",2"} = 4 Hz; J_{2",3"} = 10,5 Hz, 1, H₂"),
3,83 (d, H₅" eq 5" ax = 12 Hz, 1, H₅"), 4,86 (m, 1, H₄'),
4,98 (d, H₂"₁" = 4 Hz, 1, H₁") y 5,10 (d, J_{1',2'} = 2,5 Hz,
1, H₁').

Espectro de masas: m/e 459, 384, 329, 316, 311, 301,
283, 203, 185, 175, 160, 142, 127.

1-N-metilgentamicina C₁

(D₂O) 1,04 (3H, d, J=6,5Hz, 6'-CH₃); 1,18 (3H, s, 4"-CH₃); 2,29 (3H, s, 1-NCH₃); 2,32 (3H, s, 6'-NCH₃); 2,49 (3H, s, 3"-NCH₃); 4,95 (1H, d, J_{1"},_{2"}=4Hz, H_{1"}); y 5,13 ppm. (1H, d, J_{1'},_{2'}=3,5Hz, H_{1'}); M⁺ m/e 491, también 416, 384, 364, 361, 346, 343, 336, 333, 318, 315, 303, 286, 205, 187, 177, 160, 159, 157.

1-N-etilgentamicina C₁

[α]_D²⁶ + 114 (c=0,3%, H₂O); rmp (ppm): (D₂O): 1,03 (3H, t, 7Hz, -CH₂CH₃); 1,03 (3H, d, J=6,5Hz, -CH-CH₃); 1,17 (3H, s, C-CH₃); 2,32 (3H, s, 6'-N-CH₃); 2,49 (3H, s, 3"-NHCH₃); 4,94 (1H, d, J=4Hz, H_{1"}); 5,13 (1H, d, J=3,5Hz, H_{1'}).

Espectro de masas: (M + 1)⁺ m/e 506

también m/e 154, 157, 160, 173, 191, 201, 219, 286, 317, 329(w), 347, 350, 360, 375, 430.

1-N-etilgentamicina B.

[α]_D²⁶ + 119,7° (c, 1 en agua)

Espectro de masas m/e [MH]⁺ 380, 352, 334, 378, 350, 332, 219, 191, 173.

RMN (60 MHz D₂O): 5,55 (H-1', J_{1',2'} = 3,0 Hz), 5,05 (H-1", J_{1",2"} = 4 Hz), 2,9 (N-CH₃), 1,05-1,5 (2 C-CH₃).

1-N-etilgentamicina C_{1a}

(0,42 gm.), [α]_D²⁵ + 118° (c=0,3%, H₂O); rmp (ppm): (D₂O): 1,06 (3H, t, J=7Hz, -CH₂CH₃); 1,19 (3H, s, -C-CH₃); 2,51 (3H, s, -N-CH₃); 4,97 (1H, d, J=4Hz, H_{1"}); 5,16 (1H, d, J=3,5Hz, H_{1'}).

Espectro de masas $(M + 1)^+$ m/e 478

también m/e 129, 154, 160, 173.

1-N-ETIL-ANTIBIOTICO JI-20B

$[\alpha]_D^{26} + 112,5$ (H₂O).

5 RMN (D₂O): δ 1,1 (3H, t, J=7 Hz, CH₂-CH₃); 1,22 (3H, s, C-CH₃); 1,3 (3H, d, -CH-CH₃); 4,95 (1H, d, J=4 Hz, H₁"') 5,35 (1H, J = 3,5 Hz H₁').

Espectro de masas M^+ + 1 m/e 524, también 154, 160, 173, 175, 191, 201, 219, 304, 317, 332, 333, 350, 360.

1-N-Etilsisomicina

10 $[\alpha]_D^{26} + 164^{\circ}$ (0,3%, H₂O); rmp (ppm) (D₂O): δ 1,05 (3H, t, J=7Hz, -CH₂CH₃); 1,19 (3H, s, -C-CH₃); 2,5 (3H, s, N-CH₃); 4,85 (1H, m, =CH-); 4,95 (1H, d, J=4Hz, H₁"'); 5,33 (1H, d, J=2,5 Hz, H₁').

15 Espectro de masas: $(M + 1)^+$ m/e 476

también m/e 127, 154, 160, 173, 191, 201, 219, 256, 299, 317, 332, 345, 350, 360, 378, 390, 400.

20 EJEMPLO 4

SALES POR ADICION DE ACIDO

A. Salas de sulfato (Salas por adición con ácido sulfúrico).

25 Se disuelve 5,0 g de 1-N-etilsisomicina en 25 ml de agua y se ajusta el pH de la solución a 4,5 con ácido sulfúrico 1N. Se vierte en aproximadamente 300 ml de metanol con agitación vigorosa, se continúa la agitación durante aproximadamente 10-20 minutos y se filtra. Se lava el pre-
30 cinitado con metanol y se seca a aproximadamente 60°C en vacío para obtener sulfato de 1-N-etilsisomicina.

B. Sales de clorhidrato

Se disuelven 5,0 g de 1-N-etilverdamicina en 25 ml de agua. Se acidifica con ácido clorhídrico 2N a pH 5. Se liofiliza para obtener clorhidrato de 1-N-etilverdamicina.

5 Los compuestos preparados de acuerdo con el procedimiento de este invento son agentes antibacterianos de amplio espectro los cuales, ventajosamente, exhiben actividad contra muchos organismos, particularmente organismos gram-negativos, que son resistentes a sus precursores no
10 sustituidos en 1-N. Por lo tanto, los compuestos de este invento pueden ser utilizados sólo o en combinación con otros agentes antibióticos para evitar el crecimiento o reducir el número de bacterias en diversos ambientes. Pueden ser utilizados, por ejemplo, para desinfectar artículos de vidrio de laboratorio, equipos dentales y médicos
15 contaminados con Staphylococcus aureus u otras bacterias que puedan ser inhibidas por los compuestos. La actividad de los compuestos de este invento contra bacterias gram-negativas los hace útiles para combatir infecciones causadas por organismos gram-negativos, por ejemplo especies de
20 Proteus y Pseudomonas. Los derivados sustituidos en 1-N de los 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitolos, por ejemplo 1-N-etilsisomicina y 1-N-etilverdamicina tienen aplicaciones veterinarias, particularmente en el tratamiento de mastitis en ganado y de diarreas inducidas por Salmonella
25 nella en animales domésticos tales como perros y gatos.

30 En general, la dosificación administrada de los compuestos dependerá de la edad y del peso de la especie de animales que están siendo tratados, del modo de administración, y del tipo y gravedad de la infección bacteriana que

5 está siendo evitada o reducida. En general, la dosificación de los derivados de los 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitóles empleados para combatir una infección bacteriana dada será similar a los requisitos de dosificación de los correspondientes 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitóles no sustituidos en 1-N.

10 Los compuestos preparados de acuerdo con el procedimiento de este invento pueden ser administrados por vía oral. Pueden ser asimismo administrados por vía tópica en la forma de ungüentos, tanto hidrófilos como hidrófobos, en la forma de lociones, que pueden ser acuosas, no acuosas o del tipo de emulsión o pueden estar en la forma de cremas. Excipientes farmacéuticos útiles en la preparación de dichas formulaciones incluirán, por ejemplo, sustancias 15 tales como agua, aceites, grasas, poliésteres, políoles y similares.

20 Para administración por vía oral los compuestos pueden ser formulados en la forma de tabletas, cápsulas, elixires o similares, o incluso pueden ser mezclados con piensos para animales. Es en esta forma de dosificación en que los agentes antibacterianos son máximamente eficaces para tratar infecciones bacterianas del tracto gastrointestinal, las cuales infecciones provocan diarrea.

25 En general, los preparados para vía tópica contendrán de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3,0 gramos de los compuestos del invento por cada 100 gramos de ungüento, cremas o loción. Los preparados por vía tópica son aplicados usualmente de modo suave a lesiones en alrededor de 2 a alrededor de 5 veces por día.

30 Los agentes antibacterianos preparados de acuerdo con

5 el procedimiento de este invento pueden ser utilizados en forma líquida, tal como soluciones, suspensiones y similares para utilización ótica y óptica, y pueden también ser administrados parenteralmente mediante inyección intramuscular. La solución o suspensión inyectable será administrada usualmente en cantidades de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 15 mg de agente antibacteriano por kilogramo de peso corporal y por día, dividido en alrededor de 2 a alrededor de 4 dosis. La dosis exacta depende de la fase y de la gravedad de la infección, de la susceptibilidad del organismo infeccioso al agente antibacteriano y de las características individuales de la especie de animal que está siendo tratado.

20 REIVINDICACIONES

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

30 1ª.- Procedimiento para la preparación de nuevos pseudotrisacáridos, particularmente derivados sustituidos en 1-N de los 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitoles gentamicina A, gentamicina B, gentamicina B₁, gentamicina C₁,



5 gentamicina C_{1a}, gentamicina C₂, gentamicina C_{2a}, gentamicina C_{2b}, gentamicina X₂, sisomicina, verdamicina, tobramicina, Antibiótico G-418, Antibiótico 66-40B, Antibiótico 66-40D, Antibiótico JI-20A, Antibiótico JI-20B, Antibiótico G-52, mutamicina 1, mutamicina 2, mutamicina 4, mutamicina 5, y mutamicina 6, en que el sustituyente es alcoholo de cadena recta que tiene hasta cinco átomos de carbono, y de las sales por adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los mismos, el cual procedimiento comprende hacer
10 reaccionar uno de los 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitolos arriba enumerados, que posee grupos protectores de amino en cualquier posición diferente de la posición 1, y en que el grupo 1-amino puede estar activado, con un agente alcoholante que contiene el grupo alcoholo de cadena
15 recta que tiene hasta cinco átomos de carbono y un grupo activo, eliminar los grupos protectores y, si se requiere, el grupo o grupos activadores presentes en la molécula, y aislar el derivado tal como está o en forma de una sal por adición de ácido farmacéuticamente aceptable.

20 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, en que el grupo 1-amino libre del 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitol está alcoholado.

25 3ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, en que el grupo 1-amino del 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitol es alcoholado en la forma del derivado de trifluorometilsulfonilo.

30 4ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, en que el grupo 1-amino del 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitol es alcoholado en la forma del derivado di-(2-cianoetilico).

5ª.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 4ª, en que el agente alcoholante es un fluorosulfonato de alcoholilo, un sulfato de dialcoholilo o un yoduro de alcoholilo.

5 6ª.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 5ª, en que el 4,6-di-(aminoglicosil)-1,3-diaminociclitol, que posee grupos protectores de amino en cualquier posición diferente de la posición 1, es 3"-N-4"-O-carbonil-2',3,6'-tri-N-ter-butoxicarbonil-sisomicina.

10 7ª.- Procedimiento para la preparación de nuevos pseudotrisacáridos.

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

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

Madrid,

17.8.1972

P.A.

20 **Alberto de Elzaburu**

Por Poder,



25

30

MPB:-
