



ESPAÑA

19 ES	11 NUMERO	10 A1
	21	
	22 FECHA DE PRESENTACION	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
15421/76	14 abril 1976	INGLATERRA

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07N // A.61K	

64 TITULO DE LA INVENCION
PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR DERIVADOS L-N-SUSTITUIDOS DE CANAMICINA

71 SOLICITANTE (S)
PFIZER CORPORATION

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Calle 15 i/2, Avenida Santa Isabel, Colon, República de Panama.

72 INVENTOR (ES)
William Alexander Million, Rhona Margaret Plews., Kenneth Richardson.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
D. José Miguel Gómez-Acebo y Pombo, Agente Oficial de la P.I.

UNE A-4 MOD. 3108

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

UTILICISE COMO PRIMERA PAGINA DE LA MEMORIA

5 JUL. 1978

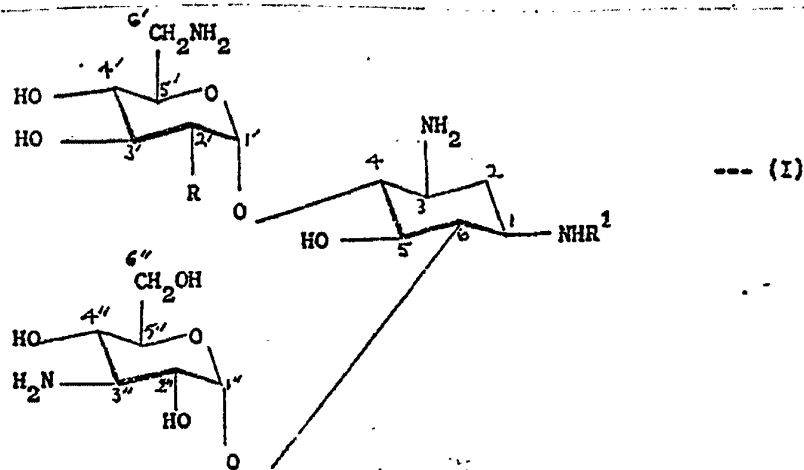
Esta invención se relaciona con un nuevo procedimiento para la preparación de antibióticos de aminoglicósidos y con nuevos productos intermediarios útiles en dicho procedimiento, y particularmente se relaciona con un procedimiento para la preparación de derivados de 1-N-sustituído-canamicina y con derivados de canamicina selectivamente N-protegidos como intermediarios para utilizarse en el procedimiento de la invención.

5 Ejemplos de tales derivados de 1-N-sustituído-canamicina se describen en la memoria completa de la Solicitud de Patente británica copendiente No. 46.412/74; otros derivados son compuestos conocidos tales como 1-N-[4-amino-2-hidroxi-butiril]-canamicina A (BB-K8) descrito en la Patente británica No. 1.401.221. Con el fin de preparar tales compuestos a partir de canamicina de producto de fermentación, fácilmente disponible, es deseable proteger algunos o todos los grupos amino distintos al grupo 1-amino.

10 La sustitución puede hacerse con preferencia en el grupo 1-amino con lo cual se simplifica el aislamiento del producto 1-N-sustituído final. Constituye un objeto de esta invención proporcionar un procedimiento para la preparación de derivados 1-N-sustituídos de canamicina proporcionando dichos intermediarios selectivamente N-protegidos.

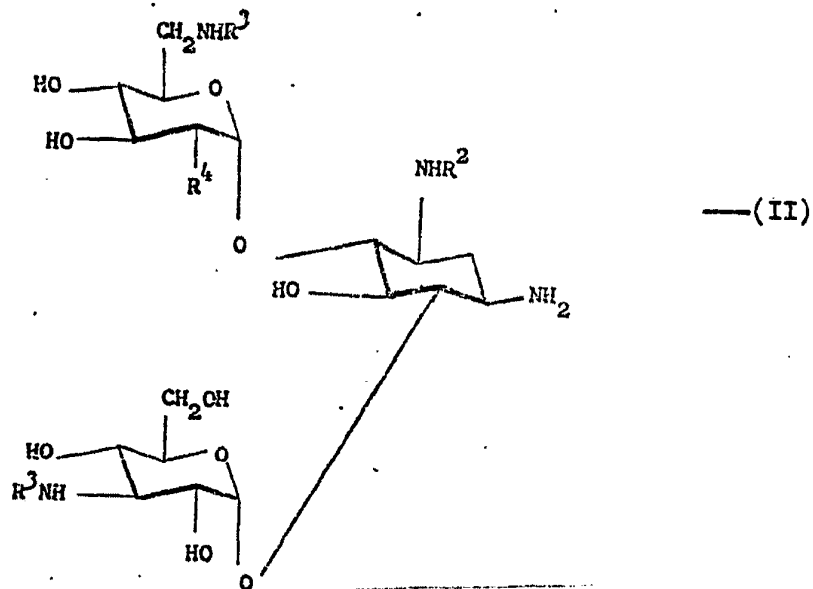
20

Así, y de acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento para preparar compuestos de fórmula:



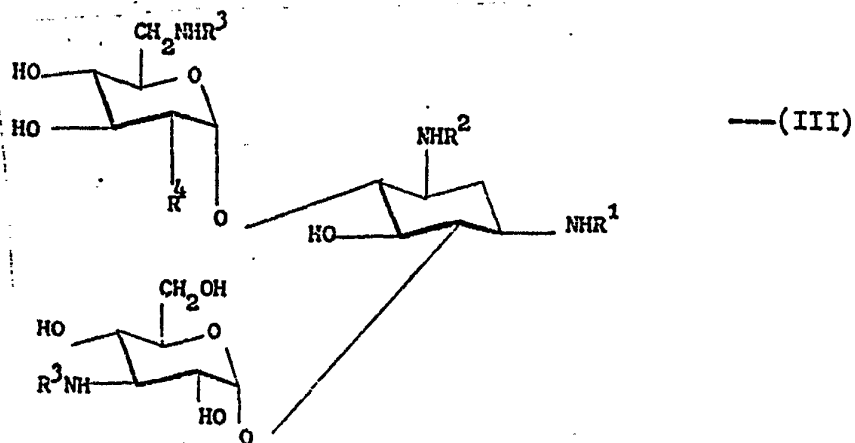
en la que R puede ser un grupo amino o hidroxilo y R^1 puede ser un grupo alquilo inferior o un grupo alcanilo alifático inferior, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con grupos hidroxilo y/o amino; cuyo proceso comprende acilar o alquilar un compuesto de fórmula:

5



en la que R^2 es un átomo de hidrógeno o un grupo bencilo; R^3 es un grupo acilo amino-bloqueante lábil como se define en esta invención; y R^4 es un grupo hidroxilo o un grupo NHR^3 , para producir un compuesto de fórmula:

10



en la que R^1 a R^4 se definen como anteriormente; separar los grupos R^2 (en el caso de que sean bencilo) y R^3 ; y aislar el compuesto de fórmula (I).

5 En esta memoria, el término alquilo inferior o alcanoilo alifático inferior indica que tales grupos contienen de 1 a 6 átomos de carbono, pudiendo ser de cadena recta o ramificada. El grupo acilo amino-bloqueante, labil, R^3 , es un grupo acilo que puede ser separado selectivamente del compuesto de fórmula (III) por técnicas convencionales. En el caso en donde
10 R^1 sea un grupo alcanoilo alifático inferior, R^3 puede ser un grupo haloacetilo, preferiblemente un grupo trifluoracetilo, el cual se puede separar por hidrólisis bajo condiciones suaves, por ejemplo con solución diluida de hidróxido amónico, de modo que el grupo alcanoilo R^1 no es aceptado. R^3 puede ser también
15 un grupo formilo o un grupo mono, di o tricloro-acetilo. Cuando R^1 es un grupo alquilo inferior, R^3 puede comprender adicionalmente un grupo alcanoilo inferior, por ejemplo un grupo acetilo, un grupo benzoilo opcionalmente sustituido en el anillo aromático con, por ejemplo, un grupo nitro o uno o más átomos de halógeno, o un grupo alcoxycarbonilo inferior, por ejemplo un grupo etoxycarbonilo o metoxycarbonilo. Estos grupos requieren condiciones de hidrólisis más fuertes para su separación y, por consiguiente, no son adecuados cuando R^1 es un grupo alcanoilo inferior. Grupos acilo, amino-bloqueantes, lábiles, preferidos
20 para utilizarse en el proceso de la invención, son los grupos acetilo y trifluoracetilo.
25

Este procedimiento para la preparación de compuestos de fórmula I comprende, como etapa inicial, acilar o alquilar un compuesto de fórmula II para introducir el sustituyente R^1
30 en el grupo amino de la posición 1. Dicha reacción se puede efectuar

tuar de diversos modos ya conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la acilación se puede conseguir utilizando un derivado activado de un ácido alcanóico alifático inferior, por ejemplo el éster de N-hidroxisuccinimida, o empleando el cloruro o anhídrido de ácido. La alquilación se puede conseguir también por reacciones convencionales, por ejemplo por alquilación reductiva utilizando un aldehído o cetona adecuada o un derivado de aldehído tal como se describe en la solicitud de Patente británica copendiente No. 7529/76, o por reducción del correspondiente derivado acilado (por ejemplo, con diborano). Naturalmente, en el caso en donde se utilice un compuesto de fórmula II en la que R^2 sea un átomo de hidrógeno, la reacción tendrá lugar también sobre la posición 3-N, pero si solamente se utiliza un ligero exceso de reactante, el isómero 1-N-sustituido requerido puede separarse comparativamente de un modo fácil a partir del isómero 3-N-sustituido y del producto 1,3-di-N-sustituido por métodos convencionales, por ejemplo mediante cromatografía de intercambio iónico. Esto se puede efectuar en esta etapa del procedimiento o, más convenientemente, después de la separación de los grupos amino-bloqueantes.

La segunda etapa del proceso comprende separar los grupos amino bloqueantes R^3 , del grupo 2'-amino, si está presente, y los grupos 6' y 3"-amino y también el grupo bencilo, si está presente, del grupo 3-amino. En ciertos casos, cuando el 1-N-sustituyente mismo lleva un grupo amino-sustituyente, puede ser deseable proteger este grupo durante el transcurso del procedimiento y entonces será necesario separar este grupo amino-bloqueante así como en la etapa final del procedimiento. Existen varias condiciones para separar totalmente los grupos amino-bloqueantes, bien conocidos para los expertos en la técnica,

que dependerán naturalmente de la naturaleza del grupo protector utilizado y del ambiente de la amina protegida y, como ya se ha mencionado, se elegirán de acuerdo con el sustituyente de la posición N-1. El medio empleado puede ser anhídrido o acuoso y, en casos particulares, puede ser ácido o básico en diversas concentraciones. Por ejemplo, el grupo bencilo, cuando está presente, se puede separar por hidrogenólisis catalítica de forma convencional, en presencia de un catalizador de paladio.

Algunos grupos acilo se pueden separar por hidrólisis bajo condiciones básicas suaves, por ejemplo el grupo trifluoracetilo se puede separar por tratamiento con hidróxido sódico 1N a temperatura ambiente durante 24 horas, mientras que los grupos acetilo, benzoilo y etoxicarbonilo requieren condiciones más vigorosas para su separación, por ejemplo calentamiento con hidróxido sódico 5N durante varias horas a 60-80°C. El producto de fórmula I se puede purificar finalmente, si se desea, por técnicas convencionales, por ejemplo por cristalización o cromatografía.

El proceso de la invención se ejemplifica por la preparación de 1-N-[(S)-4-amino-2-hidroxibutiril]-canamicina A (BB-X8) a partir de 3-N-bencil-3",6'-di-N-trifluoracetil-canamicina A. En este caso, la reacción de acilación se efectúa convenientemente utilizando el ester de N-hidroxisuccinimida de ácido (S)-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxi-butírico. La reacción se efectúa convenientemente con los reactantes disueltos en un disolvente orgánico inerte, por ejemplo tetrahidrofurano, y adecuadamente se efectúa añadiendo una solución del éster activo a una solución del derivado de canamicina a 0°C. La reacción se puede monitorizar por cromatografía de capa fina y, si se desea, se puede añadir más ester activo para asegurar la reac-

ción completa. La reacción se deja proceder convenientemente a temperatura ambiente y se ha encontrado que, bajo estas condiciones, la acilación se completa prácticamente en el espacio de 48 horas. El producto se aísla por evaporación del disolvente y el producto se puede purificar en esta etapa, si se desea, por técnicas convencionales (por ejemplo cristalización o cromatografía), pero más convenientemente se utiliza en forma bruta en la siguiente etapa del procedimiento.

La separación de los grupos 3" y 6'-N-trifluoracetilo se consigue por hidrólisis básica suave, pudiéndose realizar ésta disolviendo simplemente el producto de la primera etapa del proceso en hidróxido amónico 1N y dejando reposar la solución durante varias horas (por ejemplo durante la noche) a temperatura ambiente. Por último, los grupos bencilo y benciloxicarbonylo se pueden separar conjuntamente mediante hidrogenólisis catalítica. Esta se puede efectuar convenientemente disolviendo el producto de la etapa anterior en un disolvente adecuado, por ejemplo una mezcla de metanol, agua y ácido acético, y sometiendo la mezcla a una hidrogenación convencional, por ejemplo a 3,5 kg/cm² y 40°C, en presencia de un catalizador de paladio. Se ha encontrado que bajo estas condiciones la desprotección se completa prácticamente en el espacio de 14 horas. El producto se aísla, después de filtrar, por evaporación del disolvente. La purificación se puede conseguir luego, si se desea, mediante, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, para dar el producto requerido en forma pura. El proceso se puede realizar de un modo exactamente análogo pero a partir de 3"-6'-di-N-trifluoracetil-canamicina A. En este caso, se forma el producto 1-N-sustituído, junto con el derivado 3-N-sustituído y el producto 1,3-N,N-disustituído. Sin embargo, el producto 1-N-sus-

tituído deseado se puede separar facilmente de los otros sub-
productos, por ejemplo mediante la etapa final de cromatografía
de intercambio iónico, si bien naturalmente el producto se ob-
tiene, en este caso, en un rendimiento menor. Similarmente, se
5 puede utilizar 2',3'',6'-tri-N-trifluoracetil-canamicina B para
proporcionar los derivados 1-N-sustituídos de canamicina B.

El procedimiento de la invención se ejemplifica
también por la preparación de 1-N- \int (S)-4-amino-2-hidroxi-butil/
canamicina A. En este caso, el intermediario de canamicina pro-
10 tegido (II) se alquila primero, por ejemplo, mediante alquila-
ción reductiva con un derivado de aldehído, tal y como se des-
cribe en la Solicitud de Patente británica copendiente No.
7529/76 y a continuación los grupos N-bloqueantes son separa-
dos, aislándose el producto requerido. De este modo, cuando se
15 utiliza 3-bencil-6- \int S/-dihidroximetil-tetrahidro-1,3-oxazin-2-
ona en la alquilación reductiva con 3'',6'-di-N-acetil-canami-
cina A, la ulterior hidrólisis básica para separar los grupos
acetilo y la hidrogenólisis para separar el grupo bencilo, pro-
porciona el compuesto requerido de fórmula I en donde R es un
20 grupo hidroxí y R¹ es un grupo (S)-4-amino-2-hidroxi-butilo. La
alquilación reductiva se puede conseguir convenientemente con
los reactantes disueltos en un disolvente orgánico adecuado,
por ejemplo dimetilformamida, utilizando borohidruro sódico, y
la reacción se completa generalmente en el espacio de varias
25 horas a 30°C. La separación de los grupos acetilo se consigue
por hidrólisis con hidróxido sódico 3N a 80°C durante 4 horas
y el grupo bencilo se separa por hidrogenación catalítica a
60°C y 4,2 kg/cm² durante 16 horas. El producto requerido se
separa luego del isómero 3-N-sustituído co-formado, mediante
30 cromatografía.

Los compuestos de fórmula II son por sí mismos compuestos nuevos según esta invención. Los mismos se pueden preparar mediante una reacción de emigración acilo O \rightarrow N. De este modo, y según un procedimiento para su preparación, de acuerdo con la invención, se trata primero una sal de adición de ácido de canamicina A ó B ó 3-N-bencil-canamicina A, con un exceso de agente acilante bajo condiciones ácidas, de modo que solamente se acilen inicialmente los grupos hidroxilo. En segundo lugar, la sal de adición de ácido del producto O-acilado, disuelto en un disolvente orgánico inerte, se neutraliza.

Bajo estas condiciones, puede tener lugar la emigración acilo intramolecular sobre cualquier grupo amino que tenga un grupo aciloxi sobre su posición adyacente en el anillo, es decir los grupos 6' y 3"-amino y el grupo 2'-amino de canamicina B.

Los restantes grupos O-acilo se separan entonces del modo usual, por ejemplo por hidrólisis y alcoholisis y el producto se puede purificar, si se desea, mediante cromatografía, por ejemplo.

Este proceso para la preparación de compuestos de fórmula II ha resultado ser particularmente eficaz para la preparación de los compuestos en donde R⁴ es un grupo hidroxilo y R³ es un grupo trifluoracetilo. En este caso, se disuelve canamicina A o 3-N-bencil-canamicina A en ácido trifluoracético y se trata a 0° con anhídrido trifluoracético en exceso. La reacción se completa practicamente después de varias horas a 0°C (por ejemplo, durante la noche) y el derivado terc-O-trifluoracetil-canamicina y su sal trifluoracetato se pueden aislar por evaporación de los disolventes bajo vacío. El producto se disuel

ve en un disolvente orgánico inerte, preferiblemente tetrahidro-
furano, y se neutraliza por tratamiento con una base, por ejem-
plo por agitación de la solución con carbonato sódico o potásico.
Se ha encontrado que bajo estas condiciones la reacción de emi-
gración acilo O \rightarrow N procede rápidamente y se completa practica-
mente en el espacio de 20 minutos a temperatura ambiente. Los
restantes grupos O-trifluoracetilo se separan de modo convencio-
nal, por ejemplo por metanolisis, y el producto 3",6',di-N-
trifluoracetilo se puede aislar luego por evaporación del disol-
vente y purificarse, si se desea, por cromatografía en columna
convencional.

Según otro método de preparación, la canamicina A
ó 3-N-bencil-canamicina A se trata primero con un reactivo para
introducir grupos amino-bloqueantes selectivamente separables.

Grupos bloqueantes adecuados son, por ejemplo,
el grupo t-butuloxicarbonilo o el grupo benciloxicarbonilo. El
producto totalmente N-prottegido se O-acila a continuación por
técnicas conocidas, por ejemplo, por tratamiento con un anhídri-
do o cloruro de ácido, por ejemplo anhídrido acético en piridina,
o con un cloroformato de alquilo, por ejemplo cloroformato de
etilo, y los grupos amino-bloqueantes se separan entonces (por
ejemplo, los grupos t-butiloxicarbonilo se separan por trata-
miento con ácido trifluoracético y los grupos benciloxicarbonilo
se separan por hidrogenolisis catalítica) y la solución se neu-
traliza. La emigración acilo O \rightarrow N puede proceder luego como
anteriormente y los restantes grupos O-acilo se separan aislán-
dose el producto en la forma antes descrita.

El proceso se puede aplicar también a canamicina B,
procediendo adicionalmente en este caso la emigración acilo des-
de el grupo 3'-hidroxilo al grupo 2'-amino adyacente para dar
un intermediario tri-N-acilado.

Los compuestos de fórmula II según la invención, así como aquellos de fórmula I y III, pueden existir en varias formas conformacionales, y la invención no se limita a cualquiera de tales formas. En general, los anillos son cada uno de ellos del tipo "silla" y cada uno de los grupos sustituyentes está dispuesto ecuatorialmente con respecto al anillo. Por otra parte, los enlaces glicosídicos entre los anillos hexopiranosilo y el anillo 2-desoxiestreptamina son más normalmente enlaces alfa con respecto a los primeros.

La 3-N-bencil-canamicina A es por sí misma un compuesto nuevo. Se puede preparar por alquilación reductiva de canamicina A con benzaldehído bajo condiciones de pH cuidadosamente controladas. Se ha descubierto que cuando se somete canamicina A en solución acuosa a la alquilación reductiva, a temperatura ambiente o inferior, con un ligero exceso de benzaldehído, en presencia de cianoborohidruro de sodio, y se ajusta cuidadosamente el pH de la solución a 6, entonces el producto principal de la reacción consiste en 3-N-bencil-canamicina A.

Naturalmente, se producen también en la reacción cantidades menores de otros isómeros N-sustituídos y productos polisustituídos, pero estos productos se separan principalmente por cromatografía de intercambio iónico convencional. La fracción principal aislada de la columna por elución con hidróxido amónico, es 3-N-bencil-canamicina A, contaminada con una cantidad menor del isómero 1-N-bencilo. En la práctica, este producto es suficientemente puro para utilizarse directamente en el proceso de la invención, si bien naturalmente el isómero 1-N-bencilo presente conducirá, después de la acilación o alquilación y desprotección, a la formación del isómero 3-N-sustituído como un componente menor, junto con el producto 1-N-sustituído de

fórmula I requerido. Sin embargo, se puede separar entonces fácilmente mediante la etapa de cromatografía final ya descrita.

5 En los siguientes ejemplos, el ejemplo 1 describe la preparación de 3-N-bencil-canamicina A. Los ejemplos 2 a 5 describen la preparación de nuevos compuestos de fórmula II según la invención. Los ejemplos 6 a 9 ilustran el nuevo procedimiento de la invención para preparar compuestos de fórmula I.

10 La cromatografía de capa fina se lleva a cabo sobre placas de sílice utilizando el sistema disolvente establecido. Las manchas son visualizadas después de secar las placas por pulverización con una solución al 5% de hipoclorito de t-butilo en ciclohexano, secando las placas a 100° durante 10 minutos en un horno ventilado, enfriando y pulverizando con una solución de almidón-yoduro potásico.

15 Las temperaturas se ofrecen en grados centígrados. "Amberlite" es una marca registrada.

EJEMPLO 1

20 Se disuelven 24,3 g (0,03 moles) de sulfato de canamicina A en 150 ml de agua y se ajusta el pH a 6 por adición gota a gota de ácido clorhídrico 5N. Se añaden 1,95 g (0,03 moles) de cianoborohidruro de sodio y la mezcla se enfría a 0°C y se agita mientras se añade lentamente, en el transcurso de 2 horas y media, una solución de 3,61 g (0,033 moles) de benzaldehído disuelto en 15 ml de metanol. La mezcla se deja calentar a
25 temperatura ambiente. Después de 16 horas, el pH de la solución se ajusta a 5,5 por adición de ácido clorhídrico 1N y la solución se filtra y añade a una columna de resina intercambiadora de iones Amberlite CG-50 en la forma del ión amonio. La elución en primer lugar con agua y a continuación con un gradiente de hidróxido amónico de concentración en aumento de 0 a 0,7 N, propor
30

ciona como producto principal 3-N-bencil-canamicina A contaminado con algo de derivado 1-N-bencilo (5 g, 28%) R_f 0,44 en metanol, cloroformo, 17% de hidróxido amónico, 4:1:2. (La canamicina A proporciona un valor R_f de 0,15).

5 Se convierte una muestra al derivado volátil tetra-N-acetil-hepta-O-trimetilsililo por tratamiento con anhídrido acético en metanol a temperatura ambiente, durante 24 horas, seguido por reacción con una mezcla 2:1 de hexametildisilazano y trimetilclorosilano a temperatura ambiente durante 24 horas. m/e encontrado ${}_{54}^{1246}C_{106}H_{15}N_4O_7Si_7$ requiere m/e 1246.

10 La posición de sustitución se confirma por la siguiente secuencia de reacciones: (a) el tratamiento con t-butiloxicarbonilazida proporciona un compuesto que tiene tres grupos t-butiloxicarbonilo así como el grupo bencilo (a partir de R.M.N.),
15 (b) la hidrogenación para separar el grupo bencilo, (c) acilación con N-[(S)-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxi-butiriloxi]-succinimida, y (d) la separación de los grupos N-protectores por hidrogenación seguido por tratamiento con ácido trifluoroacético proporciona, como producto principal, 3-N-[(S)-4-amino-2-hidroxi-butiril]canamicina A (BB-K29) idéntica a una muestra preparada según el procedimiento de Naito et al. (J. Antibiotics, 1973, 26, 297).

EJEMPLO 2

25 Se añaden lentamente 5 ml de anhídrido trifluoroacético a una solución agitada de 1 g de canamicina A en 40 ml de ácido trifluoroacético a 0%. La solución se deja reposar a 0-4° durante 20 horas. El disolvente se evapora luego bajo vacío y el residuo se trata con 10 ml de tolueno y se evapora hasta sequedad. La sal trifluoroacetato se recibe en tetrahidrofurano
30 seco y se neutraliza por adición lenta a una suspensión agitada

de carbonato potásico anhidro en exceso en tetrahidrofurano. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 20 minutos y la suspensión se filtra entonces y el filtrado se evapora hasta sequedad. El producto se recibe en 20 ml de metanol y se mantiene a temperatura ambiente durante 30 minutos. El disolvente se evapora bajo presión reducida y el residuo se cromatografía sobre sílice, eluyendo con un gradiente disolvente de cloroformo, metanol (3:1) a cloroformo, metanol, 17% de hidróxido amónico (8:4:1) para dar 0,52 g de hidrato de 3",6'-di-N-tri-fluoracetil-canamicina A como un sólido blanco higroscópico. Rf 0,7 en metanol, cloroformo, 17% hidróxido amónico 4:1:1 (la canamicina A proporciona un Rf de 0,05). $\nu_{\text{C=O}}$ 1665 cm^{-1} .

Se convierte una muestra al derivado volátil di-N-acetil-hepta-O-trimetilsililo como se describe en el ejemplo 1. m/e encontrado 1264. $\text{C}_{47}\text{H}_{94}\text{N}_4\text{O}_4\text{F}_6\text{Si}_7$ requiere m/e 1264.

EJEMPLO 3

Se añaden lentamente 0,7 ml (5 mmoles) de anhídrido trifluoracético a una solución de 0,23 g (0,4 mmoles) de 3-N-bencil-canamicina A en 15 ml de ácido trifluoracético a 0°. La solución se mantiene a 0-4° durante 20 horas. El disolvente se evapora entonces y el residuo se trata con 10 ml de tolueno y se evapora hasta sequedad. El producto se disuelve en 20 ml de tetrahidrofurano y se añade lentamente a una suspensión agitada de exceso de carbonato potásico en tetrahidrofurano. La suspensión se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos, se filtra y el filtrado se evapora hasta sequedad bajo presión reducida. El residuo se recibe en 20 ml de metanol y se deja reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. El disolvente se separa luego bajo vacío para dar 3-N-bencil-3",6'-di-N-tri-fluoracetil-canamicina A. Rf 0,5 en metanol, cloroformo, 8% hi-

dróxido amónico, 4:1:0,1 (la 3-N-bencil-canamicina A proporciona un valor Rf de 0,01).

EJEMPLO 4

5 (A) Una solución de 189,4 g de 1,3,3",6'-tetra-N-bencil
oxicarbonil-canamicina A (Bull.Chem.Soc. Japan, 1965, 38, 1181)
en 568 ml de piridina y 189 ml de anhídrido acético, se agita
durante la noche a temperatura ambiente y a continuación se
vierte en 1,9 litros de agua. La solución acuosa se extracta con
cloroformo (1 x 1,8 litros y 1 x 1,0 litros) y el extracto orgá-
10 nico se evapora hasta sequedad bajo presión reducida. La tritu-
ración del residuo con éter proporciona 224,8 g de penta-O-
acetil-1,3,3",6'-tetra-N-benciloxicarbonil-canamicina A que se
filtra y se seca bajo vacío. El producto tiene un p.f. de
223-229^o; Rf 0,55 en cloroformo, alcohol metilado industrial
15 (12,1), δ 1,8 - 2,05 (15 protones multiplete, 5 grupos acetilo)
y 7,4 (20 protones singlete, 4 grupos fenilo).

(B) Una solución de 53 g de penta-O-acetil-1,3,3",6'-
tetra-N-benciloxicarbonil-canamicina A en 260 ml de acetato de
etilo conteniendo 260 ml de ácido acético glacial, se hidrogena
20 sobre 15 g de paladio sobre carbón al 5% a 60^o y 3,5 kg/cm²,
durante 7 horas. La solución se filtra y el filtrado se evapora
hasta sequedad bajo presión reducida. El residuo se tritura con
éter y se recogen 32,9 g del producto penta-O-acetilcanamicina A
que se seca bajo vacío, p.f. 97-105^o; Rf 0,0 en cloroformo,
25 alcohol metilado industrial (12:1) en comparación a un valor Rf
de 0,55 para el material de partida. El espectro de resonancia
magnética protónica muestra una ausencia completa de protones
aromáticos.

(C) Una solución de 139,2 g de penta-O-acetil-canami-
30 cina A en 1,4 litros de metanol, saturado con amoniaco, se deja

reposar durante la noche a temperatura ambiente y a continuación se evapora hasta sequedad bajo presión reducida. El residuo se disuelve en 140 ml de metanol y el producto en bruto se precipita con 2,5 litros de cloroformo, se filtra y se seca en vacío.

5 El sólido en bruto se enlecha con 400 ml de alcohol metilado industrial y se recogen 91,9 g del producto 3",6'-di-N-acetilcanamicina A por filtración, se lava con éter y se seca bajo vacío; p.f. 150-180°C, Rf 0,77 en metanol, hidróxido amónico 0,880 1:1. Proporciona un espectro ¹³C r.m.n. y un espectro r.m.n. protónico

10 en total acuerdo con la estructura requerida.

EJEMPLO 5

Se añaden lentamente 3,6 ml de anhídrido trifluoroacético a una solución agitada de 960 mg (2 mmoles) de canamicina B en 50 ml de ácido trifluoroacético a 0°. La solución se deja

15 reposar a 0 - 4° durante 20 horas. El disolvente se evapora entonces bajo presión reducida y el residuo se trata con 10 ml de tolueno y se evapora hasta sequedad. La sal trifluoroacetato se disuelve en 30 ml de tetrahydrofurano y se añade lentamente a

20 una solución agitada de trietilamina en exceso en tetrahydrofurano. La solución se deja reposar a temperatura ambiente durante 40 minutos y el disolvente se evapora luego bajo presión reducida. El residuo se disuelve en metanol para hidrolizar los restantes grupos O-trifluoroacetilo y después de 30 minutos a temperatura ambiente se evapora el disolvente bajo presión reducida

25 y el producto se cromatografía sobre sílice eluyendo con un gradiente disolvente de cloroformo, etanol (3:1) a cloroformo, metanol, 17% hidróxido amónico (20:10:1) para dar 452 mg (29%) de 2',3",6'-tri-N-trifluoroacetil-canamicina B como un cristal. Rf 0,70 en metanol, cloroformo, 8% hidróxido amónico 4:1:0,1

30 (la canamicina B proporciona un valor Rf de 0,0).

La estructura se confirma por la siguiente secuencia de reacciones: (a) acetilación con anhídrido acético en metanol durante 20 horas, a temperatura ambiente, seguido por tratamiento con hidróxido amónico 1N durante 18 horas, para separar los grupos trifluoracetilo y proporcionar un producto que contiene dos grupos acetilo. m/e (desorción de campo) encontrado $M + 1$ 568, $C_{22}H_{41}N_5O_{12}$ requiere $M + 1$ 568; (b) tratamiento del derivado di-N-acetilo con anhídrido deuterioacético en metanol a temperatura ambiente, durante 24 horas, seguido por reacción con una mezcla 2:1 de hexametildisilazano y trimetilclorosilano a temperatura ambiente durante 24 horas, para dar el derivado volátil de tri-N-deuteroacetil-di-N-acetil-hexa-O-trimetilsililo. m/e encontrado 1134, $C_{46}H_{86}N_5O_{15}D_9Si_6$ requiere m/e 1134. Se demuestra que la diacetilación ocurre en el anillo 2-deoxiestreptamina a partir del diseño de fragmentación, confirmando con ello que había tenido lugar inicialmente una trifluoracetilación sobre las posiciones 2', 3" y 6' de la canamicina B.

EJEMPLO 6

Se trata 3", 6'-di-N-trifluoracetil-canamicina A (preparada a partir de 1 g de canamicina por el método del ejemplo 2) en 40 ml de tetrahidrofurano, con 1,08 g (3,1 mmoles) de N-(\sqrt{S})-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxi-butiriloxi)succinimida en 50 ml de tetrahidrofurano. La solución se deja reposar a temperatura ambiente durante 24 horas, tras lo cual se añaden 0,54 g más de N-(\sqrt{S})-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxi-butiriloxi)succinimida y la solución se mantiene a temperatura ambiente durante 24 horas más. El disolvente se evapora bajo vacío y el residuo se disuelve en hidróxido amónico 1N y se deja reposar a temperatura ambiente durante 24 horas. La solución se concentra bajo vacío y el producto se recibe en una mezcla de dioxano, agua y

ácido acético (55 ml, 5:5:1) y se hidrogena sobre 5% de paladio en carbón vegetal como catalizador a 30^o y 3,5 kg/cm² durante 6 horas. La mezcla se filtra y el filtrado se evapora. El residuo se cromatografía sobre resina intercambiadora de iones Amberlite CG-50 (forma amónica) eluyendo con un gradiente de hidróxido amónico de concentración en aumento desde 0 a 0,5N, para dar BB-K8 (0,11 g, 9,2% a partir de canamicina A) idéntica a la muestra de referencia.

EJEMPLO 7

Se trata directamente 3-N-bencil-3",6'-di-N-tri-fluoracetil-canamicina A (preparada a partir de 0,23 g de 3-N-bencil-canamicina A en la forma descrita en el ejemplo 3) con una solución de 0,017 g (0,5 mmoles) de N-(\sqrt{S} -4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxi-butiriloxi)succinimida en 15 ml de tetrahydrofurano a 0^o. La solución se deja reposar a temperatura ambiente durante 24 horas. Se añade otra cantidad de 0,35 g del éster activo en tetrahydrofurano y la solución se mantiene durante 20 horas más a temperatura ambiente. La solución se concentra bajo vacío y el residuo se recibe en una mezcla de metanol, agua y ácido acético (30 ml, 10:10:1) y se hidrogena sobre catalizador de paladio en carbón vegetal a 40^o y 3,5 kg/cm² durante 13,5 horas. La suspensión se filtra y el filtrado se evapora. El producto se purifica por cromatografía de intercambio iónico sobre Amberlite CG-50 (forma NH₄⁺) como anteriormente, para dar BB-K8 (84 mg, 36% a partir de 3-N-bencil-canamicina A) idéntica a una muestra de referencia.

EJEMPLO 8

Se hace reaccionar 2',3",6'-tri-N-trifluoracetil-canamicina B con N-(\sqrt{S} -4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxi-butiriloxi)succinimida de forma similar a la descrita en el ejemplo

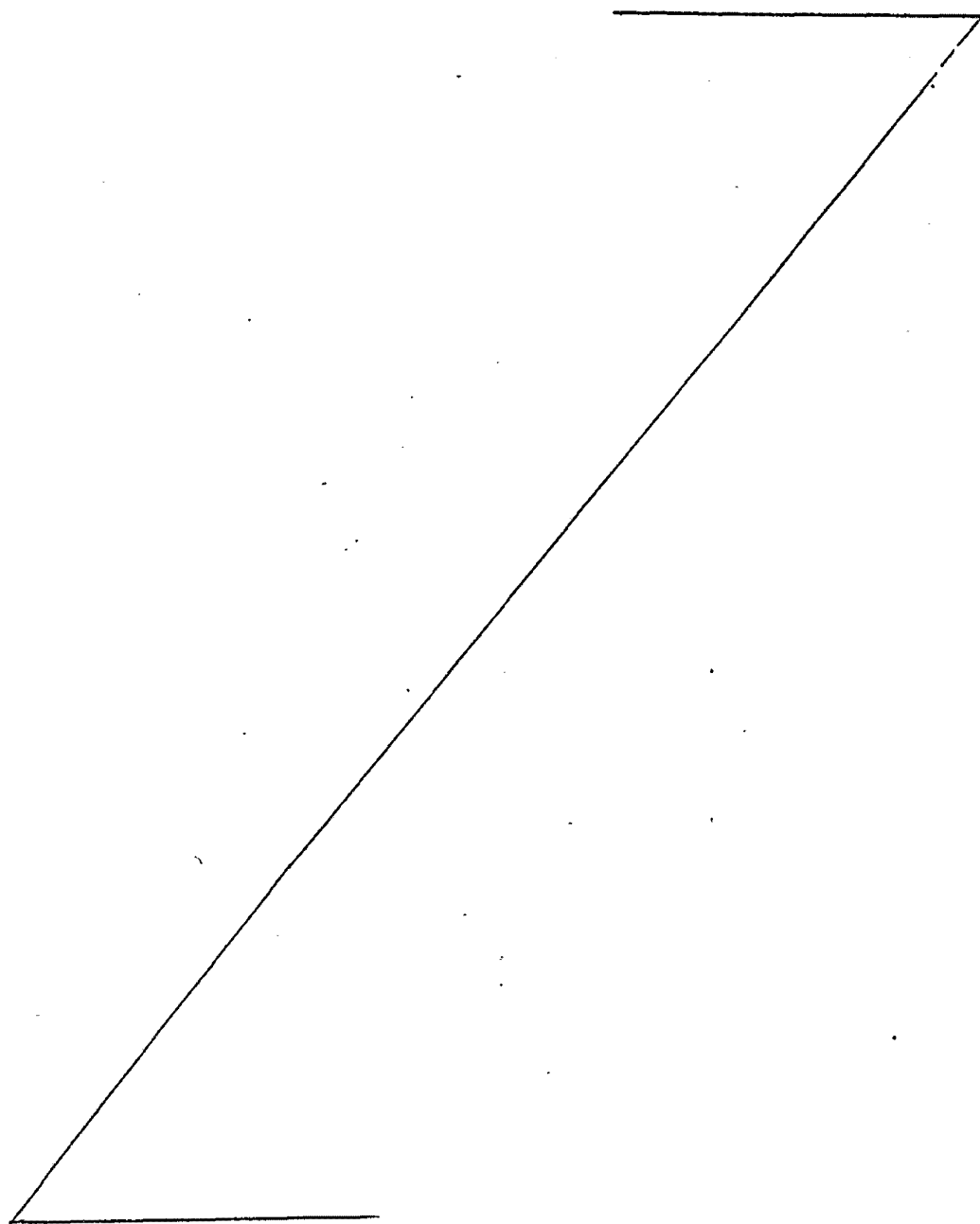
6, para dar, después de la desprotección y purificación, 1-N-(β -4-amino-2-hidroxi-butiril)canamicina B (BB-K26).

EJEMPLO 9

Una solución de 2,84 g de 3",6'-di-N-acetilcanamicina A y 1,305 g de 3-bencil-6-(S)-dihidroxi-metil-tetrahidro-1,3-oxazin-2-ona en 28,4 ml de dimetilformamida, se calienta a 60° durante 1 hora y se enfría luego a 30°. Se añaden 0,189 g de borohidruro sódico y la mezcla se agita durante 1 hora más. Se añade 1 ml de agua, se deja reposar la mezcla durante la noche y el disolvente se separa bajo presión reducida. El residuo se calienta con 28,4 ml de solución de hidróxido sódico 3N a 80° durante 4 horas y, después de enfriar, se ajusta el pH de la mezcla de reacción a 5,7 con ácido clorhídrico concentrado. La solución en bruto de 1-N-(β -4-bencilamino-2-hidroxi-butiril)-canamicina A y 3-N-(β -4-bencilamino-2-hidroxi-butiril)-canamicina A se pasa descendientemente por una columna de resinas intercambiadora de iones Amberlite CG-50 (forma amónica) eluyendo primero con agua para separar productos inorgánicos y a continuación con amoníaco 0,15 M para aislar la mezcla de aminoglicósidos en bruto. Las fracciones requeridas de la columna se evaporan y el residuo se disuelve en una mezcla de 15 ml de metanol, 15 ml de ácido acético y 15 ml de agua y se hidrogena sobre un catalizador de 30% de paladio en carbón a 60° y 4,2 kg/cm² durante 16 horas. La solución se filtra y el disolvente se separa bajo presión reducida. El producto se purifica por cromatografía de intercambio iónico como anteriormente se ha descrito, para dar 0,5 g de 1-N-(β -4-amino-2-hidroxi-butiril)-canamicina A idéntica a una muestra de referencia.

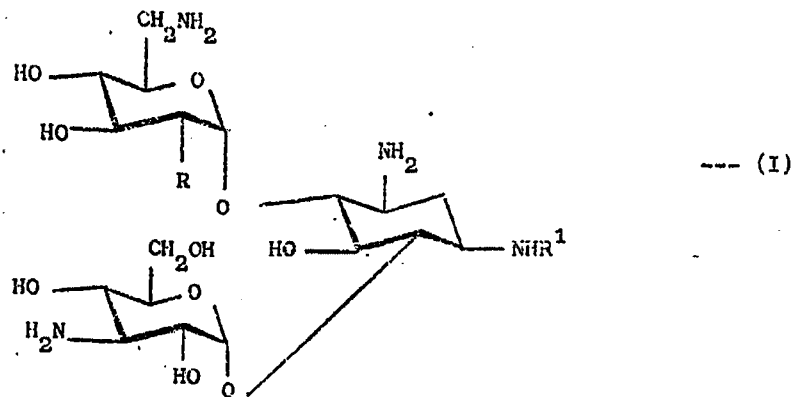
Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacer-

se constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.

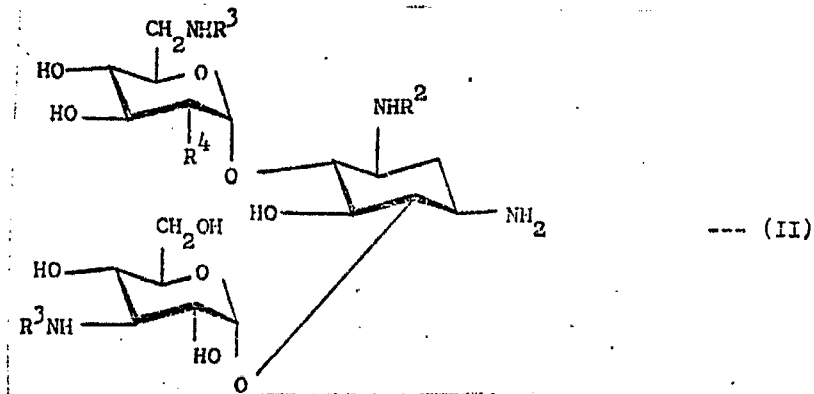


REIVINDICACIONES

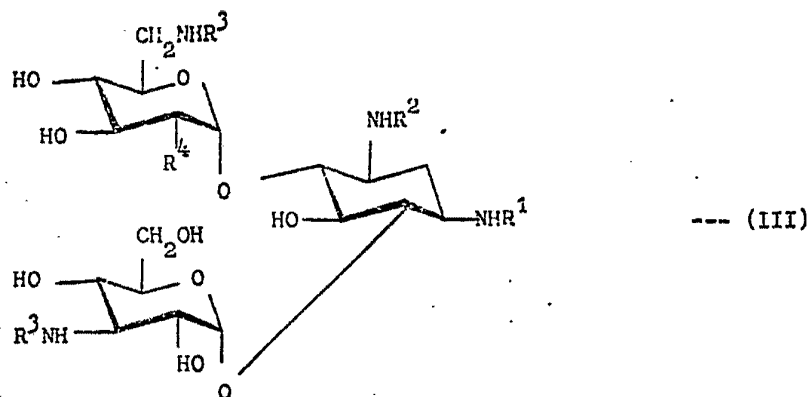
1.- Procedimiento para preparar derivados 1-N-sustituídos de canamicina, de fórmula:



en la que R puede ser un grupo amino o hidroxilo y R¹ puede ser un grupo alquilo inferior o un grupo alcenoilo alifático inferior, cualquiera de los cuales puede estar opcionalmente sustituido con grupos hidroxilo y/o amino; caracterizado porque comprende acilar o alquilar un compuesto de fórmula:



en la que R² es un átomo de hidrógeno o un grupo bencilo; R³ es un grupo acilo amino-bloqueante, lábil; y R⁴ es un grupo hidroxilo o un grupo NHR³; para producir un compuesto de fórmula:



en la que R^1 a R^4 se definen como anteriormente; separar los grupos R^2 (en el caso de que sean bencilo) y R^3 ; y aislar el compuesto de fórmula (I).

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque R^3 es un grupo trifluoracetilo.

3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque como compuesto de fórmula (II) se emplea 3-N-bencil-3"-6'-di-N-trifluoracetil-canamicina A.

4.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque como compuesto de fórmula (II) se emplea 3",6'-di-N-trifluoracetil-canamicina A.

5.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque como compuesto de fórmula (II) se emplea 2',3",6'-tri-N-trifluoracetil-canamicina B.

6.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque R^3 es un grupo acetilo.

7.- Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque compuesto de fórmula (II) se emplea 3",6'-di-N-acetil-canamicina A.

8.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque R^1 es un grupo (S)-4-amino-2-hidroxi-butirilo.

20

9.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque R¹ es un grupo (S)-4-amino-2-hidroxi-butilo.

5

10.- Procedimiento para preparar derivados 1-N-sustituidos de canamicina, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 23 hojas escritas a máquina por una sola cara.

12 Abr. 1970

Madrid,

PFIZER LIMITED
L. G. GONZALEZ Y CA
Calle de S. Francisco, 10
Madrid