

20 NOV. 1978

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

11	NUMERO	10	A1
21			
22	FECHA DE PRESENTACION		



ESPAÑA

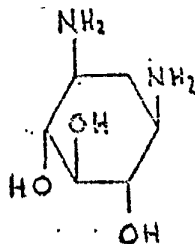
PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
24002/76	10-6-76	Gran Bretaña
45492/76	2-11-76	" "
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07H/A61K	
54 TITULO DE LA INVENCION		
"UN METODO PARA PREPARAR PSEUDOTRISACARIDOS"		
71 SOLICITANTE (S)		
DR. ANTONIO CAÑAS-RODRIGUEZ		(JWR/6251)
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
8 Saint Martin's Place, Canterbury, Kent CT1 1QD, Inglaterra		
72 INVENTOR (ES)		
El mismo solicitante		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		(P-66.175)
DOH FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ		

1 La presente invención se refiere a la preparación de
aminoglicósidos. En particular, la invención se refiere a un
método de preparar pseudotrisacáridos que tienen actividad
antibiótica.

5 Los antibióticos bien conocidos de los tipos de la
Kanamicina, Gentamicina y Apramicina son amino-pseudotrisa-
cáridos. Los antibióticos conocidos exhiben actividad con-
tra una amplia gama de bacterias. Sin embargo, están llegando
do a ser muy generalizadas cepas de bacterias que presentan
10 resistencia a estos tipos de antibióticos. Esto constituye
un problema importante debido a que las cepas resistentes
de bacterias tienden a producir toxinas más peligrosas que
las cepas no resistentes. La presente invención se basa en
el descubrimiento de que por sustitución al menos parcial
15 de los anillos normales en estos antibióticos por anillos
desoxi pueden obtenerse compuestos que tienen una actividad
notablemente mejorada cuando se comparan con los correspon-
dientes antibióticos conocidos contra tales microorganismos
resistentes.

20 Los antibióticos de los tipos de la Kanamicina, Gen-
tamicina y Apramicina son pseudotrisacáridos basados en
2-desoxiestreptamina:

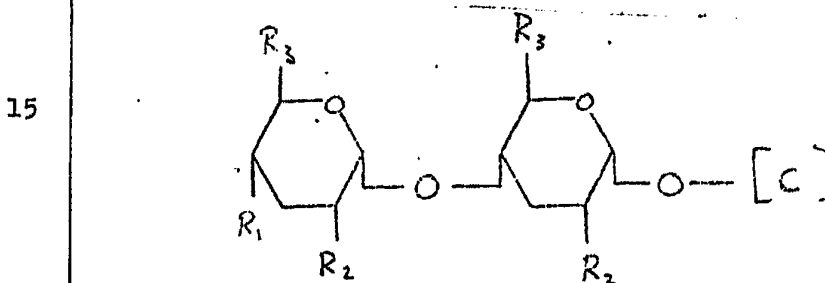


25 En los antibióticos de la Kanamicina y Gentamicina, este
anillo está sustituido con anillos de monosacáridos en las
posiciones 4 y 6, y en los antibióticos de la Apramicina es-
te anillo está sustituido con un resto de disacárido en la
30 posición 4 ó 5. En los antibióticos de este tipo, las bandas

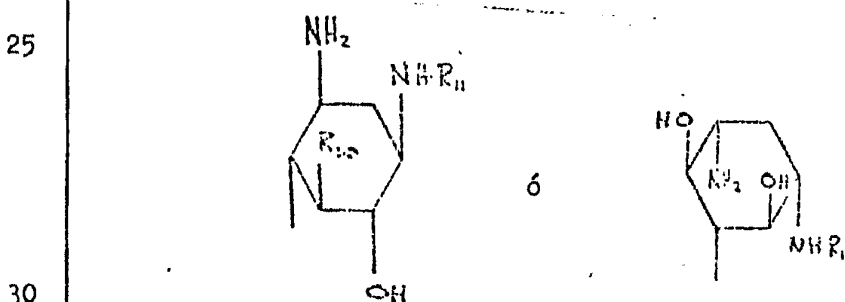
1 glicosídicas son α , y los sustituyentes de los anillos están en posición ecuatorial.

En los antibióticos de esta invención, los restos de monosacáridos distintos de los restos de estreptamina (pseudomonosacárido) pueden hallarse en sus formas D- ó L-. Generalmente, por conveniencia, en esta memoria descriptiva los compuestos se describirán e ilustrarán en sus formas D-, pero debe entenderse que tales referencias incluyen las formas L- y mezclas, tales como mezclas racémicas, de las dos formas.

La presente invención proporciona un método para preparar pseudotrisacáridos de la fórmula general (I)

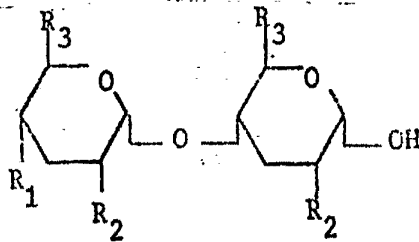


20 en la que R_1 es H, F, OH o SH; R_2 es H o NH_2 ; y R_3 es H o CH_2R_4 ; en donde R_4 es OH o NH_2 , con la condición de que cuando R_1 es H, R_3 es CH_2NH_2 y cuando R_3 es H o CH_2OH , R_1 es NH_2 ; $[C]$ es un grupo de la fórmula



1 en donde R_{10} es H u OH y R_{11} es H, CH_3 o $CO.CHOH-CH_2-CH_2-$
 - NH_2 ; cuyo método comprende las operaciones de: 1) seleccionar un derivado reactivo monofuncional en C_1 de un disacárido protegido, teniendo el disacárido la fórmula general:

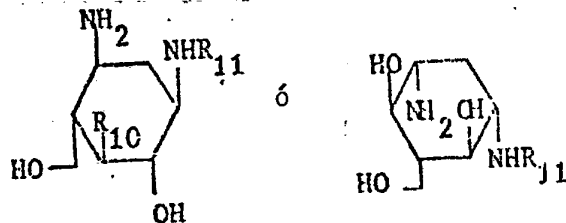
5



10

en la que R_1 , R_2 y R_3 son como se han definido anteriormente; 2) seleccionar un derivado de desoxiestreptamina protegido monofuncional que tiene un grupo hidroxilo libre en la posición C_4 o C_5 , teniendo el derivado de desoxiestreptamina la fórmula general:

15



20

en la que R_{10} y R_{11} son como se han definido anteriormente; 3) hacer reaccionar dicho disacárido protegido y dicho derivado de estreptamina protegido, en presencia de un catalizador para la formación de enlaces α -glicosídicos, a fin de formar un enlace α -glicosídico entre ellos; y 4) eliminar los grupos protectores para liberar el pseudotrisacárido de la fórmula (I).

25

En una realización preferida de la invención, R_1 es H u OH, R_2 es H o NH_2 y R_3 es CH_2NH_2 .

30

Por tanto, la invención se refiere en líneas generales a un método de fabricación que comprende hacer

1 reaccionar juntos, de una manera conocida per se para com-
puestos análogos, monosacáridos o pseudomonosacáridos pre-
cursores protegidos correspondientes para formar un pseudo-
5 trisacárido protegido en el que las uniones glicosídicas
son α -glicosídicas y subsiguientemente separar los grupos
protectores para liberar el compuesto de la invención. Es-
te método puede realizarse en dos etapas, haciendo reaccio-
nar primeramente juntas dos unidades de monosacárido prote-
gidas para dar una unidad de disacárido protegida y hacer
10 reaccionar subsiguientemente ésta con una unidad de mono-
sacárido adicional para dar el pseudotrisacárido protegido.
Este método es aplicable generalmente a los compuestos de
la invención. Una posibilidad adicional particularmente
aplicable a los análogos de la Kanamicina en los que los
15 dos restos monosacáridos terminales en el eventual pseudo-
trisacárido protegido son iguales consiste en hacer reaccio-
nar un pseudomonosacárido protegido difuncional correspon-
diente al resto intermedio del producto con dos equivalen-
tes molares de un monosacárido protegido monofuncional co-
20 rrespondiente a los restos terminales. Usualmente se utili-
zará un exceso de los compuestos monofuncionales con objeto
de desplazar la reacción más a favor de los posibles produc-
tos trisacáridos que a favor de los posibles productos di-
sacáridos.

25 Como resultará evidente para los expertos en la
técnica, algunos de los compuestos de la invención son in-
terconvertibles con otros compuestos de la invención. En
particular, los grupos -OH se pueden convertir en grupos
NH₂ ó SH ó átomos de halógeno por procedimientos conocidos
30 en la técnica. Asimismo, los compuestos directamente corres

1 pondientes a los compuestos de la invención pero que tienen
grupos OH en algunos lugares en que los compuestos de la
invención tienen grupos NH_2 se pueden convertir en compues-
tos de la invención por procedimientos conocidos en la téc-
5 nica. En esta situación, para el propósito de la invención
se considera que los grupos OH son grupos protectores.

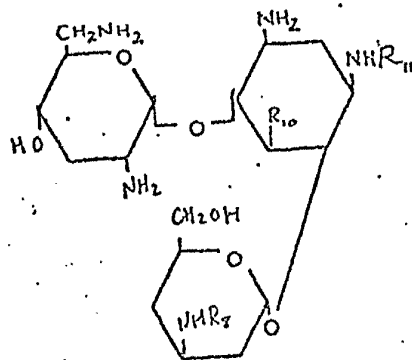
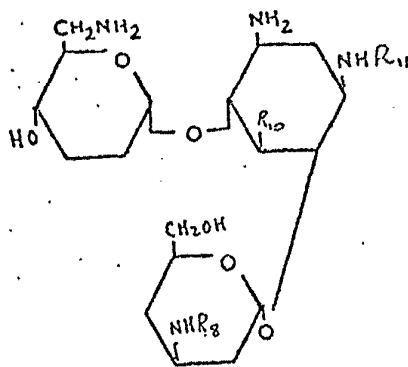
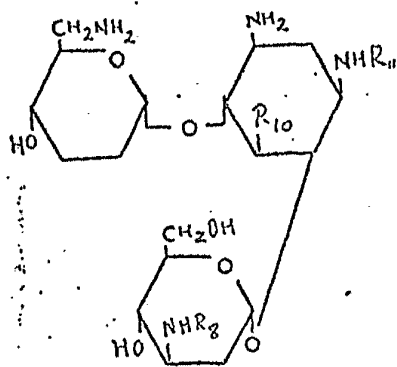
Los análogos de la Kanamicina de la invención
que tienen un grupo NH_2 en la posición 3" se pueden conver-
tir en análogos de Gentamicina por metilación en N de este
10 grupo amino por procedimientos conocidos en la técnica. Los
compuestos de la invención en los que R_{11} es diferente de
hidrógeno pueden producirse también a partir de los corres-
pondientes compuestos amino libres por métodos conocidos.

Como será evidente de las fórmulas dadas arriba,
15 los compuestos de la invención contienen un mínimo de 4 y
un máximo de 6 grupos amino. Los compuestos preferidos de
la invención tienen 5 grupos amino. En particular, en el
grupo A^1 el radical R_6 es muy preferiblemente un grupo ami-
no.

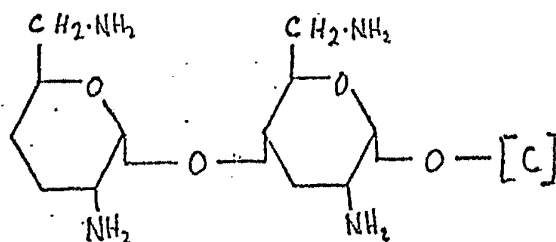
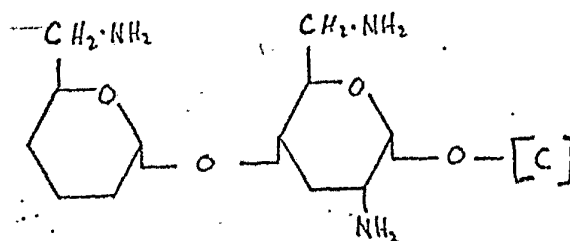
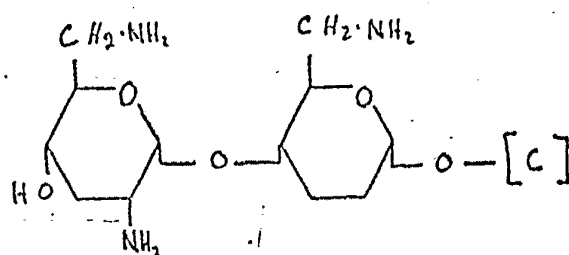
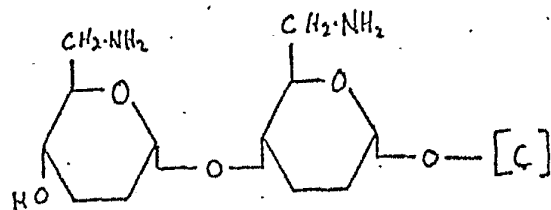
20 Los compuestos más preferidos de la invención son
los que se indican a continuación:

25

30



R₈, R₁₀ y R₁₁ son como se define arriba.



[C] es como se define arriba

1 Los compuestos de la invención pueden obtenerse
por procedimientos de síntesis generales que están perfec-
tamente comprendidos en la química de los hidratos de car-
2 bono. Se considera que muchos de los compuestos utilizados
5 como intermedios son nuevos. Las rutas de síntesis pueden
considerarse divididas en dos partes, primeramente la sín-
tesis de los monosacáridos o pseudomonosacáridos interme-
dios, y en segundo lugar la reacción de estos compuestos
para dar los pseudotrisacáridos de la invención. En ambas
10 partes de las síntesis globales, será necesario o deseable
proteger estereoselectivamente varios de los grupos reacti-
vos existentes en la molécula con el fin de que reaccionen
sin ninguna ambigüedad otros de los grupos. Como se compren-
de en la técnica, los grupos protectores utilizados durante
15 las síntesis tienen que ser capaces de enmascarar adecuada-
mente el grupo reactivo al que están unidos y tienen tam-
bién que ser eliminables en condiciones relativamente sua-
ves, en particular tales que no afecten al enlace glicosí-
dico, p. ej. hidrólisis alcalina, hidrogenólisis o un tra-
tamiento ácido muy suave.
20 .

 Los grupos adecuados para proteger las funciones
hidroxilo incluyen los grupos siguientes: acetilo, benzóilo
trifluoroacetilo, 2-cloroacetilo, metoxicarbonilo, 2,2,2-
25 -tricloroetoxicarbonilo, bencilo y cualquier grupo bencilo
sustituido en el núcleo, metil-tio-metilo y alilo.

 Los grupos adecuados para proteger las funciones
amino incluyen los grupos siguientes (denominados con inclu-
sión del átomo de nitrógeno amínico): N,N-dibencilo; N-ben-
cil-N-alcoxicarbonilo, preferiblemente en el que el grupo
30 alcoholo es metilbencilo o 2,2,2-tricloroetilo; N-ftalimido;

1 N-succinimido; N-o-benzoiloximetilbenzoílo; N-acetilo;
N-2,2,2-trifluoroacetilo; N-benciloxicarbonilo y N-2,2,2-
-tricloroetoxicarbonilo.

5 Para grupos diol vecinales ó funciones α -amino
alcohol, sistemas protectores adecuados incluyen la for-
mación de un carbonato o carbamato cíclico o un anillo de
1,3-dioxolano, p. ej. en un sistema de ciclohexilideno o
isopropilideno, siendo particularmente preferido este últi-
mo debido a la facilidad con que puede hidrolizarse en con-
10 diciones moderadamente ácidas y a la disponibilidad comer-
cial del reactivo, 2,2-dimetoxipropano.

Como será apreciado por los expertos en la téc-
nica, las reacciones individuales de los esquemas que si-
guen son bien conocidas. Además, los esquemas indicados a
15 continuación ilustran la producción de los compuestos per-
tinentes, y no son exhaustivos. Reacciones equivalentes pa-
ra muchas de las etapas serán evidentes para el experto en
la técnica y no se incluyen ni se exponen en detalle en
esta memoria para evitar un alargamiento innecesario de la
20 descripción.

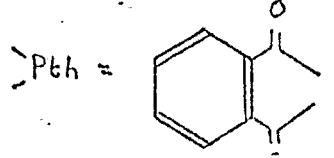
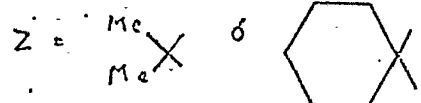
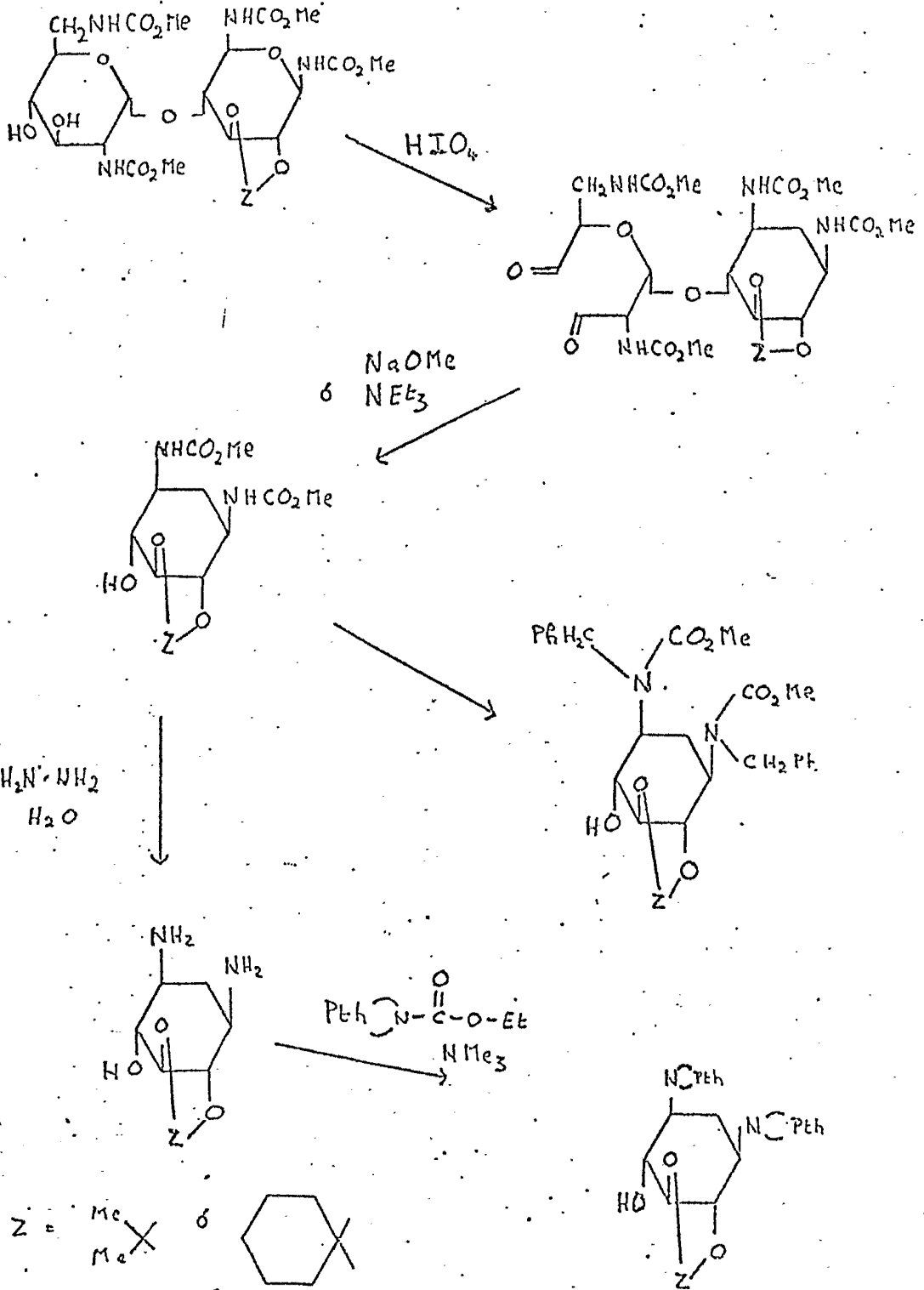
El sistema de anillo común a todos los compues-
tos de la invención es el anillo de desoxiestreptamina,
bien sea en la forma de 2-desoxiestreptamina o en la de 2,5-
-didesoxiestreptamina. Para la copulación glicosídica estos
25 compuestos se proporcionan permaneciendo únicamente sin pro-
teger el grupo hidroxilo de la posición 4, 5 (si está pre-
sente) ó 6. Estos compuestos pueden sintetizarse a partir
de la 2-desoxiestreptamina propiamente dicha o de compues-
tos que la contengan como resto, p. ej. la Kanamicina o la
30 Neomicina.

1 Puede prepararse una 4-hidroxi-2-desoxiestrepta-
mina protegida adecuadamente a partir del conocido compues-
to 5,6-O-ciclohexiliden-tetra-N-metoxicarbonilnamina por
la secuencia descrita abajo y que se ilustra en el Esquema
5 la. Este compuesto, por oxidación con periodato, da un di-
aldehído que puede degradarse por acción de un álcali, p.
ej. un alcoholato de metal alcalino o alcalinotérreo, p.
ej. NaOMe ó trietilamina para dar una 2-desoxiestreptamina
sustituida que puede aislarse de la mezcla de reacción por
10 cromatografía de columna sobre gel de sílice con acetato de
etilo/cloroformo que contiene aproximadamente 1% de trie-
tilamina. La hidrólisis con un hidróxido de metal alcalino
o alcalino-térreo, o con hidrato de hidrazina al 90%, sepa-
ra los grupos N-metoxicarbonilo.

15 Los dos grupos amino de este compuesto pueden pro-
tegerse haciéndolo reaccionar con N-etoxicarbonilftalimida
en presencia de trietilamina o de carbonato de sodio acuo-
so. El producto es 5,6-O-ciclohexiliden-2-desoxi-1,3-dif-
talimidoestreptamina. Un método alternativo es bencilar el
20 producto de la reacción de degradación en lugar de hidrolí-
zarlo, p. ej. con bromuro de bencilo-hidruro de sodio en
dimetilformamida seguido por una hidrogenólisis suave (con
Pd sobre carbón vegetal, a 1 atm) para dar 5,6-O-ciclohe-
xiliden-1,3-di-N-bencil-2-desoxi-1,3-di-N-metoxicarbonil
25 estreptamina.

1

Esquema 1a



1 - Puede ser difícil separar el grupo protector ciclohexilideno en los productos finales. Dicho grupo se puede convertir en el grupo isopropilideno más lábil por hidrólisis ácida suave seguida por tratamiento con 2,2-dimetoxipropano y cantidades catalíticas de ácido tolueno-p-

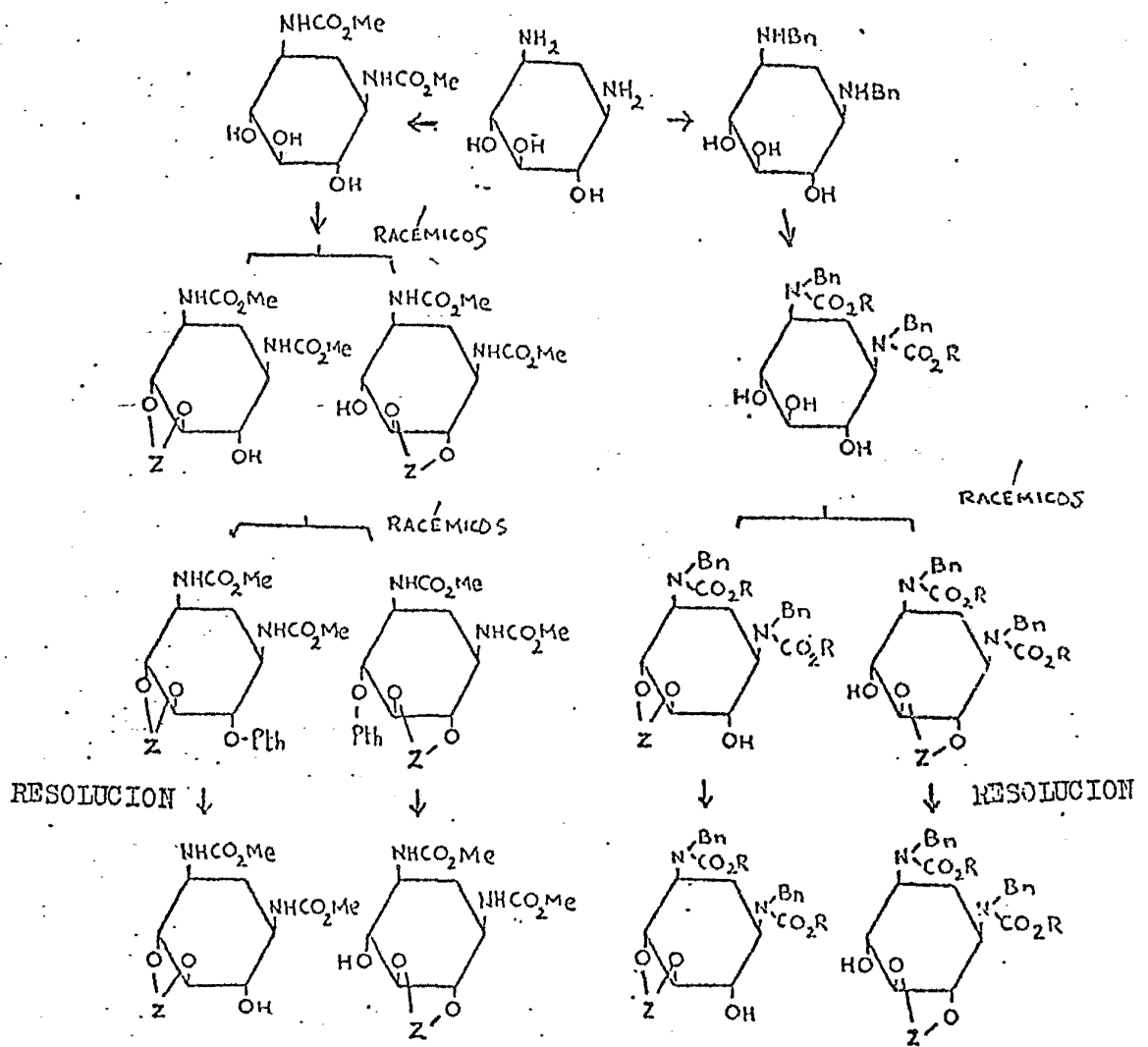
5 -sulfónico. En esta secuencia, debe protegerse el grupo hidroxilo de la posición 4, p. ej. por bencilación. El grupo bencilo se puede separar por hidrogenación catalítica después del intercambio de los grupos protectores.

10 Pueden producirse 4- y 6-hidroxi-2-desoxiestreptaminas adecuadamente protegidas por la secuencia descrita a continuación e ilustrada en el Esquema 1b. Esta secuencia comienza con la 2-desoxiestreptamina, la cual es monobencilada en cada uno de los átomos de nitrógeno y después metoxicarbonilada con, p. ej., cloroformiato de metilo. El producto resultante se hace reaccionar con 1,1-dimetoxiciclohexano. La mezcla racémica resultante puede resolverse por técnicas de cristalización fraccionada, p. ej. utilizando una siembra ópticamente activa a partir de una solución

15 etérea. La repetición de la cristalización fraccionada proporciona una separación satisfactoria de los isómeros hidroxilados en la posición 4 y en la posición 6.

20 La síntesis de la 5-hidroxi-2-desoxiestreptamina protegida puede realizarse por la secuencia descrita a continuación e ilustrada en el Esquema 1c. Esta secuencia se inicia con la 2-desoxiestreptamina, la cual se hace reaccionar con benzaldehído en condiciones reductoras, p. ej. utilizando borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio,

Esquema 1b



COOH

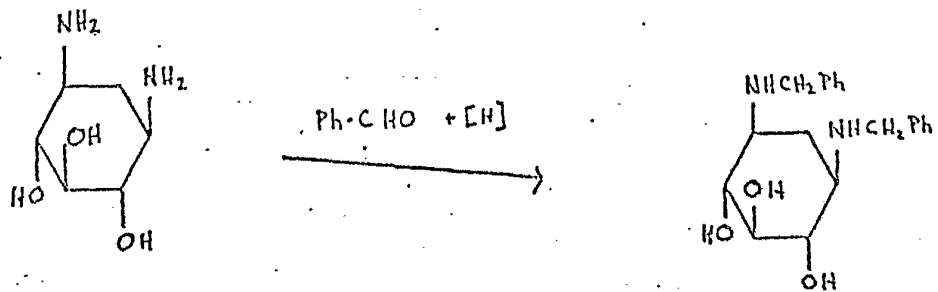
Bn: Bencilo; Pth: $-\text{OC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}-$; R= Bencilo, metilo

Z: Ciclohexilideno, isopropilideno

1 hidrógeno y paladio sobre carbón vegetal, hidrógeno y ní-
quel Raney, etc., para dar el producto estreptamina diben-
cilada en N. Este compuesto se transforma en un carbamato
dicíclico por reacción con fosgeno, cloroformiato de fenilo,
5 cloroformiato de p-nitrofenilo ó cloroformiato de metilo,
en presencia de una base tal como Amberlite 400 (OH^-), car-
bonato de sodio o de potasio, alcoholatos de metal alcalino
o hidruro de sodio. Este compuesto intermedio, 2-desoxi-
-1,3-di-N-bencilestreptamina-1,6:3,4-dicarbamato, es un in-
10 termedio clave para la síntesis de uniones 5-O-glicosídicas
con 2-desoxiestreptamina.

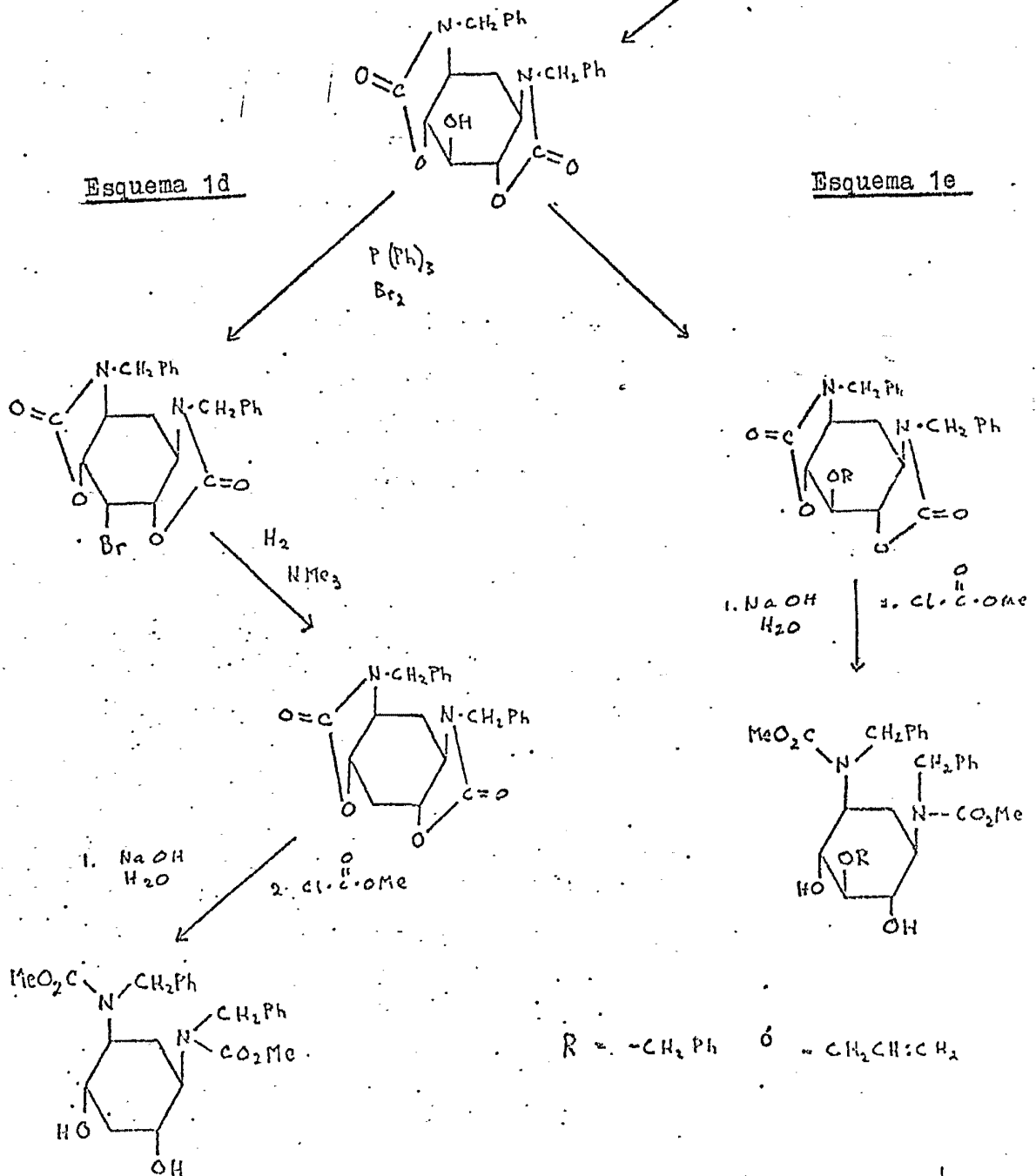
POOR
QUALITY

Esquema 1c



Esquema 1d

Esquema 1e

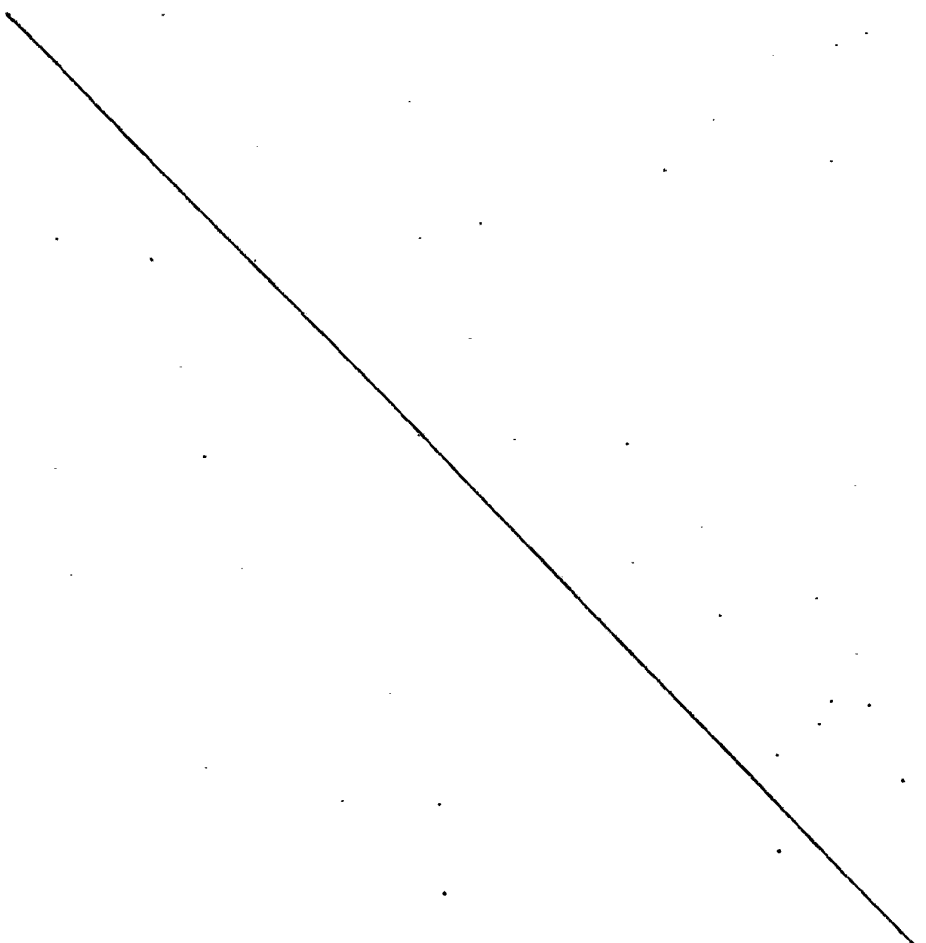


1 Este dicarbamato cíclico se puede utilizar tam-
bién en la síntesis de otros compuestos intermedios tal co-
mo se ilustra en los Esquemas de reacción ld y le. En el
Esquema ld, el dicarbamato cíclico se hace reaccionar con
5 un agente de halogenación, preferiblemente bromo o yodo,
en presencia de un compuesto de fósforo trivalente tal co-
mo trifenilfosfina o un fosfito de trialcoholo. El compues-
to resultante halogenado en la posición 5 (se ilustra el
compuesto de tipo 5-bromo) puede reducirse, p. ej. por hi-
10 drogenación catalítica en presencia de una base para dar
una 2,5-didesoxiestreptamina protegida en el dicarbamato
cíclico. En el Esquema le, el grupo hidroxilo de la posi-
ción 5 en el dicarbamato cíclico se bencila o se somete a
alilación para proteger los grupos hidroxilo de la posición
15 5. El compuesto intermedio de dicarbamato cíclico obtenido
en los Esquemas ld y le puede abrirse por el anillo (como
se ilustra) por reacción con metóxido de sodio en metanol
o, preferiblemente, por saponificación seguida por metoxi-
-carbonilación o benzoxi-carbonilación. Los productos de
20 estas dos secuencias son estreptaminas protegidas en 4,6-
-dihidroxi. El producto de la secuencia ld es importante
porque se trata de una 2,5-didesoxiestreptamina. En los ca-
sos en que se desea tener los derivados monohidroxilados
en las posiciones 4 ó 6 correspondientes a estos productos,
25 esto es, con los grupos hidroxilo de las posiciones 4 ó 6
protegidos respectivamente, aquéllos se pueden obtener por
reacciones de protección clásicas, p. ej. bencilación se-
guida por resolución de los isómeros o cambio de uno de los
grupos protectores en N a un grupo cíclico con el grupo hi-
30 droxilo adyacente, p. ej. un carbamato cíclico seguido por

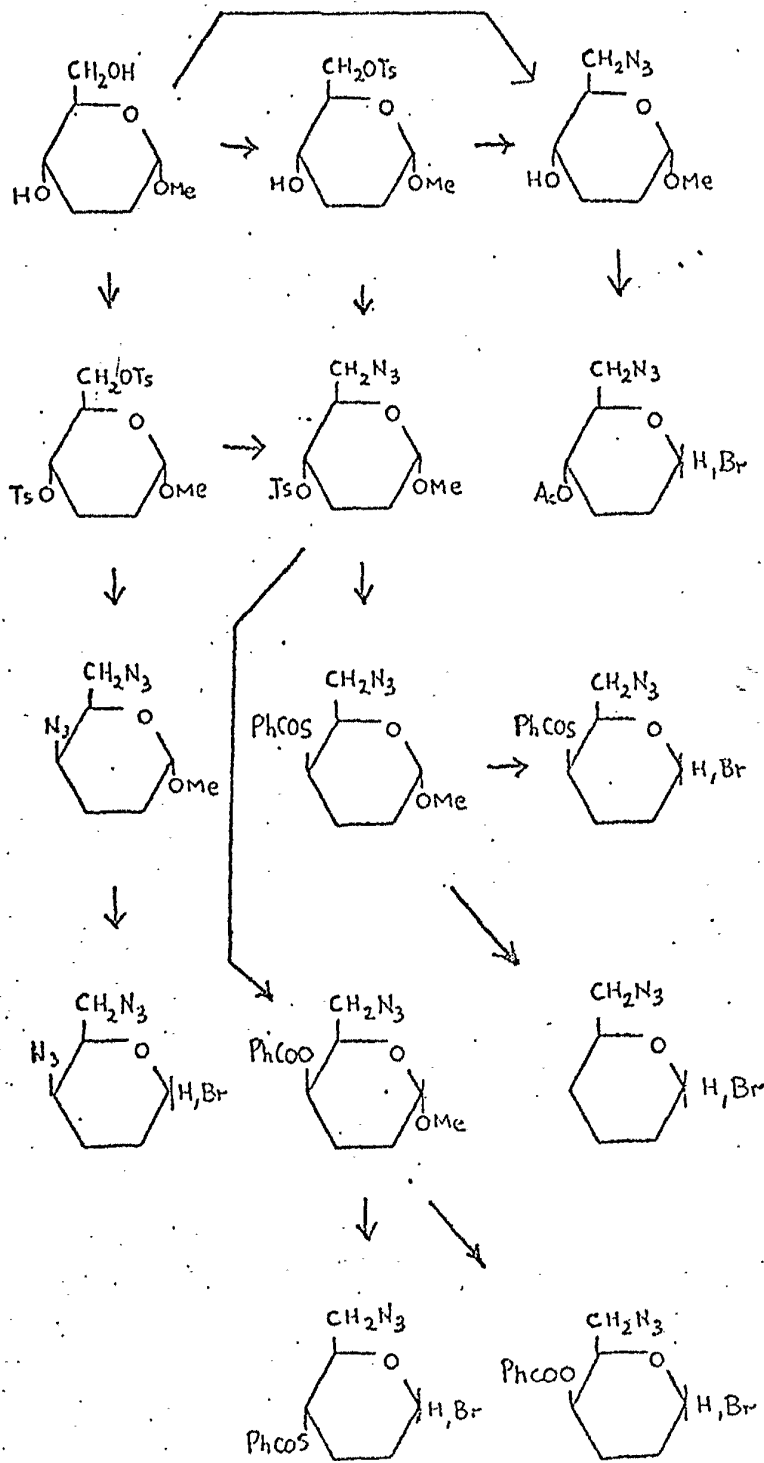
1 - resolución de los isómeros.

La síntesis de los compuestos intermedios restantes necesarios en la producción de los pseudosacáridos de la invención puede efectuarse a partir de compuestos conocidos por métodos similares a los descritos arriba para la preparación de compuestos intermedios que contienen el anillo de 2-desoxi ó 2,5-didesoxiestreptamina. El esquema 2 expone brevemente una serie de esquemas de reacción para la síntesis de algunos de estos compuestos intermedios.

5
10 Los reactivos adecuados y las condiciones de reacción asimismo adecuadas serán evidentes para el experto en la técnica.



Esquema 2



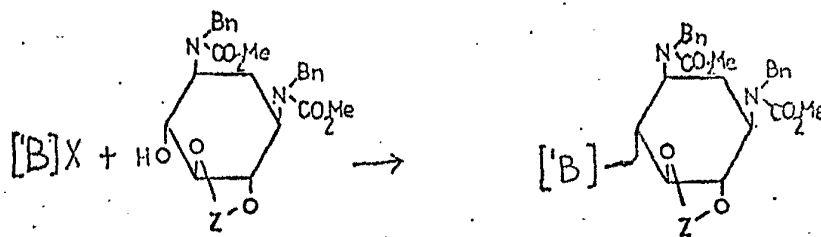
1 La reacción de copulación para la síntesis de
 α -glicósidos a partir de los compuestos intermedios mono-
 cíclicos puede realizarse fácilmente con rendimientos ex-
 celentes por la vía de dos procedimientos conocidos per se.
 5 El primero de ellos hace uso de la reacción por la cual los
 glicales pueden adicionar alcoholes gracias a la acción ca-
 talítica del eterato de trifluoruro de boro en un disolven-
 te inerte de constante dieléctrica baja, tal como benceno,
 tetracloruro de carbono o cloroformo. Durante este tipo de
 10 reacción, cualesquiera funciones amino tienen que proteger-
 se por grupos tales como ftaloilo, succinilo o alcoholoxi-
 carbonilo, p. ej. para dar $\begin{matrix} \text{CH}_2\text{Ph} \\ \text{-N} \diagdown \\ \text{COOR} \end{matrix}$. Si están presen-
 tes aminas secundarias o terciarias, amidas secundarias o
 carbamatos secundarios, el catalizador reacciona con ellos
 15 formando sub-productos insolubles y no puede aislarse gli-
 cócido alguno. Las sustancias reaccionantes deben ser solu-
 bles en los disolventes arriba mencionados (benceno, CCl_4 ,
 CHCl_3). La reacción entre glicales y alcoholes es rápida
 (de 5 a 15 minutos) y tiene lugar a la temperatura ambiente,
 20 y la proporción de β -glicósidos es despreciable.

El segundo procedimiento es una reacción de gli-
 cosilación de Koenigs-Knorr modificada entre un haluro de
 glicosilo y una función alcohol, que se vale del grupo cer-
 cano no participante situado en el carbono 2, adyacente al
 25 centro de reacción (carbono anómero). El catalizador utili-
 zado podría ser óxido de plata o carbonato de plata, pero
 preferiblemente es la mezcla de cianuro mercuríco y bromuro
 mercuríco o un bromuro de amonio cuaternario tal como bro-
 muro de tetrabutilo o Amberlite IR-400 (forma Br^-) o un sul-
 30 furo (tetrahidrotiofeno) y un aceptor de protones tal como

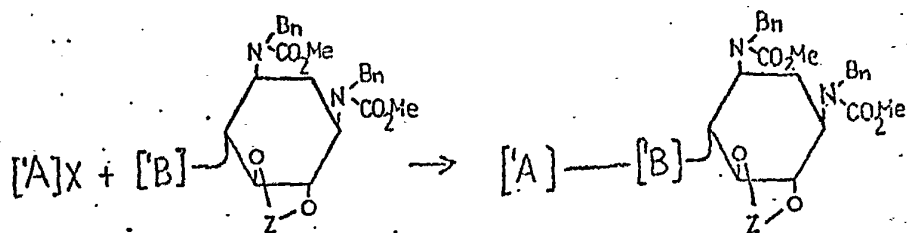
1 -2,6-lutidina, cianuro mercúrico, bicarbonato de sodio an-
hidro o Amberlite IR-400 (CN⁻), lo cual hace aumentar la
proporción de α -glicósido obtenida a expensas del β -anó-
5 -mero. La formación de pseudo-trisacáridos de 2-desoxi-es-
treptamina se puede efectuar escalonadamente, por adición
de un solo resto de glicosilo en una sola operación, esto
es, formando primeramente un disacárido con una 2-desoxi-
estreptamina protegida, haciendo reaccionar después otro
10 resto de glicosilo con el disacárido ya formado como se ha
representado arriba, donde X es un haluro o representa el
enlace doble 1:2 reactivo de un glicial.

Esquema 3

15



20



25

donde Z: ciclohexilideno o isopropilideno,

[A] y [B] son restos protegidos correspondien-
tes a [A] y [B] como se han definido arriba.

30

Bn = bencilo.

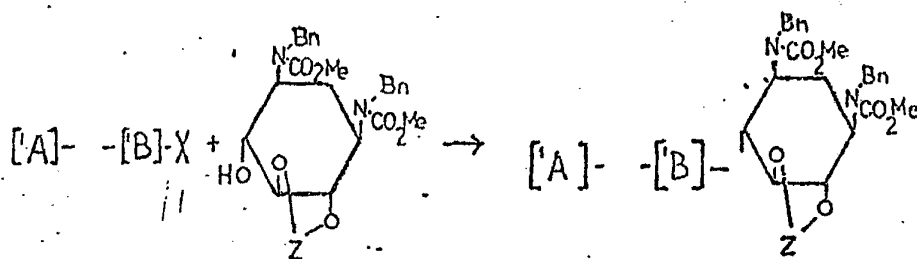
1

Alternativamente, el trisacárido puede sintetizarse por la reacción de un derivado de disacárido, $[A]-[B]-X$, con una 2-desoxiestreptamina adecuadamente protegida (Esquema 4).

5

Esquema 4

10



15

Una vez que se han obtenido los trisacáridos protegidos, las secuencias de reacciones que siguen están orientadas a la separación de los grupos protectores del trisacárido, liberando así las funciones amino e hidroxilo.

20

Los esquemas 5 y 6 resumen algunas de las vías posibles para sintetizar los 4-O y 5-O-glicósidos de la 2-desoxiestreptamina.

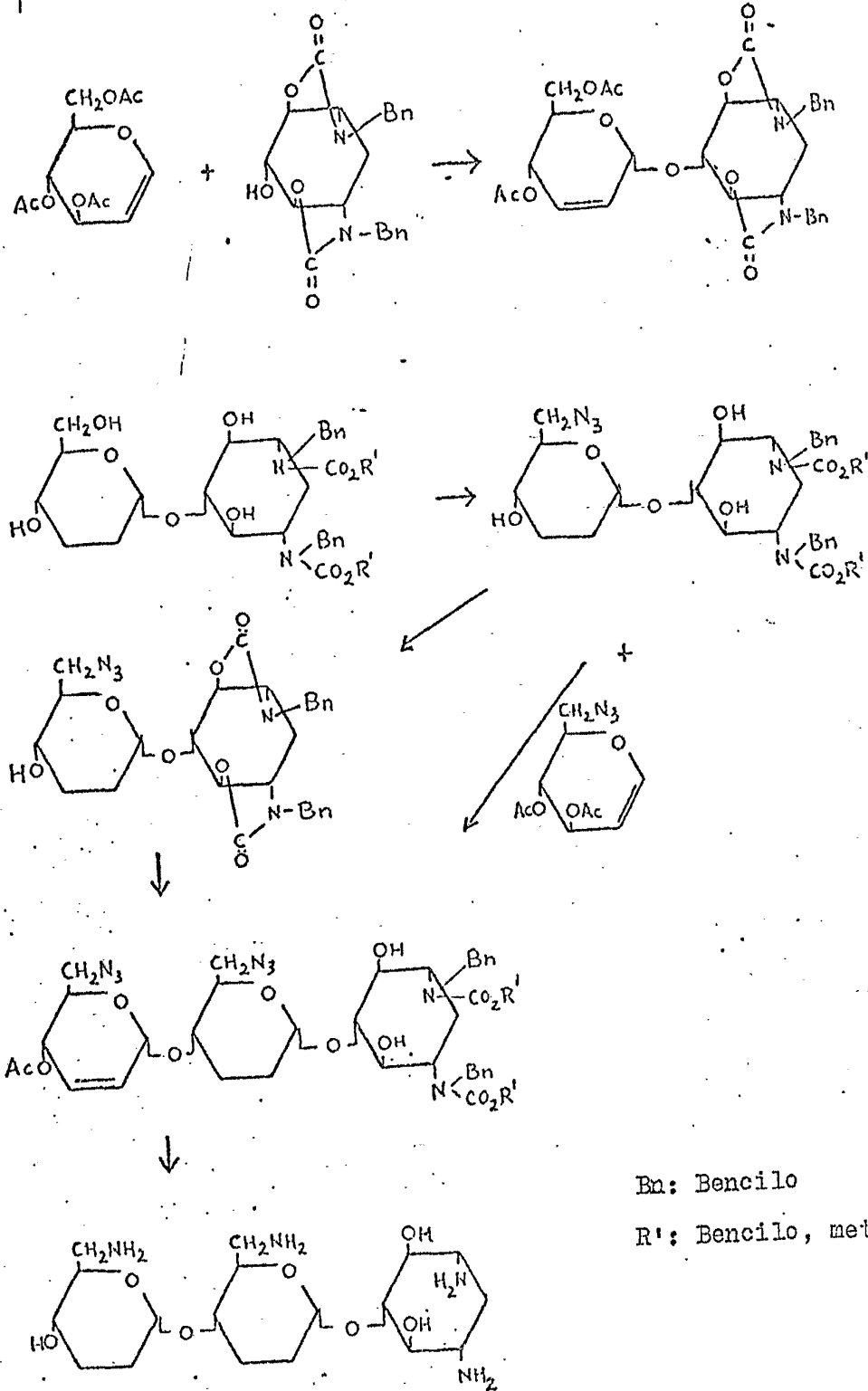
25

Cuando la glicosilación se lleva a cabo simultáneamente en los carbonos 4 y 6 del anillo de aminociclitol, tanto si se utiliza el método del glicol como el del haluro de glicilo, y a pesar de la presencia de un exceso de agente de glicosilación, un pequeño porcentaje de los disacáridos formados permanece inalterado al final del período de reacción. Su separación, sin embargo, a partir de los trisacáridos se realiza fácilmente por filtración a través de gel de sílice y elución con disolventes. Estos disacáridos (4-O-glicósido y 6-O-glicósido, de 2-desoxiestreptamina o de 2,5-didesoxiestreptamina) que están presentes en la propor-

30

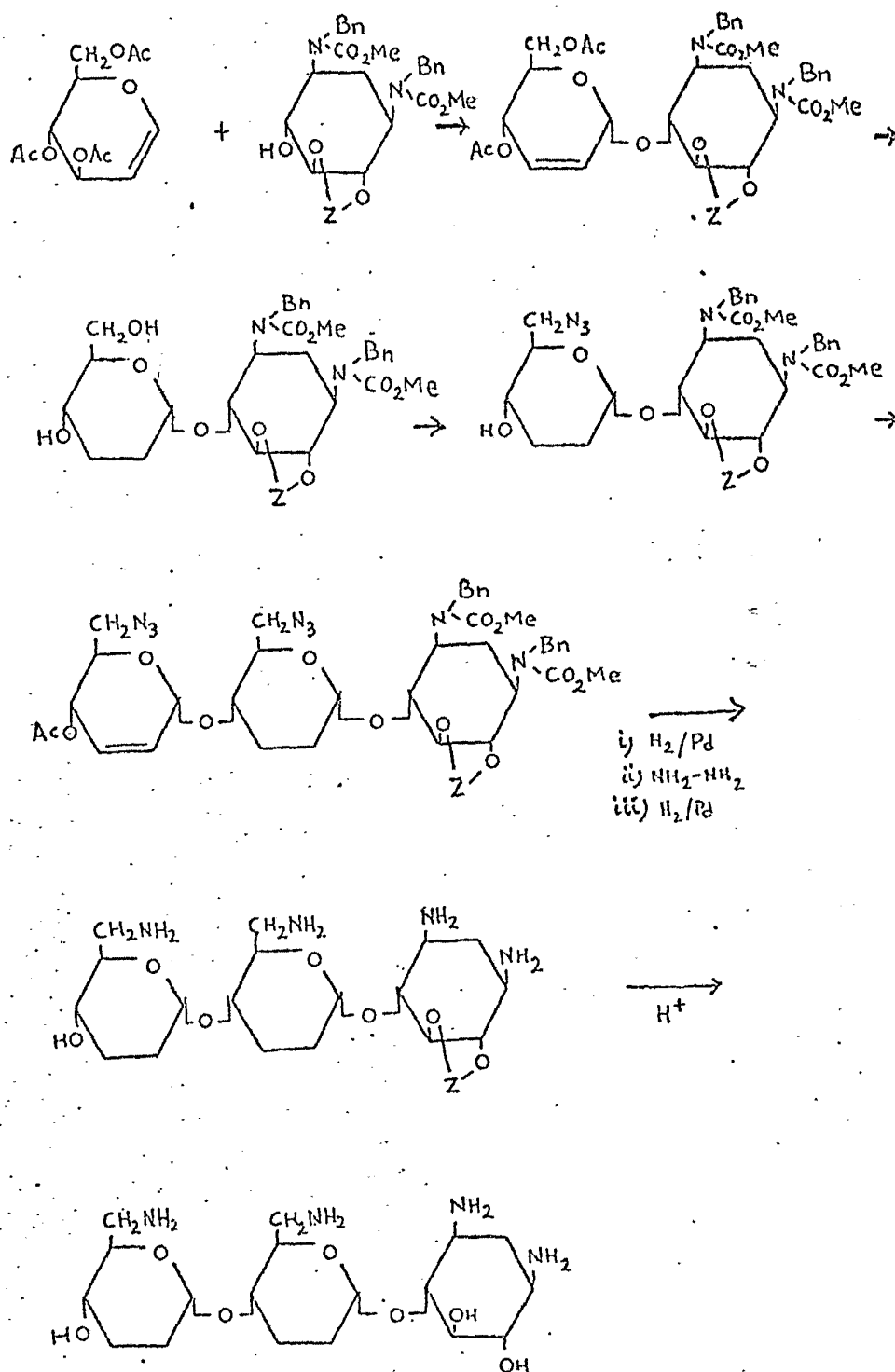
1 -ción máxima de 15-20% de los productos de reacción totales, pueden, una vez separados de los trisacáridos, ser glicosilados de nuevo para producir más trisacáridos.

Esquema 5



1

Esquema 6



Bn: Bencilo

Z: Ciclohexilideno, isopropilideno.

1 Los trisacáridos completamente protegidos obtenidos de es-
te modo se someten luego a una serie de operaciones quími-
cas diseñadas para eliminar los grupos protectores, libe-
rando así el trisacárido. La separación de los ésteres,
5 carbamatos y funciones amida se realiza por hidrólisis al-
calina con hidróxidos de los metales alcalinos o alcalino-
-térreos, o preferiblemente, con hidrato de hidrazina de
80-90% en un disolvente adecuado tal como metanol, etanol
o propanol. Los grupos bencilo en N- y en O- se separan por
10 hidrogenación catalítica con catalizadores de paladio so-
bre carbón vegetal o níquel Raney. Cualesquiera funciones
azido presentes se reducen simultáneamente a grupos amino
durante esta operación.

Algunos de los trisacáridos incluidos en esta in-
15 vención pueden obtenerse, además de por el método general
de glicosilación con el haluro de glicosilo o el glicol
apropiados, por medio de la transformación química de los
compuestos intermedios 4,6-di-O-(2,3-didesoxi- α -D-eritro-
-hexopiranosil)-2-desoxi-1,3-di-N-bencil-1,3-di-N-metoxi-
20 carbonilestreptamina y 4,6-di-O-(2,3-didesoxi- α -D-eritro-
-hexopiranosil)-1,3-di-N-bencil-2,5-didesoxi-1,3-di-N-meto-
xicarbonilestreptamina. Cuando uno u otro de estos trisacá-
ridos se hace reaccionar con tetracloruro de carbono, tria-
mida hexametilfosforosa y azida de sodio, se consigue la sus-
25 titución de las funciones alcohol primario por el grupo azi-
do en los carbonos 6' y 6". Estas transformaciones, seguidas
por la eliminación de los grupos protectores de los trisacá-
ridos, conducen a la obtención de 4,6-di-O-(6-amino-2,3,6-
-tridesoxi- α -D-eritro-hexopiranosil)-2-desoxiestreptamina
30 y 4,6-di-O-(6-amino-2,3,6-tridesoxi- α -D-eritro-hexopirano-

1 -sil)-2,5-didesoxiestreptamina.

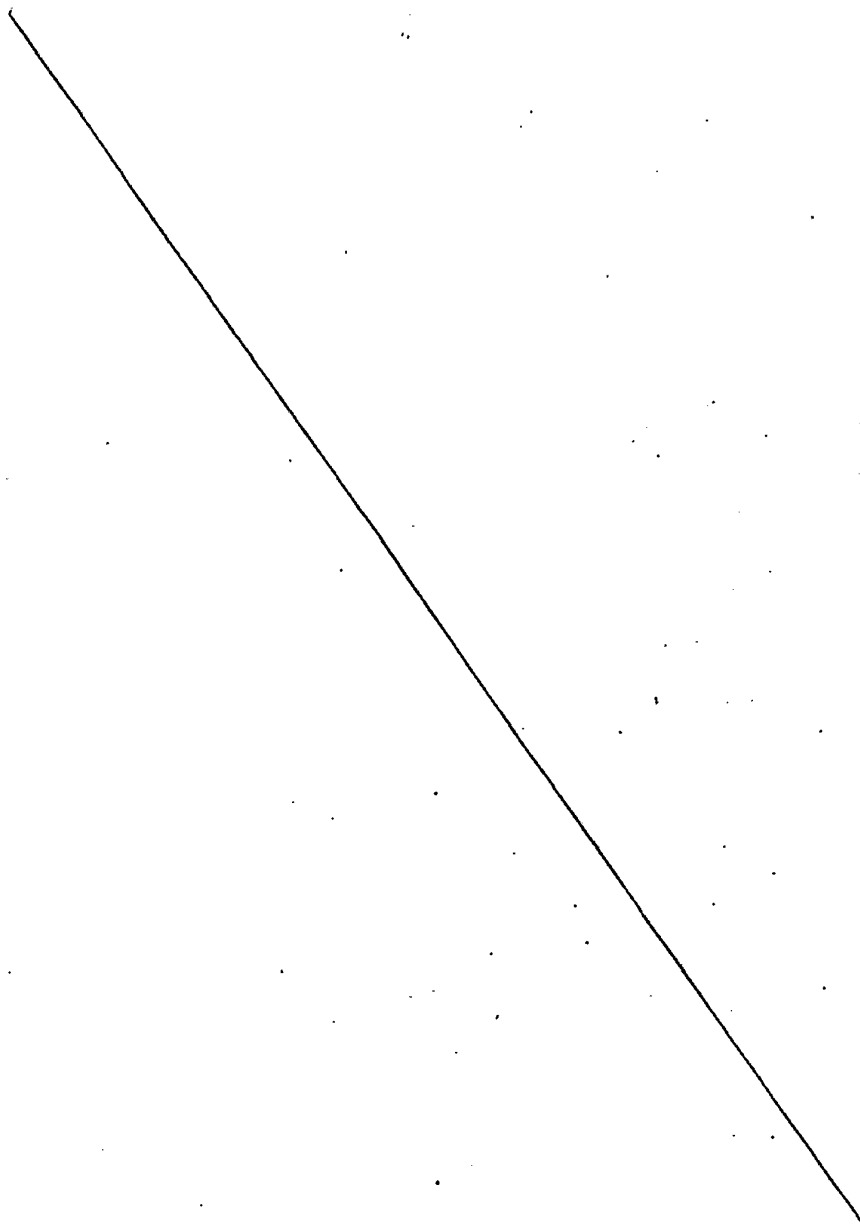
Un camino alternativo para los compuestos arriba mencionados se materializa en la secuencia de reacciones siguiente: la tosilación selectiva de las funciones alcohol primario en los trisacáridos protegidos parcialmente, esto es α -4,6-di-O-(2,3-didesoxi- α -D-eritro-hexopiranosil)-1,3-di-N-bencil-2,5-didesoxi-1,3-di-N-metoxicarbonilestreptamina (a) y 4,6-di-O-(2,3-didesoxi- α -D-eritro-hexopiranosil)-2-desoxi-1,3-di-N-metoxicarbonil-1-N,3-N, 5-O-tribencilestreptamina (b) va seguida por el desplazamiento nucleófilo del grupo tosilo por azida de sodio para dar los trisacáridos protegidos en 6',6''-diazido. Estos se tratan después en condiciones de saponificación en etanol o propanol (con hidrato de hidrazina al 80/90%, o hidróxido de sodio, potasio o bario) para eliminar los grupos N-metoxicarbonilo, después de lo cual se someten a hidrogenación (hidrógeno, paladio sobre carbón vegetal) para reducir las funciones azido a funciones amino con la consiguiente hidrólisis de los grupos N-bencilo.

20 El inconveniente de esta ruta para llegar a los compuestos intermedios de tipo azido estriba en que durante la etapa de tosilación selectiva la separación de los subproductos es difícil, lo que hace que sea imposible obtener rendimientos mayores que el 60-65% del derivado ditosilado.

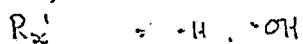
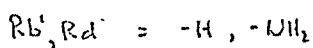
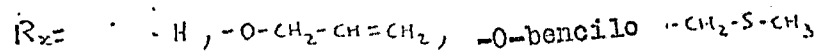
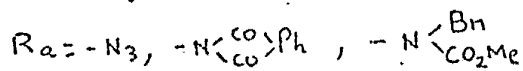
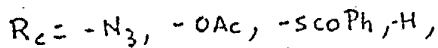
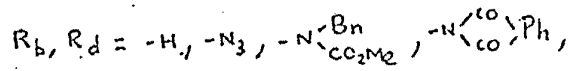
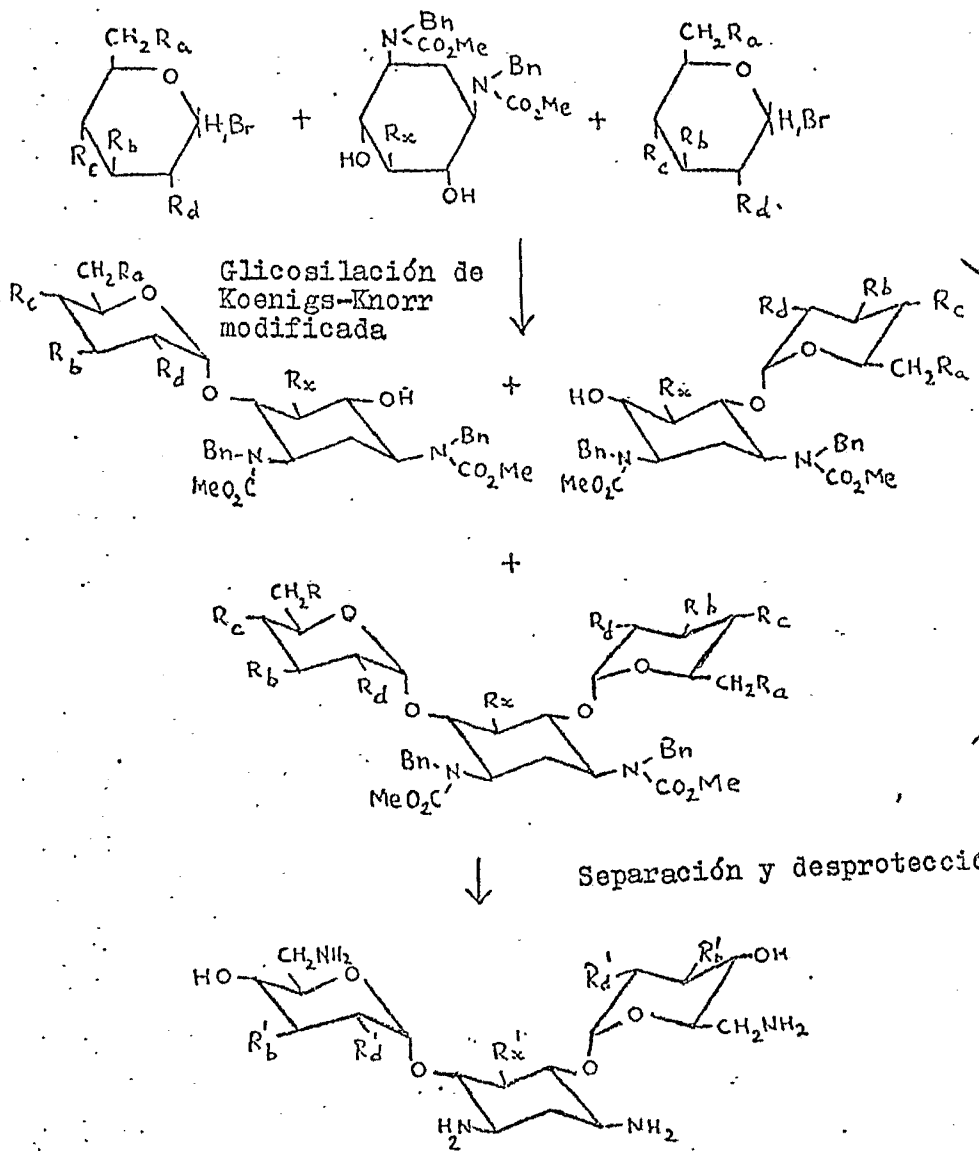
25 De un modo similar, pueden obtenerse 4,6-di-O- α -4,6-diamino-2,3,4,6-tetradesoxtreo- α -D-(treo ó eritro)-hexopiranosil]-2-desoxiestreptamina ó 4,6-di-O- α -4,6-diamino-2,3,4,6-tetradesoxtreo- α -D-(treo ó eritro)-hexopiranosil]-2,5-didesoxiestreptamina a partir de los trisacáridos intermedios (a) y (b) arriba mencionados por permesilación de

30

- 1 - las cuatro funciones hidroxilo, desplazamiento de los grupos mesilo por azido en dimetilformamida o triamida hexametilfosfórica, saponificación de los grupos protectores (N-COOMe), seguida por hidrogenación con catalizador de
- 5 paladio sobre carbón vegetal. Los esquemas 7 y 8 ilustran la secuencia de etapas en la preparación de algunos de los trisacáridos de la invención.

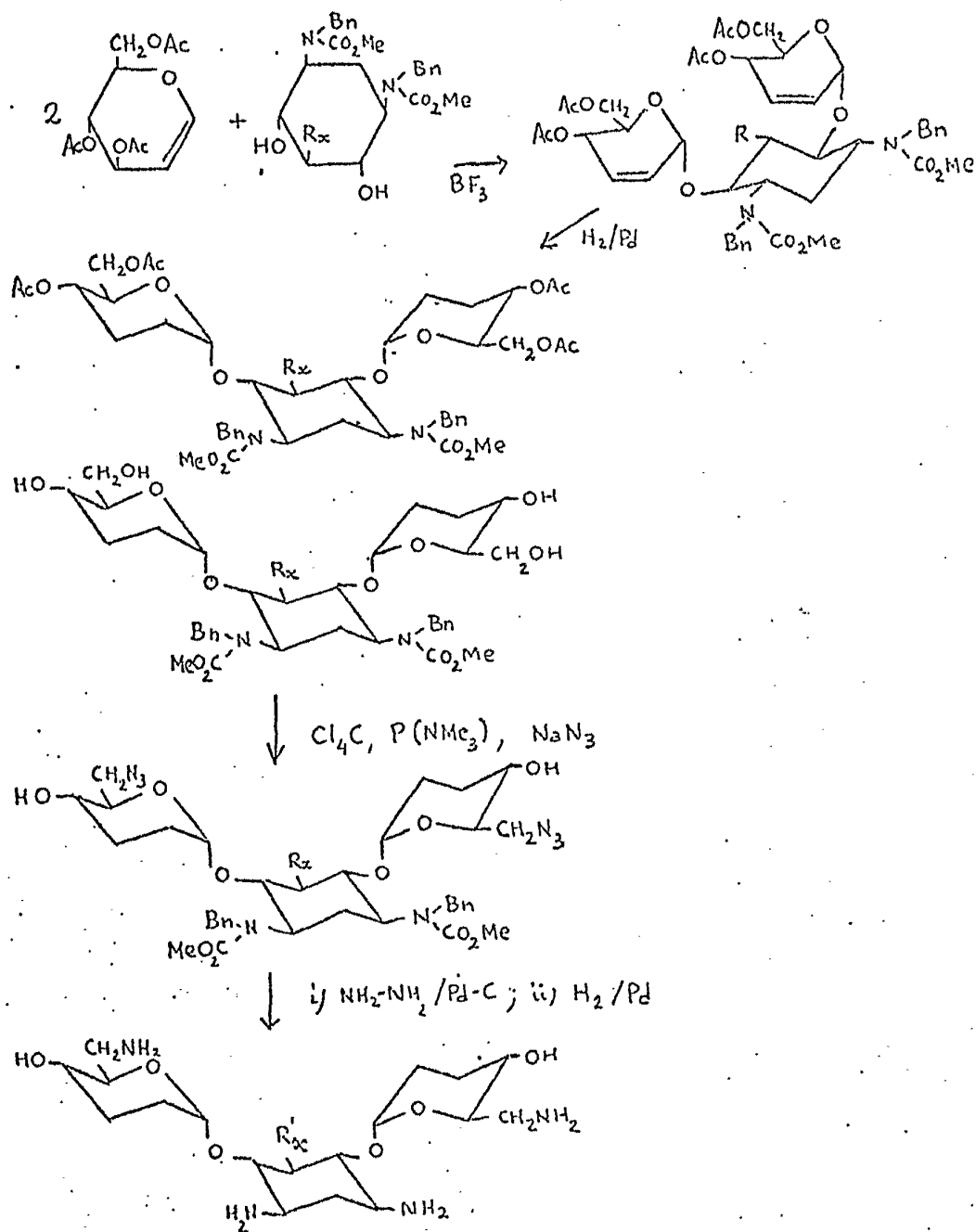


Esquema 7



1

Esquema 8



R_x : -H, -O-alilo, -O-bencilo, -O- $\text{CH}_2\text{-S-CH}_3$; R'_x = H, OH
 Bn: Bencilo

1 Los pseudotrisacáridos de la invención poseen
 una actividad antibacteriana excelente que, en algunos ca-
 5 sos, parece superior a la de la Kanamicina A propiamente
 dicha. A continuación se da una tabla que muestra las con-
 centraciones inhibitoras mínimas (valores MIC) de Kanami-
 cina A junto con las de uno de los trisacáridos sintetiza-
 dos (Ejemplo I) frente a una diversidad de bacterias Gram-
 positivas y Gram-negativas tal como se obtienen por el mé-
 todo de dilución con agar de Steers con medio de agar de
 10 Mueller-Hinton.

TABLA I

		<u>M.I.C. (µg/ml)</u>	
		<u>Kanamicina</u>	<u>Ejemplo L I</u>
		<u>A</u>	
	Micrococcus pyogenes aureus 6539 P	0,8	0,4
15	Staphylococcus pyogenes Smith A	0,8	0,4
	Escherichia coli R 1513	100	32
	Salmonella tiphymurium	100	32
	Proteus mirabilis	2	0,4
	Pseudomonas aeruginosa s.p.	100	16
20	Pseudomonas aeruginosa I.A.	100	32
	Salmonella sui-pestifer	32	32
	Pseudomonas aeruginosa D 15	25	8
	Proteus rettgeri	0,4	0,2
25	Proteus morgani	0,8	0,2

Actividad in vitro de la Kanamicina A y del com-
 puesto (Ejemplo L I).

Valores MIC en caldo Mueller-Hinton, pH 7,2.

Adicionalmente, los pseudotrisacáridos de la in-
 30 vención son menos susceptibles a la desactivación por, y

1 por consiguiente son efectivos contra, aquellas bacterias que son resistentes a la Kanamicina y Apramicina.

Los ácidos a partir de los cuales se pueden preparar sales de adición farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención son los que forman sales de adición no tóxicas que contienen aniones farmacéuticamente aceptables, tales como las sales clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato o bisulfato, fosfato o fosfato ácido, acetato, maleato, fumarato, lactato, tartrato, citrato, gluconato, sacarato y p-toluensulfonato.

Los compuestos de la invención se pueden administrar solos, pero generalmente se administrarán en mezcla con un vehículo farmacéutico seleccionado con relación a la vía de administración deseada y la práctica farmacéutica clásica. Por ejemplo, pueden administrarse oralmente en la forma de tabletas que contienen excipientes tales como almidón o lactosa, o en cápsulas bien sea solos o en mezcla con excipientes, o en forma de elixires o suspensiones que contienen agentes aromatizantes o colorantes. Dichos compuestos se pueden inyectar por vía parenteral, por ejemplo, por las vías intramuscular o subcutánea. Para administración parenteral, se utilizan óptimamente en la forma de una solución acuosa estéril que puede contener otros solutos, por ejemplo, sales o glucosa suficientes para hacer la solución isotónica.

La invención se ilustra por los Ejemplos que siguen correspondientes a la preparación y caracterización de compuestos de la invención. En estos Ejemplos, todas las temperaturas están expresadas en °C, las soluciones orgánicas se secan sobre Na_2SO_4 anhidro, y se concentran

1 a 35° (10 Torr), y los datos de RMP siguen la práctica ge-
neral adoptada en las publicaciones científicas. Primera-
mente se da la posición en el espectro para una señal o
señales particulares, en δ (partes por millón) con respecto
5 al patrón interno tetrametilsilano. Entre paréntesis se dan
los tipos de señales, esto es, singulete (s), doblete (d),
triplete (t), multiplete (m), y esto va seguido por el nú-
mero de protones responsables de aquellas señales junto con
la posición molecular o el grupo funcional cuyas señales
10 se indican.

En los Ejemplos en que se indica que ha sido ais-
lado un producto, éste se identificó por métodos analíticos
que incluyen microanálisis, y espectros infrarrojo y RMP.
No obstante, para la mayoría de los compuestos intermedios
15 estos datos no se presentan, para mayor brevedad.

EJEMPLO I

Una mezcla de 5,6-O-ciclohexiliden-2-desoxi-1,3-
-di-N-bencil-1,3-di-N-metoxicarbonilestreptamina (1,03 g,
1,91 milimoles), tri-O-acetil-D-glucal (0,8 g, 2,9 milimo-
20 les) y benceno seco (20 ml), se trató con eterato de trifluo-
ruro de boro (0,03 ml) y se agitó a 20° durante 0,5 horas.
Se añadió trietilamina (1 ml) y se continuó la agitación du-
rante 20 minutos más. Se lavó la mezcla de reacción con
agua, se secó y se hidrogenó sobre paladio al 10% en carbón
25 vegetal (20 mg) a 2 atmósferas durante 3 horas. Después de
filtrar la suspensión y lavar el catalizador con metanol, se
concentraron los líquidos orgánicos combinados para dar un
producto vítreo (1,53 g, 85%). Este producto se disolvió en
metanol (20 ml), y se desacetiló catalíticamente con metóxi-
30 do de sodio (20 mg) durante 12 horas a 22°. La neutraliza-

1 ción de la mezcla con CO₂ fue seguida por concentración pa-
 ra dar un jarabe que se extrajo en cloroformo. Los extrac-
 tos, una vez filtrados, se concentraron para dar un residuo
 sólido que se purificó por cromatografía en columna con gel
 5 de sílice utilizando cloroformo-acetato de etilo como elu-
 yente. Se obtuvo 4-O-(2,3-didesoxi- α -D-eritro-hexopirano-
 sil)-5,6-O-ciclohexiliden-2-desoxi-1,3-di-N-bencil-1,3-di-
 N-metoxicarbonilestreptamina (1,35 g) como un producto cris-
 talino. Punto de fusión: 153-159°. $[\alpha]_D^{23} + 42,7^\circ$ (c 1,
 10 cloroformo).

0,64 g (0,95 milimoles) de este compuesto se di-
 solvieron en N,N-dimetilformamida seca (4 ml) y se añadie-
 ron a esta solución tetracloruro de carbono (0,5 ml) y tria-
 mida hexametilfosforosa (0,6 ml). La mezcla se agitó a -45°
 15 en atmósfera de nitrógeno durante 1,5 horas. Se añadió des-
 pués azida de sodio (0,8 g), se agitó la mezcla a 80° duran-
 te 12 horas, y se vertió en agua de hielo, extrayéndose lue-
 go con éter. Los extractos se lavaron con agua, se secaron
 y se concentraron para dar un residuo vítreo que se purifi-
 20 có por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando
 mezclas benceno-cloroformo como eluyente. El sólido aislado
 se recristalizó en mezcla éter-gasolina para dar 4-O-(6-azi-
 do-2,3,6-tridesoxi- α -D-eritro-hexopiranosil)-5,6-O-ciclohe-
 xiliden-2-desoxi-1,3-di-N-bencil-1,3-di-N-metoxicarboniles-
 25 treptamina (0,5 g, 76%). Punto de fusión: 105-108°. (Se sin-
 teriza a 79°). $[\alpha]_D^{23} + 31^\circ$ (c 1, cloroformo).

Una mezcla de 0,35 g (0,55 milimoles) de este com-
 puesto y 6-azido-6-desoxi-3,4-di-O-acetil-D-glucal (0,167 g,
 0,65 milimoles, 20% de exceso) en benceno seco (15 ml) se
 30 trató con eterato de trifluoruro de boro (0,05 ml) y se agi-

- 1 -tó a 22° durante 25 minutos. Se añadió trietilamina (0,5 ml) y la mezcla, después de agitar durante 15 minutos, se lavó con agua, se secó y se concentró para dar un sólido. Se purificó éste por cromatografía en columna de gel de sílice
- 5 (benceno-cloroformo como eluyente) para dar 4-O-[4-O-(4-O-acetil-6-azido-2,3,6-tridesoxi- α -D-eritro-hex-2-enopiranosil)-6-azido-2,3,6-tridesoxi- α -D-eritro-hexopiranosil]-5,6,0-ciclohexiliden-2-desoxi-1,3-di-N-bencil-1,3-di-N-metoxicarbonilestreptamina pura, amorfa y vítrea (0,46 g, 88%).
- 10 $[\alpha]_D^{22} + 42,5^\circ$ (c 0,46, cloroformo).
- Una mezcla de 111 mg (0,125 milimoles) de este compuesto, hidrato de hidrazina al 90% (3 ml), isopropanol (2 ml) y paladio al 10% sobre carbón vegetal (20 mg) se calentó en atmósfera de nitrógeno a 110° durante 20 horas. Se evaporó la mezcla (2 Torr) y se redisolvió en metanol (10
- 15 ml), después de lo cual se neutralizó con HCl 1N y se hidrogenó con catalizador de paladio de nuevo aporte (30 mg) a 3 atmósferas, durante 7 horas. El catalizador se filtró y se lavó con metanol. Los líquidos orgánicos combinados se acidificaron a pH 4 con HCl, se calentaron a 40-50° durante 1
- 20 hora y se ensayaron después en lo referente a la presencia del grupo protector ciclohexilideno por evaporación de una parte alícuota de la solución a sequedad, colocación de una gota del residuo en una placa de cromatografía en capa delgada y pulverización con reactivo de anisaldehído (anisaldehído en ácido acético que contiene 5% de H₂SO₄), y calentamiento a 110°. La ausencia de una mancha de color carmín indicaba que había tenido lugar la hidrólisis del grupo ciclohexilideno. Se evaporó la solución, se recogió en 1 ml de
- 25 agua y se eluyó desde una columna de resina Amberlite CG 50
- 30

1 (NH⁺) con agua, y después con amoníaco acuoso 1N y 1,5N.
 Los productos de elución se evaporaron a un volumen pequeño, se neutralizaron con H₂SO₄ 1N, y se trataron con 3 volúmenes de metanol-acetona (1:1). El precipitado se redisolvió en agua (1 ml) y se reprecipitó como anteriormente.
 5 Se obtuvo disulfato de 4-O- β -4-O-(6-amino-2,3,6-tridesoxi- α -D-eritro-hexopiranosil)-6-amino-2,3,6-tridesoxi- α -D-eritro-hexopiranosil 7-2-desoxiestreptamina (50 mg, 65%) como un polvo amorfo higroscópico. Punto de fusión aproximado
 10 250°, con descomposición. α _D + 135° (c 1, agua). Cromatografía de capa delgada: R_f 0,35 (metanol-NH₄OH, 8:1). Peso equivalente (en ácido acético glacial): Calculado 154; encontrado, 153.

15 Espectro de masas: M/e 421
 Calculado para C₁₈H₃₆N₄O₇ M⁴¹ 421

Análisis:

Calculado para: C₁₈H₃₆N₄O₇ · 2 H₂SO₄: C, 35,06; H, 6,54;
 N, 9,08

Encontrado: C, 35,42; H, 6,69;
 20 N, 8,93%

EJEMPLO II

1,3-Di-N-bencil-2,5-didesoxi-1,3-di-N-metoxicarbonilestreptamina (442 mg, 1 milimol) y tri-O-acetil-D-glucal (820 mg, 3 milimoles) en benceno (25 ml) se trataron con
 25 eterato de trifluoruro de boro (0,1 ml) durante 0,5 horas a la temperatura ambiente con agitación. Se añadió trietilamina (0,5 ml) y se lavó la mezcla de reacción con agua, se secó y se concentró para dar un jarabe (1,2 g). Se disolvió éste en metanol (20 ml) y se hidrogenó con paladio al 10%
 30 sobre carbón vegetal (0,2 g) a la presión atmosférica du-

- 1 rante 2 horas. Después de filtrar el catalizador, la mezcla de reacción se concentró para dar un jarabe (1,13 g) que se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando benceno-cloroformo (1:2) como eluyente. Se separaron de este modo tres componentes: (cromatografía de capa delgada: benceno-acetato de etilo, 1:1):
- 5 a) componente principal, $R_f = 0,30$ (trisacárido)
 b) componente menor, $R_f = 0,09$ (disacárido)
 c) componente menor, $R_f = 0,05$ (disacárido).
- 10 El componente principal (a) se recristalizó en éter-éter de petróleo 60-80° para dar 560 mg (65%) de 4,6-di-O-(4,6-di-O-acetil-2,3-didesoxi- α -D-eritro-hexopiranosil)-1,3-di-N-bencil-2,5-didesoxi-1,3-di-N-metoxicarbonilestreptamina pura. Punto de fusión: 63-65°.
- 15 Una solución de este compuesto (360 mg, 0,41 milimoles) en metanol (10 ml) se trató con metóxido de sodio (20 mg) durante 12 horas. La mezcla se neutralizó (CO_2) y se concentró para dar un sólido que se extrajo con cloroformo. Los extractos orgánicos se evaporaron y el residuo se recristalizó en cloroformo-éter para dar 4,6-di-O-(2,3-didesoxi- α -D-eritro-hexopiranosil)-1,3-di-N-bencil-2,5-didesoxi-1,3-di-N-metoxicarbonil-estreptamina pura (280 mg, 96%).
- 20 Punto de fusión: 72° . $[\alpha]_D^{25} + 66^\circ$ (c 1,1, cloroformo).
- A una solución de este compuesto (0,351 g, 0,5 milimoles) en N,N-dimetilformamida seca (2 ml) se añadieron tetracloruro de carbono (0,2 ml) y triamida hexametilfosforosa (0,2 ml) y la mezcla resultante se agitó a -45° durante 1 hora. Se añadió azida de sodio (0,26 g, 4 milimoles) y se agitó la solución a 80° durante 18 horas. Se vertió después la solución en mezcla de agua y hielo y se extrajo con éter.
- 30

1 Los extractos se lavaron con agua, se secaron y se concen-
 traron para dar un producto vítreo (0,373 g) que se purifi-
 có por cromatografía sobre gel de sílice (cloroformo). El
 producto eluido (0,25 g, 70%) era 4,6-di-O-(6-azido-2,3,6-
 5 -tridesoxi- α -D-eritro-hexopiranosil)-1,3-di-N-bencil-2,5-
-didesoxi-1,3-di-N-metoxicarbonilestreptamina pura, vítreo.

$[\alpha]_D^{24,4} + 44,7^{\circ}$ (c, 0,78, cloroformo). Cromatografía en
 capa delgada: R_f 0,11 (benceno-acetato de etilo, 1:1); R_f
 0,50 (acetato de etilo).

10 Una mezcla de este compuesto (0,2 g, 0,265 mili-
 moles) y paladio al 10% sobre carbón vegetal (0,05 g) en
 metanol (10 ml) se hidrogenó a la presión atmosférica du-
 rante 20 horas. El catalizador se separó por filtración y
 se lavó con metanol que contenía amoníaco, después de lo
 15 cual se concentraron los líquidos orgánicos para dar un ma-
 terial vítreo (0,192 g).

Cromatografía en capa delgada: R_f 0,25 (cloroformo-
 metanol-amoníaco, 100:30:5). Este producto se calentó
 a reflujo (48 horas) con etanol-hidrato de hidrazina al
 20 90% (1:3, 2 ml) y la mezcla se evaporó a sequedad. Los ex-
 tractos clorofórmicos del residuo, al evaporarse, dejaron
 un producto vítreo (0,148 g, 95%) de 4,6-di-O-(6-amino-2,3,
6-tridesoxi- α -D-eritro-hexopiranosil)-1,3-di-N-bencil-2,5-
-didesoxiestreptamina pura. $[\alpha]_D^{24} + 54,2^{\circ}$ (c, 0,166, me-
 25 tanol).

Cromatografía en capa delgada: R_f 0,10 (cloroformo-
 etanol-amoníaco, 100:30:5); R_f 0,55 (metanol-amoníaco,
 8:1).

30 Una mezcla de este compuesto (0,23 g, 0,39 mili-
 moles) y paladio al 10% sobre carbón vegetal (65 mg) en me-

- 1 -tanol (25 ml) se hidrogenó a la presión atmosférica durante 16 horas. La filtración del catalizador y la concentración de la solución transparente dieron un residuo vítreo de 4,6-di-O-(6-amino-2,3,6-tridesoxi- α -D-eritro-hexopiranosil)-2,6-didesoxiestreptamina (0,16 g, 100%). $[\alpha]_D^{24} + 139,3^{\circ}$ (c 0,37, metanol). Cromatografía en capa delgada: R_f 0,48 (metanol-amoniaco, 4:1) (compárese con la Kanamicina A, R_f : 0,25); cromatografía sobre papel: R glucosamina: 0,26 (n-butanol-piridina-agua-ácido acético; 6:4:3:1).
- 10 Datos de RMP (D_2O): δ 1,10-2,20 (bm, H-2eq H-5ax 2 H-2', 2 H-2'', 2 H-3' y 2 H-3''), 2,70 - 3,05 (m, 4 H, H-6', 6'', 6'''), 3,30-3,70 (m, 8 H, protones del esqueleto), 5,04 (m, 1 H, H-1'' α), 5,06 (m, 1 H, H-1' α).

Análisis:

- 15 Calculado para $C_{18}H_{36}N_4O_6$:
C, 53,45; H, 8,97; N, 13,85;
Encontrado: C, 53,16; H, 8,74; N, 13,90%

EJEMPLO III

- 20 Este ejemplo ilustra un método alternativo de completar la síntesis del Ejemplo II.

- Una mezcla de 4,6-di-O-(6-azido-2,3,6-tridesoxi- α -D-eritro-hexopiranosil)-1,3-di-N-bencil-2,5-didesoxi-1,3-di-N-metoxicarbonilestreptamina (0,7 g, 1 milimol), hidrato de hidrazina al 90% (3 ml), paladio al 10% sobre carbón vegetal (50 mg) y etanol (2 ml) se calentó a reflujo durante 6 horas. Después de evaporar la mezcla, se añadieron etanol (10 ml) y más catalizador de paladio (50 mg), y la suspensión se hidrogenó a 25°, a 2 atmósferas de presión, durante 6 horas. La mezcla dió, por filtración y concentración, un residuo vítreo (0,4 g, 99%) de 4,6-di-O-(6-amino-2,3,6-tri-
- 25
- 30

1 — desoxi- α -D-critro-hexopiranosil)-2,5-didesoxiestreptami-
na pura. $[\alpha]_D^{24} + 139^\circ$ (c 0,5, metanol).

Cromatografía de capa delgada: R_f 0,47 (metanol-
-amoníaco, 4:1), (compárese con Kanamicina A, R_f : 0,25).

5 El espectro de RMP de este compuesto era idénti-
co al del producto preparado en el Ejemplo anterior.

Análisis: Calculado para $C_{18}H_{36}N_4O_6$:

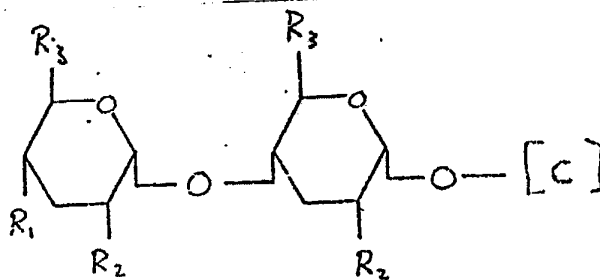
C, 53,45; H, 8,97; N, 13,85

Encontrado: C, 53,56; H, 9,09; N, 13,76%.

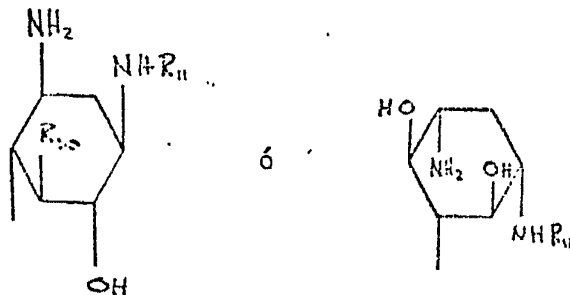
1 REIVINDICACIONES

5 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:

10 1ª.- Un método para preparar pseudotrisacáridos de la fórmula general (I):



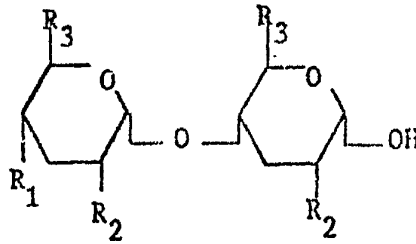
20 en la que R₁ es H, F, OH o SH; R₂ es H o NH₂; y R₃ es H o CH₂R₄, en donde R₄ es OH o NH₂, con la condición de que cuando R₁ es H, R₃ es CH₂NH₂ y cuando R₃ es H o CH₂OH, R₁ es NH₂; [C] es un grupo de la fórmula:



30 en donde R₁₀ es H u OH y R₁₁ es H, CH₃ o CO.CHOH-CH₂-CH₂-NH₂; cuyo método comprende las operaciones de: 1) seleccio

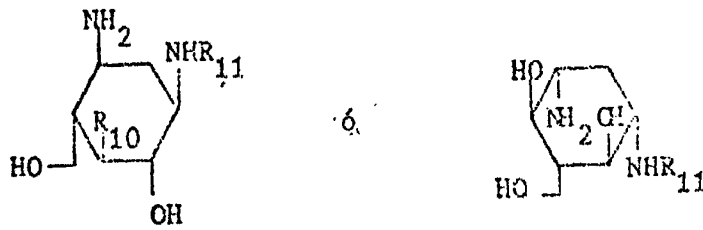
1 nar un derivado reactivo monofuncional en C₁ de un disacárido protegido, teniendo el disacárido la fórmula general:

5



10 en la que R₁, R₂ y R₃ son como se han definido anteriormente; 2) seleccionar un derivado de desoxiestreptamina protegido monofuncional que tiene un grupo hidroxilo libre en la posición C₄ o C₅, teniendo el derivado de desoxiestreptamina la fórmula general:

15



20

en la que R₁₀ y R₁₁ son como se han definido anteriormente; 3) hacer reaccionar dicho disacárido protegido y dicho derivado de estreptamina protegido, en presencia de un catalizador para la formación de enlaces α -glicosídicos, a fin de formar un enlace α -glicosídico entre ellos; y 4) eliminar los grupos protectores para liberar el pseudotrisacárido de la fórmula (I).

25

2ª.- Un método según la reivindicación 1ª, en el que R₁ es H u OH, R₂ es H o NH₂ y R₃ es CH₂NH₂.

30

3ª.- Un método para preparar pseudotrisacáridos.

1

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

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

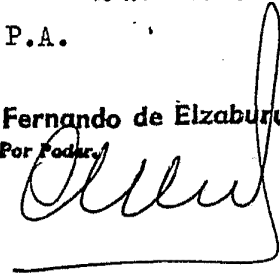
5

Madrid, 01 JUN. 1978

P.A.

Fernando de Elzaburu
Por Poder.

10



15

20

25

30