

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

20 NOV. 1978

Con el registro de acuerdo  
con la ley de patentes y según el con-  
tenido de la memoria adjunta.

NUMERO 459832
FECHA DE PRESENTACION 17 NOV 1978

(10) A 1

**PATENTE DE INVENCION**

(30) PRIORIDADES:	(32) FECHA	(33) PAIS
(31) NUMERO 24989/76	16 de junio de 1.976	República del Panamá
40145/76	28 de septiembre de 1.976	República del Panamá
51294/76	8 de diciembre de 1.976	República del Panamá

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL C07H/A61K	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
--------------------------	---	--

(64) TITULO DE LA INVENCION  
PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UN AMINOGLICOSIDO DE 2-DEOXIESTREPTAMINA

(71) SOLICITANTE (ES)  
PFIZER CORPORATION

DOMICILIO DEL SOLICITANTE  
Calle 15 1/2, Avenida Santa Isabel, Colón, República del Panamá

(72) INVENTOR (ES)  
Miss. Rhona Margaret Plews  
Dr. Kenneth Richardson  
Dr. James Robert Wright

(73) TITULAR (ES)

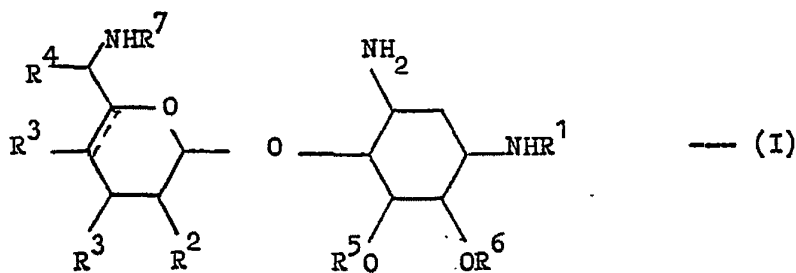
(74) REPRESENTANTE  
D. JOSE MIGUEL GOMEZ ACEBO Y POMBO

Esta invención se relaciona con un procedimiento para preparar agentes antibacteriales y, particularmente, para preparar nuevos aminoglicósidos de 2-deoxiestreptamina antibacteriales.

5 Los aminoglicósidos de 2-deoxiestreptamina son agentes antibacteriales obtenidos por fermentación o semisintéticos, bien conocidos, que incluyen agentes quemoterapéuticos valiosos tales como canamicinas, gentamicina, tobramicina, ribostamicina y neomicina.

10 Los nuevos agentes antibacteriales obtenidos por el procedimiento de la invención consisten en una serie de aminoglicósidos de 2-deoxiestreptamina en donde el grupo amino de la posición 1 está sustituido por un grupo alquilo que lleva uno o más grupos hidroxilo sobre átomos de carbono distintos  
15 al enlazado al grupo amino. Dichos compuestos son eficaces en el tratamiento de diversas infecciones bacteriales gram-positivas y gram-negativas, incluyendo infecciones del tracto urinario, en animales, incluyendo personas, y poseen diversas ventajas en su empleo en relación con los aminoglicósidos de  
20 2-deoxiestreptamina que tienen un grupo amino insustituido en la posición 1 del anillo 2-deoxiestreptamina. En particular, los compuestos de la invención han resultado poseer propiedades asociadas con una menor toxicidad que muchos de los aminoglicósidos conocidos.

25 De acuerdo con la invención, se proporciona un procedimiento para preparar nuevos aminoglicósidos de 2-deoxiestreptamina, de fórmula general:



en la que  $R^1$  representa un grupo alquilo primario con 3 a 7 átomos de carbono, llevando al menos dos de los mismos (distintos al átomo de carbono enlazado al grupo amino) un grupo hidroxilo; o un grupo alquilo secundario con 3 a 7 átomos de carbono, llevando al menos uno de los mismos (distinto al átomo de carbono unido al grupo amino) un grupo hidroxilo;  $R^2$  es un grupo amino o hidroxilo; cada  $R^3$  es un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo;  $R^4$  es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo; uno de los radicales  $R^5$  y  $R^6$  es un átomo de hidrógeno mientras que el otro representa un grupo glicosilo como más adelante se define;  $R^7$  es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior de hasta 4 átomos de carbono; y la línea de trazos representa un segundo enlace opcional cuando cada radical  $R^3$  es un átomo de hidrógeno; y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables.

El término "grupo alquilo primario" significa un grupo alquilo que tiene un grupo metileno insustituído unido al grupo amino y, cuando contiene más de 3 átomos de carbono, puede ser un grupo alquilo de cadena recta o ramificada. El término "grupo alquilo secundario" significa un grupo alquilo en el cual el átomo de carbono unido al grupo amino está enlazado a cada uno de dos átomos de carbono adicionales o cadenas de átomos de carbono.

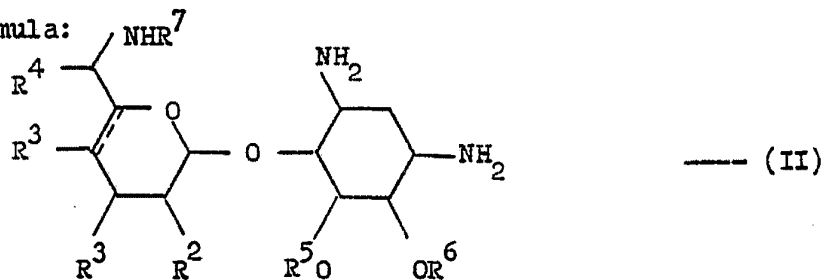
Cuando  $R^6$  es un grupo glicosilo, dicho grupo se define como un grupo hexopiranosilo que contiene dos o más grupos hidroxilo conteniendo preferiblemente un grupo amino o metilamino. Por ejemplo,  $R^6$  puede ser un grupo 3-amino-3-deoxi-alfa-D-glucopiranosilo tal y como se encuentra en canamicina A ó B, o garosamina como se encuentra en la gentamicina y sisomicina. Cuando  $R^5$  representa un grupo glicosilo, dicho grupo se define como un grupo pentofuranosilo que puede estar enlazado

opcionalmente a otros grupos hexopiranosilo mediante un enlace glicosídico adicional. Por ejemplo, R<sup>5</sup> puede ser un grupo β-D-ribofuranosilo tal y como se encuentra en la ribostamicina.

5 Una clase preferida de compuestos obtenidos por la invención comprende aquellos en los cuales R<sup>5</sup> es un átomo de hidrógeno y R<sup>6</sup> es un grupo glicosilo, particularmente un grupo 3-amino-3-deoxi-α-D-glucopiranosilo. Igualmente, se prefieren los compuestos en donde R<sup>4</sup> y R<sup>7</sup> son hidrógeno y cada R<sup>3</sup> es un grupo hidroxilo. R<sup>1</sup> es preferiblemente un grupo alquilo C<sub>3</sub> a C<sub>5</sub> hidroxilado, particularmente un grupo propilo. Un sustituyente particularmente preferido para el grupo 1-amino es el grupo dihidroxipropilo, es decir un grupo 2,3-dihidroxipropilo o un grupo 1,3-dihidroxil-2-propilo. Compuestos individuales particularmente preferidos, obtenidos por la invención, incluyen 1-N-β,3-dihidroxil-propilcanamicinas A y B y 1-N-α,3-dihidroxil-2-propilcanamicinas A y B.

20 Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención son las formadas a partir de ácidos que forman sales de adición de ácido no tóxicas, conteniendo aniones farmacéuticamente aceptables, tales como las sales hidrocloreto, hidrobromuro, sulfato o bisulfato, fosfato o fosfato ácido, acetato, maleato, fumarato, succinato, lactato, tartrato, citrato, gluconato, sacarato, p-toluenosulfonato y carbonato.

25 El procedimiento de la invención para preparar los compuestos de fórmula (I) comprende alquilar un compuesto de fórmula:



5 en la que  $R^2$  a  $R^7$  se definen como anteriormente y en donde uno o más de los grupos amino libres, distintos al grupo 1-amino, pueden estar opcionalmente protegidos; y separar los grupos amino-protectores (si están presentes) aislando a continuación el compuesto de fórmula (I).

10 La protección opcional de los grupos amino libres en el compuesto de fórmula (II), se puede conseguir por reacción con un reactivo selectivo a los grupos amino libres y fácilmente separables a continuación por técnicas convencionales, por ejemplo por hidrólisis o hidrogenólisis. Ejemplos de grupos protectores adecuados son los grupos formilo, acetilo, tri-  
15 fluoracetilo, metoxicarbonilo, t-butiloxicarbonilo y benciloxicarbonilo.

15 La alquilación se puede conseguir por reacciones convencionales, por ejemplo por alquilación reductiva empleando un aldehído o cetona hidroxi-sustituída adecuada o en el caso en donde  $R^1$  es un grupo alquilo primario, por acilación con un ácido hidroxi-sustituído adecuado y reducción del correspondiente derivado acilado (por ejemplo con diborano). Naturalmente en  
20 aquellos casos en donde existen grupos amino libres presentes además del grupo 1-amino, tendrá lugar también la reacción sobre dichos grupos y entonces será necesario separar el derivado 1-N-sustituído requerido de la mezcla de productos obtenida. Esto se puede conseguir por técnicas convencionales, por ejemplo  
25 mediante cromatografía de intercambio iónico. Sin embargo, es deseable proteger algunos o preferiblemente todos los grupos amino distintos al grupo 1-amino durante la reacción de alquilación, al objeto de simplificar el aislamiento final del producto requerido. En este caso, será necesario separar los grupos protectores en una etapa extra del proceso.  
30

De este modo, y según un procedimiento para la preparación de los compuestos de fórmula (I), se hace reaccionar un derivado aminoglicósido selectivamente protegido de fórmula (II), que tiene un grupo 1-amino libre, con el aldehído o cetona, utilizándose este último reactivo en exceso, y la base de Schiff inicialmente formada en la reacción se reduce simultáneamente o discontinuamente para dar el producto 1-N-sustituído. La reducción se puede efectuar adecuadamente empleando borohidruro sódico o cianoborohidruro sódico como agente reductor y convenientemente se lleva a cabo añadiendo este último a la mezcla de reacción, a un pH comprendido entre 4 y 7, lo que permite realizar la reacción eficazmente en una sola etapa. Alternativamente, la mezcla del aminoglicósido (II) y del aldehído o cetona, se puede someter a una hidrogenación catalítica convencional.

La reacción se puede efectuar convenientemente con los reactantes disueltos en un disolvente inerte a la reacción, por ejemplo agua o dioxano acuoso o metanol acuoso, a una temperatura comprendida entre 0°C y la temperatura de reflujo del disolvente. El periodo dentro del cual la reacción procede sustancialmente hasta su término depende naturalmente de la naturaleza de los reactantes, disolvente y temperatura empleada, pero se ha encontrado que la reacción entre el aminoglicósido de fórmula (II) y el aldehído o cetona hidroxí-sustituído (por ejemplo, gliceraldehído o dihidroxiacetona) en presencia de un exceso de cianoborohidruro sódico, a un pH de 4 a 7, se termina prácticamente en el espacio de 2 días cuando se lleva a cabo en metanol acuoso a una temperatura de 60°C.

Como segunda etapa, es necesario separar cualquier grupo amino-protector que esté presente en la molécula de amino-

glicósido. Existen varias condiciones para separar totalmente los grupos amino-protectores, las cuales dependen de la naturaleza del grupo protector empleado y del ambiente de la amina protegida. El medio empleado puede ser anhidro o acuoso y en casos particulares puede ser ácido o básico en diversas concentraciones. Un grupo protector particularmente preferido para los compuestos de fórmula (II) es el grupo formilo. Este se puede separar fácilmente por hidrólisis básica suave, por ejemplo por tratamiento con hidróxido sódico diluido a temperatura ambiente durante varias horas, o calentando con acetato de hidrazina o por hidrólisis ácida suave, por ejemplo con ácido clorhídrico 5N a temperatura ambiente, durante varias horas. Igualmente, son adecuados los grupos t-butiloxicarbonilo que se pueden separar bajo condiciones ácida, por ejemplo por tratamiento con ácido trifluoroacético anhidro a temperatura ambiente, durante un período de hasta 45 minutos, el grupo benciloxicarbonilo que se puede separar por hidrogenólisis catalítica, por ejemplo mediante hidrogenación en solución acuosa de ácido acético en presencia de un catalizador de paladio sobre carbón vegetal, a 30°C, y una presión de 3,5 kg/cm<sup>2</sup> durante varias horas, y el grupo acetilo se separa por calentamiento con hidróxido sódico 3N a 80-90° durante varias horas. El producto, después de la separación de los grupos protectores, se procesa finalmente de forma convencional, por ejemplo mediante filtración y evaporación del disolvente, y el producto en bruto se puede purificar entonces por cristalización o por cromatografía.

Un derivado de aminoglicósido protegido particularmente preferido, de fórmula (II), para utilizarse en el proceso de preparación de derivados de canamicina A (de fórmula (I) en donde R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>7</sup> son hidrógeno, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son hidroxilo y R<sup>6</sup> es

un grupo 3-amino-3-deoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosilo), es 3,3",6'-tri-N-formil-canamicina A. El correspondiente derivado de 2',3,3",6'-tetra-N-formil-canamicina B se prefiere para la preparación de los derivados de canamicina B 1-N-sustituídos de fórmula (I) (en donde R<sup>2</sup> es amino y R<sup>3</sup> a R<sup>7</sup> se definen como anteriormente). Igualmente son adecuados los derivados de canamicina A y B selectivamente protegidos, descritos y reivindicados en la solicitud de Patente británica copendiente No. 15421/76, por ejemplo 3",6'-di-N-acetil-canamicina A y 2',3",6'-tri-N-trifluoracetil-canamicina B.

El aminoglicósido o derivados aminoglicósidos protegidos de fórmula (II) son compuestos conocidos anteriormente descritos en la literatura. Por ejemplo, en la Patente belga No. 817.546, se describen varios aminoglucósidos N-formilados sobre todo en el grupo 1-amino, incluyendo 3,3",6'-tri-N-formil-canamicina A y 2',3,3",6'-tetra-N-formil-canamicina B de forma análoga se pueden preparar derivados similares de otros aminoglicósidos. Los derivados en los cuales el grupo 6'-amino está protegido son bien conocidos y su preparación se describe, por ejemplo, en la Patente británica No. 1.401.220 y en las Patentes de Alemania Occidental Nos. 2.311.524, 2.350.169 y 2.512.587.

Los aldehidos y cetonas hidroxisustituídos, adecuados para utilizarse en el proceso de preparación de los compuestos de fórmula (I), son fácilmente disponibles. Por ejemplo, el D-gliceraldehido, cuando se utiliza en el proceso, da lugar a un producto en el cual R<sup>1</sup> es (S)-2,3-dihidroxipropilo. En la reacción se pueden emplear también otras aldosas y deoxi-aldosas fácilmente disponibles, por ejemplo D-eritrosa, D-ribosa y 2-2-deoxi-D-ribosa. Similarmente, se puede emplear dihidroxi-acetona para dar el derivado 1-N-(1,3-dihidroxipropilo) e

hidroxiacetona (acetol) para dar el correspondiente derivado 1-hidroxi-2-propilo.

5 Los compuestos de fórmula (I) así como aquellos de fórmula (II) pueden existir en varias formas conformacionales y la invención no está limitada a cualquiera de tales formas. Generalmente, los anillos son de la forma "silla" y cada uno de los grupos sustituyentes está dispuesto ecuatorialmente con respecto al anillo. Por otra parte, el enlace glicosídico entre el anillo hexopiranosilo y el anillo 2-deoxiestreptamina es normalmente un enlace  $\alpha$  con respecto al primero. Adicionalmente, el sustituyente alquilo hidroxi-sustituído en el grupo 1-amino puede tener uno o más centros ópticamente activos y cada uno de ellos puede estar en configuración R o S o puede estar presente como una mezcla de isómeros ópticos.

15 La evaluación in vitro de los compuestos de la invención como agentes antibacteriales, se lleva a cabo determinando la concentración mínima inhibitoria (MIC) del compuesto del ensayo en un medio adecuado en el cual deja de presentarse el crecimiento del microorganismo particular. En la práctica, se inoculan placas de agar, cada una de ellas teniendo al compuesto del ensayo en una concentración particular, con un número standard de células del microorganismo y a continuación se incubaba cada placa durante 24 horas a 37°C. Las placas son observadas entonces en relación con la presencia o ausencia del crecimiento de bacterias y se anota el valor MIC adecuado. Los microorganismos utilizados en dichos ensayos incluyen cepas de Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus y Streptococcus faecalis.

30 La evaluación in vivo se efectúa por administración de los compuestos subcutáneamente a ratones que están expuestos

a una cepa de Escherichia coli.

5 Cada compuesto se administra, en una serie de niveles de dosificación, a grupos de ratones y se determina su actividad como aquel nivel que proporciona una protección del 50%, contra el efecto letal del organismo Escherichia coli en un periodo de 72 horas.

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

25 Para la administración a personas, se supone que el nivel de dosificación diaria de los compuestos antibacteriales de la invención será comparable al de los agentes antibacteriales de aminoglicósidos corrientemente utilizados, por ejemplo de 0,1 a 50 mg/kg (en dosis divididas) cuando se administran por vía parenteral, o de 10 a 100 mg/kg (en dosis divididas) cuando se administran por vía oral. De este modo, las tabletas o cápsulas de los compuestos pueden contener de 0,1 a 1 g de compuesto activo para la administración oral hasta 4 veces al  
30 día, mientras que las unidades de dosificación para la adminis-

5 tración parenteral contendrán de 10 a 500 mg de compuesto activo. En cualquier caso, será el médico el que determine la dosis real que resulte más adecuada para un paciente individual y dicha dosis variará en función de la edad, peso y respuesta del paciente particular. Las dosis anteriores son ejemplificativas de un anfotrión medio. Naturalmente, pueden existir casos individuales en donde se suministren gamas de dosificación mayores o menores, estando estos casos dentro del alcance de la invención.

10 Los siguientes ejemplos describen la preparación de los compuestos según la invención. Las temperaturas se ofrecen en grados centígrados. "Amberlite" y "Sephadex" son marcas registradas. La cromatografía de capa fina se lleva a cabo sobre placas de sílice empleando el sistema disolvente establecido. Las manchas son visualizadas después del secado de las  
15 placas por pulverización con una solución al 5% de hipoclorito de t-butilo en ciclohexano, tras lo cual se secan las placas a 100°C durante 10 minutos en un horno ventilado, se enfría y se pulverizan con solución de almidón-yoduro potásico.

20

EJEMPLO 1

1-N- $\beta$ -(S)-2,3-dihidroxipropil/canamicina A

25

30

Se disuelven 100 mg (0,18 mmoles) de 3,3",6'-tri-N-formil-canamicina A, 31,6 mg (0,35 mmoles) de D-gliceraldehido y 33 mg (0,52 mmoles) de cianoborohidruro sódico en metanol acuoso (10 ml de metanol y 2 ml de agua) y se ajusta el pH de la solución a 6 con ácido clorhídrico 5N. La solución se mantiene a temperatura ambiente durante 40 horas. El disolvente se evapora luego bajo presión reducida y el residuo se trata con hidróxido sódico 1N y se deja reposar a temperatura ambiente durante 20 horas más. Después de concentrar bajo presión reducida,

el residuo se cromatografía en una columna de resina intercambiadora de iones Amberlite CG-50 (forma  $\text{NH}_4^+$ ), eluyendo con un gradiente de hidróxido amónico de concentración en aumento de 0 a 0,1N, para dar 1-N-[(S)-2,3-dihidroxipropil]canamicina A (66 mg, 67%). Rf 0,27 en cloruro sódico acuoso 1M (la canamicina A proporciona un valor Rf de 0,21), Rf 0,70 en metanol, hidróxido amónico 0,880 1:2 (canamicina A, 0,70).

Encontrado: C, 40,1; H, 7,0; N, 8,3;  $\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_{13} \cdot 2\text{H}_2\text{CO}_3$  requiere C, 40,5; H, 6,8; N, 8,2%.

Se convierte una muestra al derivado tetra-N-acetil-nona-O-trimetilsililo volátil 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 1285.  $\text{C}_{56}\text{H}_{122}\text{N}_4\text{O}_{17}\text{Si}_9$  menos de un grupo  $\text{C}_3\text{H}_9\text{OSi}$  requiere  $m/e$  1285.

#### EJEMPLO 2

##### 1-N-[(S)(R)2,3,4-trihidroxibutil]canamicina A

Se calienta a 60° durante 50 horas, una solución de 100 mg (0,18 mmoles) de 3,3",6'-tri-N-formil-canamicina A, 107 mg (0,90 mmoles) de D-eritrosa y 66 mg (1,04 mmoles) de cianoborohidruro sódico en una mezcla de 10 ml de metanol y 2 ml de agua a pH 6. La solución se concentra bajo presión reducida. El residuo se disuelve en 12 ml de hidrato de hidrazina al 10%, se ajusta el pH de la solución a 6 con ácido acético glacial y se calienta la solución bajo reflujo durante 6 horas. El disolvente se evapora bajo presión reducida y el residuo se cromatografía en Amberlite CG-50 en la forma descrita en el ejemplo 1, seguido por cromatografía de la fracción principal que contiene el producto sobre Sephadex CM25 (forma  $\text{NH}_4^+$ ), elu-

yendo con un gradiente de hidróxido amónico como anteriormente, para dar 1-N-[(S)(R)2,3,4-trihidroxibutil]canamicina A (37 mg, 36%). Rf 0,29 en metanol, hidróxido amónico 0,880 2:1 (canamicina A, 0,32). Encontrado: C, 41,6; H, 6,6; N, 7,9.

5  $C_{22}H_{44}N_4O_{14} \cdot 2H_2CO_3$  requiere C, 40,5; H, 6,8; N, 7,9%.

EJEMPLO 3

Se prepara 1-N-[(S)(S)(R)2,3,4,5-tetrahidroxipentil]canamicina A empleando el método del ejemplo 2 pero a partir de D-ribosa. Rf 0,68 en metanol, hidróxido amónico 0,880 1:2 (canamicina A, 0,70).

10

EJEMPLO 4

Se prepara 1-N-[(S)(R)3,4,5-trihidroxipentil]canamicina A usando el método del ejemplo 2 pero a partir de 2-deoxi-D-ribosa. Rf 0,68 en metanol, hidróxido amónico 0,880 1:2 (canamicina A, 0,70).

15

EJEMPLO 5

Se prepara 1-N-[(S)(R)(R)(R)2,3,4,5,6-pentahidroxihexil]canamicina A empleando el método del ejemplo 2 pero a partir de D-glucosa. Rf 0,55 en metanol, hidróxido amónico 0,880 1:2 (canamicina A, 0,71).

20

EJEMPLO 6

Se prepara 1-N-[(R)(S)(R)2,3,4,5-tetrahidroxipentil]canamicina A empleando el método del ejemplo 2 pero a partir de D-arabinosa. Rf 0,34 en metanol, hidróxido amónico 0,880 1:1 (canamicina A, 0,49).

25

EJEMPLO 7

1-N-[(S)(R)(R)2,3,4,5-tetrahidroxipentil]canamicina A

Se calienta a 90°C durante 3 horas y media, una solución de 100 mg (0,18 mmoles) de 3,3",6'-tri-N-formil-canamicina A, 79 mg (0,53 mmoles) de D-xilosa y 44 mg (0,68 mmoles) de cianoborohidruro de sodio en 10 ml de agua a pH 4,6.

30

El disolvente se evapora bajo presión reducida y el residuo se disuelve en 10 ml de ácido clorhídrico 5N y se agita a 30°C durante 16 horas. El disolvente se evapora y el residuo se cromatografía sobre una columna de resina intercambiadora de 5 iones Amberlite CG-50 (forma  $\text{NH}_4^+$ ) eluyendo en un gradiente de hidróxido amónico de concentración en aumento desde 0 a 0,2N, para dar 56 mg (51%) de 1-N- $\lambda$ (S)(R)(R)2,3,4,5-tetrahidroxipentil/canamicina A. Rf 0,58 en metanol, hidróxido amónico 0,880 1:2 (canamicina A proporciona un valor Rf de 0,66).

EJEMPLO 8

10 Se prepara 1-N- $\lambda$ (R)(S)(S)2,3,4,5-tetrahidroxipentil/canamicina A usando el método del ejemplo 7 pero a partir de L-xilosa. Rf 0,34 en metanol, hidróxido amónico 0,88 1:2 (canamicina A, 0,50).

EJEMPLO 9

15 Se prepara 1-N- $\lambda$ (R)(R)(S)2,3,4,5-tetrahidroxipentil/canamicina A empleando el método del ejemplo 7 pero a partir de L-ribosa. Rf 0,38 en metanol, hidróxido amónico 0,88, 1:1 (canamicina A, 0,51). <sup>m</sup>/e (desorción de campo) M + 1  
20 encontrado 619.

EJEMPLO 10

25 Se prepara 1-N- $\lambda$ (R)(R)(R)2,3,4,5-tetrahidroxipentil/canamicina A usando el método del ejemplo 7 pero a partir de D-lixosa. Rf 0,37 en metanol, hidróxido amónico 0,880 1:1 (canamicina A, 0,48).

EJEMPLO 11

1-N- $\lambda$ (S)2,3-dihidroxipropil/canamicina B

30 Se añade una solución de 45 mg (0,5 mmoles) de D-gliceraldehido en 1 ml de metanol a una solución de 100 mg (0,17 mmoles) de 2',3,3'',6'-tetra-N-formil-canamicina B en 5 ml

de metanol y 1 ml de agua. Se añaden 20 mg (0,3 mmoles) de cianoborohidruro sódico a la solución agitada, se ajusta el pH a 6 con ácido clorhídrico 5N y la solución se agita a temperatura ambiente durante la noche. La solución se evapora hasta sequedad bajo presión reducida y el residuo se recibe en ácido clorhídrico 5N y la solución se deja reposar a temperatura ambiente durante la noche. El pH de la solución se ajusta a 6 con solución de hidróxido sódico y la solución se cromatografía sobre Amberlite CG-50 en la forma descrita en el ejemplo 1.

La liofilización de las fracciones adecuadas proporciona 1-N-/(S)2,3-dihidroxiopropil/canamicina B (53 mg, 56%).

Rf 0,51 en cloruro sódico acuoso 3M (canamicina B, 0,42), Rf 0,54 en metanol, hidróxido amónico 0,880, 1:1 (canamicina B, 0,58). La espectrometría de masa de desorción de campo muestra una fuerte cresta M + 1 en <sup>m</sup>/e 558.  $C_{21}H_{43}N_5O_{12}$  requiere M + 1 = 558.

#### EJEMPLO 12

Se prepara 1-N-/(S)(R) 2,3,4-trihidroxiutil/canamicina B empleando el método del ejemplo 11, pero a partir de D-eritrosa. Rf 0,60 en cloruro sódico 3M (canamicina B, 0,45).

#### EJEMPLO 13

Se prepara 1-N-/(S)(S)(R)2,3,4,5-tetrahidroxipentil/canamicina B usando el método del ejemplo 11, pero a partir de D-ribosa. Rf 0,3 en cloruro sódico 2M (canamicina B, 0,2).

#### EJEMPLO 14

Se prepara 1-N-/(S)(R)3,4,5-trihidroxipentil/canamicina B empleando el método del ejemplo 11, pero a partir de 2-deoxi-D-ribosa. Rf 0,3 en cloruro sódico 2M (canamicina B, 0,2).

EJEMPLO 15

1-N-[(S)(R)(R)2,3,4,5,6-pentahidroxihexil]canamicina B: se prepara usando el método del ejemplo 11, pero a partir de D-glucosa. Rf 0,25 en metanol, hidróxido amónico 0,880, 1:1 (canamicina B, 0,42).

EJEMPLO 16

Se prepara 1-N-(2,3-dihidroxi-2-hidroximetilpropil)canamicina B usando el método del ejemplo 11, pero a partir de DL-2-hidroximetil-2,3-O-isopropilideno-gliceraldehido. Rf 0,55 en cloruro sódico 3M (canamicina B, 0,42).  $m/e$  (desorción de campo)  $M + 1$  encontrado 588.  $C_{22}H_{45}N_5O_{13}$  requiere  $M + 1 = 588$ .

EJEMPLO 17

Se prepara 1-N-[(R)2,3-dihidroxipropil]canamicina B usando el método del ejemplo 11 pero a partir de L-gliceraldehido. El producto es idéntico, según se comprueba por cromatografía de capa fina, al producto del ejemplo 11.

EJEMPLO 18

1-N-[1,3-dihidroxi-2-propil]canamicina A

Se disuelven 200 mg (0,36 mmoles) de 3,3",6'-tri-N-formil-canamicina A, 95 mg (1,05 mmoles) de dihidroxiacetona y 88 mg (1,40 mmoles) de cianoborohidruro sódico en metanol acuoso (20 ml de metanol, 4 ml de agua) y el pH de la solución se ajusta a 6,6 con ácido clorhídrico 5N. La solución se calienta bajo reflujo durante 22 horas. Se añaden 95 mg de dihidroxiacetona y 88 mg de cianoborohidruro sódico y el pH se ajusta a 5,5. Se continua el reflujo durante 24 horas más y el disolvente se evapora luego bajo presión reducida y el residuo se trata con 10% de hidrato de hidrazina/ácido acético a pH 6 (20 ml) y se calienta bajo reflujo durante 6 horas. Después de concentrar bajo presión reducida, el residuo se cromatografía en una columna de resina intercambiadora de iones Amberlite

CG-50 (forma  $\text{NH}_4^+$ ), eluyendo con un gradiente de hidróxido amónico de concentración en aumento desde 0 a 0,1N. Las fracciones que contienen producto (tal y como se controla por cromatografía de capa fina) se combinan, evaporan y el producto se vuelve a cromatografiar sobre Sephadex CM25 (forma del ión amonio) eluyendo como anteriormente, para dar 1-N- $\sqrt{1,3}$ -dihidroxi-2-propil- $\sqrt{7}$ -canamicina A (0,11 g, 57%). Rf 0,40 en metanol, hidróxido amónico 0,880, 2:1 (canamicina A, 0,30). Encontrado: C, 40,6; H, 6,5; N, 8,4;  $\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_{13} \cdot 2\text{H}_2\text{CO}_3$  requiere C, 40,5; H, 6,8; N, 8,2%.

EJEMPLO 19

1-N- $\sqrt{1,3}$ -dihidroxi-2-propil- $\sqrt{7}$ -canamicina B

Se añaden 88 mg (1,40 mmoles) de cianoborohidruro sódico a una solución de 200 mg (0,33 mmoles) de 2',3,3'',6'-tetra-N-formil-canamicina B y 95 mg (1,05 mmoles) de hidroxiacetona en 12 ml de metanol y 3 ml de agua. El pH de la solución se ajusta a 4,5 con ácido clorhídrico 2N y la solución se calienta bajo reflujo durante 20 horas. El disolvente se evapora bajo presión reducida y el residuo se recibe en 10 ml de agua. Se añaden 2 ml (60%) de hidrato de hidrazina, se ajusta el pH de la solución a 6 con 2 ml de ácido acético glacial y la solución se calienta bajo reflujo durante 6 horas y se evapora luego a una goma bajo presión reducida. El producto se disuelve en 8 ml de agua, se ajusta el pH a 5,5 con ácido clorhídrico 0,2N y la solución se cromatografía sobre una columna de resina intercambiadora de iones Amberlite CG-50 en la forma amónica, eluyendo primero con agua y a continuación con un gradiente de hidróxido amónico de concentración en aumento hasta 0,25 N. Las fracciones que contienen producto (tal y como se controla por cromatografía de capa fina) se combinan, se evaporan y el pro-

ducto se vuelve a cromatografiar sobre una columna de Sephadex CM25 (forma amónica) eluyendo como anteriormente para dar 1-N-[1,3-dihidroxi-2-propil]canamicina B (59 mg, 32%). Rf 0,55 en metanol, hidróxido amónico 0,880, (1:1)(canamicina B, 0,47), Rf 0,37 en cloruro sódico 2M (canamicina B, 0,26). Encontrado: C, 37,6; H, 6,3; N, 9,2.  $C_{21}H_{43}N_5O_{12} \cdot 3H_2CO_3 \cdot H_2O$  requiere: C, 37,8; H, 6,8; N, 9,2%.

EJEMPLO 20

1-N-[1-hidroxi-2-propil]canamicina B

10 Se disuelven 200 mg (0,36 mmoles) de 2',3,3",6'-tetra-N-formil-canamicina B, 78 mg (1,05 mmoles) de hidroxiacetona y 88 mg (1,40 mmoles) de cianoborohidruro sódico en metanol acuoso (20 ml de metanol, 4 ml de agua) y el pH de la solución se ajusta a 6 con ácido clorhídrico 5N. La solución se calienta bajo reflujo durante 22 horas. Se añade adicionalmente  
15 23 mg de hidroxiacetona y 30 mg de cianoborohidruro sódico y el reflujo se continua durante 24 horas más. El disolvente se evapora entonces bajo presión reducida y el residuo se trata con hidrato de hidrazina acuoso al 10% ajustado a pH 6 con  
20 ácido acético glacial (20 ml) y se calienta bajo reflujo durante 6 horas. Después de concentrar bajo presión reducida, el residuo se cromatografía sobre una columna de resina intercambiadora de iones Amberlite CG-50 (forma del ión amonio), eluyendo con un gradiente de hidróxido amónico de concentración en aumento desde 0 a 0,1N. Las fracciones que contienen producto (tal y como se controla por cromatografía de capa fina) se combinan y evaporan para dar 1-N-[1-hidroxi-2-propil]canamicina B (0,11 g, 50%). Rf 0,55 en cloruro sódico 3M (canamicina B, 0,47).  
25 Encontrado: C, 39,6; H, 6,8; N, 10,5;  $C_{21}H_{43}N_5O_{11} \cdot 2\frac{1}{2}H_2CO_3$  requiere C, 40,5; H, 6,9; N, 10,0%. <sup>m</sup>/e (desorción de campo)  
30

(M + 1) encontrado 542.  $C_{21}H_{43}N_5O_{11}$  requiere M + 1 = 542.

EJEMPLO 21

Se prepara 1-N-(1-hidroxi-2-propil)canamicina A de forma similar a la descrita en el ejemplo 20 pero empleando  
5 3,3",6'-tri-N-formil-canamicina A. Rf 0,3 en metanol, cloroformo, hidróxido amónico al 8% (4:1:2) (canamicina A, 0,20).

EJEMPLO 22

1-N-(1-hidroxi-2-propil)tobramicina

Se disuelven 2 g (3,5 mmoles) de 6'-N-t-butiloxi-  
10 carbonil-tobramicina, 0,78 g (10,6 mmoles) de hidroxiacetona y 0,89 g (14 mmoles) de cianoborohidruro sódico en una mezcla de 150 ml de metanol y 30 ml de agua y el pH de la solución se  
ajusta a 6 con ácido clorhídrico 5N. La mezcla se calienta bajo  
reflujo durante 72 horas. El disolvente se separa bajo presión  
15 reducida y el residuo se trata con 20 ml de ácido trifluoracético agitando durante 45 minutos a temperatura ambiente. La  
solución se evapora de nuevo hasta sequedad bajo presión reducida, se recibe el residuo en un poco de agua, se ajusta el pH  
a 6 con hidróxido amónico 3N y la solución se cromatografía sobre  
20 resina intercambiadora de iones Amberlite CG-50 (forma del ión amonio) eluyendo con un gradiente de hidróxido amónico. Las  
fracciones que contienen producto se combinan, evaporan y el  
producto se vuelve a cromatografiar sobre Sephadex CM25 (forma  
del ión amonio) eluyendo como anteriormente, para dar 1-N-(1-  
25 hidroxi-2-propil)tobramicina (8 mg, 0,4%). Rf 0,68 en cloruro  
sódico 3M (tobramicina 0,60). <sup>m</sup>/e (desorción de campo) M + 1  
encontrado 526.  $C_{21}H_{43}N_5O_{10}$  requiere M + 1 = 526.

EJEMPLO 23

Se prepara 1-N-(s)2,3-dihidroxi-2-propil)tobramicina  
30 de forma similar a la descrita en el ejemplo 22, pero usando

D-gliceraldehido en lugar de hidroxiacetona. Rf 0,55 en cloruro sódico 3M (tobramicina 0,45), Rf 0,37 en metanol, hidróxido amónico 0,880 (2:1)(tobramicina 0,35).

EJEMPLO 24

5 1-N-(1,3-dihidroxi-2-propil)canamicina A

Se disuelven 500 mg (0,88 mmoles) de 6',3"-di-N-acetil-canamicina A, 237 mg (2,64 mmoles) de 1,3-dihidroxiacetona y 181 mg (2,64 mmoles) de cianoborohidruro sódico en metanol acuoso (45 ml de metanol, 5 ml de agua) y el pH de la solución se ajusta a 6 con ácido clorhídrico 2N. La solución se deja reposar a temperatura ambiente durante 3 días. La cromatografía de capa fina (metanol, cloroformo, hidróxido amónico 1N, 4:2:1) demuestra dos componentes principales Rf 0,17, 0,22. La solución se evapora y los productos se separan por cromatografía de intercambio iónico sobre la forma del ión amonio de Sephadex CM25, eluyendo con un gradiente de hidróxido amónico de concentración en aumento. El componente de carrera más lenta (Rf 0,17) que es el segundo componente eluido de la columna, es desprotegido por calentamiento en una solución de hidróxido sódico 3N a 80-90°C durante 4 horas. La neutralización y purificación por cromatografía de intercambio iónico sobre Amberlite CG-50 (forma del ión amonio), eluyendo como anteriormente, proporciona 1-N-(1,3-dihidroxi-2-propil)canamicina A idéntica al producto del ejemplo 18.

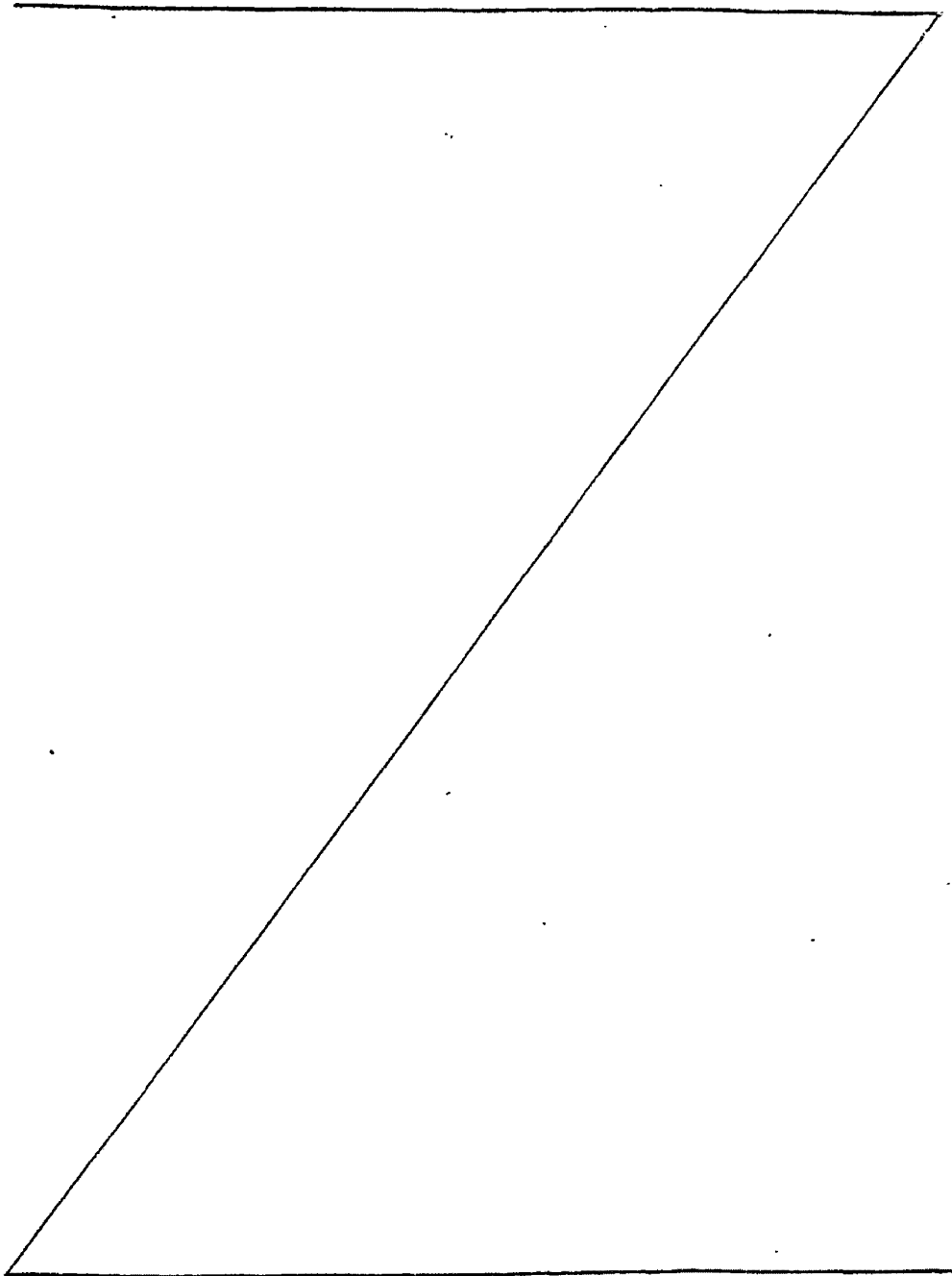
25 En la siguiente tabla se describen los resultados del ensayo de los compuestos de los ejemplos con respecto a la actividad antibacterial in vitro por los métodos anteriormente indicados:

TABLA: Actividad in vitro

Ejemplo No.	M.I.C. / $\mu$ g/ml				
	<u>E. Coli</u>	<u>Klebsiella pneumoniae</u>	<u>Proteus mirabilis</u>	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	<u>Staphylococcus aureus</u>
1	6,2	6,2	25	6,2	6,2
2	12,5	6,2	12,5	6,2	6,2
3	12,5	12,5	12,5	6,2	6,2
4	12,5	12,5	25	12,5	12,5
5	12,5	12,5	25	12,5	12,5
6	25	25	50	25	25
7	12,5	12,5	25	12,5	6,2
8	50	25	100	25	25
9	25	12,5	25	12,5	25
10	25	25	100	25	25
11	6,2	3,1	6,2	3,1	1,6
12	3,1	3,1	6,2	1,6	1,6
13	3,1	3,1	12,5	3,1	1,6
14	3,1	3,1	6,2	3,1	1,6
15	6,2	6,2	100	6,2	6,2
16	6,2	3,1	12,5	3,1	3,1
17	6,2	6,2	12,5	6,2	3,1
18	6,2	6,2	25	3,1	6,2
19	3,1	1,6	6,2	1,6	1,6
20	3,1	3,1	25	3,1	1,6
21	3,1	3,1	12,5	6,2	3,1
22	3,1	6,5	12,5	3,1	0,8
23	6,2	3,1	6,2	3,1	1,6

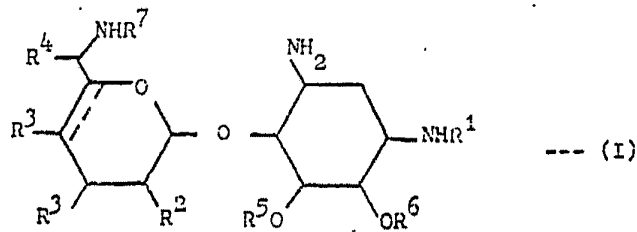
Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.

5

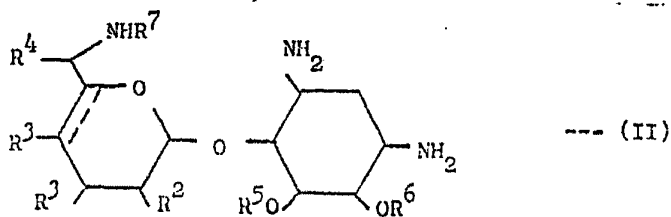


REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para preparar un aminoglicosido de 2-deoxiestreptamina, de fórmula:



5 en la que R<sup>1</sup> es un grupo alquilo primario con 3 a 7 átomos de  
carbono, dos al menos de los cuales (distintos al átomo de  
carbono unido al grupo amino) llevan un grupo hidroxilo; o un  
grupo alquilo secundario con 3 a 7 átomos de carbono, uno al  
menos de los cuales (distinto al átomo de carbono unido al  
10 grupo amino) lleva un grupo hidroxilo; R<sup>2</sup> es un grupo amino o  
hidroxilo; cada R<sup>3</sup> es un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo;  
R<sup>4</sup> es un átomo de hidrógeno o un grupo metilo; uno de R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup>  
es un átomo de hidrógeno mientras que el otro es un grupo  
glicosilo; R<sup>7</sup> es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo infe-  
15 rior de hasta 4 átomos de carbono; y la línea de trazos es un  
segundo enlace opcional cuando cada R<sup>3</sup> es un átomo de hidrógeno;  
y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables;  
caracterizado porque comprende alquilar un compuesto de fórmula:



en la que R<sup>2</sup> a R<sup>7</sup> se definen como anteriormente y en la que uno o más de los grupos amino libres, distintos al grupo 1-amino, pueden estar opcionalmente protegidos; separar los grupos amino-protectores si están presentes; y aislar el compuesto de fórmula (I):

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque uno o más de los grupos amino libres, distintos al grupo 1-amino, se protegen con un grupo formilo:

3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque como compuesto de fórmula (II) se alquila 3,3",6'-tri-N-formilcanamicina A.

4.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque como compuesto de fórmula (II) se alquila 2',3,3",6'-tetra-N-formilcanamicina B.

5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque uno o más de los grupos amino libres distintos al grupo 1-amino, se protegen con un grupo acetilo.

6.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque como compuesto de fórmula (II) se alquila 3",6'-di-N-acetilcanamicina A.

7.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque uno o más de los grupos amino libres distintos al grupo 1-amino, se protegen con un grupo trifluoracetilo.

8.- Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque como compuesto de fórmula (II) se alquila 2',3",6'-tri-N-trifluoracetilcanamicina B ó 3",6'-di-N-trifluoracetilcanamicina A.

9.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque uno o más de los grupos amino libres distintos al grupo 1-amino, se protegen con un grupo t-butiloxicarbonilo.

5 10.- Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque como compuesto de fórmula (II) se alquila 6'-N-t-butiloxicarboniltobramicina:

11.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la alquilación se efectúa por alquilación reductiva con un aldehído o cetona.

10 12.- Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque la reducción se efectúa con borohidruro de sodio o cianoborohidruro de sodio.

15 13.- Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque la reducción se efectúa por hidrogenación catalítica.

14.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizado porque la alquilación reductiva se efectúa con D-gliceraldehído.

20 15.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizado porque la alquilación reductiva se efectúa con dihidroxiacetona.

16.- Procedimiento para preparar un aminoglicosido de 2-deoxiestreptamina, tal y como queda sustancialmente

descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 25 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 24 MAYO 1978

PFIZER CORPORATION.

Dr. Don GONZALO ABELLO  
c. p. Firmado J. Suarez Dia

5