



19 ES	11	NUMERO	10 A1
	21		
	22	FECHA DE PRESENTACION	
			28-10-1977

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
130119/76	28-10-1976	Japón

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

64 TITULO DE LA INVENCION
"UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR NUEVOS DERIVADOS DE AMINOGLICOSIDOS"

71 SOLICITANTE (S)
SHIONOGI & CO., LTD.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
12, 3-chome, Dosho-machi, Higashi-ku, Osaka, Japón

72 INVENTOR (ES)
Kikuo IGARASHI

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ (P.-67.362)

jga

1 I.- Resumen del invento

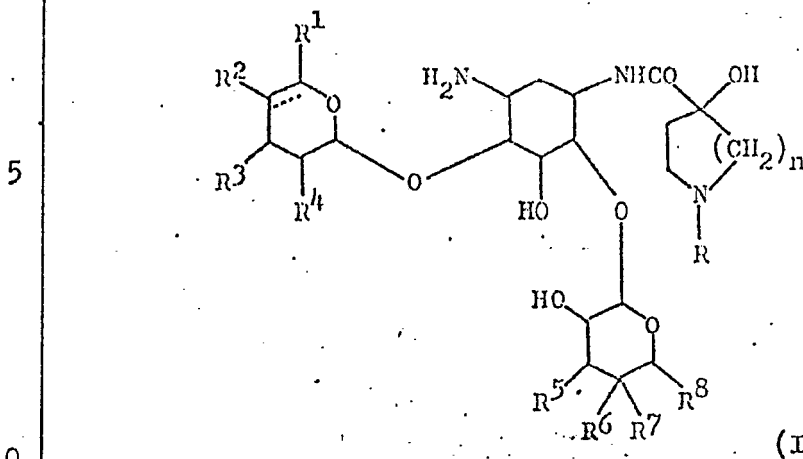
Este invento se refiere a nuevos derivados de anti-
tibiótico de aminoglicósido que tienen una excelente acción
antimicrobiana. Más particularmente, se refiere a nuevos
5 derivados de antibióticos de aminoglicósido y sus sales
que contienen un resto de 2-desoxiestreptamina cuyo grupo
1-amino está sustituido con un ácido pirrolidincarboxílico
o ácido piperidincarboxílico.

Se ha intentado mejorar la actividad antimicro-
biana y el espectro de los antibióticos de aminoglicósido
10 por introducción de un grupo acilo especificado en el gru-
po 1-amino del resto 2-desoxiestreptamina. Por ejemplo, la
amikacina derivada de la kanamicina A es un derivado repre-
sentativo cuyo grupo 1-amino está acilado con ácido 4-ami-
15 no-2-hidroxitúterico. Se sabe que la amikacina es eficaz
contra las bacterias resistentes a la kanamicina pero con
aproximadamente el mismo grado de toxicidad que la kanami-
cina. [Kawaguchi y otros., J. Antibiotic, 25, 695(1972);
Patente de EE.UU. 3.781.268 (1973); Fujisawa y otros, J.
20 Antibiotic, 27, 677 (1974)].

Se ha descubierto por el autor del presente inven-
to que el bloqueo del grupo 1-amino de los antibióticos de
aminoglicósido con ácido pirrolidincarboxílico o piperidin-
carboxílico o sus derivados de N-alcoholo mejora grandemen-
25 te la actividad antimicrobiana y además amplía la activi-
dad efectiva contra las cepas resistentes a los aminoglicó-
sidos. El presente invento está basado en este descubrimien-
to.

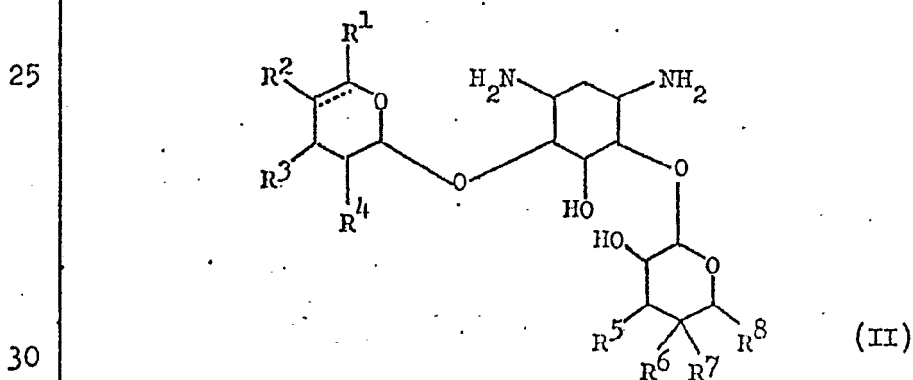
Los nuevos derivados de antibiótico de aminogli-
cósido de este invento pueden representarse por la fórmula

1 general siguiente (I):



(en la que R es un átomo de hidrógeno, alcoholo inferior o
 15 aralcoholo; R¹ es aminometilo, hidroximetilo, metilaminome-
 tilo o 1-metilaminoetilo; R², R³ y R⁶ representan independi-
 eientemente un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo; R⁴
 es un grupo hidroxilo o amino; R⁵ es un grupo amino o metila-
 20 mino; R⁷ es un grupo hidroxilo; o metilo; R⁸ es un átomo de
 hidrógeno, hidroximetilo o carbamoiloximetilo; la línea de
 puntos representa la presencia o ausencia de un doble enla-
 ce, n es el número entero 1 ó 2).

Los aminoglicósidos empleados como materiales de
 partida en este invento que contienen el resto de 2-desoxi-
 estreptamina están representados por la fórmula general (II)



- 1 (en donde R^1 - R^8 y la línea de puntos tienen el mismo significado que se ha mencionado anteriormente). Representativos de los compuestos (II) incluyen tobramicina ($R^1=CH_2NH_2$; $R^2=OH$; $R^3=H$; $R^4=NH_2$; $R^5=NH_2$; $R^6=H$; $R^7=OH$; $R^8=CH_2OH$) \sphericalangle producida
- 5 por *Streptomyces tenebrarius* ATCC 17920 y 17921; patente de Estados Unidos 3.691.279 \sphericalangle , kanamicina A ($R^1=CH_2NH_2$; $R^2=OH$; $R^3=OH$; $R^4=OH$; $R^5=NH_2$; $R^6=H$; $R^7=OH$; $R^8=CH_2OH$), kanamicina B ($R^1=CH_2NH_2$; $R^2=OH$; $R^3=OH$; $R^4=NH_2$; $R^5=NH_2$; $R^6=H$; $R^7=OH$; $R^8=CH_2OH$) y kanamicina C ($R^1=CH_2OH$; $R^2=OH$; $R^3=OH$; $R^4=NH_2$; $R^5=NH_2$; $R^6=H$; $R^7=OH$; $R^8=CH_2OH$) \sphericalangle producida por
- 10 *Streptomyces kanamyceticus* ATCC 12853 y 21252; patente de Estados Unidos 2.931.798), didesoxikanamicina B (dibekacina) ($R^1=CH_2NH_2$; $R^2=H$; $R^3=H$; $R^4=NH_2$; $R^5=NH_2$; $R^6=H$; $R^7=OH$; $R^8=CH_2OH$) \sphericalangle producida por *Streptomyces kanamyceticus* ATCC
- 15 21259, 21260 y 21261; patente de Estados Unidos 3.753.973 \sphericalangle , gentamicina C_1 ($R^1=CH(CH_3)NHCH_3$; $R^2=H$; $R^3=H$; $R^4=NH_2$; $R^5=NHCH_3$; $R^6=OH$; $R^7=CH_3$; $R^8=H$), gentamicina C_2 ($R^1=CH(CH_3)NH_2$; $R^2=H$; $R^3=H$; $R^4=NH_2$; $R^5=NHCH_3$; $R^6=OH$; $R^7=CH_3$; $R^8=H$), gentamicina C_{1a} ($R^1=CH_2NH_2$; $R^2=H$; $R^3=H$; $R^4=NH_2$; $R^5=NHCH_3$; $R^6=OH$; $R^7=CH_3$; $R^8=H$) y gentamicina B ($R^1=CH_2NH_2$; $R^2=H$; $R^3=OH$; $R^4=OH$; $R^5=NHCH_3$; $R^6=OH$; $R^7=CH_3$; $R^8=H$) \sphericalangle producida por *Micromonospora echinospora* ATCC 15837 (NRRL 2985), *Micromonospora echinospora* var. *ferruginea* ATCC 15836 (NRRL 2995), *Micromonospora echinospora* var. *pallida* ATCC 15838 (NRRL 2996)
- 20 y *Micromonospora purpurea* ATCC 15835; patente de EE.UU. 3.091.572 y 3.136.704 \sphericalangle , nebramicina factor 4 ($R^1=CH_2NH_2$; $R^2=OH$; $R^3=OH$; $R^4=NH_2$; $R^5=NH_2$; $R^6=H$; $R^7=OH$; $R^8=CH_2OCONH_2$) y factor 5' ($R^1=CH_2NH_2$; $R^2=OH$; $R^3=H$; $R^4=NH_2$; $R^5=NH_2$; $R^6=H$; $R^7=OH$; $R^8=CH_2OCONH_2$) \sphericalangle producida por *Streptomyces tenebrarius* ATCC 17920 y 17921; patente de EE.UU. 3.691.279 \sphericalangle , si-
- 30

- 1 -somicina ($R^1=CH_2NH_2$; $R^2=H$; $R^3=H$; $R^4=NH_2$; $R^5=NHCH_3$; $R^6=OH$; $R^7=CH_3$; $R^8=H$; línea de puntos = la presencia de doble enlace) producida por *Micromonospora inyoensis* ATCC 27600 (NRRL 3292); patente de Estados Unidos 3.907.771 y 3.832.286/
5. y similares. Los nombres genéricos de estos compuestos (II) y sus sustituyentes están enumerados en la Tabla 1.

10

15

20

25

30

21117

1
5
10
15
20
25
30

Tabla 1

Nombre genérico	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	línea de puntos
tobramicina	CH ₂ NH ₂	OH	H	NH ₂	NH ₂	H	OH	CH ₂ OH	nada
kanamicina A	"	"	OH	OH	"	"	"	"	"
" B	"	"	"	NH ₂	"	"	"	"	"
" C	CH ₂ OH	"	"	"	"	"	"	"	"
diideoxikanamicina B (dibekacina)	CH ₂ NH ₂	H	H	"	"	"	"	"	"
gentamicina C1	CH(CH ₃)NHCH ₃	"	"	"	NHCH ₃	OH	CH ₃	H	"
" C2	CH(CH ₃)NH ₂	"	"	"	"	"	"	"	"
" C1a	CH ₂ NH ₂	"	"	"	"	"	"	"	"
" B	"	"	OH	OH	"	"	"	"	"
nebramicina factor 4	"	OH	"	NH ₂	NH ₂	H	OH	CH ₂ OCONH ₂	"
" " 5'	"	"	H	"	"	"	"	"	"
sisomicina	"	H	"	"	NHCH ₃	OH	CH ₃	H	doble enlace

1 En la fórmula general antes mencionada (I), alco-
hilo inferior como R significa alcohol de C₁ a C₅, parti-
cularmente alcohol de C₁ a C₃, por ejemplo metilo, etilo,
propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo; aralco-
5 hilo significa aralcohol de C₇ a C₁₀, por ejemplo bencilo,
feniletilo, 1-fenil-etilo, 3-fenilpropilo.

Los nuevos derivados de antibióticos de amoniglicósido (I) de este invento incluyen las bases libres y las sales de los mismos, particularmente las sales de adición
10 de ácido no tóxicas, por ejemplo, sales con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido carbónico, y similares, y sales con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido cítrico, ácido mandélico, ácido
15 ascórbico, ácido gálico, y similares.

Representativos de los compuestos (I) son:

- 1) 1-N-(4-hidroxipiperidin-4-carbonil)tobramicina
- 2) 1-N-(4-hidroxipiperidin-4-carbonil)kanamicina A
- 20 3) 1-N-(4-hidroxipiperidin-4-carbonil)kanamicina B
- 4) 1-N-(4-hidroxipiperidin-4-carbonil)kanamicina C
- 5) 1-N-(4-hidroxipiperidin-4-carbonil)didesoxikanamicina B
- 6) 1-N-(4-hidroxipiperidin-4-carbonil)gentamicina C₁
- 7) 1-N-(4-hidroxipiperidin-4-carbonil)gentamicina C₂
- 25 8) 1-N-(4-hidroxipiperidin-4-carbonil)gentamicina C_{1a}
- 9) 1-N-(4-hidroxipiperidin-4-carbonil)gentamicina B
- 10) 1-N-(4-hidroxipiperidin-4-carbonil)nebramicina factor 4
- 11) 1-N-(4-hidroxipiperidin-4-carbonil)nebramicina factor 5'
- 12) 1-N-(4-hidroxipiperidin-4-carbonil)sisomicina
- 30 13) 1-N-(3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)tobramicina

- 1 14) 1-N-(3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)kanamicina A
15) 1-N-(3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)kanamicina B
16) 1-N-(3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)kanamicina C
17) 1-N-(3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)didesoxikanamicina B
- 5 18) 1-N-(3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)gentamicina C₁
19) 1-N-(3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)gentamicina C₂
20) 1-N-(3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)gentamicina C_{1a}
21) 1-N-(3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)gentamicina B
22) 1-N-(3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)nebramicina factor 4
- 10 23) 1-N-(3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)nebramicina factor 5'
24) 1-N-(3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)sisomicina
25) 1-N-(1-metil-3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)tobramicina
26) 1-N-(1-metil-3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)kanamicina A
27) 1-N-(1-metil-3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)kanamicina B
- 15 28) 1-N-(1-metil-3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)kanamicina C
29) 1-N-(1-metil-3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)didesoxi-
kanamicina B
30) 1-N-(1-metil-3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)gentamici-
na C₁
- 20 31) 1-N-(1-metil-3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)gentamici-
na C₂
32) 1-N-(1-metil-3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)gentamici-
na C_{1a}
33) 1-N-(1-metil-3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)gentamici-
na B
- 25 34) 1-N-(1-metil-3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)nebramicina
factor 4
35) 1-N-(1-metil-3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)nebramicina
factor 5'
- 30 36) 1-N-(1-metil-3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)sisomicina

- 1 37) 1-N-(1-isopropil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)tobra-
micina
- 38) 1-N-(1-isopropil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)kanami-
cina A
- 5 39) 1-N-(1-isopropil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)kanami-
cina B
- 40) 1-N-(1-isopropil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)kanami-
cina C
- 41) 1-N-(1-isopropil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)dideso-
10 xikanamicina B
- 42) 1-N-(1-isopropil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)genta-
micina C₁
- 43) 1-N-(1-isopropil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)genta-
micina C₂
- 15 44) 1-N-(1-isopropil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)genta-
micina C_{1a}
- 45) 1-N-(1-isopropil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)genta-
micina B
- 46) 1-N-(1-isopropil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)nebra-
20 micina factor 4
- 47) 1-N-(1-isopropil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)nebra-
micina factor 5'
- 48) 1-N-(1-isopropil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)sisomi-
cina
- 25 49) 1-N-(1-bencil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)tobramici-
na
- 50) 1-N-(1-bencil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)kanamicina A
- 51) 1-N-(1-bencil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)kanamicina B
- 52) 1-N-(1-bencil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)kanamicina C
- 30 53) 1-N-(1-bencil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)didesoxi-

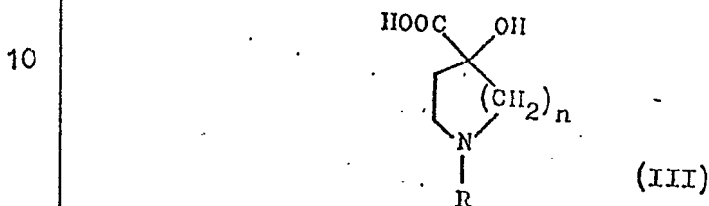
- 1 kanamicina B
- 54) 1-N-(1-bencil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)gentamicina C₁
- 5 55) 1-N-(1-bencil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)gentamicina C₂
- 56) 1-N-(1-bencil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)gentamicina C_{1a}
- 57) 1-N-(1-bencil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)gentamicina B
- 10 58) 1-N-(1-bencil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)nebramicina factor 4
- 59) 1-N-(1-bencil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)nebramicina factor 5'
- 60) 1-N-(1-bencil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)sisomicina
- 15 61) 1-N-(1-etil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)tobramicina
- 62) 1-N-(1-etil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)kanamicina A
- 63) 1-N-(1-etil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)kanamicina B
- 64) 1-N-(1-etil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)kanamicina C
- 65) 1-N-(1-etil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)didesoxikanamicina B
- 20 66) 1-N-(1-etil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)gentamicina C₁
- 67) 1-N-(1-etil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)gentamicina C₂
- 25 68) 1-N-(1-etil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)gentamicina C_{1a}
- 69) 1-N-(1-etil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)gentamicina B
- 70) 1-N-(1-etil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)nebramicina factor 4
- 30

1 -71) 1-N-(1-etil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)nebramicina
factor 5'

72) 1-N-(1-etil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)sisomicina

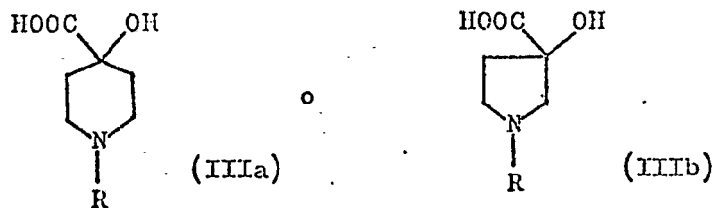
5 II. Preparación

Los compuestos de este invento pueden prepararse fácilmente haciendo reaccionar dichos aminoglicósidos (II) con ácidos carboxílicos de la fórmula general (III)



más particularmente, pueden representarse por la fórmula general:

15



20

(en donde R y n tienen los mismos significados que se han mencionado anteriormente) o sus derivados reactivos.

Puesto que los aminoglicósidos de partida tienen muchos grupos funcionales (por ejemplo, grupos amino) distintos del grupo 1-amino que han de acilarse, es apropiado protegerlos opcionalmente por grupos protectores. Pueden emplearse todos los grupos protectores ordinariamente empleados en la síntesis de péptidos, que pueden separarse fácilmente después de la acilación del grupo 1-amino. Tales grupos incluyen benciloxicarbonilo que puede opcionalmente

25

30

1 estar sustituido en el núcleo de benceno, t-butiloxicarbo-
nilo, t-amiloxicarbonilo, metoxicarbonilo, etoxicarbonilo,
tosil(t-toluensulfonilo), tritilo, formilo, trifluoroaceti-
lo, ftalcoilo, m-nitrofeniltio, trifenilmetiltio y simila-
5 res.

Los derivados reactivos de los ácidos carboxíli-
cos antes mencionados empleados como agentes acilantes in-
cluyen los ordinariamente utilizados en la síntesis de pép-
tidos, por ejemplo haluros de ácido, azidas de ácido, anhí-
10 dridos de ácido, anhídridos de ácidos mixtos, ésteres reac-
tivos y similares. Ejemplos de estos derivados han sido
descritos en "Synthesis 453 (1972) y Peptide Synthesis 75
a 135 (1966) por M. Bodanszky y otros. En los agentes de
acilación, cuando R es un átomo de hidrógeno, es deseable
15 proteger el átomo del nitrógeno del esqueleto mediante un
grupo protector adecuado, por ejemplo, los mismos que se
mencionan en la protección del aminoglicósido. Los agentes
de acilación pueden prepararse fácilmente de un modo con-
vencional. Por ejemplo, el N-benciloxicarbonil-4-hidroxipi-
20 peridin-4-carboxilato de N-hidroxi-succinimido puede prepa-
rarse haciendo reaccionar N-bencilpiperidona con cianuro de
hidrógeno o cianuro de potasio en tetrahidrófurano seco
para proporcionar cianhidrina de N-bencilpiperidona, hidro-
lizando esta última con ácido clorhídrico concentrado para
25 proporcionar el derivado de ácido carboxílico, debencilar
éste último por hidrogenación catalítica, hacer reaccionar
este último con cloruro de benciloxicarbonilo para propor-
cionar ácido N-benciloxicarbonil-4-hidroxipiperidin-4-car-
boxílico, y a continuación esterificar este último con N-
30 -hidroxisuccinimida. El N-benciloxicarbonil-3-hidroxipirro-

1 -lidin-3-carboxilato de N-hidroxisuccinimido puede prepararse del modo que se ha mencionado anteriormente.

La acilación de aminoglicósido en este invento se consigue haciendo reaccionar los materiales de partida, aminoglicósidos, cuyos grupos funcionales distintos del grupo 1-amino están protegidos, con el agente de acilación anterior en un disolvente adecuado. Al llevar a cabo la acilación, se emplea una cantidad equimolecular o una cantidad en exceso de agente acilante, preferiblemente aproximadamente 1,0 a 2,0 moles, para un mol de aminoglicósidos. La temperatura de reacción es 0 a 35°C, preferiblemente 20 a 25°C.

Ejemplos de los disolventes empleados son los alcoholes inferiores tales como metanol, etanol y etilenglicol, ésteres tales como éter dietílico, 1,2-dimetoxietano, tetrahidrofurano y dioxano, cetonas tales como acetona y metiletilcetona, dimetilformamida dimetilacetamida, piridina, agua, y similares, y pueden usarse solos o como una mezcla de dos o más de ellos.

Después de la terminación de la acilación, los grupos protectores se separan de modos convencionales tales como tratamiento con ácido o hidrogenación catalítica para proporcionar los compuestos deseados.

III. Efectos y empleo

Los derivados de antibióticos de aminoglicósido y las sales no tóxicas de los mismos preparadas en este invento exhiben excelentes actividades antimicrobianas. Son varias decenas de veces más activos que los aminoglicósidos no acilados correspondientes frente algunas especies de bacterias gram-positivas y gram-negativas. Por ejemplo, la Ta-

1 - la 2 indica las concentraciones inhibitorias mínimas compa-
 rativamente (CIM, $\mu\text{g/ml}$) de 1-N-(4-hidroxipiperidin-4-car-
 bonil)tobramicina, tobramicina, gentamicina, sisomicina y
 5 - kanamicina A. La Tabla 3 indica la CIM ($\mu\text{g/ml}$) de 1-N-(3-
 -hidroxipirrolidin-3-carbonil)tobramicina, tobramicina,
 1-N-(3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)kanamicina A y kanami-
 cina A.

10 Tabla 2 CIM de 1) derivado TOB, 2) TOB, 3) GM, 4) SSM, y 5) KM-A

10

($\mu\text{g/ml}$)

	Bacterias	der. TOB	TOB	GM	SSM	KM-A
15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PP-6*	6,25	50	>200	200	200
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TB-121*	12,5	100	100	200	>200
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TB-151*	6,25	100	100	>200	>200
20	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1,56	1,56	0,78	1,56	6,25
	<i>Escherichia coli</i> W-677/ /JR 762*	6,25	100	100	50	>200
	<i>Escherichia coli</i> W-677/ /JR 214*	1,56	50	100	25	>200
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KL-38	1,56	3,13	0,78	0,39	>200
25	<i>Proteus mirabilis</i> TB-617	6,25	12,5	25	12,5	>200
	" <i>vulgaris</i> TB-162*	6,25	12,5	6,25	12,5	>200

30

Nota: 1) Derivado TOB significa 1-N-(4-hidroxipiperidin-4-
 -carbonil)tobramicina.

- 1) 2) TOB significa tobramicina
 3) GM significa gentamicina
 4) SSM significa sisomicina
 5) KM-A significa kanamicina A
- * muestra los organismos resistentes a la tobramicina.

Tabla 3 CIM de 1)derivado TOB, 2)TOB, 3)derivado KM-A y 4)KM-A

($\mu\text{g/ml}$)

Bacterias	der. TOB	TOB	der. KM-A	KM-A
Staphylococcus aureus 80285	0,39	0,78	12,5	>100
Escherichia coli TB-705	3,13	6,25	25	>100
" " W-677/JR 214*	0,78	100	6,25	>100
Klebsiella pneumoniae Kl-38	0,78	1,56	3,13	>100
Enterobacter cloacae CI-83	0,78	0,78	3,13	>100
Serratia marcescens MA-26*	12,5	50	6,25	>100
Citrobacter freundii Ct-31	0,78	3,13	3,13	>100
Proteus mirabilis TB-617	1,56	12,5	6,25	>100
" vulgaris TB-162*	1,56	6,25	3,13	>100
" rettgeri Ret 33	0,78	1,56	1,56	>100
Pseudomonas aeruginosa PP-6*	3,13	>100	12,5	>100
" " TB-151*	3,13	100	6,25	>100

Nota: 1) Derivado TOB significa 1-N-(3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)tobramicina

2) TOB significa tobramicina

3) Derivado KM-A significa 1-N-(3-hidroxipirrolidin-

1

5

10

15

20

25

30

-3-carbonil)kanamicina A

4) KM-A significa kanamicina A

* Significa los organismos resistentes a la tobramicina.

Como puede verse de las Tablas 2 y 3, los compuestos (I) de este invento son agentes antimicrobianos valiosos eficaces contra diversas especies de bacterias gram-positivas y gram-negativas y útiles como medicamentos utilizados para seres humanos y otras varias clases de animales.

Pueden emplearse en la prevención o tratamiento de infecciones causadas por bacterias gram-positivas (por ejemplo Staphilococcus aureus, Bacillus anthracis) y bacterias gram-negativas, por ejemplo Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa). Los compuestos I de este invento pueden también emplearse como desinfectantes para impedir el desarrollo de bacterias vivas en alimentos perecederos o materiales higiénicos.

Los compuestos I de este invento pueden emplearse en una amplia variedad de formas de dosificación orales o parenterales sólo o en mezcla con otras sustancias coactuantes. Las composiciones farmacéuticas pueden ser una mezcla de 0,01 a 99% de los compuestos (I) con un excipiente o excipientes farmacéuticos que pueden ser un material sólido o un material líquido en los cuales los compuestos (I) son solubles, dispersables o susceptibles de poner en suspensión. Pueden estar en forma de dosificación unitaria. Las composiciones sólidas pueden estar en forma de tabletas, polvos, jarabes secos, trociscos, gránulos, cápsulas, píldoras, supositorios, o preparados sólidos similares. Las com-

1 -posiciones líquidas pueden estar en forma de inyecciones,
ungüentos, dispersiones, líquidos por inhalación, suspensio
nes, soluciones, emulsiones jarabes o elixires. Puede
5 emplearse cualquier diluyente (por ejemplo almidón, sacaro
sa, lactosa, carbonato de calcio, caolín). Agentes de re-
lleno (por ejemplo, lactosa, azúcar, sal, glicina, almidón,
carbonato de calcio, fosfato de calcio, caolín, bentonita,
talco, sorbita); aglutinante (por ejemplo almidón, acacia;
10 gelatina, glucosa, alginato de sodio, goma de tragacantó,
carboximetilcelulosa, sorbita, polivinilpirrolidona); de-
sintegradores (por ejemplo almidón, agar, carbonatos, lau-
rilsulfato de sodio), lubricantes (por ejemplo ácido esteá-
rico, talco, parafina, ácido bórico, sílice, benzoato de
15 sodio, polietilenglicol, aceite de cacao, sulfato de magne-
sio); agentes emulsificantes (por ejemplo lecitina, mono-
leato de sorbitán, goma acacia); agentes de puesta en sus-
pensión (por ejemplo sorbita, metilcelulosa, glucosa, jara-
be de azúcar, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetil-
celulosa, gel de estearato de aluminio, grasas hidrogena-
20 das); disolventes (por ejemplo agua, aceite de cacahuete,
aceite de sésamo, oleato de metilo); conservadores (por
ejemplo para-hidroxibenzoato de metilo o de etilo, ácido
sorbico); agentes colorantes comestibles, sustancias aromá-
ticas, agentes solubilizantes, tampones, agentes estabili-
25 zantes, agentes dispersantes, agentes humectantes, antioxi-
dantes y similares, pueden emplearse en los modos conven-
cionales en tanto que no afecten adversamente a los compues-
tos (I).

30 Los compuestos (I) de este invento, particular-
mente sus sulfatos son fácilmente solubles en agua y conve

1 nientemente se emplean en forma de soluciones para inyec-
ciones intravenosas, intramusculares o subcutáneas, de
acuerdo con un método convencional. Los compuestos I pueden
5 disolverse en disolventes acuosos u oleosos para inyección
para dar una solución inyectable en una ampolla; con el
fin de conservar el preparado inyectable durante un largo
período de tiempo, es apropiado preparar un preparado en
vial que contiene polvo cristalino, microcristalino o lio-
10 filizado del compuesto (I). El preparado en vial puede di-
solverse o ponerse en suspensión en dichos disolventes pa-
ra inyección inmediatamente antes de su uso. El preparado
puede contener dichos conservadores.

Además, los compuestos (I) de este invento pueden
emplearse como supositorios, ungüentos para empleo tópico
15 u oftálmico, polvos para empleo tópico y preparaciones si-
milares preparables de acuerdo con los métodos bien conoci-
dos para los expertos en la técnica. La preparación externa
puede contener 0,01 a 99% del compuesto (I) de este inven-
to junto con una cantidad necesaria de excipiente farmacéu-
20 tico dado antes.

Este invento también proporciona un método para
tratar o prevenir infecciones originadas por bacterias en
seres humanos o animales domésticos, que comprende adminis-
trar a los seres humanos o animales los compuestos (I) de
25 este invento en una dosis dividida o única de 0,01 a 5 g/kg
al día por inyección a 0,01 a 10 g/kg al día para adminis-
tración oral, ó 0,01 a 10 g al día por una aplicación tópi-
ca a intervalos de 3 a 12 horas.

El método es aplicable para tratar o prevenir al-
30 gunas enfermedades infecciosas causadas por bacterias sensi

1 bles a los compuestos de este invento, por ejemplo estafi-
lodermia, antropozoonosis, cistitis, pielitis, neumonía,
neumonitis, bronquitis, nasofaringitis epitemática, tonsili-
5 titis, rinitis, dermatitis, pustulosis, accesos, infecciones
en las heridas y en los tejidos blandos, infecciones de oi-
dos, osteomielitis, septicemia, enteritis, infecciones del
tracto urinario, y pielonefritis.

Preferiblemente, los compuestos (I) de este inven-
to se dan a un paciente en forma de una preparación farma-
10 céutica, por ejemplo polvo, jarabe seco, tabletas, pasti-
llas, gránulos, cápsulas, píldoras, supositorios, inyeccio-
nes, ungüentos, dispersiones inhaladores, suspensiones, so-
luciones, emulsiones, jarabes y elixires. Puede estar en
una forma de dosificación unitaria, por ejemplo tabletas,
15 pastillas, cápsulas, inyecciones, viales, gránulos o polvo
en un recipiente de empaquetamiento separado.

Los ejemplos siguientes se dan para ilustrar más
este invento.

Ejemplo 1

20

Preparación de N-benciloxicarbonil-4-hidroxipipe-
ridina-4-carboxilato de N-hidroxisuccinimido

a) A una solución de 10,0 g (53 milimoles) de N-
-bencilpiperidona en 14 ml de tetrahidrofurano anhidro se
25 añaden 23 ml (3,6 equivalentes) de una solución al 25% (en
peso; lo mismo se aplica correspondientemente a los siguien-
tes) de cianuro de hidrógeno en tetrahidrofurano a la tempe-
ratura ambiente, y la mezcla se deja reposar durante 1 ho-
ra. El disolvente y los reactivos residuales se separan por
30 evaporación a presión reducida proporcionando 11,50 g de

1 N-bencilpiperidona-cianhidrina como un compuesto cristali-
no incoloro, p. de f. 79-95°C.

b) Una mezcla de 9,477 g (43,9 milimoles) de la
5 N-bencilpiperidona-cianohidrina cruda preparada antes y
18,4 ml (5 equivalentes) de ácido clorhídrico concentrado
se calienta en un baño de agua durante 1 hora. Se precipi-
ta el cloruro de amonio como una sustancia cristalina a lo
largo de la reacción. La mezcla de la reacción se enfría,
y el cloruro de amonio precipitado se recoge por filtración
10 y se lava con acetona fría. El filtrado y las aguas de la-
vado reunidas se evaporan hasta sequedad a presión reduci-
da proporcionando 12,65 g del residuo.

El residuo se disuelve en 65 ml de agua, se mez-
cla con 28 ml de agua que contiene 3,97 g de acetato de so-
15 dio, y la mezcla se evapora a presión reducida. El residuo
resultante se tritura con 150 ml de acetona y el material
insoluble se extrae con una mezcla de cloroformo y metanol
(9:1). El cloruro de sodio insoluble se separa por filtra-
ción y el filtrado se evapora a presión reducida. El resi-
20 duo resultante se disuelve en 46 ml de agua, se mezcla con
acetona, y la mezcla se mantiene en un refrigerador duran-
te una noche. Los cristales precipitados se recogen por fil-
tración y se lavan con acetona fría proporcionando 8,70 g
de ácido N-bencil-4-hidroxipiperidin-4-carboxílico (rendi-
25 miento del 84,5%), p. de f. 260,5-262°C (descomposición).

Los cristales contienen un mol de agua de crista-
lización, que se pierde cuando se secan a 75°C a presión re-
ducida durante 5 horas. El peso disminuye hasta 7,92 g (ren-
dimiento del 77%).

30 c) Una solución de 2,35 g (10 milimoles) del áci-

1 do N-bencil-4-hidroxipiperidin-4-carboxílico antes prepara-
do disuelto en una mezcla de 20 ml de agua, 20 ml de meta-
nol y 2,0 ml de ácido clorhídrico concentrado se hidrogenan
catalíticamente en atmósfera de hidrógeno durante 23 horas
5 en presencia de 1 g de paladio-carbono al 10%. Después de
terminar la reacción, el catalizador se separa por filtra-
ción y se lava con metanol acuoso. El filtrado y las aguas
de lavado reunidos se evaporan a presión reducida propor-
cionando 1,95 g del residuo en forma de cristales amarillos
10 claros.

Estos se disuelven en 15 ml de agua que contiene
1,25 g (30 milimoles) de hidróxido de sodio, y se añaden a
él 2,05 g (12 milimoles) de cloruro de benciloxicarbonilo
durante un período de 30 minutos a temperatura ambiente con
15 agitación. La mezcla se deja reposar a temperatura ambiente
durante 2 horas, y se añaden 0,5 ml de una solución acuosa
al 10% de hidróxido de sodio. La mezcla se lava con éter y
la capa acuosa se ajusta a pH 2 con ácido clorhídrico al
10% proporcionando un material aceitoso, que se extrae con
20 éter. La solución etérea se lava con agua y se seca sobre
sulfato de sodio anhidro proporcionando 2,53 g (rendimiento
del 90%) de ácido N-benciloxicarbonil-4-hidroxipiperidin-4-
-carboxílico en forma de un material aceitoso amarillo cla-
ro.

25 IR: ν_{max} CHCl_3 (cm^{-1}): 3500 a 2400, 1730, 1700.

d) A una suspensión de 2,49 g (8,92 milimoles)
del ácido N-benciloxicarbonil-4-hidroxipiperidin-4-carboxí-
lico antes mencionado y 1,02 g (8,92 milimoles) de N-hidro-
30 xisuccinimida en 40 ml de acetato de etilo seco se añade

1 una solución de 1,83 g (8,92 milimoles) de dicitclohexilcar-
bodiimida en 5 ml de acetato de etilo anhidro, y la mezcla
se agita a temperatura ambiente durante una noche y a con-
tinuación se enfría en un baño de hielo. El material insolu-
5 ble se separa por filtración y se lava con acetato de etilo
frío. El filtrado y las aguas de lavado reunidas se evapo-
ran a presión reducida proporcionando 3,34 g de N-bencilo-
xicarbonil-4-hidroxipiperidin-4-carboxilato de N-hidroxisuc-
cinimido (rendimiento cuantitativo).

10 IR: $\left. \begin{array}{l} \text{CHCl}_3 \text{ (cm}^{-1}\text{): } 3500, 1820, 1790, 1700, 1690 \\ \text{max} \end{array} \right\}$

Esto se emplea en la acilación subsiguiente sin
más purificación.

15 Ejemplo 2

Preparación de DL-1-benciloxicarbonil-3-hidroxipi-
rrolidin-3-carboxilato de N-hidroxisuccinimido.

a) A una solución de 16,40 g (9,45 milimoles) de
1-bencil-3-pirrolidona (véase E. Jaeger y J.H. Biel; J. Org.
20 Chem. 30, 740 a 744 (1975)) en 5 ml de tetrahidrofurano se
añaden 40 ml (343 milimoles) de una solución de HCN/tetrahi-
drofurano al 35%, y la mezcla se deja reposar durante 5 ho-
ras. El disolvente y el exceso del reactivo se evaporan a
presión reducida. El residuo se disuelve en 38,5 ml de áci-
25 do clorhídrico concentrado y la solución se calienta en un
baño de agua durante una hora. Después de enfriamiento, el
cloruro de amonio precipitado se separa por filtración y se
lava con 4 ml de ácido clorhídrico concentrado frío y a con-
tinuación con acetona. El filtrado y las aguas de lavado reu-
30 nidos se evaporan a presión reducida. El residuo se disuel-

1 ve en 50 ml de una solución acuosa de 8 g de acetato de so-
dio, y la mezcla (pH 5) se evapora a presión reducida. El
residuo se disuelve en cloroformo, y el cloruro de sodio
insoluble se separa por filtración y se lava con cloroformo.
5 mo. La capa de cloroformo se extrae con 50 ml de solución
acuosa de 4 g de hidróxido de sodio (la mezcla llega a tener
pH 9). La capa acuosa se lava una vez con cloroformo,
se adsorbe lentamente sobre 200 ml de Amberlite IR-120B
(H⁺) (a una velocidad de 3 a 4 segundos por una gota). La
10 columna se lava con 400 ml de agua y se eluye con 700 ml
de hidróxido de amonio 1N. El eluato se evapora a presión
reducida, y el residuo resultante se recristaliza en 80 ml
de agua proporcionando 12,084 g de agujas incoloras, p. de
f. 184-189°C (descomposición). Las agujas contienen agua
15 de cristalización, que se separa a 70°C a presión reducida
durante dos días proporcionando 10,45 g de ácido DL-1-ben-
cil-3-hidroxipirrolidin-3-carboxílico (rendimiento del
50,0%).

Análisis elemental: (para C₁₂H₁₅NO₃·1/5H₂O)

20 Calculado: (%) : C, 64,10 ; H, 6,90 ; N, 6,23

Encontrado: (%): C, 64,10 ; H, 6,94 ; N, 6,25

IR:) Nujol (cm⁻¹) : 1601 (fuerte).
máx

25 b) A una solución de 885 mg (4,0 milimoles) de
ácido DL-1-bencil-3-hidroxipirrolidin-3-carboxílico disuel-
to en 50% de dioxano acuoso se añade 1 ml de ácido clorhí-
drico concentrado, y la mezcla se hidrogena catalíticamente
en presencia de 440 mg de paladio-carbono al 10%. El catali-
30 zador se separa por filtración y se lava con dioxano acuoso.

1 El filtrado y las aguas de lavado reunidos se evaporan a
presión reducida proporcionando el residuo, que se recrisc-
taliza en acetona proporcionando 610 mg de clorhidrato del
ácido DL-3-hidroxi-pirrolidin-3-carboxílico en forma de pris-
5 ma incoloros (rendimiento del 91%), p. de f. 201-210°C (des-
composición).

c) A una solución de 610 mg (3,6 milimoles) de
clorhidrato del ácido DL-3-hidroxi-pirrolidin-3-carboxílico
disueltos en 10 ml de agua se añaden 6 ml de una solución
10 acuosa de 456 mg (3 equivalentes) de hidróxido de sodio y
750 mg (1,2 equivalentes) de cloruro de benciloxicarbonilo
a temperatura ambiente con agitación, y la mezcla se agita
durante 2 horas. La mezcla de reacción se ajusta a pH 11
con una solución acuosa de hidróxido de sodio al 10%, se
15 lava dos veces con éter, a continuación se ajusta a pH 2
con ácido clorhídrico al 10% y se extrae tres veces con
éter. El extracto se seca sobre sulfato de sodio anhidro y
se evapora a presión reducida proporcionando 800 mg del re-
siduo, que se cristaliza en una mezcla de éter y éter de
20 petróleo. Los cristales resultantes (p. de f. 117-133°C)
se recrystalizan en una mezcla de éter y cloruro de metile-
no proporcionando 595 mg del ácido DL-1-benciloxicarbonil-
-3-hidroxi-pirrolidin-3-carboxílico (rendimiento del 61,6%),
p. de f. 142-144°C.

25 Análisis elemental: (para $C_{13}H_{15}NO_5$)

Calculado: (%) : C, 58,86 ; H, 5,70 ; N, 5,28

Encontrado (%) : C, 58,96 ; H, 5,76 ; N, 5,16

IR: ν Nujol (cm⁻¹) : 3230, 1750, 1680.
máx

30

d) A una solución de 266 mg (1,0 milimoles) del

1 ácido DL-1-benciloxicarbonil-3-hidroxipirrolidin-3-carboxi-
lico disuelto en 30 ml de acetato de etilo con calentamien-
to se añaden 115 mg (1,0 milimoles) de N-hidroxisuccinimi-
da en polvo. Los cristales incoloros se depositan inmediata-
5 mente después de la adición de 206 mg (1,0 milimoles) de di-
ciclohexilcarbodiimida. La mezcla se agita durante 1,5 ho-
ras y se mantiene en un refrigerador durante una noche. Los
cristales se recogen por filtración insoluble y el material
insoluble se lava con acetato de etilo. El filtrado y las
10 aguas de lavado reunidas se evaporan a presión reducida pro-
porcionando 390 mg del residuo (p. de f. 154-161°C). Este
se recristaliza en una mezcla de acetona y hexano propor-
cionando 277 mg de DL-1-benciloxicarbonil-3-hidroxipirroli-
din-3-carboxilato de N-hidroxisuccinimido (rendimiento del
15 76,5%), p. de f. 159-161°C.

IR: $\left. \begin{array}{l} \text{Nujol} \\ \text{max} \end{array} \right\} (\text{cm}^{-1}): 3350, 1815, 1785, 1740, 1690.$

Ejemplo 3

20 Preparación de 1-N-(4-hidroxipiperidina-4-carbo-
nil)kanamicina A

A una solución de 1,55 g (2,5 milimoles) de 6'-N-
-t-butoxicarbonil-kanamicina A (véase Publicación de Paten-
te japonesa no examinada n.º 50-140420) en 24 ml de 1,2-dime-
25 toxietano al 50% se añade gota a gota una solución de 1,53
g (4,06 milimoles) de N-benciloxicarbonil-4-hidroxipiperi-
din-4-carboxilato de N-hidroxisuccinimido en 24 ml de 1,2-
-dimetoxietano de 2 a 3°C durante un período de 2 horas. La
mezcla se agita a temperatura ambiente durante 14,5 horas
30 y se evapora a presión reducida a una temperatura del baño

1 por debajo de 35°C, proporcionando 3,2 g del residuo en
forma de un material espumoso blanco. Este se disuelve en
20 ml de ácido trifluoroacético al 90%, y la mezcla se de-
ja reposar a temperatura ambiente durante 1 hora 40 minutos
5 y se evapora a presión reducida. El residuo se disuelve en
50 ml de metanol acuoso al 50% y se hidrogena catalíticamen-
te en presencia de 1 g de paladio-carbón al 10% en atmósfe-
ra de hidrógeno durante 3 horas. Después de terminar la
reacción el paladio-carbón se separa por filtración y el
10 disolvente se evapora a presión reducida. El residuo (4,15
g) se disuelve en 10 ml de agua, se adsorbe sobre 100 ml de
Amberlite CG-50 (NH_4^+), y la columna se lava con 240 ml de
agua, y se eluye con 1000 ml de agua y 1000 ml de hidróxi-
do de amonio 1N por el método del gradiente (una fracción:
15 10 g).

Los eluatos (475 mg) de las fracciones N^os 91 a
108 se disuelven en 10 ml de agua, se adsorben en 100 ml de
Amberlite CG-50 (NH_4^+), y la columna se lava con 20 ml de
agua y se eluye con 1000 ml de agua y 1000 ml de hidróxido
20 de amonio 1N.

Los eluatos (270 mg) de las fracciones N^o 89 a 95
se disuelven en 6 ml de agua, se adsorben sobre una columna
100 ml de Amberlite CG-50 (NH_4^+), y la columna se lava con
30 ml de agua, y se eluye con 1000 ml de agua y 1000 ml de
25 hidróxido de amonio 1N. Los eluatos (270 mg) de las fraccio-
nes N^os 89 a 95 se disuelven en 6 ml de agua, se adsorben
sobre una columna de 100 ml de Amberlite CG-50 (NH_4^+) y la
columna se lava con 30 ml de agua, y se eluye con 1000 ml
de agua e hidróxido de amonio 0,5 N. Los eluatos de las
30 fracciones N^os 159 a 166 se liofilizan, proporcionando 71 mg

1 del compuesto buscado (rendimiento del 6%).

$$[\alpha]_D^{24} + 86,3 \pm 1,2^\circ \text{ (c=1,016, H}_2\text{O)}.$$

CCD (Kieselgel 60 F₂₅₄; Merck): Rf= 0,45 [Sistema disolvente/metanol: amoníaco concentrado (1:1)] (cf. kanamicina A:

5 Rf = 0,25).

Ejemplo 4

Preparación de 1-N-(4-hidroxi piperidin-4-carbonil) tobramicina

a) A una solución de 9,0 g (17,9 milimoles) de dihidrato de tobramicina en 322 ml de agua se añaden 322 ml de piridina, 32 ml de trietilamina y 2,64 g (18,4 milimoles) de t-butiloxicarbonilazida, y la mezcla se deja reposar a temperatura ambiente durante una noche y se evapora a presión reducida a 40°C. El producto resultante se disuelve en 100 ml de agua y la mezcla se evapora a presión reducida. Esta operación se repite tres veces proporcionando 11,95 g del residuo.

El residuo se disuelve en 60 ml de agua, y se adsorbe sobre 450 ml de Amberlite CG-50 (NH₄⁺). La columna se lava con 1500 ml de agua y se eluye con 1000 ml de agua y 1000 ml de hidróxido de amonio 0,1N por el método del gradiente y a continuación con 4100 ml de hidróxido de amonio 0,1N (una fracción: 15). Las fracciones N^os 141 a 200 proporcionan 4,70 g de 6'-N-t-butiloxicarboniltobramicina (rendimiento del 46,4%).

$$[\alpha]_D^{23,5} + 110,3 \pm 1,6^\circ \text{ (c=0,940, H}_2\text{O)}$$

Análisis elemental: (para C₂₃H₄₅N₅O.1/2H₂O)

Calculado (%): C, 47,90 ; H, 8,00 ; N, 12,15

Encontrado (%): C, 47,79 ; H, 7,92 ; N, 11,78

30 b) A una solución de 1,81 g (3,0 milimoles) de la

1 6'-N-t-butiloxicarbonil-tobramicina antes preparada disuel-
ta en una mezcla de 5 ml de agua y 5 ml de dimetilformami-
da se añaden gota a gota 8 ml de una solución de dimetilfor-
mamida que contiene 0,748 g (3,0 milimoles) de N-benciloxi-
5 carbonilsuccinimida de 0 a 5°C con agitación durante un pe-
ríodo de 2 horas, y la mezcla se agita a la misma tempera-
tura durante una noche.

Se evapora el disolvente a presión reducida pro-
porcionando 3,17 g del residuo. Este se disuelve en 40 ml
10 de agua y se extrae cuatro veces cada una con 30 ml de ace-
tato de etilo.

La capa acuosa se adsorbe en 100 ml de Amberlite
CG-50 (NH_4^+), y se eluye con 1700 ml de agua y 1700 ml de
hidróxido de amonio 0,05N por el método del gradiente y a
15 continuación con 1500 ml de hidróxido de amonio 0,1N (una
fracción: 18 ml).

Las fracciones N^os 13 a 132 proporcionan 877 mg
de 6'-N-t-butiloxicarbonil-2'-N-benciloxicarboniltobramici-
na (rendimiento del 40%). Las fracciones N^os 114 a 132 se
20 liofilizan y se miden las propiedades físicas.

$$[\alpha]_D^{25} + 87,2 \pm 1,2^\circ \quad (c=1,023, \text{H}_2\text{O})$$

Análisis elemental: (para $\text{C}_{31}\text{H}_{51}\text{N}_5\text{O}_{13} \cdot 15\text{H}_2\text{O}$)

Calculado (%): C, 51,09 ; H, 7,47 ; N, 9,61

Encontrado (%): C, 51,09 ; H, 7,47 ; N, 9,37

25 IR: $\left. \begin{array}{l} \text{KBr} \\ \text{máx} \end{array} \right\} (\text{cm}^{-1}) : 3355, 1697.$

CCD (Kieselgel 60 F₂₅₄; Merck): R_f = 0,19 $\left[\begin{array}{l} \text{sistema disolven} \\ \text{te/alcohol isopropílico: amoníaco acuoso concentrado: cloro} \\ \text{formo (4:1:1)} \end{array} \right]$ (cf: 6'-N-t-butiloxicarbonil-tobramicina:
30 R_f = 0,08).

1 c) A una solución de 397 mg (0,566 milimoles) de
6'-N-t-butiloxicarbonil-2'-N-benciloxicarbonil-tobramicina
disuelta en dimetilformamida acuosa al 50% se añade gota a
gota una solución de 319 mg (0,679 milimoles) de N-bencilo-
5 xicarbonil-4-hidroxi piperidin-4-carboxilato de N-hidroxisuc-
cinimida en 6 ml de dimetilformamida de 0 a 3°C con agita-
ción durante un período de 1 hora 45 minutos. La mezcla se
agita a la misma temperatura durante 50 minutos y a conti-
nuación a temperatura ambiente durante 4 horas, y se evapo-
10 ra a presión reducida proporcionando 787 mg del residuo en
forma de un material espumoso incoloro. Este se disuelve en
8 ml de ácido trifluoroacético al 90% y la mezcla se agita
a temperatura ambiente durante 1,5 horas y se evapora pro-
porcionando el residuo, que se hidrogena catalíticamente
15 con 334 mg de paladio-carbón al 5% en una mezcla de 3 ml de
ácido acético, 0,6 ml de agua y 3 ml de metanol. Después de
terminar la reacción, el catalizador se separa por filtra-
ción y el filtrado se evapora a presión reducida, proporcio-
nando 1,25 g de residuo. Este se disuelve en 4 ml de agua
20 y se adsorbe sobre una columna de 30 ml de Amberlite CG-50
(NH₄⁺). La columna se lava con 300 ml de agua, y se eluye
con 1000 ml de agua y 1000 ml de hidróxido de amonio 1N por
el método del gradiente (una fracción: 10 ml).

Los eluatos (47 mg) de las fracciones N.ºs 68 a 73
25 se disuelven en 1,5 ml de agua, se adsorben sobre 5 ml de
Amberlite CG-50 (NH₄⁺) y se eluyen con 480 ml de agua y 480
ml de hidróxido de amonio 1N por el método del gradiente
(una fracción: 5 ml).

Los eluatos de las fracciones N.ºs 40 a 43 se lio-
30 filizan proporcionando 16 mg del compuesto buscado (rendi-

1 miento del 4,9%).

CCD (Kieselgel, 60 F₂₅₄; Merck); Rf=0,35 [sistema disolvente/metanol: amoníaco acuoso concentrado (1:1)] (cf. tobramicina: Rf = 0,58).

5

Ejemplo 5

Preparación de DL-1-N-(3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)-tobramicina

10 a) Una mezcla de 174 mg (0,3 milimoles) de tetra-N-formiltobramicina [preparada de acuerdo con el método descrito en la publicación no examinada de patente japonesa Nº 50-35129] y 131 mg (1,2 equivalentes) de DL-1-benciloxi carbonil-3-hidroxi-pirrolidin-3-carboxilato de N-hidroxisuccinimido disuelto en 10 ml de dimetilformamida se deja repo-
15 sar a temperatura ambiente durante dos horas y a continuación se evapora a presión reducida proporcionando un residuo, que se tritura bien con acetato de etilo. El precipita-
do, que aparece se recoge por filtración y se lava con acetato de etilo. El residuo (266 mg) se hidrogena con 140 mg
20 de paladio/carbón al 10% en una mezcla de 10 ml de agua, 8 ml de metanol y una gota de ácido acético. Después de la separación del catalizador, se obtienen 204 mg de tetra-N-formil-DL-1-N-3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)-tobramicina
bruta.

25

b) Hidrólisis de tetra-N-formil-DL-1-N-(3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)-tobramicina.

i) Con ácido clorhídrico al 5% y metanol.

A una solución de 204 mg de tetra-N-formil-DL-1-N-(3-hidroxi-pirrolidin-3-carbonil)-tobramicina preparada
30 antes en 0,22 ml de agua se añaden 1,96 ml de una solución

1 de ácido clorhídrico al 5%:metanol (una mezcla de 0,55 ml
 de ácido clorhídrico concentrado y 6 ml de metanol) y la
 mezcla se hidroliza a 36°C en un baño de aceite durante 2,5
 horas. Después de terminada la reacción, la cantidad en ex-
 5 ceso de ácido clorhídrico se elimina en tratamiento con 6
 ml de Amberlite IR-45. La resina se separa por filtración
 y se lava con agua. El filtrado y las aguas de lavado reu-
 nidos se evaporan a presión reducida, proporcionando 197
 mg de residuo. El residuo se cromatografía sobre una colum-
 10 na de 25 ml de Amberlite CG-50 (NH_4^+) y se eluye con 500
 ml de agua y 500 ml de hidróxido de amonio 1N por el méto-
 do del gradiente. Los eluatos de las fracciones N^{os} 64 a
 78 se condensan y liofilizan proporcionando 98 mg de DL-1-
 -N-(3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)tobramicina (rendimiento
 15 como sal bicarbonato: 46,4%).

$$[\alpha]_D^{24} + 85,2 \pm 1,2^\circ \quad (c = 1,046, \text{H}_2\text{O})$$

CCD (Kieselgel 60 F₂₅₄; Merck): R_f = 0,40 [sistema disol-
 vente/alcohol isopropílico: amoníaco acuoso concentrado
 (1:1)] (cf.tobramicina: R_f = 0,56).

20 ii) con hidrazina hidratada-ácido acético.

Una solución (pH 6) de 206 mg de la tetra-N-for-
 mil-DL-1-N-(3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)tobramicina an-
 tes preparada disuelta en una mezcla de 20 ml de hidrazina
 monohidratada y 2,63 ml de ácido acético se lleva a refluj
 25 con agitación durante 6 horas. La mezcla de reacción se di-
 luye con agua hasta 400 ml, se adsorbe sobre 100 ml de Amber-
 lite CG-50 (NH_4^+), se lava con 1 litro de agua 1 litro de
 hidróxido de amonio al 0,4%, y a continuación se eluye con
 hidróxido de amonio al 0,8% (una fracción: 12 ml).

30 Las fracciones N^{os} 20 a 47 se evaporan a presión

1 reducida y se liofilizan proporcionando 125 mg del compues-
to objeto del invento (rendimiento como sal de $3\text{H}_2\text{CO}_3$:54,6%).
 $\alpha\text{D}^{24} + 77,0 \pm 1,1^\circ$ (c=1,064, H_2O)

Análisis elemental: (para $\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{N}_6\text{O}_{11} \cdot 3\text{H}_2\text{CO}_3$)

5 Calculado (%): C, 40,75 ; H, 6,57 ; N, 10,96

Encontrado (%): C, 40,62 ; H, 6,39 ; N, 10,80

Este compuesto es idéntico a una muestra auténti-
ca preparada en el método i).

10 Ejemplo 6

Preparación de 1-N-(1-etil-3-hidroxipirrolidin-3- -carbonil)tobramicina

Una mezcla de ácido 1-benciloxicarbonil-3-hidro-
xipirrolidin-3-carboxílico (2,090 g; 7,16 milimoles), 3,2',
15 6',3"-tetra-N-formil-tobramicina (4,160 g; 7,16 milimoles)
N-hidroxisuccinimida (910 mg) y dicitclohexilcarbodiimida
(1,870 g; 7,16 milimoles) disuelta en 50 ml de N,N-dimetil-
formamida se deja reposar a la temperatura ambiente durante
una noche. La dicitclohexilurea precipitada se separa por
20 filtración y se lava con 5 ml de N,N-dimetilformamida. Al
filtrado y a las aguas de lavado reunidos se añaden 550 mg
de acetato de etilo para proporcionar un precipitado. El
precipitado se recoge por filtración, se lava con acetato
de etilo, se disuelve en agua, y se evapora a presión redu-
25 cida. El residuo (6,00 g) se disuelve en una mezcla de 70 ml
de agua y 20 ml de metanol, y se hidrogena catalíticamente
en presencia de 2,00 g de paladio-carbón al 10% bajo atmós-
fera de hidrógeno. Después de que se adsorba una cantidad
calculada de hidrógeno gaseoso, el catalizador se separa
30 por filtración y se lava con agua. El filtrado y las aguas

1 de lavado reunidos se evaporan a presión reducida propor-
cionando 5,30 g de 1-N-(3-hidroxi-pirrolidin-3'-carbonil)-3,2',
6'-3"-tetraformil-tobramicina en forma de un polvo incoloro.

5 A una solución de 228 mg (0,3 milimoles) del pol-
vo disuelto en 0,5 ml de agua se añaden 1,0 ml de acetoni-
trilo. La mezcla se separa en dos capas y a continuación se
vuelve homogénea con la adición de 0,48 ml de una solución
acuosa de acetaldehído recientemente destilado (una solu-
10 ción de 6,77 g de acetaldehído en 50 ml de agua). Inmedia-
tamente, se añaden 30 ml de cianoborohidruro de sodio mien-
tras se ajusta la mezcla a pH 7 con ácido acético. Después
de 2 horas, la mezcla se concentra y al residuo se añaden
4 ml de acetato de etilo y la mezcla se agita bien. El pol-
vo resultante se recoge por filtración, se lava con aceta-
15 to de etilo, se disuelve en una mezcla de 1 ml de agua y 1
ml de alcohol isopropílico, se adsorbe lentamente sobre una
columna de 13,5 g de Kieselgel 60 (preparado por Merck Co.),
y se eluye con una mezcla de alcohol isopropílico, hidróxi-
do de amonio concentrado y cloroformo (2:1:1) (una fracción:
20 10 g). Los eluatos de las fracciones N.ºs 11 a 30 se evapo-
ran y el residuo (138 mg) se disuelve en 14,6 ml de agua,
a la que se añaden 1,46 ml de hidrazina hidratada y 1,73
ml de ácido acético.

25 La mezcla se lleva a reflujo durante 6 horas, se
diluye con 261 ml de agua y se adsorbe sobre 73 ml de Amber-
lite CG-50 (tipo NH_4^+). La columna se lava con 680 ml de
agua, y se eluye a continuación con una solución de hidróxi-
do de amonio acuosa al 0,4% (una fracción: 10 g).

30 El eluato de las fracciones N.ºs 70 a 75 se trata
con carbono descolorante y la mezcla se filtra a través de

1 un filtro Pyrex para microanálisis (hecho por Nihon Millipore Ltd.), y el filtrado se evapora proporcionando 52,2 mg del compuesto del epígrafe como un polvo incoloro.

5 Este se disuelve en una pequeña cantidad de agua, se ajusta a pH 4,6 con ácido sulfúrico 0,0955N y se evapora a presión reducida. Se añade etanol y el precipitado, que aparece se recoge por filtración, se lava con etanol, se disuelve en agua, se trata con carbono descolorante (Norit A) se filtra a través de un filtro Pyrex para microanálisis
10 (fabricado por Nihon Millipore Ltd.,) y se liofiliza proporcionando 103 mg de sulfato correspondiente (rendimiento total del 41,9%).

$$[\alpha]_D^{25} + 72,5 \pm 1,1^{\circ} \text{ (c=1,031, en H}_2\text{O)}$$

Análisis elemental: (para $\text{C}_{25}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_{11} \cdot 2,5\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 10,5\text{H}_2\text{O}$)

15 Calculado (%) : C, 28,79; H, 7,15; N, 8,06; S, 7,69

Encontrado (%) : C, 28,61; H, 6,93; N, 7,93; S, 7,48

Los compuestos siguientes de la Tabla 4 pueden prepararse de la misma forma que se ha descrito antes.

20

25

30

Table 4

Producto	Rendto (%)	Rotación específica	Análisis elemental	RMN: δ ppm
Sulfato de 1-N-(1-Metil-3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)tobramicina	31,3	$[\alpha]_D^{23,0} = +74,4^{\circ}$ $\pm 1,1$ (c=1,041 en H ₂ O)	(Para C ₂₄ H ₄₆ N ₆ O ₁₁ ·2,0H ₂ SO ₄ ·4H ₂ O) Calc. (%): C, 33,40; H, 6,78; N, 9,74; S, 7,43. Enc. (%): C, 32,98; H, 6,43; N, 9,78; S, 7,86.	3,56s, 6,37d (H, aromático), 5,67m.
Sulfato de 1-N-(1-isopropil-3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)tobramicina	24,2	$[\alpha]_D^{22,0} = +73,0^{\circ}$ $\pm 1,1$ (c=1,010 en H ₂ O)	(Para C ₂₆ H ₅₀ N ₆ O ₁₁ ·2,5H ₂ SO ₄ ·3H ₂ O) Calc. (%): C, 34,05; H, 6,16; N, 9,17; S, 8,74. Enc. (%): C, 34,02; H, 6,79; N, 9,11; S, 8,63.	1,83d (H, aromático), 6,37d, 5,67m.
Sulfato de 1-N-(1-bencil-3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)tobramicina	57,0	$[\alpha]_D^{22,0} = +70,6^{\circ}$ $\pm 1,1$ (c=0,999 en H ₂ O)	(Para C ₃₀ H ₅₀ N ₆ O ₁₁ ·2,5H ₂ SO ₄ ·2,5H ₂ O) Calc. (%): C, 37,49; H, 6,29; N, 8,75; S, 8,34. Enc. (%): C, 37,82; H, 6,35; N, 8,54; S, 7,91.	8,01s, 4,98s, 6,34d, 5,82m.
Sulfato de 1-N-(3-hidroxipirrolidin-3-carbonil)kenamicina A	69,6	$[\alpha]_D^{24,0} = +75,7^{\circ}$ $\pm 1,1$ (c=1,046 en H ₂ O)	(Para C ₂₃ H ₄₃ N ₅ O ₁₃ ·2H ₂ SO ₄ ·7,5H ₂ O) Calc. (%): C, 29,74; H, 6,72; N, 7,54; S, 6,90. Enc. (%): C, 29,65; H, 6,56; N, 7,52; S, 6,88.	—

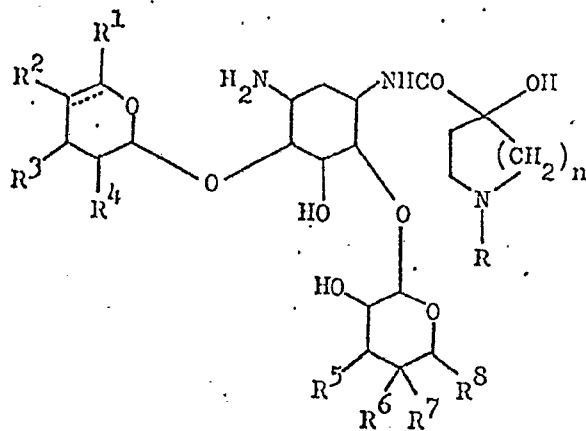
Tabla 4 (continuación)

Producto	Rendto ^o (%)	Rotación específica	Análisis elemental	RMN: δ ppm D ₂ O
Sulfato de 1-N-(3-hidro- xipirrolidin-3-carbo- nil)kanamicina B	64,5	$[\alpha]_D^{23,0} = + 71,8^{\circ}$ $+ 1,1$ (c=1,004 en Calo. (%) : H_2O)	(Para $C_{23}H_{44}N_6O_{12} \cdot 2,5H_2SO_4 \cdot 9,5H_2O$) C, 27,27 ; H, 6,76; H, 8,30 ; S, 7,91; Enc. (%) : C, 27,11 ; H, 6,41; N, 8,34 ; S, 8,29.	---

- REIVINDICACIONES -

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:

1ª.- Un procedimiento para preparar nuevos derivados de aminoglicósido y sus sales representados por la fórmula:



(en donde R es un átomo de hidrógeno, alcoholo de C₁ a C₅ o aralcoholo de C₇ a C₁₀; R¹ es aminometilo, hidroximetilo, metilaminometilo o 1-metilaminoetilo; R², R³ y R⁶ representan independientemente un átomo de hidrógeno o hidroxilo; R⁴ es hidroxilo o amino, R⁵ es amino o metilamino; R⁷ es hidroxilo o metilo; R⁸ es un átomo de hidrógeno, hidroximetilo o carbamoiloximetilo; la línea de puntos representa la presencia o ausencia de un doble enlace; n es el número entero 1 ó 2; que comprende hacer reaccionar aminoglicósidos de la fórmula:

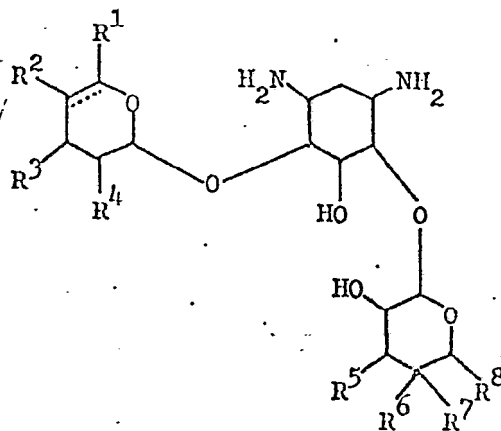
30

21117

m/e

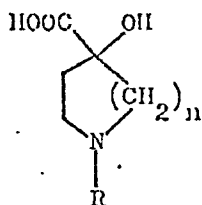
1

5



(en donde R^1 es aminometilo, hidroximetilo, metilaminometilo o 1-metilaminoetilo; R^2 , R^3 y R^6 representa independientemente un átomo de hidrógeno o hidroxilo; R^4 es hidroxilo o amino; R^5 es amino o metilamino; R^7 es hidroxilo o metilo; R^8 es un átomo de hidrógeno, hidroximetilo o carbamoiloximetilo; la línea de puntos representa la presencia o ausencia de un doble enlace, estando los grupos funcionales distintos del grupo 1-amino opcionalmente protegidos, con ácidos carboxílicos de la fórmula:

20



25

(en la que R es un átomo de hidrógeno, alcohol inferior o aralcoholo; n es el número entero 1 ó 2, o sus derivados reactivos, seguido por la desprotección de los grupos funcionales.

30

2ª.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1ª, en el que la reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico seleccionado del grupo que consiste en alcoholes inferiores, éteres, cetonas, dimetilformamida, di-

1 metilacetamida, piridina y agua.

3^a.— Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1^a, en el que la reacción se lleva a cabo en dimetilformamida.

5 4^a.— Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1^a, en el que la reacción se lleva a cabo a 0-35°C.

5^a.— Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1^a, en el que la reacción se lleva a cabo a 20-25°C.

10 6^a.— Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1^a, en el que los derivados reactivos de los ácidos carboxílicos son haluros de ácido, azidas de ácidos, anhídridos de ácidos, anhídridos de ácidos mixtos, o ésteres reactivos.

15 7^a.— Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6^a, en el que los derivados reactivos de los ácidos carboxílicos son ésteres de N-hidroxisuccinimido.

8^a.— Un procedimiento para preparar nuevos derivados de aminoglicósido.

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

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

Madrid, 29. NOV. 1977

P.A.

Alberto de Elizaburu
Por Poder

25

DNM 30

21117

mce