

IN.-



ESPAÑA

10 ES

11

21

22

NUMERO

472.657

10 A1

FECHA DE PRESENTACION

17-7-1.978

**PATENTE DE INVENCION**

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

<p>50 PRIORIDADES:</p> <p>51 NUMERO</p> <p>34808/77</p>	<p>52 FECHA</p> <p>18-8-1.977</p>	<p>53 PAIS</p> <p>Gran Bretaña</p>
---	-----------------------------------	------------------------------------

<p>47 FECHA DE PUBLICIDAD</p>	<p>51 CLASIFICACION INTERNACIONAL</p> <p>C07H, A61K</p>	<p>52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA</p>
-------------------------------	---	---

54 TITULO DE LA INVENCION

UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE AMINOGLICOSIDOS ANTIBIOTICOS.

71 SOLICITANTE (ES)

PFIZER CORPORATION

DOMICILIO DEL SOLICITANTE Avenida Santa Isabel, COLON, Republica de Panama, cuya sociedad tiene un establecimiento comercial en: 102 Rue Leon Theodor, 1090 BRUSELAS, Belgica

72 INVENTOR (ES)

Michael Barrie Thomas, de nacionalidad británica, el cual ha cedido sus derechos a la entidad solicitante.

73 TITULAR (ES)

El mismo solicitante

74 REPRESENTANTE

DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU

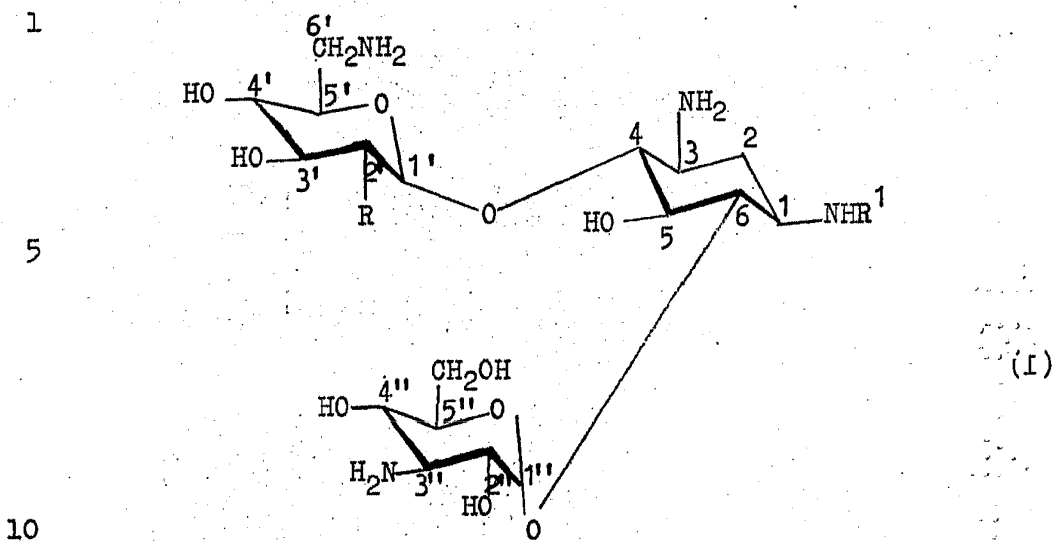
**POOR QUALITY**

1           Esta invención se refiere a un nuevo procedimiento  
para la preparación de antibióticos aminoglicósidos y  
a nuevos intermediarios para uso en dicho procedimiento  
y especialmente se refiere a un procedimiento para la  
5           preparación de derivados de 1-N-alkil-kanamicina y de  
derivados de kanamicina selectivamente N-protegidos como  
intermediarios para uso en este procedimiento.

          En la memoria de la patente británica n° 1.464.401  
se describen ejemplos de estos derivados de 1-N-alkil-ka-  
10           namicina; otros ejemplos están descritos en la patente  
belga n° 855.709.

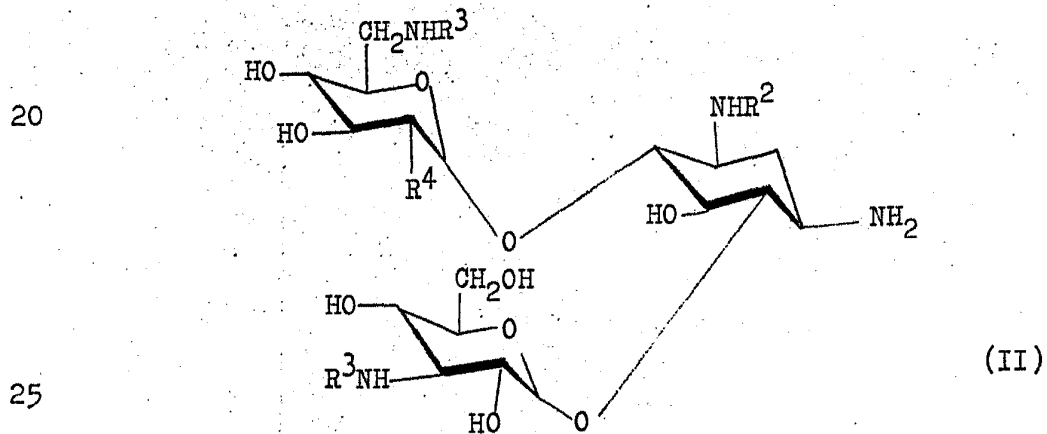
          Para preparar estos compuestos a partir de la ka-  
namicina fácilmente asequible producida por fermentación,  
es conveniente proteger todos los grupos amino distintos  
15           del grupo 1-amino. Entonces puede efectuarse la alkila-  
ción preferentemente sobre el grupo amino de la posición  
1 y con ello se simplifica el aislamiento del producto  
1-N-sustituído final. Un objeto de esta invención es pro-  
porcionar un procedimiento para la preparación de deri-  
20           vados de kanamicina 1-N-sustituídos mediante la provisión  
de los intermediarios selectivamente N-protegidos.

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

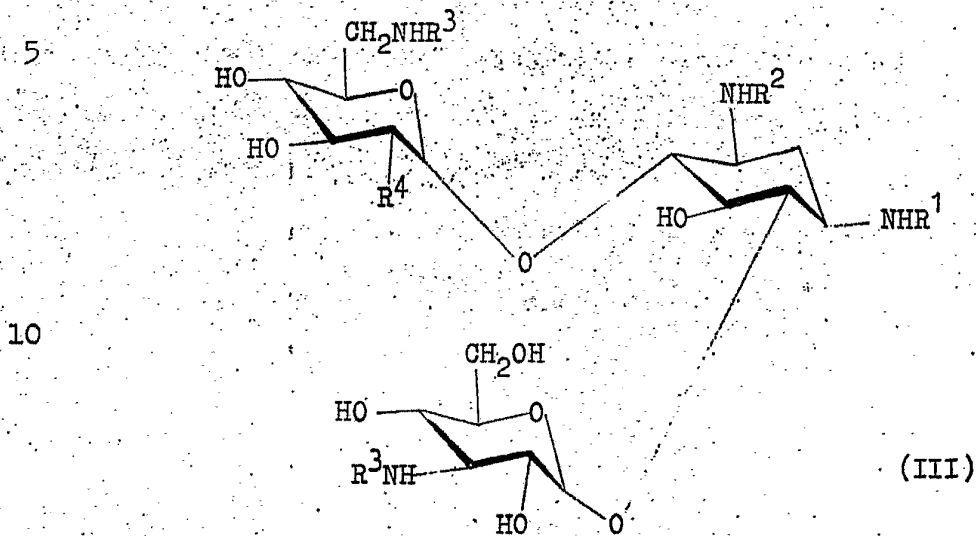


15

donde R es un grupo amino o hidroxilo y R<sup>1</sup> es un grupo alquilo inferior, del que cualquier átomo de carbono distinto del átomo de carbono unido al átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo o amino; cuyo procedimiento consiste en alquilar un compuesto de fórmula:



1 donde  $R^2$  es un grupo formilo,  $R^3$  es un grupo alcanóilo  $C_2-C_4$  o un grupo benzóilo y  $R^4$  es un grupo hidroxilo o un grupo  $NHR^3$ , para producir un compuesto de fórmula:



15

donde  $R^1$  a  $R^4$  son los definidos anteriormente; separar los grupos  $R^2$  y  $R^3$  y aislar el compuesto de fórmula (I).

20

En esta memoria, el término alquilo inferior se refiere a un grupo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono y puede ser de cadena lineal o ramificada. Son ejemplos particulares de grupos alquilo inferior sustituidos  $R^1$  los grupos {S}-4-amino-2-hidroxibutilo y 1,3-dihidroxi-prop-2-ilo. El grupo de bloqueo  $R^3$  es preferiblemente un grupo acetilo.

25

Este procedimiento para la preparación de los com-

1        puestos de fórmula (I) comprende como etapa inicial la  
alquilación de un compuesto de fórmula (II) para intro-  
ducir el sustituyente R<sup>1</sup> en el grupo amino de la posición 1.  
Esta reacción puede llevarse a cabo por diversos métodos  
5        muy conocidos por los expertos en este campo. Por ejemplo,  
la alquilación puede realizarse por alquilación reductiva  
empleando un aldehído o cetona apropiados o un compuesto  
como el descrito en la patente belga n°851.777.

10        La segunda etapa del procedimiento comprende la  
separación de los grupos de bloqueo R<sup>3</sup> del grupo 2'-amino,  
si están presentes, y de los grupos 6'- y 3"-amino y tam-  
bién del grupo formilo del grupo 3-amino. En algunos ca-  
sos, cuando el 1-N-sustituyente lleva a su vez un grupo  
15        sustituyente amino, puede ser conveniente proteger este  
grupo en el transcurso del proceso y entonces será nece-  
sario separar este grupo de bloqueo del amino también en  
la etapa final del proceso. Existen diversas condiciones  
para separar completamente los grupos de bloqueo del amino,  
muy conocidas por los expertos en este campo y estas con-  
20        diciones dependen naturalmente del carácter del grupo pro-  
tector empleado y del medio de la amina protegida. El me-  
dio empleado puede ser anhidro o acuoso y en casos parti-  
culares puede ser ácido o básico a diversas concentraciones.  
Por ejemplo, el grupo bencilo, cuando está presente, puede  
25        ser separado por hidrogenólisis catalítica de forma con-

1 vencial, en presencia de un catalizador de paladio. Los  
grupos de bloqueo alcanóilo o benzóilo puede ser separados  
en general por hidrólisis en condiciones básicas suaves,  
por ejemplo por tratamiento con una solución diluída de  
5 hidróxido sódico a 65°C durante varias horas. En estas con-  
diciones se separa también el grupo formilo. El producto (I)  
puede ser purificado finalmente, si se desea, por técnicas  
convencionales, por ejemplo por cristalización o por cro-  
matografía.

10 El procedimiento es ilustrado para la preparación  
de 1-N-{{(S)-4-amino-2-hidroxi-butil}kanamicina A. En este  
caso, la kanamicina protegida intermedia de fórmula (II),  
donde R<sup>4</sup> es un grupo hidroxilo y R<sup>3</sup> es un grupo acetilo,  
se alquila mediante alquilación reductiva utilizando un  
15 aldehído apropiado o un compuesto como el descrito en la  
patente belga n° 851.777. Así, puede utilizarse 3-bencil-6-  
(S)-dihidroximetil-tetrahidro-1,3-oxazin-2-ona y la alquila-  
ción reductiva puede llevarse a cabo empleando borohidru-  
sódico o preferiblemente cianoborohidruo sódico como agen-  
20 te reductor. Puede utilizarse un exceso de aldehído (u otro  
compuesto) y de agente reductor para garantizar la reacción  
completa del grupo 1-amino libre. Los disolventes adecuados  
son metanol acuoso o dioxano acuoso; también son adecuados  
la dimetilformamida o el dimetilsulfóxido. Puede ser agre-  
25 gado ventajosamente un ácido, v.g. ácido acético. La reacción

1 se lleva a cabo generalmente a la temperatura ambiente y  
habitualmente es completa en 5 o 6 horas. El producto cru-  
do puede ser aislado por evaporación del disolvente y pue-  
de ser purificado de nuevo, si se desea, por recristaliza-  
5 ción o cromatografía. Sin embargo, en general, es más con-  
veniente emplear directamente el producto crudo en la si-  
guiente etapa del procedimiento.

Así, el producto crudo se disuelve en hidróxido  
sódico diluido y se calienta a 65°C durante un periodo de  
10 unas 5 horas para efectuar la separación de los grupos de  
bloqueo formilo y acetilo. Después de la neutralización, el  
producto, preferiblemente separado de la materia inorgáni-  
ca, se somete a hidrogenación catalítica convencional para  
separar el grupo protector del bencilo. Son suficientes  
15 generalmente un periodo de 4 o 5 horas a 60°C y a una pre-  
sión de 60 psi (4,2 kg/cm<sup>2</sup>) para efectuar la separación  
completa del grupo bencilo y el producto es finalmente tra-  
tado de forma convencional y purificado si es necesario por  
cromatografía de intercambio de ion para dar el producto  
20 final. Como solamente hay un grupo amino reactivo en el ma-  
terial de partida de fórmula (II), el producto final está  
constituído esencialmente por el isómero 1-N-sustituído re-  
querido y con ello se evita la difícil separación de isóme-  
ros estrechamente relacionados.

25 La reacción también puede llevarse a cabo de forma

1 exactamente similar utilizando 2',3'',6'-tri-N-acetil-3-  
formil-kanamicina B para formar el correspondiente deri-  
vado de kanamicina B 1-N-sustituído.

5 La reacción de alquilación también puede llevarse  
a cabo empleando un hidroxialdehído o una hidroxiketona  
para formar los derivados de 1-N-hidroxialquil-kanamicina  
como los descritos en la patente belga n° 855.709. Así,  
por ejemplo, cuando se utiliza 1,3-dihidroxi-acetona en  
el procedimiento, se obtiene el producto de fórmula (I)  
10 donde R<sup>1</sup> es un grupo 1,3-dihidroxiprop-2-ilo.

Los compuestos de fórmula (II) son compuestos  
nuevos de acuerdo con esta invención. Pueden ser prepara-  
dos a partir de 3'',6'-di-N-acil-kanamicina A o de 2',3'',6'-  
tri-N-acil-kanamicina B mediante una reacción que implica  
15 en primer lugar la formilación de los grupos 1- y 3-amino  
sin sustituir restantes y en segundo lugar una etapa  
de hidrólisis selectiva que, sorprendentemente, se ha en-  
contrado que realiza la separación del grupo formilo de  
la posición 1-amino mientras que deja intacto el grupo  
20 formilo de la posición 3.

La preparación de derivados adecuados de acil-kanamicina  
sustituídos en los grupos 3''- y 6'-amino en la ka-  
namicina A y adicionalmente en el grupo 2'-amino en la  
kanamicina B con un grupo alcanóilo C<sub>2</sub> a C<sub>4</sub> o con un gru-  
25 po benzóilo ha sido descrita en la patente belga número

1 853.564. Por ejemplo, se describe la preparación de 3",6'-  
di-N-acetil-kanamicina A a través de una reacción de migra-  
ción selectiva del acetilo O a N. Otros derivados pueden  
prepararse de forma similar.

5 La reacción de formilación puede llevarse a cabo  
por diferentes métodos, muy conocidos por los expertos en  
este campo. Por ejemplo, la formilación puede realizarse  
empleando una mezcla de anhídrido fórmico y acético pero he-  
mos encontrado que la reacción puede efectuarse convenientemente  
10 empleando formiato de 4-nitrofenilo. Los disolventes  
adecuados para la reacción son dioxano acuoso, tetrahidro-  
furano acuoso o dimetilformamida y la reacción se lleva a  
cabo agregando poco a poco un exceso (v.g. un exceso de  
tres veces) de formiato de 4-nitrofenilo al derivado de  
15 kanamicina. Es preferible agregar una base para favorecer la  
reacción y puede emplearse para este fin una base orgánica,  
por ejemplo trietilamina. Preferiblemente se agrega por lo  
menos un equivalente de base por cada grupo amino reactivo.  
20 La reacción de formilación es generalmente completa dentro  
de las 24 horas a la temperatura ambiente y el producto pue-  
de ser después aislado por técnicas convencionales, por  
ejemplo por evaporación del disolvente o por precipitación y  
puede ser purificado de nuevo si se desea.

25 La etapa de hidrólisis selectiva se realiza con el  
producto 1,3-di-N-formílico disuelto en agua o en un disol-

1     vente orgánico acuoso, v.g. dioxano acuoso o tetrahidro-  
furano acuoso y el pH de la solución se ajusta cuidadosa-  
mente dentro de la región de 12,0 a 12,5 con un álcali,  
por ejemplo por adición de hidróxido sódico o potásico  
5     diluído. La solución se agita a la temperatura ambiente du-  
rante varios días, siguiéndose el transcurso de la reacción  
por cromatografía en capa fina, hasta que es completa la  
conversión en el derivado 3-N-fenílico deseado de fórmula  
(II). Después la solución se neutraliza por adición de un  
10    ácido o más convenientemente por adición de una resina cam-  
biadora de ión en la forma de ión hidrógeno. Esto tiene  
la ventaja de evitar la acumulación de materia inorgánica  
en la solución y la ventaja adicional de que cualquier  
subproducto del que se hayan separado ambos grupos 1- y  
15    3-formilo queda adsorbido en la resina. Finalmente el pro-  
ducto es aislado por técnicas convencionales, por ejemplo  
por evaporación a volumen reducido y precipitación con un  
disolvente orgánico, v.g. isopropanol. Si se desea puede  
purificarse más mediante cromatografía, pero en general el  
20    producto es suficientemente puro para ser utilizado directa-  
mente en la preparación de los compuestos de fórmula (I).

El procedimiento para la preparación de los compues-  
tos de fórmula (II) puede realizarse utilizando 3",6'-di-N-  
acetil-kanamicina A para dar el compuesto de fórmula (II)  
25    donde R<sup>3</sup> es acetilo y R<sup>4</sup> es un grupo hidroxilo. Análogamente,

1 puede utilizarse 2',3",6'-tri-N-acetil-kanamicina B para  
dar el compuesto de fórmula (II) donde R<sup>4</sup> es un grupo NHR<sup>3</sup>  
y R<sup>3</sup> es acetilo.

5 La invención es ilustrada mediante los siguientes  
ejemplos, donde los Ejemplos 1 a 3 lo son de preparación  
de los nuevos intermediarios de fórmula (II) y los Ejemplos  
2 a 4 lo son del nuevo procedimiento para la preparación  
de los compuestos de fórmula (I).

10 La cromatografía en capa fina se realiza sobre pla-  
cas de sílice empleando el sistema disolvente indicado. Las  
manchas se visualizan después de secar las placas por rocia-  
da con una solución al 5 % de hipoclorito de ter-butilo en  
ciclohexano, secando las placas a 100°C durante 10 minutos  
en una estufa ventilada, enfriando y rociando con solución  
15 de almidón-yoduro potásico.

La electroforesis en capa fina se realiza sobre pla-  
cas de sílice de 20 cm, con una diferencia de potencial de  
900 voltios aplicada durante 45 minutos. El electrolito es  
una mezcla de ácido fórmico y acético que da un pH igual a 2,  
20 realizándose la detección como antes.

"Amberlite" y "Sephadex" son marcas registradas.

#### EJEMPLO 1

##### Preparación de 3",6'-di-N-acetil-3-N-formil-kanamicina A

25 (A) Se añaden poco a poco a lo largo de 45 minutos  
6,88 g de formiato de 4-nitrofenilo a una suspensión de 3,9 g

1 de 3",6'-di-N-acetil-kanamicina A en 21 ml de agua y 21 ml  
de tetrahidrofurano conteniendo 6,91 g de trietilamina. La  
mezcla de reacción se agita a la temperatura ambiente du-  
rante la noche y después se evapora a volumen reducido,  
5 sustituyendo las trazas finales de agua por destilación  
azeotrópica con isopropanol (volumen final: 35 ml). Preci-  
pitan de la solución 2,41 g de 3",6'-di-N-acetil-1,3-di-  
N-formil-kanamicina A que se filtra y seca a vacío a 50°C.

10 Por electroforesis en capa fina (pH = 2), el compues-  
to da un valor de 0,09 con respecto a la kanamicina A. Por  
cromatografía en capa fina empleando metanol, acetato de  
etilo, amoníaco y agua (40:40:1:30) como eluyente, da una  
 $R_f = 0,42$ . El espectro de RMN protónico presenta señales  
a  $\delta = 7,96$  ppm (protón formílico), 8,02 ppm (protón for-  
15 mílico) y 2,02 ppm (6 protones acetílicos).

(B) Se disuelven 2,4 g del producto de (A) en 72 ml  
de agua y el pH de la solución se ajusta a 12,0-12,5 con  
2,0 ml de una solución de hidróxido sódico 2N. La solución  
se agita a la temperatura ambiente durante 7 días manteni-  
20 do el pH entre 12,0 y 12,5 y después se neutraliza por adi-  
ción de 10 ml de resina cambiadora de ión Amberlite IR 120  
(forma  $H^+$ ). Se filtra la resina y el filtrado se concentra  
a volumen reducido, separándose las últimas trazas de agua  
por desplazamiento con 5 ml de dimetilformamida a reflujo.  
25 Después se añaden lentamente 30 ml de isopropanol a la so-

1            lución en dimetilformamida y el precipitado de 3'',6'-di-N-acetil-3-N-formil-kanamicina A (1,75 g) se filtra y se seca a vacío a 40°C.

5            El compuesto es suficientemente puro para utilizarlo en la siguiente etapa del procedimiento. Una muestra se purifica por cromatografía sobre CM Sephadex C25 (forma  $\text{NH}_4^+$ ) empleando como eluyente una solución de hidróxido amónico 0,1M. El espectro de RMN C-13 concuerda por completo con la estructura requerida y confirma la mono-formilación del grupo 3-amino. La electroforesis en capa fina (pH = 2) da un valor de 0,43 con respecto a la kanamicina A. Por cromatografía en capa fina empleando como eluyente metanol, acetato de etilo, amoníaco y agua (40:40:1:30), el compuesto da un valor de  $R_f$  de 0,23.

15

#### EJEMPLO 2

#### Preparación de 1-N-{(S)-4-amino-2-hidroxibutil}-kanamicina A

20            Se añaden 0,21 g de cianoborohidruro sódico en 40 ml de agua a 2,0 g de 3'',6'-di-N-acetil-3-N-formil-kanamicina A, 2,38 g de 3-bencil-6-(S)-dihidroximetil-tetrahidro-2H-1,3-oxazin-2-ona y 0,1 g de sulfato de cobre en 66 ml de agua y 322 ml de metanol, a lo largo de 5 horas. La mezcla de reacción se evapora a sequedad bajo presión reducida y el residuo se trata con 25 ml de agua y 25 ml de cloruro de metileno. La fase acuosa se evapora a sequedad y el residuo se calienta con 20 ml de una solución de hi-

25

1 dróxido sódico 3N a 65-70°C, durante 4 horas. Se enfría  
la solución y se neutraliza con ácido clorhídrico concen-  
trado empleando una buena extracción de humos (se despren-  
de HCN) y se pasa por una columna de 600 ml de resina cam-  
5 biadora de ión Amberlite CG-50 (forma  $\text{NH}_4^+$ ), eluyendo la  
materia inorgánica con agua y los materiales aminoglicósi-  
dos con solución de hidróxido amónico 0,2N.

Las fracciones de aminoglicósidos se evaporan a se-  
quedad y el residuo se disuelve en una mezcla de 13 ml  
10 de metanol, 13 ml de ácido acético y 13 ml de agua y se  
hidrogena sobre 0,4 g de paladio al 5 % en carbón, a 60°C  
y 60 psi (4,2 kg/cm<sup>2</sup>) durante 4 horas. Se filtra el cata-  
lizador y el filtrado se evapora a sequedad. El residuo se  
disuelve en 20 ml de agua y se cromatografía sobre una co-  
15 lumna cambiadora de ión de 200 ml de CG-50 (forma  $\text{NH}_4^+$ ),  
empleando como eluyente una solución de hidróxido amónico  
(0,25-1,0M). Por evaporación de las fracciones apropiadas  
se obtienen 0,75 g (37 %) de 1-N-((S)-4-amino-2-hidroxi-  
butil}kanamicina A, idéntica por cromatografía en capa fi-  
20 na y por electroforesis en capa fina a una muestra autén-  
tica.

### EJEMPLO 3

#### Preparación de 2',3'',6'-tri-N-acetil-3-N-formil-kanamicina B

25 (A) Se añaden a lo largo de 10 minutos 128 g de clo-  
roformiato de bencilo a una solución de 80,5 g de sulfato

1 de kanamicina B y 76 g de carbonato sódico en 400 ml de  
agua y la solución se agita durante una hora a la tempe-  
ratura ambiente. El precipitado se recoge por filtración,  
se lava con agua, con ácido clorhídrico diluído y con  
5 agua y se seca para dar 125,7 g de penta-N-benciloxicarbo-  
nil-kanamicina B.

(B) Se añaden poco a poco a lo largo de 15 minutos  
230,8 g de penta-N-benciloxicarbonil-kanamicina B a una  
solución agitada de 189 ml de anhídrido acético en 346 ml  
10 de piridina y 346 ml de diclorometano y la suspensión se  
agita a la temperatura ambiente durante 48 horas. La solu-  
ción se vierte en una mezcla de 1,5 litros de diclorometano  
y 2,3 litros de agua. Se separa la fase orgánica y se  
lava con ácido clorhídrico diluído (pH 4) y con agua. El  
15 disolvente se evapora hasta un volumen de 0,75 litros y  
la solución se vierte en 4 litros de éter dietílico. El pre-  
cipitado de tetra-O-acetil-penta-N-benciloxicarbonil-kana-  
micina B se recoge por filtración y se seca a vacío (ren-  
dimiento: 244,8 g, 92,6 %).

20 (C) Una solución de 33,0 g de tetra-O-acetil-penta-N-  
benciloxicarbonil-kanamicina B en 132 ml de tetrahidrofura-  
no, 66 ml de agua y 3,3 ml de ácido acético se hidrogena  
sobre 3,3 g de catalizador de paladio al 5 % en carbón  
a 50°C y 50 psi (3,5 kg/cm<sup>2</sup>), durante 7 horas. El cataliza-  
25 dor se separa por filtración y el filtrado se concentra has-

1 ta un volumen de 25 ml. El residuo se trata con 81,5 ml de hi  
dróxido amónico acuoso (7M) y se agita durante la noche a la  
temperatura ambiente. La solución se evapora a sequedad y el  
residuo se cromatografía en una columna de resina cambiador  
5 ra de ión Amberlite CG-50 en forma de ión amonio (2 litros),  
eluyendo con agua y después con amoniaco acuoso 0,01M. Se  
combinan las fracciones que contienen el producto deseado  
y se evaporan para dar 9,37 g (61,6 %) de 2',3'',6'-tri-N-  
acetil-kanamicina B, p.f. 191-198°C (desc.).  $\nu_{\max}$  (KBr),  
10 1650, 1550  $\text{cm}^{-1}$ . Rf 0,11 (metanol/éter dietílico/agua/amo-  
niaco acuoso 0,880 6:3:1:2), Rf 0,11 (metanol/acetato de  
etilo/agua/amoniaco acuoso 0,880 40:40:30:1).

(D) Se añaden poco a poco a lo largo de 40 minutos  
15 153,1 g de formiato de p-nitrofenilo a una solución enfria-  
da de 93 g de 2',3'',6'-tri-N-acetil-kanamicina B en una  
mezcla de 465 ml de agua, 558 ml de tetrahidrofurano y  
154 g de trietilamina. La mezcla de reacción se agita a la  
temperatura ambiente durante la noche y después se concen-  
tra hasta pequeño volumen bajo presión reducida. El con-  
20 centrado acuoso se diluye con isopropanol para precipitar  
el producto, separándose el agua residual por destilación  
azeotrópica con isopropanol. Finalmente el producto se reco-  
ge por filtración, se lava con isopropanol y se seca a vacío  
para dar 89,2 g de 2',3'',6'-tri-N-acetil-1,3-di-N-formil-  
25 kanamicina B, p.f. 310-318°C (desc.).  $\nu_{\max}$  (KBr): 1665,

1 1545  $\text{cm}^{-1}$ . Rf 0,49 (metanol/éter dietílico/agua/amoniaco  
acuoso 0,880 6:3:1:2), Rf 0,54 (metanol/acetato de etilo/  
agua/amoniaco acuoso 0,880 40:40:30:1).

5 (F) Una solución de 86,9 g de 2',3'',6'-tri-N-acetil-  
1,3-di-N-formil-kanamicina B en 2,61 litros de agua se lle-  
va a pH 12-12,5 con solución de hidróxido sódico 10N. La  
mezcla de reacción se mantiene a la temperatura ambiente  
durante 4 días reajustando el pH de la solución a 12 con  
10 hidróxido sódico acuoso cuando sea necesario y después la  
solución se neutraliza por adición de resina Amberlite IR  
120 (forma  $\text{H}^+$ ). Se filtra la mezcla y el filtrado se cromatografía sobre resina cambiadora de ión Amberlite 200 (en  
forma de ión amonio, 5,5 litros), eluyendo con agua y des-  
pués con hidróxido amónico acuoso 0,1N. Por evaporación de  
15 las fracciones apropiadas se obtienen 55,4 g de 2',3'',6'-  
tri-N-acetil-3-N-formil-kanamicina B, p.f. 266-268° (desc.).  
 $\nu_{\text{max}}$  (KBr): 1665, 1555  $\text{cm}^{-1}$ . Rf 0,49 (metanol/acetato de  
etilo/agua/amoniaco acuoso 0,880 40:40:30:1). La estructura  
fué confirmada por espectroscopía de RMN C-13.

20

#### EJEMPLO 4

##### Preparación de 1-N-(1,3-dihidroxi-prop-2-il)kanamicina B

Una solución de 8,8 g de 2',3'',6'-tri-N-acetil-3-N-  
formil-kanamicina B en 880 ml de metanol y 176 ml de agua  
se trata con 4,0 g de 1,3-dihidroxiacetona y 3,9 g de ciano-  
25 borohidruro sódico y el pH de la solución resultante se ajus

1 ta a 6,5 con ácido clorhídrico 5N. La solución se calien-  
ta a reflujo durante 18 horas, se enfría y se añaden otros  
4,0 g de 1,3-dihidroxiacetona y 3,9 g de cianoborohidruro  
sódico. El pH se reajusta a 5,5 con ácido clorhídrico y  
5 la solución se calienta a reflujo durante 6 horas más.  
El metanol se separa a presión reducida y el concentrado  
acuoso se cromatografía en una columna de resina cambiadora  
de ión Amberlite 200 en forma de ión amonio, eluyendo con  
agua. Se combinan las fracciones que contienen la 2',3",6'-  
10 tri-N-acetil-3-N-formil-1-N-(1,3-dihidroxi-prop-2-il)kana-  
micina B, requerida y se concentran a presión reducida has-  
ta un volumen de 40 ml.

El concentrado se trata con 40 ml de solución acuosa  
de hidróxido sódico 10N y la mezcla se calienta en un  
15 baño de vapor durante 16 horas. La solución enfriada se  
neutraliza con ácido clorhídrico concentrado, se agrega  
agua hasta un volumen de 1 litro y la mezcla se cromatografía  
en una columna de resina cambiadora de ión Amberlite 200  
20 (forma de ión amonio, 3 litros). La columna se lava con  
agua para separar la materia inorgánica y después con amo-  
niaco acuoso 1N para eluir los materiales aminoglicósidos.  
El producto crudo se recromatografía sobre resina cambiadora  
de ión Amberlite CG-50 (forma de ión amonio, 2 litros) elu-  
25 yendo con agua, hidróxido amónico acuoso 0,05N y finalmente

1 hidróxido amónico acuoso 0,1N. Por evaporación de las frac-  
ciones apropiadas se obtienen 3,2 g de 1-N-(1,3-dihidro-  
xiprop-2-il)kanamicina B, idéntica por cromatografía en  
capa fina a una muestra de referencia.

5

---

10

15

20

---

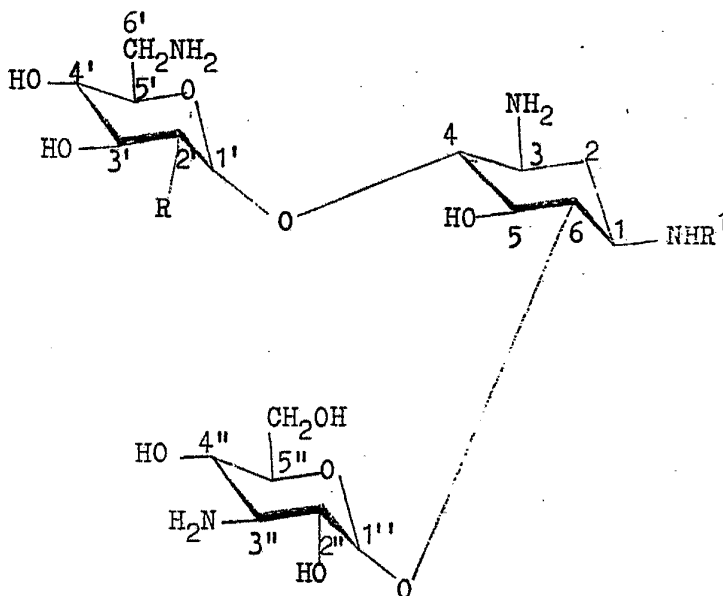
25

---

En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer en las siguientes:

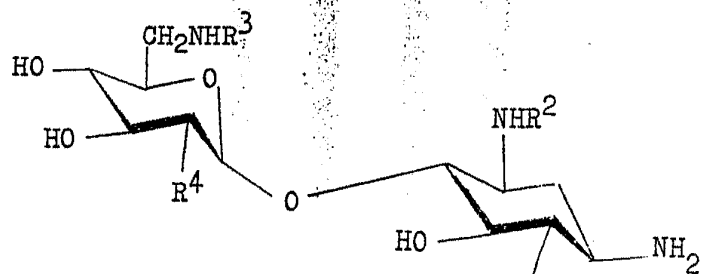
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de aminoglicósidos antibioticos de fórmula:



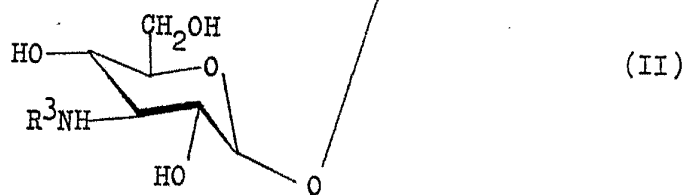
donde R es un grupo amino o hidroxilo y R<sup>1</sup> es un grupo alquilo inferior, del que cualquier átomo de carbono distinto del átomo de carbono unido al átomo de nitrógeno puede estar sustituido opcionalmente con un grupo hidroxilo o amino; cuyo procedimiento consiste en alquilar un compuesto de fórmula:

1



5

10

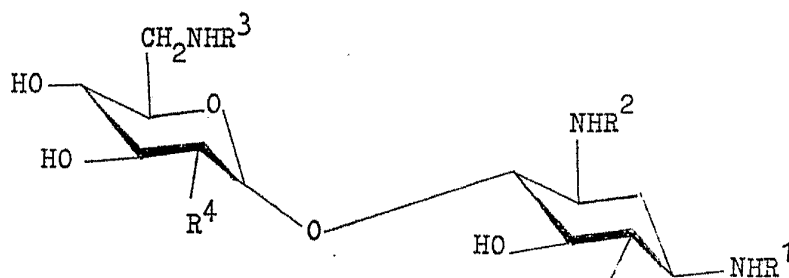


(II)

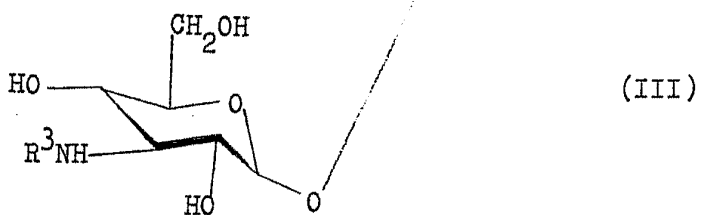
15

donde  $R^2$  es un grupo formilo,  $R^3$  es un grupo alcanóilo  $C_2$  a  $C_4$  o un grupo benzóilo y  $R^4$  es un grupo hidroxí o un grupo  $NHR^3$ , para producir un compuesto de fórmula:

20



25



(III)

- 1 donde R<sup>1</sup> a R<sup>4</sup> son los definidos anteriormente; separar los grupos R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> y aislar el compuesto de fórmula (I).
2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde R<sup>1</sup> es un grupo S-4-amino-2-hidroxibutilo.
- 5 3. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde R<sup>1</sup> es un grupo 1,3-dihidroxiprop-2-ilo.
4. Un procedimiento según cualquiera de las precedentes reivindicaciones, donde R<sup>3</sup> es un grupo acetilo.
- 10 5. Un procedimiento según la Reivindicación 4, donde el compuesto de fórmula (II) es 3",6'-di-N-acetil-3-N-formil-kanamicina A.
6. Un procedimiento según la Reivindicación 4, donde el compuesto de fórmula (II) es 2',3",6'-tri-N-acetil-3-N-formil-kanamicina B.
- 15 7. Un procedimiento según cualquiera de las precedentes reivindicaciones, donde la alquilación se realiza por alquilación reductiva.
8. Un procedimiento según la Reivindicación 7, donde la alquilación reductiva se realiza con 3-bencil-6-(S)-dihidroximetil-tetrahydro-1,3-oxazin-2-ona.
- 20 9. Un procedimiento según la Reivindicación 7, donde la alquilación reductiva se realiza con 1,3-dihidroxi-acetona.
- 25 10. Un procedimiento según las Reivindicaciones 7 a 9, donde el agente reductor es borohidruro sódico o ciano-

)

1 borohidruro sódico.

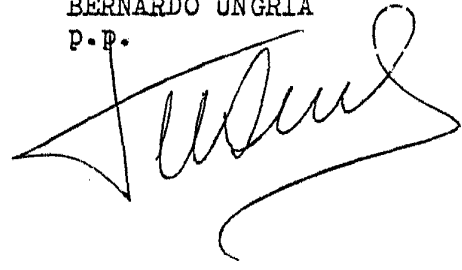
11.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:  
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE AMINOGLICOSIDOS AN  
5 . TIBIOTICOS.

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de veintitres páginas mecanografiadas.

Madrid, 17 de Agosto de 1.978

BERNARDO UNGRIA

P.P.



10

15

20

25