

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial

IN.-



ESPAÑA

Comunido el Registro de acuerdo con lo que figura en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

19 ES	11	NÚMERO	10 A1
21	22	FECHA DE PRESENTACION	
		17-4-1.979	

PATENTE DE INVENCION

20 PRIORIDADES:		23 PAIS
21 NÚMERO	22 FECHA	
34808/77	18-8-1.977	Gran Bretaña
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07H 5/06 // A61K 31/70	472.657
64 TITULO DE LA INVENCION		
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE DERIVADOS DE KANAMICINA.		
71 SOLICITANTE (ES)		
PFIZER CORPORATION		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE Avenida Santa Isabel, COLON, República de Panama, cuya Sociedad tiene un establecimiento comercial en: 102 Rue León Theodor, 1090 BRUSELAS, Bélgica		
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

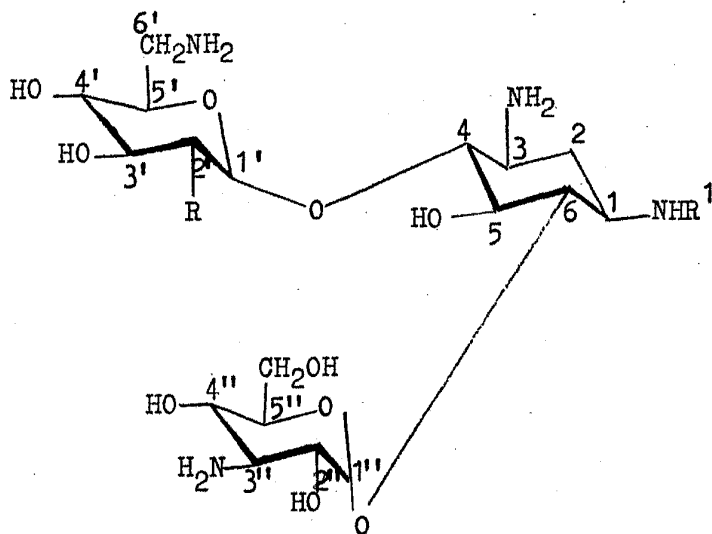
1 Esta invención se refiere a un nuevo procedimiento
para la preparación de antibióticos aminoglicósidos y
a nuevos intermediarios para uso en dicho procedimiento
y especialmente se refiere a un procedimiento para la
5 preparación de derivados de 1-N-alkil-kanamicina y de
derivados de kanamicina selectivamente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

 En la memoria de la patente británica nº 1.464.401
se describen ejemplos de estos derivados de 1-N-alkil-ka-
10 namicina; otros ejemplos están descritos en la patente
belga nº 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-sustituido 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
25 fórmula:

1



5

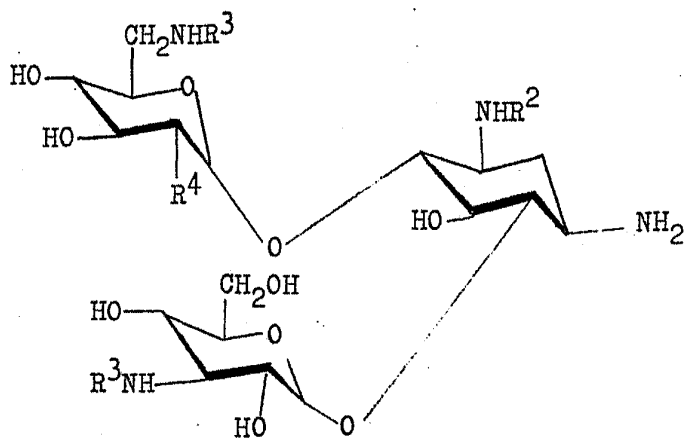
(I)

10

donde R es un grupo amino o hidroxilo y R^1 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:

15

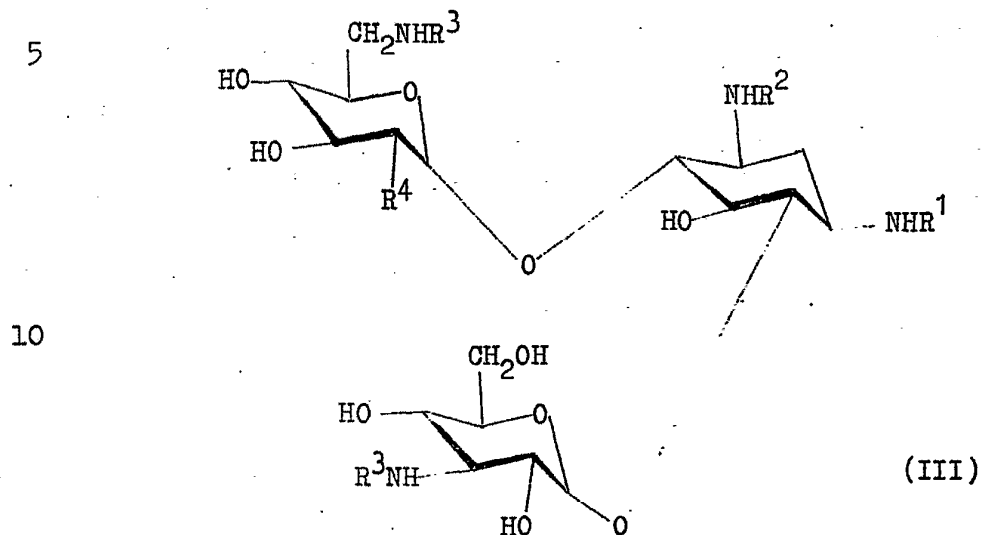
20



25

(II)

1 donde R^2 es un grupo formilo, R^3 es un grupo alcanóilo
5 C_2-C_4 o un grupo benzoílo 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 car-
bono y puede ser de cadena lineal o ramificada. Son
ejemplos particulares de grupos alquilo inferior susti-
tuídos R^1 los grupos (S)-4-amino-2-hidroxibutilo y 1,3-
dihidroxiprop-2-ilo. El grupo de bloqueo R^3 es preferi-
blemente 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^1 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^3 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 anhídrido 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 R⁴ es un grupo hidroxilo y R³ 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)-dihidroxi-metil-tetrahidro-1,3-oxazin-2-ona y la alquila-
ción reductiva puede llevarse a cabo empleando borohidru-
rú sódico o preferiblemente cianoborohidru-
rú 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/cm²) 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
constituido esencialmente por el isómero 1-N-sustituido 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 hidroxicetona
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 R¹ 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-ami-
no 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-kan-
amicina sustituidos 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 C₂ a C₄ o con un gru-
25 po benzoílo 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 conveniente-
10 mente 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
15 tres veces) de formiato de 4-nitrofenilo al derivado de
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 R³ es acetilo y R⁴ es un grupo hidroxilo. Análogamente,

1 puede utilizarse 2',3",6'-tri-N-acetil-kanamicina B para
dar el compuesto de fórmula (II) donde R⁴ es un grupo NHR³
y R³ 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 manteniend
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 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-tetrahydro-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 NH_4^+), eluyendo la
materia inorgánica con agua y los materiales aminoglicósidos
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/cm²) 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 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-kan-
amicina 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/cm²), 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 cambiadora
5 ra de ión Amberlite CG-50 en forma de ión amonio (2 litros),
eluyendo con agua y después con amoniacó 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.). $v_{\max}(\text{KBr})$,
10 1650, 1550 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/amoniacó 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.). $v_{\max}(\text{KBr})$: 1665,

1 1545 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 MB
120 (forma 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.).
 v_{max} (KBr): 1665, 1555 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 cianoborohidru-
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 acuo-
sa 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-
yendo con agua, hidróxido amónico acuoso 0,05N y finalmente
25

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
5 capa fina a una muestra de referencia.

5

10

15

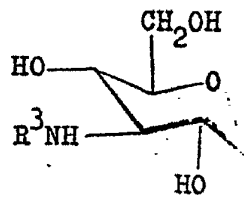
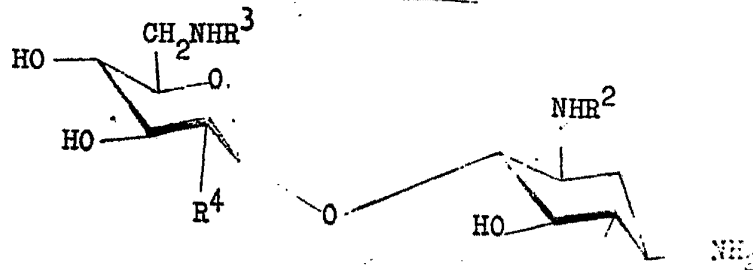
20

25

1 En resumen, la patente de invención que se solicita recaerá sobre las siguientes:

- REIVINDICACIONES -

5 1. Un procedimiento para la preparación de derivados de kanamicina de fórmula (II):



20 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 hidroxilo o un grupo NHR^3 , que consiste en la formilación de dicho compuesto donde R^2 es hidrógeno y R^3 y R^4 son los definidos anteriormente, seguida de hidrólisis selectiva para separar el grupo formilo de la posición 1-amino.

25 2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde R^3 es un grupo acetilo.

3. Un procedimiento según las Reivindicaciones 1, o

1 2, donde el material de partida de fórmula (II) donde
R² es hidrógeno es 3",6'-di-N-acetil-kanamicina A.

4. Un procedimiento según las Reivindicaciones 1 ó
2, donde el material de partida de fórmula (II) donde R²
5 es hidrógeno, es 2',3",6'-tri-N-acetil-kanamicina B.

5. Un procedimiento según cualquiera de las Reivin-
dicaciones 1 a 4, donde la formilación se realiza con for-
miato de 4-nitrofenilo.

6. Un procedimiento según la Reivindicación 5, don-
10 de la formilación se realiza en un disolvente orgánico -
acuoso, en presencia de una base.

7. Un procedimiento según cualquiera de las Reivin-
dicaciones 1 a 6, donde la hidrólisis selectiva se reali-
za con hidróxido sódico o potásico diluido.

8. Un procedimiento según la Reivindicación 7, don-
15 de la hidrólisis selectiva se realiza a un pH de 12,0 a
12,5.

9. Un procedimiento según la reivindicación 1, don-
de el compuesto obtenido es 3",6'-di-N-Acetil-3-N-formil-
20 kanamicina A.

10. Un procedimiento según la reivindicación 1, don-
de el compuesto obtenido es 2',3",6'-tri-N-acetil-3-N-for-
mil-kanamicina B.

11. Se reivindica por último como objeto sobre el que
25 ha de recaer la patente de invención que se solicita: UN -

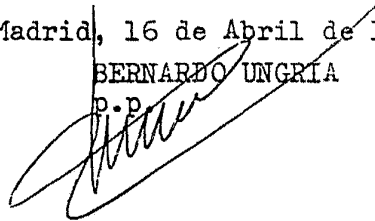
1 PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE DERIVADOS DE KANA-
MICINA.

 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente memoria descriptiva que consta de veintidos pá-
5 ginas mecanografiadas.

Madrid, 16 de Abril de 1.979

BERNARDO UNGRIA

p.p.



10

15

20

25