

46
25j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

*ADAPTACION DE LA TECNOLOGIA QUIMICA
PARA LA SINTESIS DE AMIKACINA*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

JUAN CARLOS TREVIÑO VAZQUEZ



México, D. F. 1992



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCION.....	1
2. FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	3
2.1 Antecedentes de Antibióticos Aminoglucósidos.....	3
2.2 Resistencia a los Aminoglucósidos.....	7
2.3 Rutas Sintéticas de Amikacina.....	10
3. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
4. OBJETIVOS.....	20
5. HIPOTESIS.....	21
6. MATERIAL . PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS.....	22
6.1 Reactivos.....	22
6.2 Equipo.....	23
6.3 Parte Experimental y Resultados.....	24
7. DISCUSION DE RESULTADOS.....	31
8. CONCLUSIONES.....	34
9. ESPECTROS.....	35
10. BIBLIOGRAFIA.....	39

1. INTRODUCCION

El elevado consumo de antibióticos en el país¹, y la necesidad de obtener nuevos y mejores fármacos para el tratamiento de la tuberculosis, ha propiciado la aparición de nuevos compuestos. En el área de los antibióticos aminoglucósidos (Figura 3), se encuentra la Amikacina (VI) (Fig. 1), que es un derivado semisintético de la N-acilación de la Kanamicina A (Figura 1).

La Amikacina está incluida dentro del Cuadro Básico de Medicamentos² y ha tenido gran demanda por parte del Sector Salud, debido a su eficiente actividad bactericida; no obstante su elevado costo, así como sus efectos tóxicos en oído y riñón.

La selección de un proceso industrial para la producción de Amikacina, requiere de información técnica, económica y de mercado; en este caso, por ser un principio activo de reciente aparición en el mercado, la información es confidencial o publicada sólo a través de patentes.

Dentro de este panorama se iniciará el proceso de plantear diferentes alternativas de preparación, para llevarlas a cabo en el laboratorio, y posteriormente continuar con los trabajos de optimización y escalamiento en la planta.

El riesgo que plantea este proyecto, así como el esfuerzo técnico y económico, deben ser tomados por empresas que forman la Industria Química Farmacéutica Nacional, para que partiendo del proyecto obtengan sus beneficios como son: el desarrollo de tecnología propia, la creación de una infraestructura para producir principios activos del tipo aminoglucósido o similares, disminución de la dependencia externa, abastecimiento y competitividad en el mercado nacional, y a mediano plazo incursionar en el mercado internacional.

Los métodos de preparación de Amikacina se inician con la Kanamicina A (IIIa) (Figura 2), que es materia prima disponible en el país, sometiéndola a una N-acilación con el éster activo del ácido L(-)-4-amino-2-hidroxil-

butanoico(L-HABA)(Figura 1),para obtener la Amikacina y sus tres isómeros(Figura 1).

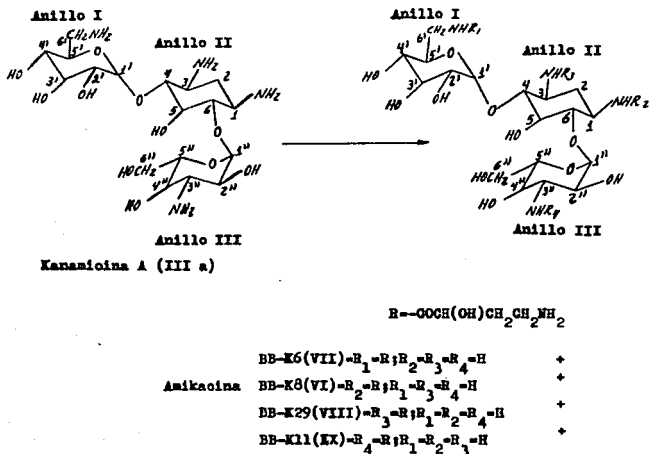


Figura 1. Obtención de Amikacina y sus isómeros

La Amikacina cumple con las especificaciones de la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos.

+ Las siglas BB-K significan Bristol-Banyou-Kanamicina, que se refiere a la empresa que la descubrió y a la materia prima.

2. FUNDAMENTACION DEL TEMA

2.1 Antecedentes de Antibióticos Aminoglucósidos

Los antibióticos, sustancias químicas producidas por diferentes microorganismos, que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y pueden eventualmente destruirlos, se clasifican y agrupan de diversas formas. Las clasificaciones propuestas se basan en: fuente microbiológica, estructura química, mecanismo de acción y actividad antimicrobiana^{3,4}.

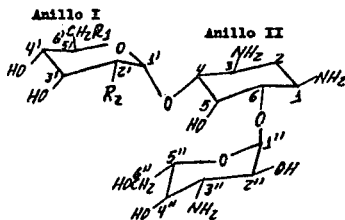
La clasificación más común se basa en la combinación entre la estructura química y el mecanismo de acción, de la siguiente manera: 1) agentes que inhiben la síntesis de proteínas o activan las enzimas que rompen las paredes celulares bacterianas, causando la pérdida de la viabilidad y a menudo lisis celular; los mismos incluyen penicilinas y cefalosporinas, de estructura semejante, y agentes tan disímiles como la cicloserina, vancomicina, ristocetina y bacitracina; 2) los agentes que actúan directamente sobre la membrana celular afectando su permeabilidad y produciendo filtración de compuestos intracelulares; incluyen a los detergentes como la polimixina y el colimastato, y a los agentes antifúngicos de polieno tales como nistatina y anfotericina B, que se unen a los esteroides de la pared celular; 3) los agentes que afectan la función de los ribosomas bacterianos causando inhibición reversible de la síntesis de proteínas; estos fármacos bacteriostáticos incluyen al cloranfenicol y a las tetraciclinas

Los antibióticos macrólidos como la eritromicina, lincoamicina y su análogo conocido, clindamicina, también son parte de este grupo; 4) agentes que se unen a la cadena ribosomal 30 S, y causan la acumulación de complejos iniciales de la síntesis proteica, lectura errónea del código RNA mensajero y producción de polipeptidos anormales; incluyen al grupo de los aminoglucósidos que son bactericidas; 5) agentes que afectan el metabolismo del ácido nucleico, como la rifampicina, que inhibe la RNA polimerasa dependiente del DNA; 6) los antimetabólitos incluyendo al trimetoprima y a las sulfonamidas, que bloquean pasos metabólicos esenciales para el mi-

croorganismo^{3,4}.

Dentro de la clasificación anterior se encuentra el grupo de antibióticos aminoglucoídicos, que son fármacos formados por aminoazúcares en unión glucosídica (Figuras 1, 2, 3), útiles en el tratamiento de infecciones sistémicas graves, causadas por bacilos anaeróbicos gram-negativos, aunque existen bacterias anaeróbicas resistentes a ellos. Actúan directamente sobre los ribosomas bacterianos inhibiendo la síntesis de proteínas e interfiriendo en la transmisión del mensaje genético^{3,4}.

Los aminoglucoídicos están representados, principalmente por estreptomicina (I), neomicina (II), kanamicina (III), gentamicina (IV), tobramicina (V), y amikacina (VI).



Anillo III

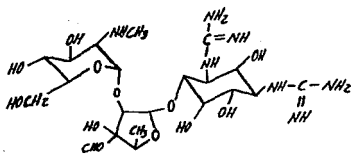
IIIa kan A:R₁-NH₂;R₂-OH

IIIb kan B:R₁-NH₂;R₂-NH₂

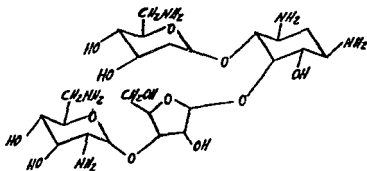
IIIc kan C:R₁-OH;R₂-NH₂

Kanamicina (III)

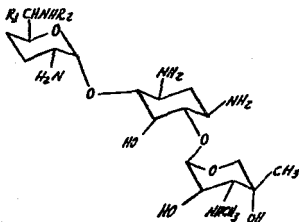
Figura 2. Estructura de los tres tipos de kanamicina.



Streptomycina (I)



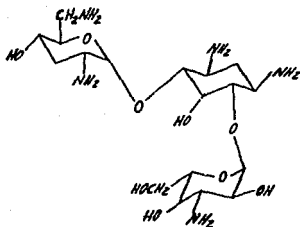
Neomicina (II)


 $C_1:R_1-R_2-CH_3$ (IVa) Gentamicina

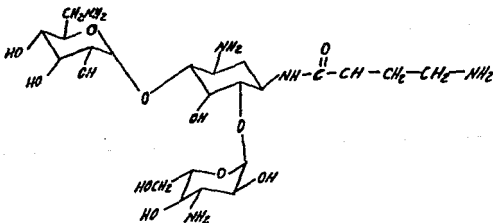
 $C_2:R_1-CH_3;R_2-H$ (IVb)

 $C_{1a}:R_1-R_2-H$ (IVc)

Gentamicina (IV)



Tobramicina (V)



Amikacina (VI)

Los aminoglucoídos consisten en dos o más aminoazúcares unidos por enlaces glucosídico a un núcleo de hexosa, generalmente central. Esta hexosa o aminociclitol, es estreptidina (en el caso de la estreptomina), 2-deoxiestreptamina (en el caso de los aminoglucoídos restantes) (Figuras 1, 2, 3). Los grupos de los aminoglucoídos se distinguen por los azúcares unidos al aminociclitol. En la familia de la neomicina, hay tres aminoazúcares unidos a la 2-deoxiestreptamina central, lo cual lo distingue de la familia de la kanamicina y de la gentamicina, que sólo tienen dos de estos aminoazúcares⁴.

En la familia de la kanamicina, que incluye: kanamicina A, B y C (Figura 2), amikacina (VI) y tobramicina (V), dos aminoazúcares se unen a una 2-deoxiestreptamina central, en los tres casos uno de los aminoazúcares es una 3-aminohexosa.

La tobramicina (V), difiere de la kanamicina B (IIIb), por la ausencia de un átomo de oxígeno en la posición 3' del aminoazúcar. I. La amikacina es un derivado semisintético, que se prepara a partir de kanamicina A, por acilación del grupo 1-amino de la 2-deoxiestreptamina con ácido L(-)-2-hidroxi-4-amino-butanoico (Figura 1). La gentamicina tiene un 3-aminoazúcar diferente (garosamina), en el anillo III.

La estreptomina difiere de los demás antibióticos aminoglucoídos, porque contiene estreptidina en el lugar de 2-deoxiestreptamina, y porque el aminociclitol no está en posición central.

2.2 Resistencia a los Aminoglucoídos

El empleo indiscriminado de antibióticos convencionales, las propiedades químicas de los mismos, así como las características bioquímicas inherentes a los microorganismos, han propiciado el desarrollo de especies bacterianas resistentes a los antibióticos más común, como son las penicilinas, las tetraciclinas y los macrólidos; lo cual ha venido a represen-

tar un serio problema en el tratamiento de infecciones bacterianas.

En el momento que se manifiesta la resistencia a los antibióticos convencionales, es recomendable el uso de antibióticos aminoglucoídicos, con potente acción bactericida, aunque también con mayor grado de toxicidad. Sin embargo, aún dentro de los aminoglucoídicos hay bacterias que ya presentan resistencia a ellos, específicamente a la estreptomocina, kanamicina y gentamicina^{3,4}.

El desarrollo de resistencia a los antibióticos implica un cambio genético estable, que se puede heredar de generación en generación. Puede operar cualquier mecanismo que altere la composición genética bacteriana.

Aunque la mutación es la causa más frecuente de la resistencia bacteriana, también puede adquirirse por transferencia de material genético de una bacteria a otra por transducción, transformación o conjugación³.

El más importante mecanismo de resistencia a los antibióticos aminoglucoídicos, comprende la modificación de la estructura del antibiótico, por parte de las enzimas bacterianas, localizadas en la membrana bacteriana, para producir un compuesto inactivo. Estas enzimas son capaces de acetilar fosforilar a los aminoglucoídicos en numerosos sitios³.

Las enzimas responsables de la inactivación de los aminoglucoídicos son codificadas por plásmidos, conocidos como factor R; estos factores pueden ser transferidos a otra bacteria por contacto directo y mediante un puente sexual en un proceso llamado conjugación³.

El material transferible consta de dos secuencias diferentes de DNA. La primera secuencia codifica la resistencia y se llama factor de resistencia (R), o plásmido determinante R. La segunda secuencia codifica un factor sexual para el aparato de transferencia, y se llama factor de transferencia de resistencia (FTR), o plásmido de factor de resistencia. Este DNA especifica la síntesis de aparatos sexuales esenciales para la transferencia conjugada del material genético³.

La manifestación de estos mecanismos de resistencia en los sitios de inactivación de la molécula, pueden ser estudiados tomando como base una

estructura de referencia (Kanamicina A. Ver Figura 4), estableciéndose ahí la presencia y posición de determinados grupos funcionales, así como la numeración de los anillos básicos que forman la estructura. El anillo I es importante, porque proporciona las características de amplio espectro a los aminoglucósidos y es el punto principal de ataque de las enzimas inactivadoras de las bacterias⁴ (Figura 4).

La acetilación en el carbono 6' o en el grupo amino de la posición 6' no disminuye drásticamente su actividad antibacteriana, y en cambio si le confiere resistencia a la acetilación enzimática en el grupo amino de la misma posición⁴. Los estudios de estas modificaciones y sus consecuencias constituyen una guía importante en el cambio de actividad de ciertos com puestos.

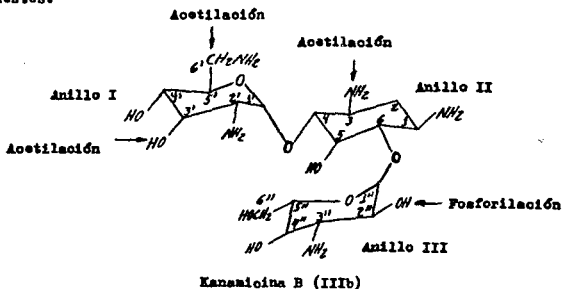


Figura 4. Estructura de la Kanamicina B y sitios de inactivación de las enzimas bacterianas.

Algunas modificaciones en los grupos funcionales del anillo II (deoxiestreptamina), no producen pérdida de actividad en la mayoría de los aminoglucósidos. Los grupos funcionales del anillo III son menos sensibles a los cambios estructurales, que los grupos funcionales de los anillos I, y II⁴ (Figura 4).

Del panorama expuesto anteriormente se justifica, que los esfuerzos recientes en el campo de los aminoglucósidos, están enfocados a la obtención de nuevos antibióticos, o a la modificación de los ya existentes, para obtener antibióticos que sean resistentes a la inactivación de las enzimas bacterianas. Un importante avance logrado en esta búsqueda es la obtención de la Amikacina, que es un aminoglucósido semisintético preparado por la N-acilación de la Kanamicina A con el éster del ácido L(-)-4-amino-2-hidroxi-butanoico(L-HABA)(Figura 1).

2.3 Rutas Sintéticas de Amikacina

Las rutas modernas para la síntesis de Amikacina que se encuentran descritas, se esquematizan a continuación^{5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15}.

La ruta A se inicia con la protección de los grupos amino pertenecientes a la Kanamicina A base libre, enseguida, por medio de una resina de intercambio iónico, se aisla el compuesto protegido en la posición marcada con el número 6^{5,6,7,8}.

El rendimiento descrito es del 45%. Este compuesto es acilado con el éster activo del ácido de N-hidroxisuociniimida-L-(-)-4-benciloxicarbonil amino-2-hidroxi-butanoico(XXII)^{5,6,7,8,9} para obtener(XI), que finalmente es sometido a una hidrólisis seguido de una hidrogenólisis para obtener amikacina base libre(VI)^{5,6,7,8}, y sus isómeros(VII), (VIII) y (IX)⁸, que son purificados con resinas de intercambio iónico⁹. El rendimiento descrito es de 22%.

La ruta B se asemeja a la ruta A; se inicia con la protección de los grupos amino de la Kanamicina A base, pero con el empleo de un grupo protector diferente al cloroformiato, en este caso se emplea un agente silanizante para obtener (XII)^{12,13,16}, el cual es tratado con un solvente prático para producir(XIII)^{12,13,16}, el cual es finalmente sometido a una hidrólisis en medio ácido, seguido de una hidrogenación para obtener

la base libre y sus isómeros (Figura 1), que al igual que en la ruta A, son purificados por intercambio iónico. El rendimiento reportado para Amikacina es de 60.25%.

La ruta C se inicia con la quelación de los grupos amino-hidroxil de la Kanamicina A base¹⁴ seguida de una acilación de los grupos amino disponibles para obtener (XV)¹⁵, el cual es sometido a una trifluoroacetilación, obteniendo (XVII); este compuesto es acilado con (XXII), finalmente es sometido a una hidrólisis en medio básico, seguido de una hidrogenólisis, para obtener Amikacina base libre, en un rendimiento mayor al 60%^{15,16}.

Los métodos de síntesis de Amikacina tienen varios pasos en común, y este es uno de los puntos que se toman en consideración en el momento de seleccionar la ruta de síntesis. Uno de estos puntos en común es la purificación, empleando resinas de intercambio iónico.

La ruta A y C requieren en dos ocasiones de este paso, mientras que la ruta B lo requiere sólo una vez; según lo reportado en la bibliografía la ruta B se puede realizar sin purificar la mayoría de sus intermedios, esta situación no es aclarada totalmente en la ruta C, que inicialmente llevó a cabo tres protecciones (quelación, trifluoroacetilación y carbobensoxilación). En cuanto al tiempo necesario para llevar a cabo cada una de las rutas, se encontró que, la ruta A necesita 72 horas, la B 17 horas, y la C 19 horas. En este aspecto es más atractiva la ruta B.

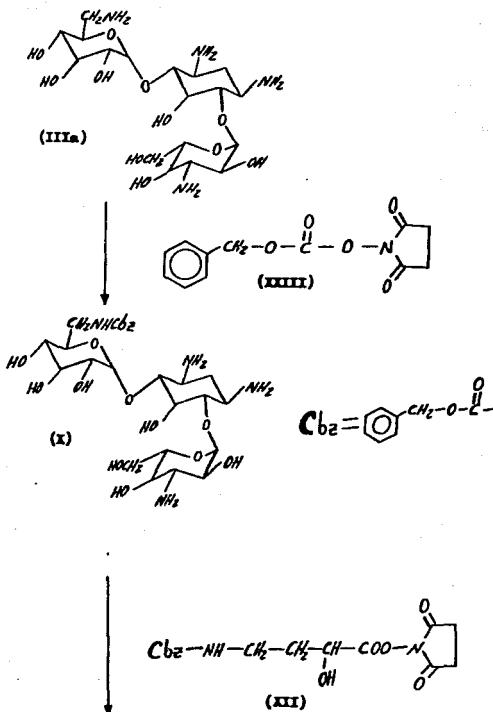
En el aspecto de costos el punto de referencia es el reactivo que se utiliza como grupo protector. El costo del cloroformiato (empleado en A y C para proteger las aminas de la Kanamicina), es mayor que el de los silanos, aunado a que en la ruta C también se realizan dos protecciones más, por medio de una quelación y de una trifluoroacetilación. Además proteger la Kanamicina con cloroformiato de bencilo representa un mayor costo y un proceso más largo, pero a cambio de ello no ofrece ventajas en cuanto a los rendimientos descritos.

En base al análisis anterior se concluye que método más atractivo

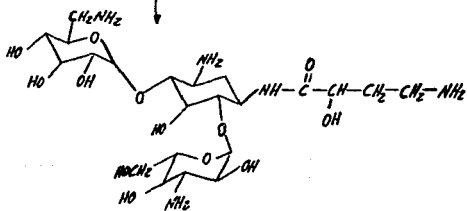
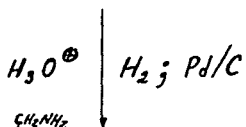
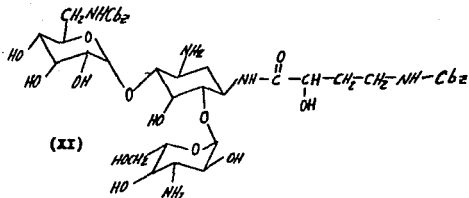
para la síntesis de Amikacina es el de la ruta B, debido a las siguientes razones:

- a) Presenta el rendimiento final más alto, al igual que la ruta C, pero sin el empleo de tres protecciones.
- b) Es la ruta con el menor tiempo de proceso.
- c) Es la ruta con el menor costo de materias primas, ya que a diferencia de las rutas A y C, utiliza un grupo protector más económico (agente silanizante), y no utiliza ningún otro tipo de protector como en la ruta C.
- d) Además no requiere la purificación de los productos intermedios, lo cual se manifiesta en el empleo de una cantidad menor de personal, equipo y número de procesos.

Ruta A 5,7,8

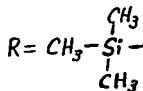
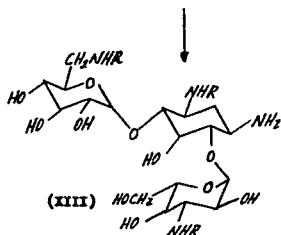
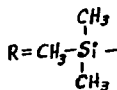
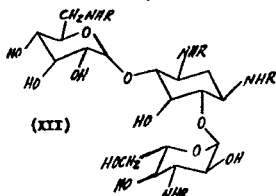
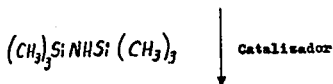
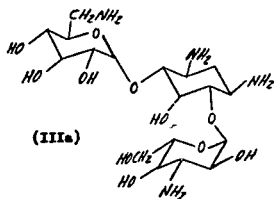


Esquema 1. Síntesis de Amikacina

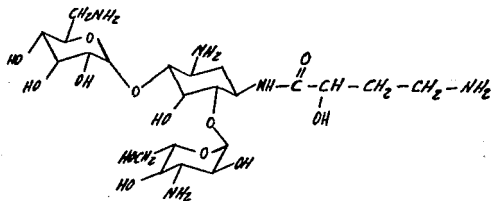
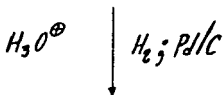
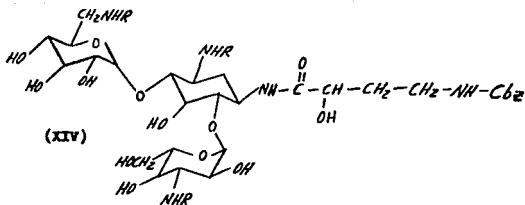
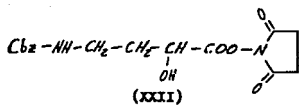


Amikacina (VI)

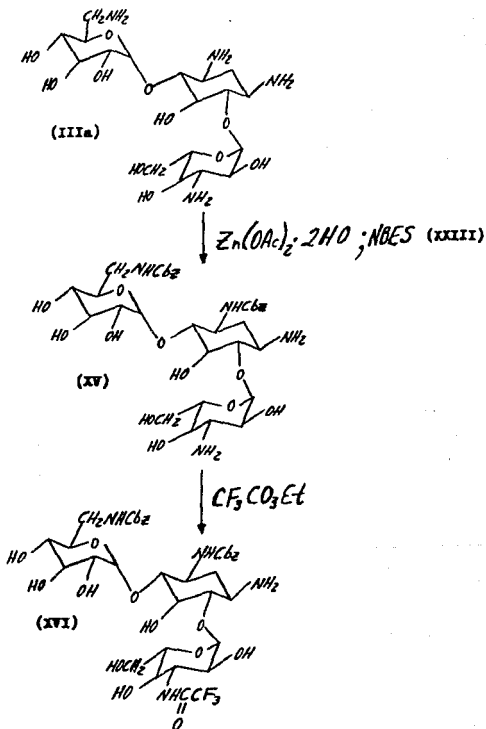
Ruta B 12,13



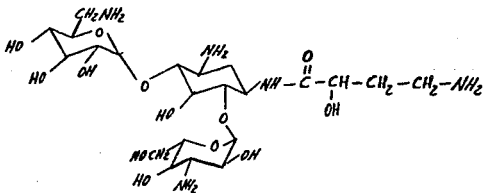
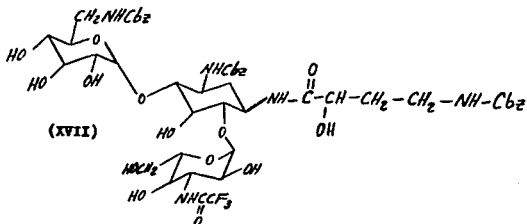
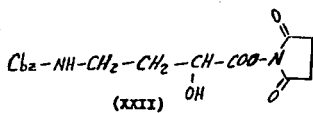
Esquema 2. Síntesis de Amikacina



Continúa. Esquema 2

Ruta C^{14,15}

Esquema 3. Síntesis de Amikacina



Amikacina (VI)

Continúa. Esquema 3

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El elevado consumo de antibióticos en el país, como la Amikacina, por parte del Sector Salud, así como el hecho de que la demanda de esta clase terapéutica no esté totalmente cubierta, ha estimulado a la Industria Farmacéutica Nacional a investigar, desarrollar o adaptar las tecnologías necesarias, para la producción de este tipo de principios activos. Esta iniciativa propicia una disminución de la dependencia tecnológica, crea una infraestructura tecnológica en esta área, abastece la demanda nacional del principio activo, y económicamente disminuye la salida de divisas a través de su importación.

La adaptación de tecnología química para la obtención de Amikacina, que se inicia en el laboratorio, forma parte de una serie de acciones tecnológicas que culminarán con su industrialización, mismas que incluyen la adaptación implementación y desarrollo de procesos químicos, que durante su evolución crean una infraestructura propia, partiendo siempre que sea posible de materias primas nacionales, y con el personal y equipo disponibles en la empresa.

4. OBJETIVOS

- Los objetivos planteados al inicio de este trabajo son los siguientes:
- a) A partir del sulfato de Kanamicina(XVIII), para obtener la Kanamicina base libre.
 - b) Obtener el éster activo del ácido L(-)-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxi-butanoico(XXII).
 - c) Obtener Kanamicina protegida(XII), en sus grupos hidroxilo y amino, con un grupo funcional que se elimine fácilmente(grupo trimetilsililo)(XXVI).
 - d) Obtener Kanamicina desprotegida parcialmente(XIII), y unirla al éster activo, obtenido en el objetivo b.
 - e) Remover los grupos protectores, por medio de una hidrólisis seguida de una hidrogenólisis con Pd/C, para obtener Amikacina cruda y sus isómeros(Figura 1).
 - f) Purificar la Amikacina(VI), por medio de resinas de intercambio iónico.
 - g) Purificar, cuantificar y caracterizar los intermedios obtenidos, a través de métodos comparativos(HPLC, TLC). Así como, por sus constantes físicas, o métodos complementarios como espectroscopia infrarroja y resonancia magnética nuclear.

5. HIPOTESIS

Una ruta de síntesis para la Amikacina es la silanización de la Kanamicina base libre, para proteger los grupos amino disponibles. Este compuesto protegido, mediante el tratamiento con un disolvente prótico produce un compuesto intermedio que presenta a la amina de la posición 1, (Ver página 2-Figura 1), del anillo II, libre para ser acilada con el éster activo del ácido L(-)-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxi-butanoico (XII). Este compuesto obtenido se hidroliza y enseguida se hidrogena con Paladio sobre carbono, para obtener Amikacina.

6. MATERIAL Y PARTE EXPERIMENTAL

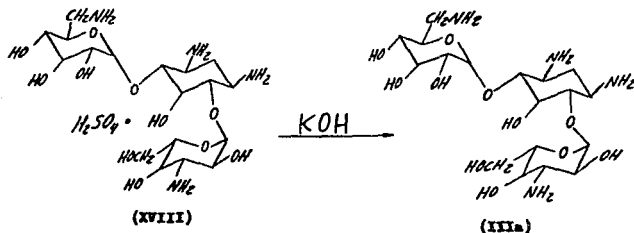
6.1 Reactivos

Acetona	J.T. Baker
Acetonitrilo	J.T. Baker
Agua desionizada	
Acido sulfúrico	Industrial
Acido clorhídrico	Industrial
Acido L(-)-4-amino-2-hidroxitbutanoico	
Hexametildisilazano	Aldrich
Hidróxido de Amonio	J.T. Baker
Hidróxido de Sodio	Industrial
Metanol	Industrial
Paladio sobre Carbono	Aldrich
Resinas de intercambio iónico	Rohm and Hass
Sulfato de Kanamicina	Aldrich

6.2 Equipo

Farrillas de agitación y calentamiento	Sybro	
Espectrofotómetro I.R.	Perkin-Elmer	Spectronic
Espectrofotómetro U.V. y Visible	Bausch & Lomb	<u>1420</u>
Rotavapor	Buchi	011
Balanza analítica	Mettler	AR 100
Balanza granataria	Ohaus	
Lámpara de U.V.	U.L.	399-1
Estufa	Felisa	291
Aparato para medir punto de fusión	Mettler	FP 61
Cromatoplaacas	Merck	GF 254
Cromatógrafo de líquidos de alta presión	Hewlett Packard	1090
Cromatógrafo de gases	Hewlett Packard	5890
Espectrómetro de RMN ¹ H	Varian	EM 360

6.3 Parte Experimental y Resultados

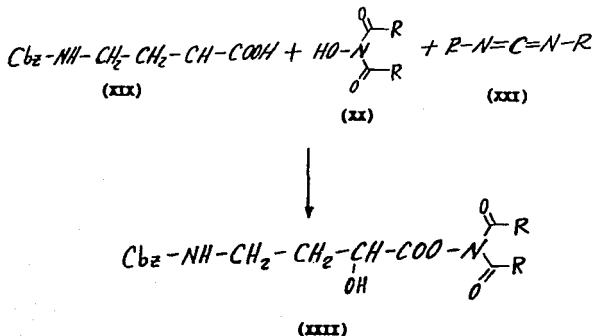
Libración de Sulfato de Kanamicina(XVIII), para Obtener Kanamicina base libre(III a)⁹.

En un vaso de precipitados se disuelven dos partes de hidróxido de potasio en dos partes de alcohol, se le adiciona una parte de sulfato de Kanamicina, con vigorosa agitación, se calienta entre 45-65°C por 2 hrs.

Esta mezcla es agitada hasta lograr la precipitación de la Kanamicina base libre, la cual es filtrada y lavada con metanol. La cantidad de sulfato de Kanamicina liberada se determina por un ensayo ácido-base.

El ensayo ácido-base mostró una liberación a Kanamicina base libre (III a) del orden de 99-99.5%.

Obtención de Éster Activo del Ácido de N-Hidroxisuccinimida-L(-)-4-benciloxycarbonilamino-2-hidroxi-butanoico (XXII)^{6,7,8,13}.



Una solución conteniendo una parte de ácido L(-)-4-benciloxycarbonilamino-2-hidroxi-butanoico, y una parte de alcohol aromático, en 200 ml de acetato de etilo, la mezcla es enfriada a 0°C, enseguida se le adiciona una parte de un agente deshidratante. Todo en condiciones anhidras. La mezcla se agita a baja temperatura y se deja en reposo toda la noche. El precipitado formado se separa por filtración. El filtrado es concentrado para obtener cristales. El nuevo filtrado se evapora a sequedad y el residuo cristalino es lavado con 20 ml de una mezcla de benceno-*n*-hexano, para obtener una cantidad extra de éster activo.

El progreso de la reacción es seguido por cromatografía en capa fina y revelado con luz U.V.. El final de la reacción se detectó por cromato-

grafía de alta resolución, comparándolo contra un estándar, y observando la desaparición de la materia prima. Además se determinó el punto de fusión y se comparó contra el punto de fusión descrito.

Punto de fusión: 120°C (reportado 121-122.5°C) Recristalizado. No está corregido.

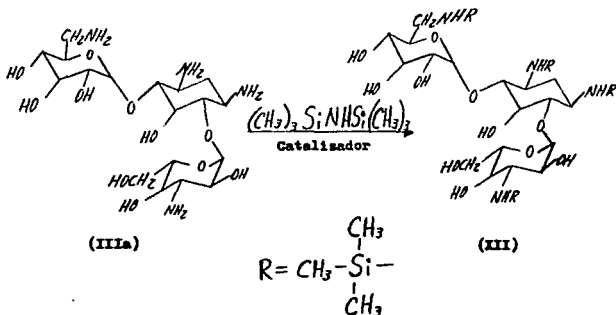
Rendimiento: 80% (reportado 92%).

I.R. (KBr) 1105 cm^{-1} (-O-); 1680 cm^{-1} (C=O, amida); 1735 cm^{-1} (C=O, éster); 1755 y 1810 cm^{-1} (C=O, succinimida); 3315 cm^{-1} (-NH-).

Resonancia Magnética Nuclear ^1H (DMSO + CDCl_3 + D_2O):
 (en p.p.m.) 2.0 (2H, m, CH_2); 3.37 (2H, d-d, CH_2 - C_6H_5); 4.99 (2H, s, CH_2); 6.3 (2H, CH_2); 2.83 (4H, s, succinimida); 4.56 (1H, m, -NH-); 7.23 (5H, s, C_6H_5).

Por cromatografía de líquidos de alta resolución se reporta 98% de éster activo, con un tiempo de retención de 7.1-7.2 minutos. (Ver Cromatografía 1 en la sección de espectros).

Silanización de Kanamicina base (III a) para obtener Kanamicina Silanizada (XII) [2,1].

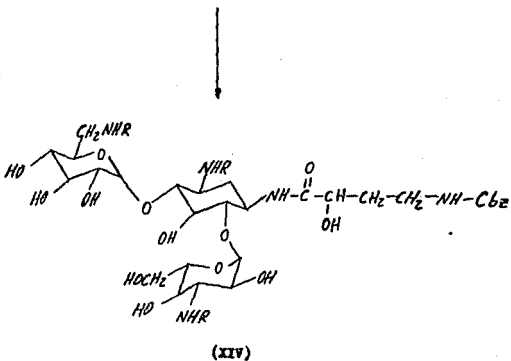
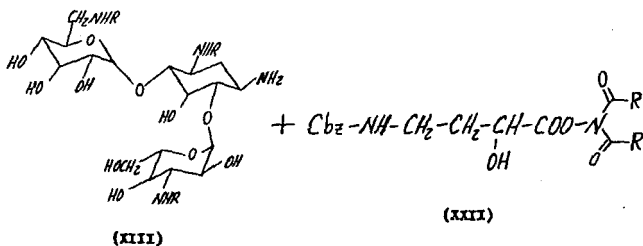


En un matraz balón de tres bocas equipado con termómetro, refrigerante, trampa para agua, y trampa para humedad, se suspende una parte de Kanamicina base libre en cuatro partes de un halogenuro de alquilo (dicloroetano). Todo en condiciones anhidras. A la suspensión se le adicionan tres partes de hexmetildisilazano y entre 5-10% de catalizador. La mezcla se calienta hasta obtener la Kanamicina silanizada. El seguimiento de la reacción se realiza por cromatografía en capa fina por cromatografía de gases se determina el final de la reacción.

La kanamicina silanizada muestra un grado de silanización de 7-8 equivalentes. Esta determinación se realizó por diferencia de pesos.

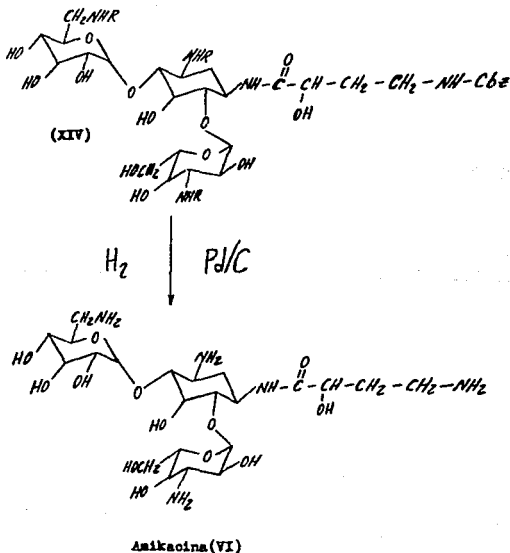
El rendimiento fue de 20-30%.

Desprotección Selectiva de (XII), Para Obtener (XIII), y Acilación con el
Ester de N-Hidroxisuccinimida-L-(-)-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxi-
butanoico (XXII), para obtener el complejo (XIV)^{12,13}.



A la mezcla que contiene la Kanamicina silylizada se le destila el disolvente, se agita en diez partes de alcohol-agua a baja temperatura, la mezcla es acilada, con el éster activo del ácido L(-)-4-benciloxicarbonil-asino-2-hidroxi-butanoico. Al terminar la reacción adicionar acetona con agitación. Manteniendo la temperatura, continuar la agitación. Eliminar el disolvente aplicando alto vacío. El progreso de la reacción es seguido por cromatografía en capa fina, hasta la desaparición del éster activo.

Obtención de Amikacina Cruda (VI), a Partir del Complejo (XIV)^{12,13}



A la solución obtenida anteriormente se le ajusta el pH en ácido y se coloca en un hidrogenador se le adiciona Paladio sobre Carbono como catalizador; se somete a presión de hidrógeno. El avance de la reacción se determina por cromatografía en capa fina. La Amikacina formada se cuantifica por cromatografía de líquidos de alta resolución, obteniéndose un valor de 58%.

Purificación por Intercambio Iónico 5,6,7,8,11,13

La mezcla resultante de la hidrogenación, se aplica sobre una columna de intercambio iónico, empacada con resina CG-50, y se eluye con hidróxido de amonio. Las fracciones que contienen Amikacina pura son concentradas y tratadas con ácido sulfúrico para obtener sulfato de Amikacina, el cual es precipitado con un alcohol alifático. (Para ver la estructura de Amikacina y sus isómeros, consultar la figura 1, en la página 2).

El rendimiento global del método es de 33%.

El producto es sometido a las siguientes especificaciones:

Especificaciones	Resultados
Rotación específica	+98
pH (potenciométrico)	4
Humedad (Karl-Fisher)	7%
Ensayo Microbiológico	672 mg/mg
Sulfatos	24%
Ensayo HPLC	Cumple contra un estándar
Identificación HPLC	Cumple contra un estándar
Identificación TLC	Cumple contra un estándar

7. DISCUSION DE RESULTADOS

La ruta sintética elegida consta de siete etapas:

- 1) Liberación del sulfato de kanamicina.
- 2) Obtención del éster del ácido de N-hidroxisuocinimida-L(-)-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxi-butanoico (éster activo).
- 3) Silanización de la kanamicina base libre.
- 4) Desprotección selectiva de la kanamicina silanizada.
- 5) Acilación con el éster activo
- 6) Obtención de amikacina cruda
- 7) Purificación por intercambio iónico de amikacina

El objetivo de la primera etapa es la obtención de la kanamicina base, con todos sus grupos amino disponibles; esto se logra realizando una reacción ácido-base, entre los iones sulfato unidos a la kanamicina y una base fuerte como el hidróxido de potasio. La mezcla de reacción obtenida contiene sulfato de kanamicina, sales, hidróxido de potasio y kanamicina base. Esta última no se aisló pues el resto de los componentes de la mezcla no interfieren en las reacciones posteriores. La cantidad de sulfato de kanamicina que no se liberó se determinó por un ensayo ácido-base, obteniéndose una cantidad residual sin liberar menor al 1%.

La segunda etapa es la obtención del éster activo del ácido L(-)-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxi-butanoico, empleando un alcohol como la N-hidroxisuocinimida, y un agente deshidratante que desplace la reacción hacia los productos, en este caso la dicitolohexilcarbodiimida. La sensibilidad del éster a la humedad dificulta su aislamiento, sin embargo el producto aislado presenta las señales reportadas para el infrarrojo y para la espectroscopía R.M.N. ^1H , espectro 1 y 2.

En el espectro 1 se observan las señales características para cada uno de los siguientes grupos del éster activo: a 1105 cm^{-1} aparece la señal del éster; a 1680 cm^{-1} aparece la señal del carbonilo de la amida; a

1735 cm^{-1} aparece la señal del carbonilo del éster; 1755 y 1810 aparecen dos señales correspondientes a los carbonilos de la succinimida; finalmente a 3315 cm^{-1} aparece la señal de la amina secundaria.

En resonancia magnética nuclear aparecen las siguientes señales: (en p.p.m.) en 2.0, 3.37, 4.99 y 6.3, aparecen las señales para los protones de los metilenos; en 2.83 aparece el singulete de los cuatro protones de la succinimida; en 4.56 aparece la señal del protón de la amina; finalmente en 7.23 aparece el otro singulete correspondiente a los protones aromáticos.

La tercera etapa es la silanización de todos los grupos hidroxilo de la kanamicina base libre. Esta reacción se llevó a cabo, empleando un fuerte agente silanizante como es el hexametildisilazano y un catalizador.

Cuando el primero de ellos llega a un nivel del orden del 8% la reacción se da por concluida. El producto no fué aislado.

La cuarta etapa es la desprotección selectiva de la kanamicina silanizada, para ello se emplea un agente capaz de romper las protecciones. En este punto la identificación o cuantificación del intermedio es muy difícil, y de hecho en la práctica, la realización de una buena desprotección se determina al final de la ruta sintética.

La quinta etapa, la acilación con el éster activo, es el paso determinante de la reacción, y está en función del tiempo de contacto y de la cantidad del agente que va a romper las protecciones, debido a que en este paso, la reactividad inicial de las aminas de la kanamicina se encuentra alterada. El producto intermedio no fué aislado, y la reacción fué seguida por la desaparición de la materia prima (éster activo, básicamente).

El sexto paso, consiste en romper todos los grupos protectores, que se encuentran sin reaccionar, y que se encuentran unidos a la molécula de amikacina. El producto obtenido, hasta aquí, todavía se encuentra en mezcla con sus tres isómeros, por lo que se emplea el método de HPLC para cuantificar

ficarlo. El sistema de HPLC funciona a partir del bombeo de una mezcla de disolventes, para arrastrar la muestra previamente inyectada, a través de la columna empacada. La temperatura de la columna así como el flujo de los disolventes están controlados. Debido a que este modelo de HPLC detecta compuestos que absorban en la región de U.V., es necesario formar un derivado con la mezcla para que el compuesto sea detectado.

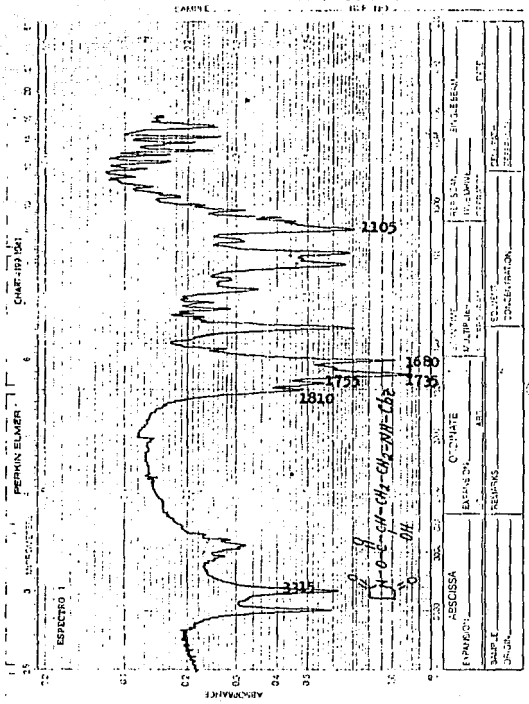
El séptimo paso, consisten en separar la amikacina de sus isómeros, por medio de una resina de intercambio iónico, para posteriormente obtener el sulfato de Amikacina.

8. CONCLUSIONES

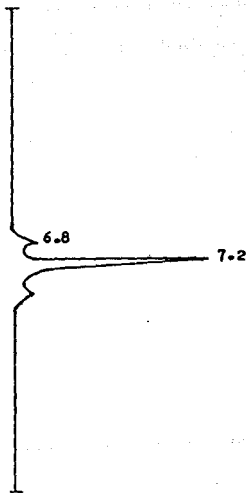
En base a los resultados obtenidos, se concluye que la ruta elegida, B, parece ser la adecuada para obtener el sulfato de Amikacina, el cual cumple con las especificaciones de la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, y es apta para el consumo humano. Además es una ruta atractiva para escalarla a nivel industrial.

Tomando en cuenta su rendimiento, y el costo de la materia prima, también es atractiva en el aspecto económico. Aunque es necesario continuar la búsqueda de mejores rendimientos, con el empleo de otros agentes silanizantes.

9. ESPECTROS



Espectro 1



**Cromatograma 1. Cromatograma por Cromatografía de Líquidos de
Alta Resolución del Ester Activo (XII).**

10. BIBLIOGRAFIA

1. Foro Sobre Empresas Multinacionales y Transferencia de Tecnología en el Ramo de la Industria Químico Farmacéutica, Primera Edición, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México, 1979, p.p. 34.
2. Cuadro Básico de Medicamentos del Sector Salud, Consejo de Salubridad General, 1984.
3. Goodman, A., Gilman, A., Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, Sexta Edición, Edit. Panamericana, México, 1982, p.p. 640.
4. Doerge, Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, Eighth Ed., J.B. Lippincot Company, U.S.A., 1982, p.p. 258.
5. Kawaguchi, H., Naito, T., Nakagawa, S., Fujisawa, K., J. Antibiotics, **25**, 695, (1972).
6. Kawaguchi, H., Naito, T., Nakagawa, S.; U.S. Patent; Bristol-Myers Co.; Antibiotics derivatives of Kanamycin; **3**, 781, 268; Dec. 25, 1973.
7. Schreiber, R.; Keit, J.; Bristol-Myers Co.; U.S. Patent; Process for the preparation of 1-[L(-)-]-amino- α -hydroxybutyryl]-Kanamycin A; **3**, 974, 137; Aug. 10, 1976.
8. Sittig, Marshall; Pharmaceutical Manufacturing Encyclopedia; Noyes Data Corporation; U.S.A.; 1979; p.p. 22.
9. Martin, J.; et al.; J. Chem. Soc. Chem. Commun.; 1979; p.p. 266.
10. Takayuki, N.; et al.; J. Antibiotics; **26** (5); 297; 1973.
11. Umezawa, H., Kondo S.; Methods in Enzymology; **43**; 263; 1975.
12. Rinehart, K., Suami, T.; Aminocyclitol Antibiotics; ACS Symposium Series; American Chemical Society; Washington D.C.; 1980; p.p. 247.
13. Cron, M.J.; U.S. Patent; Bristol-Myers Co.; Preparation of 1-N-[L-amino- α -hydroxyalkanoyl-] aminoglycoside polysilylated antibiotics and products obtained therefrom; **4**, 347, 354; Oct. 1, 1980.
14. Hanessian, S., Patil G.; Tetrahedron Letters; **34**, (12), 1978, p.p. 1035.
15. Tsuchiya, T., Takagi, Y., Umezawa, S.; Tetrahedron Letters; **35**; (51); 1979; p.p. 4951.

16. Pierce, Alan, E.; *Silylation of Organic Compounds*; Fourth Printing; Pierce Chemical Company; U.S.A.; 1982; p.p. 7-24, 40-63, 191-192.
17. Offord, R., E.; *Semysynthetic Proteins*; John Wiley and Sons; Great Britain 1980; p.p. 1-19.
18. Pierce.; 1988 Handbook and General Catalog; U.S.A.; 1988; p.p. 144-156.