

21
2ej

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

" ZARAGOZA "

UNAM

Adaptación de la Tecnología para la
preparación de Ac.L-(-)-4-benciloxi
carbonilamino-2-hidroxi**but**írico.
(CADENA LATERAL DE AMIKACINA)

T E S I S

Que para obtener el Título de
Químico Farmacéutico Biólogo.

PRESENTA

Héctor Hugo Hernández Mendoza.

MEXICO, D.F. 1990

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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

1. INTRODUCCION.....	1
2. FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	3
2.1 Antecedentes de los Aminoglucósidos.....	3
2.2 Relación Estructura-Actividad.....	6
2.3 Resistencia a los Aminoglucósidos.....	7
2.4 Criterios de Selección de la Ruta de Síntesis.....	13
2.4.1 Preparación de L-(-)-HABA, a partir de L-(+)-glutamato - monosódico.....	13
2.4.2 Preparación de L-(-)-HABA, de ac.L-(-)-2,4-diaminobutírico	14
2.4.3 Preparación de L-(-)-HABA, a partir de ac.L-(-)-2-aminosuc- cinámico.....	14
2.4.4 Síntesis de DL-HABA, a partir de metacrilato de metilo y - un ester nitronico.....	14
2.4.5 Síntesis de DL-HABA, partiendo de 2-pirrolidona.....	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
4. OBJETIVOS.....	22
5. HIPOTESIS.....	23
6. MATERIAL Y METODO.....	24
6.1 Reactivos.....	24
6.2 Equipo.....	25
6.3 Consideración Previa.....	26
7. DESARROLLO DE TRABAJO.....	27
7.1 Métodos.....	27
7.2 Resultados.....	31

8. DISCUSION.....	34
9. CONCLUSIONES.....	37
10. ESPECTROS.....	39
11. BIBLIOGRAFIA.....	47

INTRODUCCION

La amikacina es un aminoglucósido semisintético obtenido por acilación de kanamicina A con ácido-L-(-)-4-amino-2-hidroxi-butírico, sobre la posición uno del anillo de deoxiestreptamina, este derivado además de ser activo, es resistente al ataque por enzimas inactivantes bacterianas, lo que no es característico en otros aminoglucósidos, incluyendo la gentamicina y tobramicina. En realidad la amikacina es resistente a la mayoría de las enzimas inactivantes de aminoglucósidos conocidas, excepto a la aminoacil transferasa la cual acetila el grupo amino en la posición número seis prima de los aminoglucósidos.

Estudios preliminares indican que la amikacina es menos tóxica que kanamicina y gentamicina, encontrándose que se requieren altas dosis para el tratamiento de algunas infecciones bacilarias gram-negativas. Por esta razón y la proliferación de cepas bacterianas resistentes a estos, la amikacina es correctamente recomendada para el tratamiento de infecciones serias.

Tomando en cuenta lo anterior, se trata de encontrar la mejor forma de preparar amikacina y que además involucre la utilización de materias primas disponibles, preferentemente producidas en el país, y de esta manera que la industria nacional lo fabrique y lo lleve a un nivel competitivo con el producto de importación.

Como consecuencia de esto el país ahorra divisas y disminuye la dependencia de exterior.

La preparación de amikacina consta de dos partes.

- a)- Preparación del ácido-L-(-)-4-amino-2-hidroxi-butírico previamente protegido con cloroformiato de bencilo (Cbz).

b)- Acilación de kanamicina A con el aminoácido y su posterior purificación por cromatografía de intercambio iónico.

En el presente trabajo se describe la preparación del ácido-L-(-)-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxi-butírico partiendo de L-(+)-glutamato monosódico que es una materia prima de producción nacional. Como se puede observar, se parte de un material ópticamente activo con una esterequímica definida, lo que da un producto que retiene su configuración al final de la secuencia de reacciones.

Con el L-(+)-glutamato monosódico se lleva a cabo una reacción de diazoación utilizando nitrito de sodio y ácido clorhídrico, misma que da una sustitución del grupo azo por agua, este a su vez sufre una deshidratación interna para formar el compuesto más estable que es la lactona, que al someterla a una aminólisis, produce el ácido-L-(+)-2-hidroxi-glutarámico, y a través de una degradación de Hofmann en condiciones alcalinas con hipoclorito de sodio, da el ácido-L-(-)-4-amino-2-hidroxi-butírico L-(-)-HABA, que al tratarlo con cloroformiato de bencilo proporciona el producto que se desea, mismo que unido a la amikacina le da la potencia frente a cepas resistentes en comparación con los isómeros D-(+)-HABA y DL-HABA.

FUNDAMENTACION DEL TEMA

2.1 Antecedentes de los Aminoglucósidos.

La poca eficacia de la penicilina G en el tratamiento de infecciones debidas a microorganismos aerobios gram-negativos fué el principal estímulo para llevar a cabo la búsqueda de agentes antimicrobianos efectivos.

El desarrollo de la estreptomina fué el resultado de una búsqueda científica bien planeada de sustancias antibacterianas.

Antes de que esto sucediera, se tuvieron que analizar numerosos actinomicetos de suelo demostrándose que producían sustancias capaces de inhibir su crecimiento pero ninguno fué clínicamente útil debido a su alta toxicidad. No fué si no hasta que se logró aislar una cepa de Streptomyces griseus la cual produjo una potente sustancia a la que se le denominó estreptomina, misma que se comprobó que inhibía el crecimiento del bacilo de la tuberculosis, y de muchos microorganismos gram-negativos.

Todo esto desencadenó un gran número de investigaciones a nivel mundial para la obtención de principios activos provenientes de actinomicetos, principalmente del género streptomyces. Algunos antibióticos aislados de este género, son compuestos parecidos estructuralmente a estreptomina.

Los aminoglucósidos consisten de dos ó más aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un núcleo de hexosa generalmente central.

Esta hexosa o aminociclitol es denominado estreptidina (Fig. I), que se encuentra contenida en la estreptomina; o la 2-deoxiestreptamina (Fig. II), que es característica de los restantes aminoglucósidos (kanamicina, neomicina, tobramicina y paromomicina).

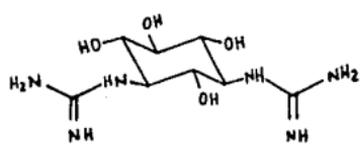


Fig. I Estreptidina

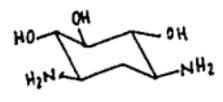


Fig. II 2-Deoxistreptamina

La familia de los aminoglucósidos se caracterizan por el número de aminoazúcares unidos al aminociclitol. En la familia de neomicina (Fig. III), de las cuales incluyen paromomicina, ribostamicina y lividomicina (estos - últimos no se usan clínicamente), hay tres aminoazúcares unidos a la 2-deoxistreptamina central.

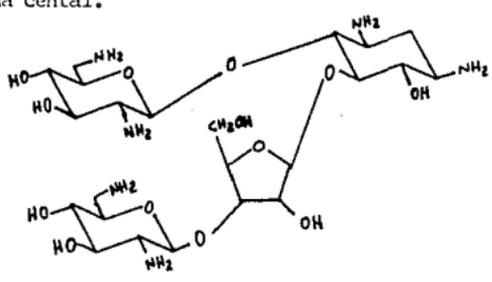


Fig. III Neomicina C

La familia de kanamicina (Fig. IV) y gentamicina se distinguen por - que sólo tienen dos de estos aminoazúcares unidos a la 2-deoxistreptamina central.

Los aminoglucósidos son en su mayoría compuesto fuertemente básicos, - sus sales de ácidos inorgánicos son muy solubles en agua, sin que contribuya a sus propiedades farmacocinéticas.

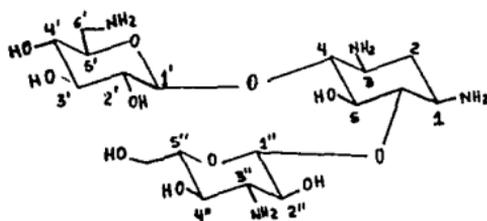


Fig. IV Kanamicina A

Se distribuyen bien en fluidos corporales pero no a nivel de Sistema Nervioso Central, espina dorsal y tejidos conectivo¹. Son muy poco absorbidos después de la administración oral, aproximadamente menos del 1%. Aunque los antibióticos aminoglucósidos se clasifican como de amplio espectro, su utilidad radica en que se usan solamente en el tratamiento de infecciones sistémicas serias causadas por bacilos aerobicos gram-negativos, los cocos aerobios gram-negativos y gram-positivos tienden a ser menos sensibles a estos fármacos por lo cual se prefieren para estos casos los β -lactámicos.

Los aminoglucósidos se absorben rápidamente después de su aplicación intramuscular, alcanzando niveles sericos máximos en aproximadamente de 30-90 minutos, la vida media sérica de estos fármacos son similares variando de 2-3 horas. La excreción es exclusivamente a través del riñon encontrándose altas concentraciones en orina.

Sin que estos compuestos hayan sufrido degradación alguna. La Toxicidad más importante es aquella que tiene sobre el riñon (nefrotoxicidad) y la que afecta al oido interno (ototoxicidad), la nefrotoxicidad es producida en algún grado por todos los aminoglucósidos siendo irreversibles los daños por lo que la terapia con estos compuestos debe ser tomada con precaución.

2.2 Relación Estructura-Actividad.

Muchos de los estudios concernientes a elucidar el mecanismo de acción de los antibióticos aminoglucósidos se han realizado con la estreptomicina. La acción de otros aminoglucósidos se cree que es similar; actuando directamente en el ribosoma bacteriano para inhibir la síntesis de proteínas, además interfieren en la fidelidad de traducción del código genético, obligando a la subunidad ribosomal 30S a formar un complejo que es incapaz de iniciar la polimerización para formar los aminoácidos requeridos por el microorganismo.

Para llegar al ribosoma los fármacos deben transportarse a través de la membrana celular, como estos compuestos son muy polares, hay poca difusión pasiva. Su transporte parece ser un transporte activo que está estrechamente relacionado con el transporte de electrones, y con la fosforilación oxidativa.

Pero en sí, ninguna de las acciones conocidas explica satisfactoriamente el efecto bactericida de estos fármacos por lo cual no sabemos porque los aminoglucósidos son bactericidas, y los antibióticos que deterioran la síntesis de proteínas son por lo general solo bacteriostáticos².

2.3 Resistencia a los Aminoglucósidos.

La mayoría de antibióticos utilizados hoy en día como agentes terapéuticos en algún grado experimentan una resistencia en su acción inhibitoria frente a algunos microorganismos (como son las enterobacterias y algunas especies de Pseudomonas y Staphylococcus). Los aminoglucósidos no son la excepción a este importante fenómeno clínico demostrándose que las características estructurales de la molécula de aminoglucósido tiene una relación con la resistencia bacteriana.

Estableciéndose que la resistencia que manifiestan los microorganismos mencionados, es transmitida a cepas no resistentes de la misma especie y - además a bacterias de diferente especie.

El mecanismo de transferencia de resistencia a sido atribuida directamente a factores-R extracromosomales el cual es replicativo y transferible por conjugación (contacto directo).

Cepas que llevan factores-R para resistir la inactividad a estos fármacos sintetizan enzimas capaces de acetilar, fosforilas y/o adenilar grupos amino o hidroxilo, dando como resultado un producto inactivo que es incapaz de inhibir el desarrollo microbiano, los sitios de acoplamiento de estas - enzimas y la bioquímica de las reacciones se describen usando la estructura de kanamicina B (Fig. V).

Las enzimas inactivantes de aminoglucósidos incluyen.

Aminoacetiltransferasa que acetila el grupo amino de la posición 6' - del anillo I, y el grupo amino en posición 3 del anillo II y el grupo amino en la posición 2' del anillo I.

Fosfotransferasa que fosforila el grupo hidroxilo de la posición 3' - del anillo I, y la Nucleotidiltransferesa que adenila el grupo de la posición 2' del anillo III y el OH de la posición 4' del anillo I o el hidroxilo

de la posición 4'' del anillo III.

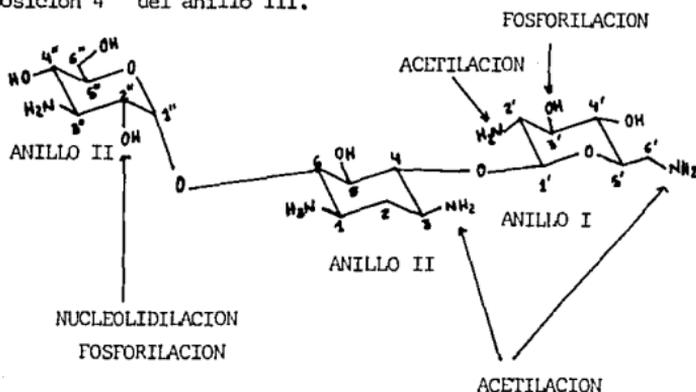


Fig. V Sitios de ataque enzimático en Kanamicina B

Muchos de los estudios realizados se encaminaron a investigar variantes estructurales sobre los antibióticos aminoglucósidos, y de esta manera producir compuestos que resistan la inactivación enzimática.

Demostrando que si el grupo funcional, que es el blanco de ataque está ausente en la estructura, entonces los aminoglucósidos son capaces de resistir el ataque enzimático. Otra característica que se encontró es que los factores estéricos le pueden conferir resistencia al ataque sobre otros grupos funcionales vecinos que pueden ser susceptibles³.

Las modificaciones que se efectuaron en las estructuras de los aminoglucósidos fué llevada tomando en cuenta la reactividad de los sustituyentes de cada uno de los anillos.

El anillo I es de crucial importancia por sus características estructurales y por conferirle a la molécula la actividad de amplio espectro, siendo además el blanco primario de las enzimas bacterianas inactivantes. La función amino de la posición 2' y 6' son particularmente importantes puesto que le confieren la potencia a la kanamicina A con respecto a kanamicina B (que tiene un grupo amino en la posición 6'' y un grupo hidroxilo en posi-

ción 2"). Esta a su vez es más activa que kanamicina C (que tiene un grupo hidroxilo en la posición 6" y un grupo amino en posición 2").

La metilación en cualquier posición sobre el carbono en la posición 6" o sobre el grupo amino en la misma posición no disminuye la actividad antibacteriana, pero sin embargo le confiere resistencia a la acetilación enzimática sobre el grupo amino en la posición 6".

La eliminación de grupos hidroxilos en las posiciones 3" o 4" o ambas en las kanamicinas como ej: La dibekacina también llamada 3", 4"-dideoxikanamicina B (Fig. VI), no reduce la actividad antibacteriana. Otro derivado que posee excelente actividad frente a bacterias resistentes a kanamicina es la 3"-deoxikanamicina A (Fig. VII).

Son pocos los cambios que se pueden llevar acabo en el anillo II (deoxiestreptamina), sin que se altere la actividad antibacteriana, sin embargo el grupo amino en la posición I de kanamicina A puede ser acilado reteniendo la potencia de la estructura base.

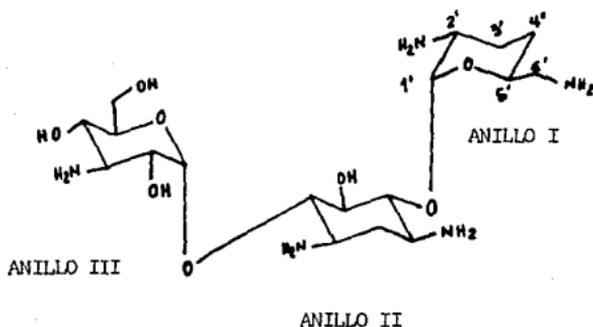


Fig. VI 3", 4"-Dideoxikanamicina B (Dibekacina)

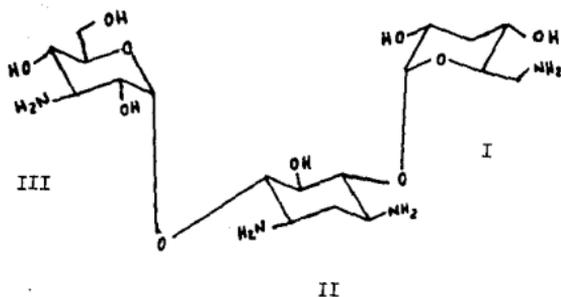


Fig. VII 3'- Deoxikanamicina A

Otro compuesto que se desarrolló en la netilmicina denominado 1-N-etil-sisomicina (Fig. VIII), este compuesto retiene la potencia de su estructura base que es sisomicina (Fig. IX), siendo este resistente a las enzimas bacterianas. En el anillo III los grupos funcionales son un poco menos susceptibles a los cambios estructurales que cualquiera de los anteriores.

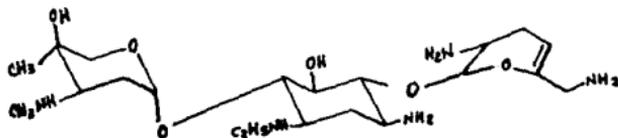


Fig. VIII 1-N-etilsisomicina (Netilmicina)

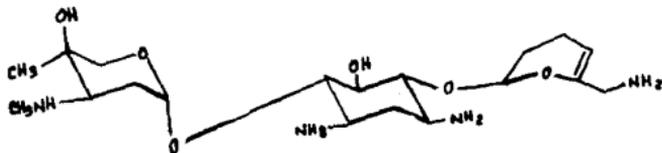


Fig. IX Sisomicina

Sin embargo el compuesto que más se ha estudiado dentro de los antibióticos aminoglucósidos y que además es utilizado hoy en día terapéuticamente es la amikacina (BB - K8) (Fig. X), que es sintetizado por medio de la acilación selectiva sobre el grupo en la posición uno amino del anillo II - de kanamicina A con el ácido-L-(-)-4-amino-2-hidroxi-butírico⁴ L-(-)-HABA, siendo éste fármaco más potente que la kanamicina A, y además es resistente a las enzimas bacterianas, excepto a la aminoacetyl transferasa que acetila el grupo amino de la posición número seis del anillo I.

La causa que provoca la resistencia de amikacina a las enzimas no se conoce, pero se ha sugerido que la introducción del aminoácido L-(-)-HABA en kanamicina A hace que decaezca la afinidad por parte de las enzimas inactivantes.

Además, se llevaron a cabo estudios para demostrar cual de los isómeros del ácido-4-amino-2-hidroxi-butírico le dá más potencia a la amikacina, encontrándose que el isómero con la configuración (L), dá un producto más activo que el producido por los isómeros DL-(+)-4-amino-2-hidroxi-butírico - (BB-K19) (Fig. XI) y el D-(+)-4-amino-2-hidroxi-butírico (BB-K31) (Fig. XII), enlistados en la tabla 1.

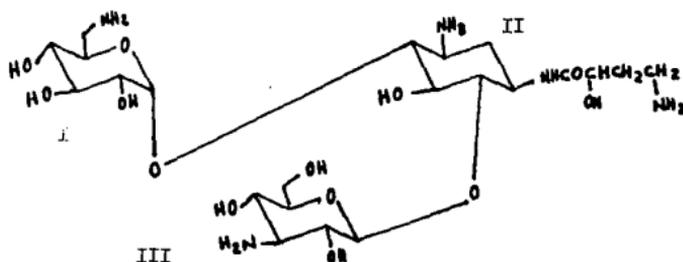


Tabla 1 Kanamicina A acilada con los isómeros del ac.4-amino-2-hidroxi-butírico

	COMPUESTO	CONFIGURACION
(X)	BB-K8	L-(-)-HABA
(XI)	BB-K19	DL-HABA
(XII)	BB-K31	D-(=)-HABA

Como además la kanamicina A tiene cuatro grupos amino capaces de ser acilados con el ácido-L-(-)-4-amino-2-hidroxi-butírico, esto produce tres isómeros posicionales aparte de amikacina (BB-K8) (Fig. X), denominados " B-B-K6 " (Fig. XIII), que es el producto de acilación sobre el grupo -amino en posición seis prima del anillo I en kanamicina A, " BB-K29 " - - (Fig. XIV), obtenido de acilar la posición número tres del anillo II con L-(-)-HABA, y el " BB-K31 " compuesto acilado por la posición cuatro biprima del anillo III (Fig. XV). Los cuales se encuentran enlistados en la tabla 2.

Estos tienen aproximadamente del 1-3 % de la potencia que tiene amikacina " BB-K8 " (Fig. X), frente a bacterias resistentes a los aminoglucósidos ^{5,6}.

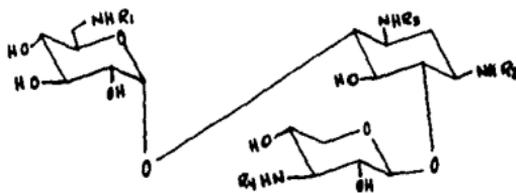


Tabla 2 Amikacina y sus isómeros posicionales

	COMPUESTO	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(X)	BB-K8	H	L-(-)-HABA	H	H
(XIII)	BB-K6	L-(-)-HABA	H	H	H
(XIV)	BB-K29	H	H	L-(-)-HABA	H
(XV)	BB-K11	H	H	H	L-(-)-HABA

2.4 Criterios para la Selección de Ruta de Síntesis.

Conociendo que el isómero con la estereoquímica L-(-)-HABA, le confiere mayor potencia a la amikacina, en comparación con los isómeros DL-HABA, y -D-(+)-HABA, se buscó una ruta de síntesis que proporcionará el producto con la estereoquímica deseada, el rendimiento óptimo y si fuera factible, involucre materias primas de producción nacional. Así, se encontraron las siguientes posibilidades.

2.4.1 Preparación del ácido-L-(-)-HABA, a partir de ácido-L-(+)-glutámico, o del L-(+)-glutamato monosódico (Fig. XVI)..^{7,8} (esquema 1).

Esta ruta se inicia llevando a cabo una reacción de diazoación con nitrato de sodio y ácido clorhídrico, sobre el ácido glutámico, donde el grupo diazonio sufre una sustitución nucleofílica por agua, que bajo las condiciones ácidas del medio provoca una ciclación intramolecular para dar el ácido L-(+)-4-carboxi-4-butirolactona (Fig. XVII)^{9,10}.

La reacción procede con retención de configuración debido a la participación del grupo carboxilato vecino^{11,12}. Esta lactona por medio de una aminólisis da el ácido-L-(+)-2-hidroxi-glutarámico (Fig. XVIII)¹³, que al someterlo a una transposición de Hofmann¹⁴ en condiciones alcalinas genera el ácido L-(-)-4-amino-2-hidroxi-butírico (Fig. XIX), mismo que bajo las condiciones de Schotten-Baumann¹⁵ con cloroformiato de bencilo (Fig. XIX), produce el ácido L-(-)-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxi-butírico (Fig. XXI)^{16, 17}.

Transformación que mantiene la configuración absoluta, excepto el sentido de la desviación del plano de la luz polarizada.

2.4.2 Preparación de L-(-)-HABA, partiendo del ácido L-(-)-2,4-diaminobutírico (L-(+)-DABA)¹⁸. (Fig. XXII) (Esquema 2).

Este compuesto es convertido a su sal cúprica para proteger el α -amino, empleando una solución de hidróxido de sodio y carbonato de cobre, el cual forma el quelato (Fig. XXIII), que a su vez se hace reaccionar con N-etoxycarbonilftalimida¹⁷ (Fig. XXIV), que al acidularlo da el clorhidrato de L-(+)-2-amino-4-ftaloilaminobutírico (Fig. XXV); el tratamiento con ácido nitroso en acético acuoso produce el ácido L-(+)-2-hidroxi-4-ftaloilaminobutírico (Fig. XXVI), la configuración del carbono α del compuesto anterior se asignó como (L), conociendo que la deaminación de α -aminoácidos procede con retención de la configuración^{11, 12}. Removiendo el grupo ftaloilo con hidrazina-etanol, se obtiene el ácido-L-(-)-4-amino-2-hidroxi-butírico (Fig. XIX).

2.4.3 Preparación de L-(-)-HABA, utilizando ácido-L-(+)-2-aminosuccinámico¹⁹ (Fig. XXVII) (Esquema 3).

El ácido-L-(+)-2-aminosuccinámico es transformado al ácido-L-(+)-2-hidroxisuccinámico (XXVIII) por tratamiento con nitrito de sodio.

Durante el proceso, el compuesto conserva su estereoquímica¹¹. Al someterlo a una deshidratación con anhídrido acético-piridina^{20, 21} proporciona el ácido-L-(-)-2-acetoxi-3-cianopropiónico (Fig. XXIX), que con una hidrogenación con óxido de platino en etanol acuoso, y acidulado da el ácido-L-(-)-4-amino-2-hidroxi-butírico (Fig. XIX).

2.4.4 Síntesis de DL-HABA, por medio de una reacción regioespecífica de esteres nitrónicos con compuestos carboxílicos α, β -insaturados²².

(Ver Esquema 4)

Esta ruta consiste en una adición regioespecífica del éster nitrónico sobre el acrilato de metilo a baja temperatura para dar la isoxazolidina (Fig. XXX), misma que por descomposición a alta temperatura y posterior - hidrogenólisis produce el ácido-DL-4-amino-hidroxi-butírico (Fig. XIX).

2.4.5 Síntesis de ácido-DL-4-amino-2-hidroxi-butírico partiendo de 2-pi-rrrolidona (Fig. XXXI)²³ (Esquema 5).

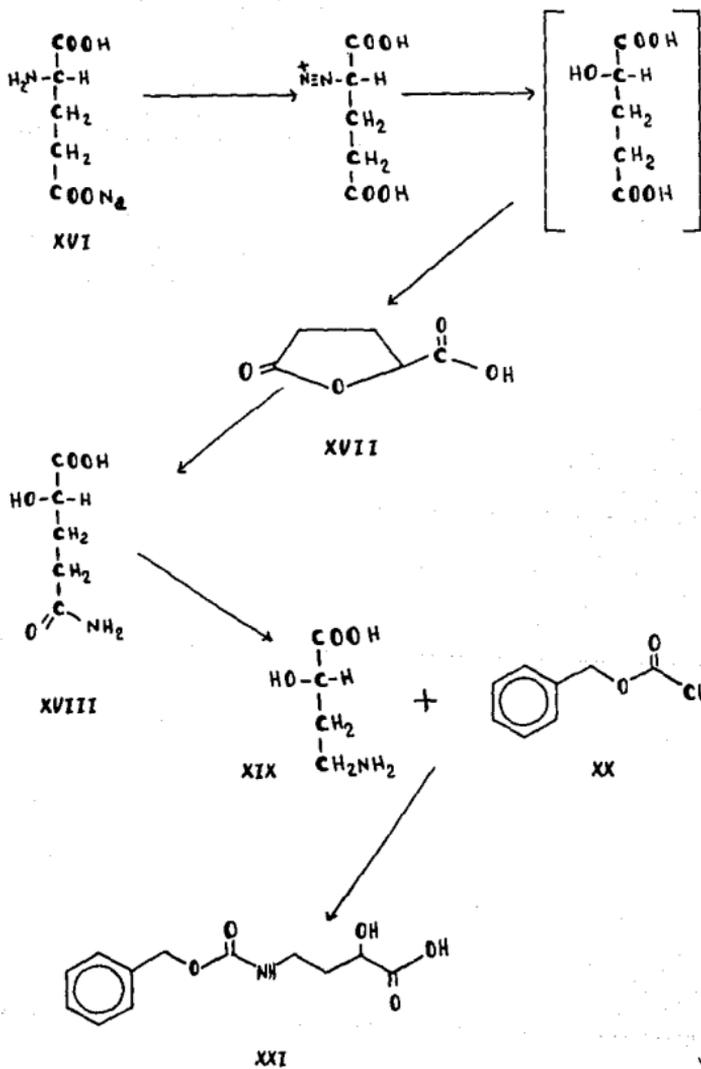
Compuesto que se metila para dar 2-metóxi-1-pirrolidona, después se - halogena en el átomo de carbono α con N-bromosuccinimida para dar 3-bromo-2-metóxi-1-pirrolidona (Fig. XXXII), el cual es desplazado por acetato y for- mar 3-acetoxi-2-metoxi-1-pirrolidona (Fig. XXXIII), y finalmente se hidro- liza para obtener la mezcla racémica del ácido-4-amino-2-hidroxi-butírico.

De las rutas publicadas la que parte del glutamato monosódico presen- ta las siguientes ventajas:

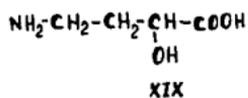
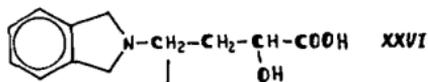
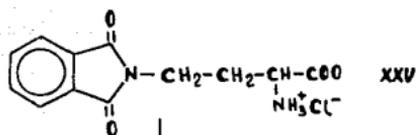
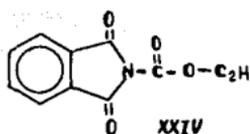
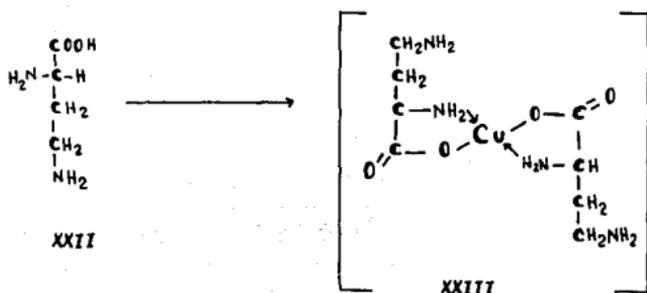
- a) El L-(+)-glutamato monosódico es una materia prima de producción nacio- nal, y de costo bajo.
- b) Produce un buen rendimiento global.
- c) Requiere de reacciones que no son complicadas.
- d) Tiene la estereoquímica adecuada para obtener el producto con la con- figuración necesaria para la actividad.
- e) No son necesarias las resoluciones racémicas.

Por lo que se seleccionó para desarrollarla en el presente trabajo.

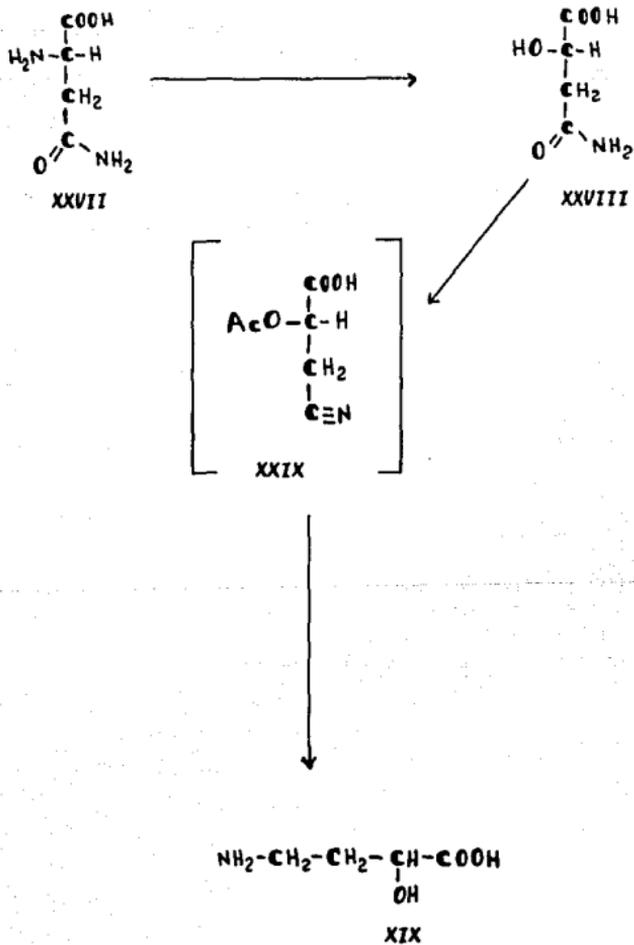
ESQUEMA No. 1



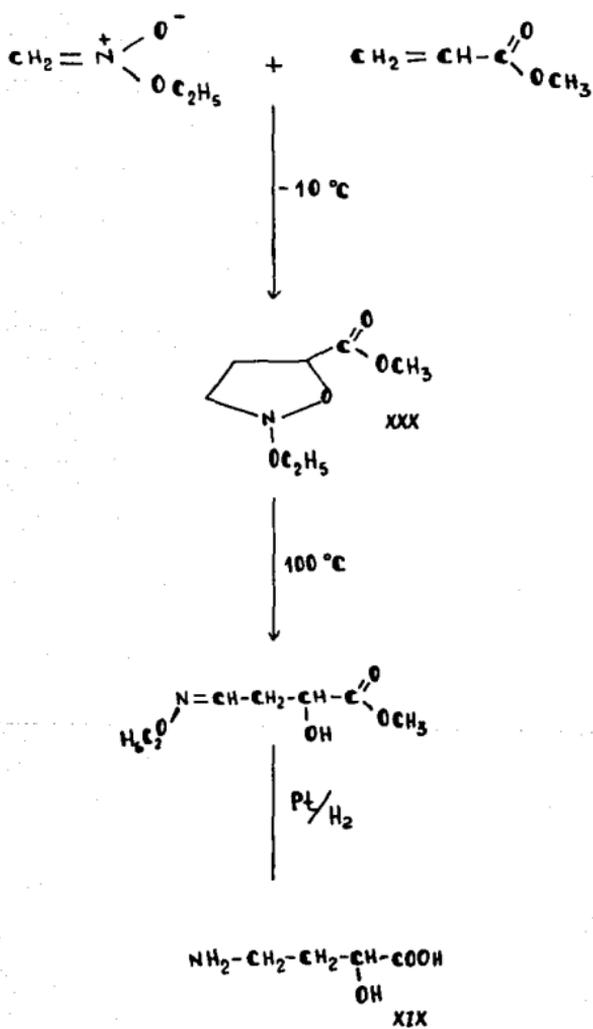
ESQUEMA No. 2



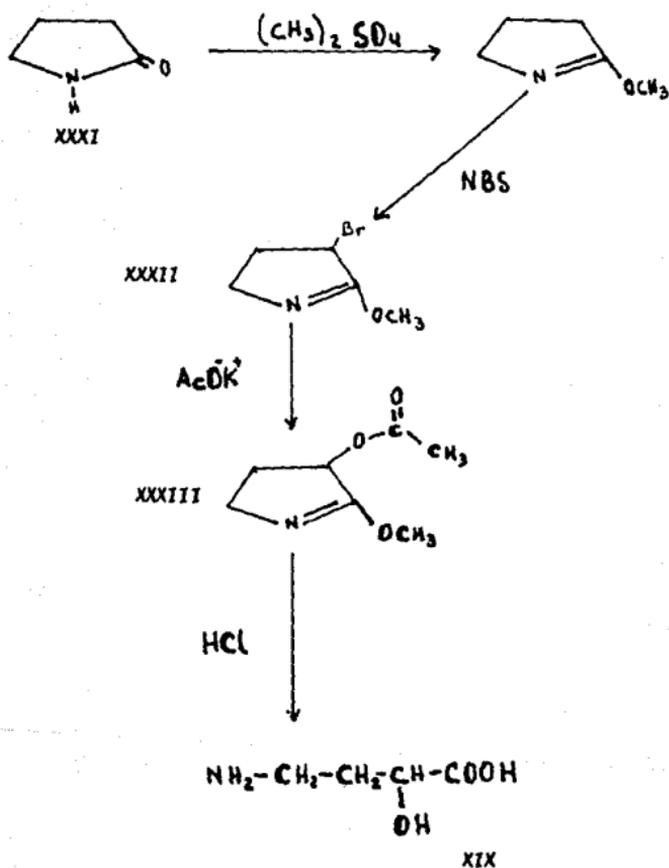
ESQUEMA No. 3



ESQUEMA No. 4



ESQUEMA No. 5



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La demanda que tiene el Sector Salud en cuanto a principios activos hace que la Industria, Químico-Farmacéutica, investigue, desarrolle y/o adapte tecnología para la elaboración de fármacos, reduciéndose progresivamente su dependencia técnica y económica.

Además, de esta manera se va creando la infraestructura tecnológica, para la producción de fármacos del Cuadro Básico de Medicamentos. Uno de los beneficios que se consigue al investigar, desarrollar o adaptar tecnología química, es que cada día va haber más empresas nacionales capaces de llevar a cabo este proceso desde nivel laboratorio hasta su industrialización. Un ejemplo importante es la amikacina un fármaco cuyos principales volúmenes de consumo ya se fabrican en el país, por Empresas Nacionales.

Debido a las ventajas farmacológicas de la amikacina en comparación con los demás aminoglucósidos lo hace de gran interés. Este fármaco se obtiene al llevar a cabo una acilación selectiva del grupo amino en posición uno de kanamicina A con el ácido-L-(-)-4-amino-2-hidroxi-butírico de aquí la necesidad de obtener el aminoácido, partiendo de L-(+)-glutamato monosódico que es una materia prima de producción nacional, y con la estereoquímica deseada.

Conjuntamente las ventajas de desarrollo tecnológico la importancia terapéutica de amikacina y la disponibilidad de materia prima, se definió claramente la factibilidad técnica y económica para desarrollar la tecnología de este principio activo.

OBJETIVOS

Para el presente trabajo se propusieron realizar los siguientes objetivos:

- 1) Adaptar un método a nivel laboratorio, para obtener el ácido-L-(-)-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxi-butírico.
- 2) Preparación de cada uno de los intermedios: ácido-L-(+)-4-carboxi-4-butirolactona; ácido-L-(+)-2-hidroxi-glutarámico; ácido-L-(-)-4-amino-2-hidroxi-butírico.
- 3) Identificación de los intermedios, y producto final por: IR, RMN, así como, por sus constantes físicas y perfiles cromatográficos.

HIPOTESIS

Una ruta de síntesis para el ácido-L-(-)-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxi-butírico (Cbz-L-(-)-HABA), sería partiendo del L-(+)-glutamato - monosódico a través de una diazoación y sustitución por agua, producto que sufre una deshidratación interna para dar el ácido-L-(+)-4-carboxi-4-butiro lactona, que por aminólisis se obtiene L-(+)-glutaramato de amonio, compuesto que con una solución de hidróxido de sodio da L-(-)-glutaramato de sodio mismo que al someterlo a una degradación del tipo Hofmann produce ácido L-(-)-4-amino-2-hidroxi-butírico, que al protegerlo con cloroformiato de bencilo dará el ácido-L-(-)-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxi-butírico.

MATERIAL Y METODO

6.1 Reactivos

Acetato de etilo	Industrial
Acido clorhídrico	Industrial
Alcohol etílico	Industrial
Alcohol metílico	Industrial
Benceno	Industrial
Carbón activado	Industrial
Cloroformiato de bencilo	Aldrich
Eter de petróleo	Industrial
L-(+)-glutamato monosódico	Industrial
Hidróxido de amonio	Industrial
Hidróxido de sodio	Industrial
Hipoclorito de sodio	Industrial
Ninhidrina	Merck
Nitrito de sodio	Industrial

6.2 Equipo

Espectrofotómetro RMN	Varian	CML-360
Rotavapor	Büchi	011
Balanza analítica	Mettler	AE-100
Balanza granataria	Ohaus	
Lámpara de luz U.V.	U.L	399-Y
Estufa	Felisa	291
Instrumento para medir punto de fusión	Mettler	FP-61
Cromatoplacas	Merck	GP-254

6.3 Consideración Previa.

A continuación se describen los métodos de preparación en los cuales se omiten detalles y pormenores para proteger la inversión y esfuerzo de la empresa. Puesto que se trata de una tecnología que pertenece a Química Fina Farmex, S.A. de C.V.

Dando que ésta fué la que dió las facilidades para la obtención de la información necesaria para llevar a cabo el desarrollo del proyecto que consistió en la preparación del ácido-L-(-)-4-benciloxycarbonilamino-2-hidroxibutírico. (CADENA LATERAL DE AMIKACINA).

DESARROLLO DEL TRABAJO

7.1 Trabajo experimental.

Obtención del ácido-L-(+)-4-carboxi-4-butirolactona (Fig. XVII)

En un matraz de tres bocas de 250 ml. provisto de trampa para gases nitrosos, termómetro y embudo de adición se colocan los siguientes reactivos: 33.8 g (0.2 moles) de L-(+)-glutamato monosódico disuelto previamente en agua, a esta solución se le añade con agitación cincuenta mililitros de ácido clorhídrico concentrado. A la mezcla se le adiciona 20.7 g (0.3 moles) de nitrito de sodio disuelto en agua lentamente y a baja temperatura, una vez terminada la adición se deja agitando tres horas más y después se deja reposar toda la noche, el progreso de la reacción se sigue por cromatografía en placa fina.

El producto se purifica por una destilación a vacío y además el residuo también se cristaliza con una mezcla de benceno-acetato de etilo-eter de petróleo, rindiendo aproximadamente 55%; con un punto de fusión de 50-52 °C⁷; y una rotación específica de $[\alpha]_D^{20} = + 10$ (c. 2.0, MeOH)

Preparación de L-(+)-2-hidroxiglutarato de sodio (Fig. XVIII)

En un matraz de dos bocas de 100 mililitros provisto de termómetro y embudo de adición se colocan los siguientes reactivos: 2.99 g (0.023 moles) de ácido-L-(+)-4-carboxi-4-butirolactona, y en frío le son adicionados treinta mililitros de una solución de hidróxido de amonio.

Terminada esta, se deja agitando por espacio de una a dos horas a temperatura ambiente, la formación del producto se sigue por cromatografía en - capa fina, la mezcla de reacción se deja reposar; la recuperación del producto se lleva a cabo eliminando el disolvente por una destilación a vacío, - - para obtener la sal de amonio del ácido-L-(+)-2-hidroxiglutarámico.

Al producto obtenido se valora, y se le adiciona una solución de hidróxido de sodio previamente disuelto en agua para formar el (L-(+)-glutarato de sodio la cual se utiliza para llevar a cabo la degradación de Hofmann.¹⁴

Preparación del ácido-L-(-)-4-amino-2-hidroxi-butírico (Fig. XIX)

Es un matraz de dos bocas de 250 ml. equipado con termómetro y embudo de adición se colocan 2.53 g (0.034 moles) de hipoclorito de sodio a esta solución se le adicionan 5.75 g (0.034 moles) de L-(+)-glutamato de sodio a bajo temperatura con agitación vigorosa el avance de la reacción es seguida por cromatografía en capa fina.

La mezcla de reacción se calienta suavemente por espacio de una a dos horas. Terminada ésta la solución es acidificada y posteriormente absorbida sobre una columna empacada con resina de intercambio iónico (DOWEX-50W-X8) la columna es lavada con agua, y desarrollada con una solución de amoníaco acuoso 0.25 N los eluatos son colectados en fracciones de cincuenta mililitros, las fracciones que revelan positivo con ninhidrina se juntan y se evaporan a presión reducida el residuo se cristaliza de etanol agua dando un producto con un punto de fusión de 118-121 °C.

Preparación del ácido-L-(-)-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxi-butírico -
(Fig. XXI).

En un matraz de tres bocas provisto de termómetro, trampa para gases y embudo de adición son colocados los siguientes reactivos: 7.37 g (0.062 moles) de ácido-L-(-)-4-amino-2-hidroxi-butírico en una solución alcalina y con agitación vigorosa le son adicionados en frío 10.57 g (0.062 moles) de cloroformiato de bencilo lentamente, la mezcla de reacción es agitada por espacio de una a dos horas a la misma temperatura, el avance de la reacción es seguida por cromatografía en capa fina.

Una vez terminada la reacción el producto es extraído con acetato de etilo el cual es concentrado por medio de una destilación a presión reducida, el residuo es cristalizado de benceno para dar aproximadamente 60-70 % del producto con un punto de fusión de 78.5-79.5 °C, $[\alpha]_D^{25} = -4.5$ (c. 2.0, CH₃OH)^{5, 16}.

7.3 Resultados

Los resultados obtenidos se resumen en las siguientes tablas.

Compuesto	Puntos de Fusión			Rendimiento		
	<u>Crudo</u>	<u>Recristalizado</u>	<u>Reportado</u>	<u>Crudo</u>	<u>Recristalizado</u>	<u>Rep.</u>
XVII		51.7 °C	50 - 51 °C	70 %	55 %	90 %
XVIII	105.9 °C	106.3 °C	120 - 122 °C	28 %	23 %	80 %
(COMO ACIDO)						
XIX	186 °C	187 °C	197 - 198 °C	26 %	20 %	37 %
XXI	75 °C	77 °C	78.5 - 79.5 °C	70 %	60 %	74 %

Nota: Los puntos de fusión no están corregidos.

DATOS DE ESPECTROFOTOMETRIA INFRARROJA

KBr

COMP.	C - H	C - H _{sat.}	C - O	N - H	C - N	O - H	ESPECTROS
XVII	1175		1771			3412	1
XVIII (COMO ACIDO)	1244		1698	3425	1457	3212	3
XIX	1291	2931	1611	3305	1424		5
XXI	1267		1668	3305			

DATOS DE ESPECTROFOTOMETRIA DE RMN

COMPUESTO	p.p.m (Cloroforno, DMSO, Agua Deuterada)										ESPECTRO No.	
	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
XVII	2.4-2.8 CH ₂ -CH ₂			4.9-5.1								2
COMO ACIDO	1.9 - 2.2		4.0									4
XVIII	CH ₂	CH ₂	CH									
XIX	1.8 CH ₂	3.2 N=CH ₂	4.1 CH									6
XXI		2.1 CH ₂	3.4 CH ₂	4.2 CH	5.1 CH ₂		7.4 5H					8

DISCUSION

En el primer paso de síntesis para obtener el ácido-L-(-)-4-benciloxi-carbonilamino-2-hidroxi-butírico (CADENA LATERAL DE AMIKACINA); se lleva a cabo una reacción de diazoación utilizando L-(+)-glutamato monosódico, también se puede utilizar ácido-L-(+)-glutámico, nitrito de sodio y ácido clorhídrico, estos últimos forman el ácido nitroso que es el reactivo que lleva a cabo la transformación en el grupo amino para formar la sal de diazonio, por ser esta sal muy reactiva sufre una reacción de sustitución por el agua para formar un α -hidroxiácido, intermedio que por las condiciones ácidas del medio favorece su ciclación para dar un compuesto termodinámicamente más estable, el ácido-L-(+)-4-carboxi-4-butirolactona, (Fig. XVII).

La reacción de diazoación procede con retención total de la configuración⁹, esto debido a la participación del grupo carboxilato vecino al grupo amino.

Este compuesto se caracterizó por lo siguiente:

pf. 51.7 °C, $[\alpha]_D^{25} = +9.5$ (c. 2.0, MeOH), IR (KBr) banda ancha en - 3412 cm^{-1} (OH); 1771 cm^{-1} (C=O); 1175 cm^{-1} (C-O); RMN (D_2O -DMSO) - (ppm) 2.4-2.8 (m. CH_2); 4.9-5.1 (d. H-C-C=O).

El segundo paso de síntesis consiste en la obtención del L-(+)-glutamato de amonio, que se obtiene haciendo reaccionar el ácido-L-(+)-4-carboxi-4-butirolactona con una solución de hidróxido de amonio provocando que el anillo lactónico se abra formando una amida, ocurriendo una reacción de adición nucleofílica (aminólisis).

La amida se denomina L-(+)-2-hidroxi-glutaramato de amonio, este producto es diferenciado de la materia prima por sus valores de R_{f} en cromatografía de capa fina. Este compuesto retiene su configuración ya que no está involu-

crado el centro quiral en la reacción. A esta sal de amonio se le añade una solución de hidróxido de sodio para transformarla a su respectiva sal sodica.

Para obtener el ácido-L-(+)-2-hidroxiglutarámico se lleva a cabo - - haciendo pasar la sal de amonio por una columna de intercambio iónico tipo (II⁺) eluyendo con ácido clorhídrico 0.5 N concentrando las fracciones con vacío y cristalizar el residuo con metanol dando un pf. 106.3 °C IR (KBr) Dos bandas características de amidas primarias 3425 cm⁻¹ y 3319 cm⁻¹ (N-H) 1698 cm⁻¹ (C=O), 1244 cm⁻¹ (C-O). RMN (D₂O-DMSO) (ppm) 1.9-2.2 (m. 4H. C₃-C₄) 4.0 (H. q. CH (OH) COOH).

Para la preparación del ácido-L-(-)-4-amino-2-hidroxibutírico (XIX), se realiza haciendo reaccionar el producto del paso anterior con una solución alcalina de hipoclorito de sodio, este tipo de reacción se conoce como transposición de Hofmann¹⁴. La reacción transcurre a través de la formación de - un isocianato para producir su ácido carbámico, el cual es inestable y pierde con facilidad dióxido de carbono y pasa a dar el producto deseado (XIX).

La reacción se lleva a cabo con retención de la configuración puesto - que no esta involucrado el centro quiral de la molécula, no así la rotación - óptica la cual cambia de dextrógira a levógira.

La purificación del aminoácido se lleva a cabo por medio de cromatografía de intercambio iónico y eluyendo con una solución de amoniaco 0.25 N las fracciones que revelan positivo con ninhidrina se concentran a vacío y el - residuo es cristalizado con etanol.

El producto se caracterizó por tener un pf. 187 °C (dec.) por CCF - revela con ninhidrina mientras que la amida no revela las bandas de absorción IR (KBr) 3305 cm⁻¹ (N-H), 2931 cm⁻¹ (C-H) alifático; 1611 cm⁻¹ (C=O);

1531 cm^{-1} (C-)).

RMN (D_2O -DMSO) (ppm) 1.8-2.3 (2H. m. CH_2); 3.2 (2H, t. N- CH_2); 4.1 (H. q. CH (OH) COOH).

En cuanto a la obtención del ácido-L-(-)-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxi-butírico (Fig. XXI), se logra haciendo reaccionar el ácido-L-(-)-4-amino-2-hidroxi-butírico (Fig. XIX), en medio alcalino con cloroformiato de bencilo (Fig. XX), esta reacción es llevada a cabo bajo las condiciones de Schotten-Bauman siendo esta reacción de sustitución nucleofílica para dar como producto un carbamato.

El cloroformiato de bencilo es comunmente utilizado para proteger - aminas primarias en síntesis de péptidos.

El compuesto final sigue reteniendo la configuración del material de partida, además de que por CCF se observa un sólo compuesto con un R_f , diferente al del aminoácido por la forma de revelar.

El compuesto (Fig. XXI) se caracterizó por pf. 75-77 °C IR (KBr) - 3305 cm^{-1} (N-H); 1668 cm^{-1} (C=O); 1267 cm^{-1} (C-O), RMN (D_2O -DMSO) 2.4 - (2H.m.); 3.4 (2H. d.d.); 4.2 (H. d-d); 5.1 (2H. s.); 7.4 (5H. s.).

CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos que se propusieron al iniciar el trabajo para obtener el ácido-L-(-)-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxi-butírico, los intermediarios de los que consta el trabajo fueron obtenidos purificados e identificados por sus constantes físicas así como por sus perfiles cromatográficos además de que identificaron por espectrofotometría IR y RMN.

En lo que respecta al primer intermedio que es el ácido-L-(+)-4-carboxi-4-butirolactona, fue purificada por medio de una destilación a vacío, lo que hace que el rendimiento disminuya, en comparación al que se obtiene por medio de una recristalización por lo cual es preferible este último.

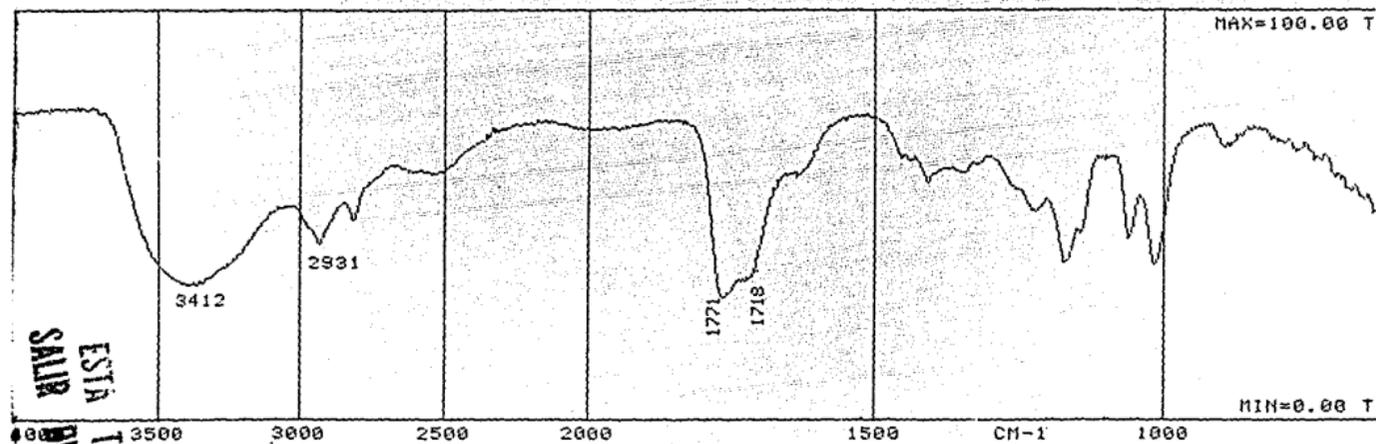
En cuanto al ácido-L-(+)-2-hidroxi-glutarámico, es purificado por medio de cromatografía de intercambio iónico, y eluyendo con una solución de ácido clorhídrico 0.5 N identificados por los métodos arriba mencionados y correspondieron a éste.

Para aislar el aminoácido L-(-)-HABA y poderlo identificar se paso la mezcla de reacción por una columna empacada con una resina de intercambio iónico fuertemente ácida la cual fué eluida con una solución de amoníaco 0.25 N que rindió 28 % aproximadamente y también correspondió a los espectros de IR y RMN.

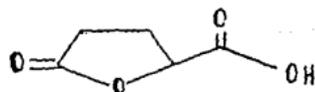
El ac.-L-(-)-4-benciloxicarbonilamino-2-hidroxi-butírico este se purificó por medio de una recristalización dando un rendimiento de aproximadamente 65.70 %. El cual es identificado por los métodos arriba mencionados. Por lo cual los intermediarios que se obtuvieron en bajo rendimiento se prefiere utilizar otro método de purificación para tratar de aumentar el rendimiento.

De lo anterior se deduce que los objetivos planteados se llevaron a cabo, puesto que se identificaron cada uno de ellos por los métodos menciona-

dos, lo que también demuestra que la hipótesis propuesta sea acertada, puesto que se llevaron a cabo las reacciones que se mencionaron en ella y que produjo el compuesto deseado con la estereoquímica deseada para darle la potencia a la amikacina.



ESTA TESIS NO DEBE SAIR DE LA BIBLIOTECA



Acido- δ -carboxi- δ -butirolactona

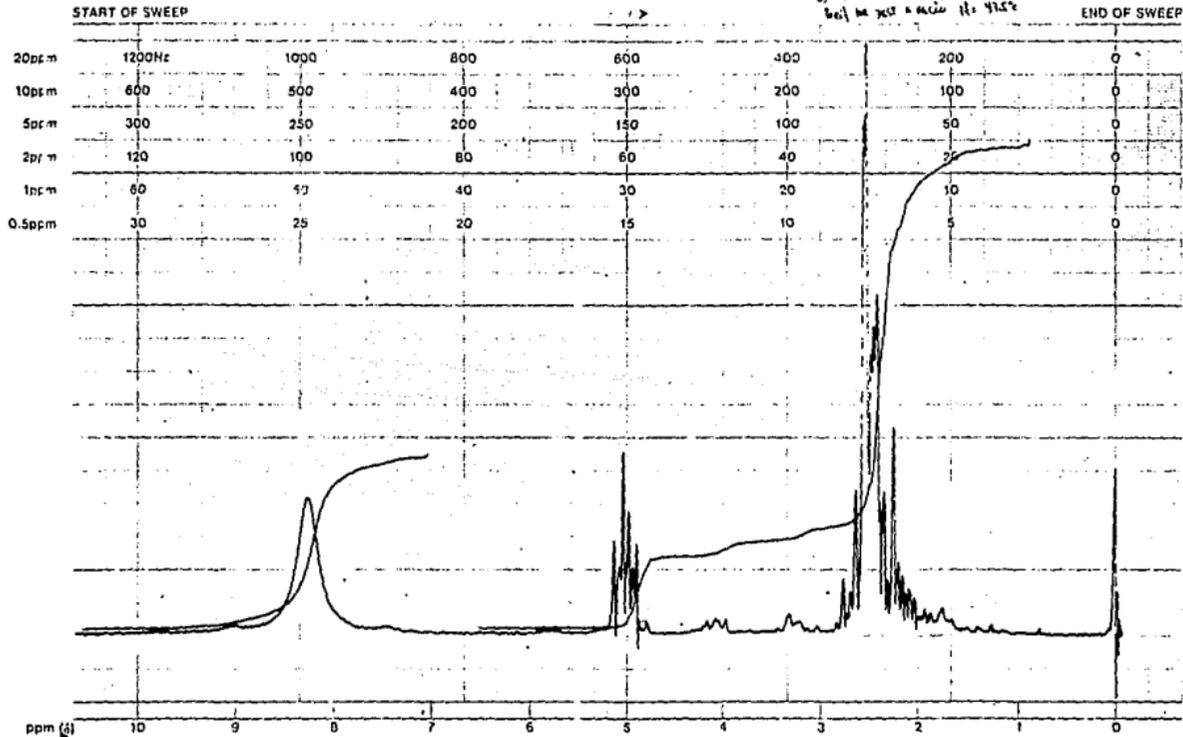
PRINTED IN U.S.A.

PART NO. V6040-01



varian instrument division

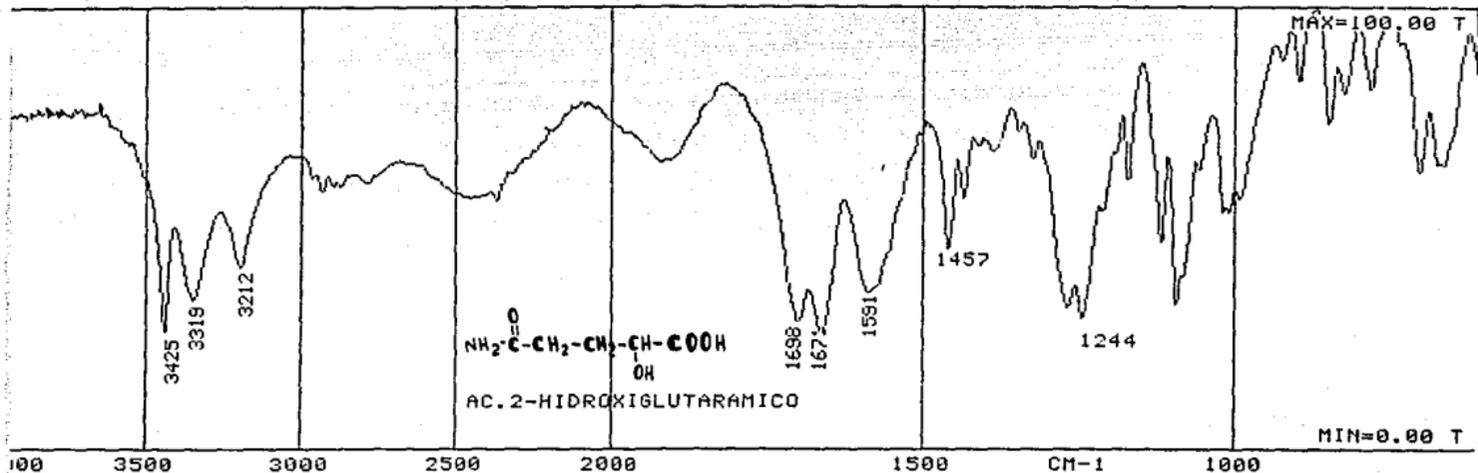
palo alto, california.



EM-360 60-MHz NMR SPECTROMETER

LOCK POS. _____ ppm SPECTRUM AMPL 3000 SWEEP TIME 5 min NUCLEUS ¹H SAMPLE: r-p OPERATOR L. G. Hill
 LOCK POWER _____ mG FILTER 0.05 sec SWEEP WIDTH 10 ppm ZCHO REF TMS CC(O)C DATE 1-2-68
 DECOUPLE POS. _____ ppm RF POWER 0.045 mG END OF SWEEP 0 ppm SAMPLE TEMP. 24 C SOLVENT: DMSO-d₆ SPECTRUM NO. 723
50

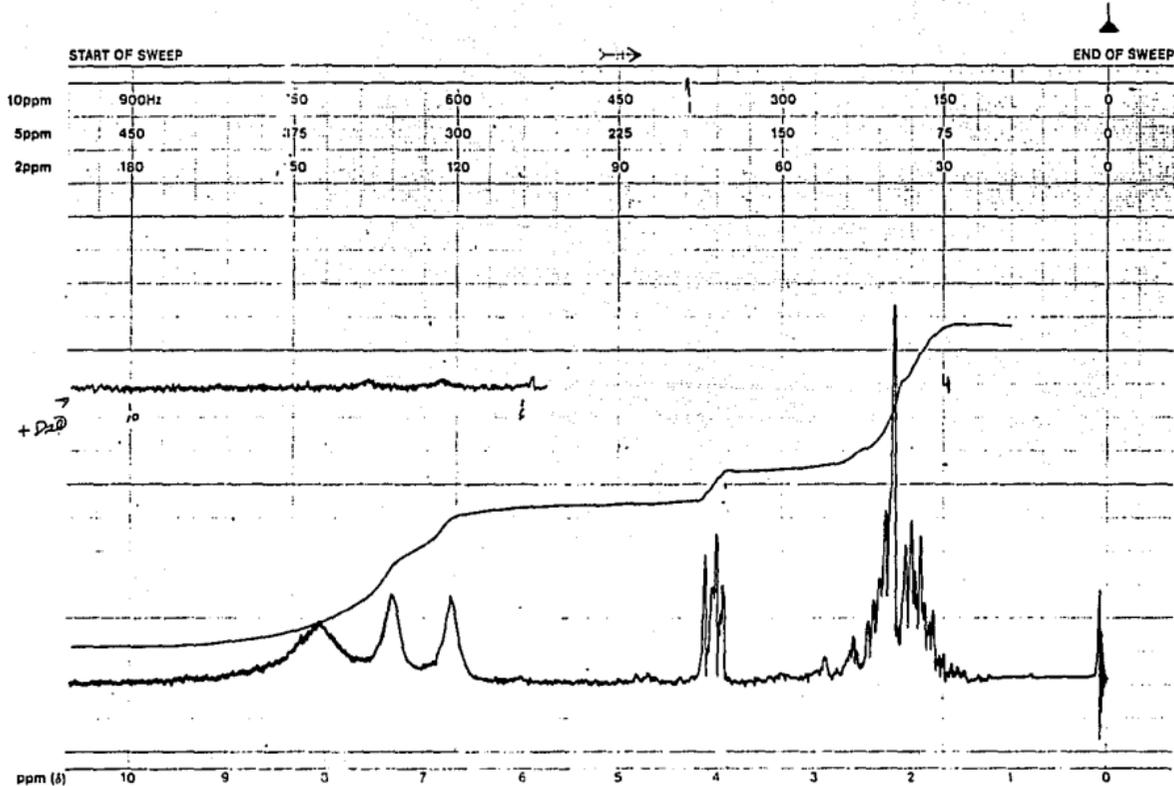
LV4 2A-7
11.1000





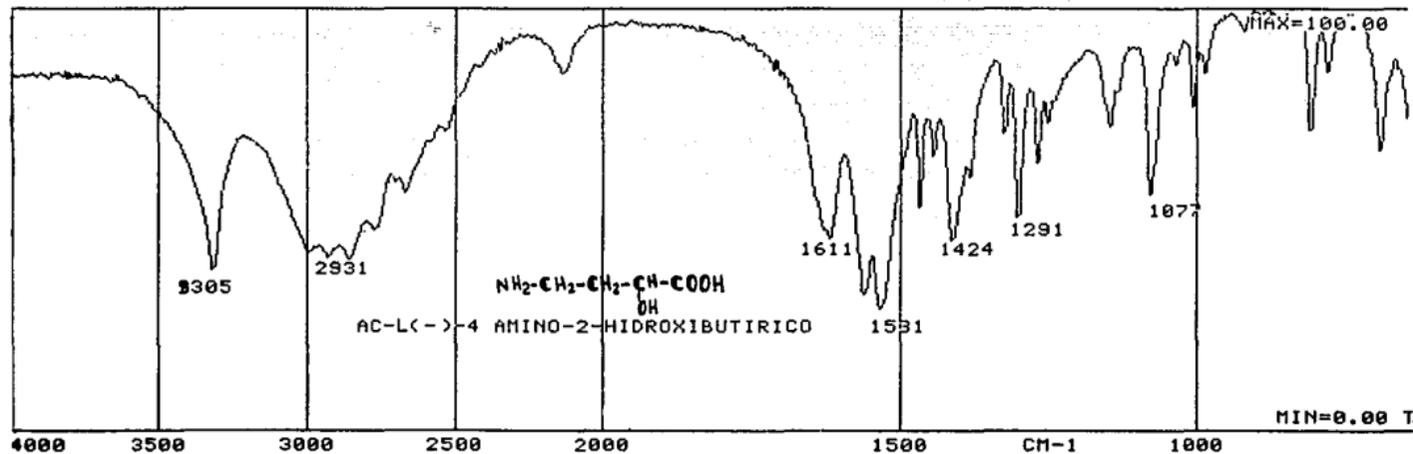
varian instrument division

palo alto, california

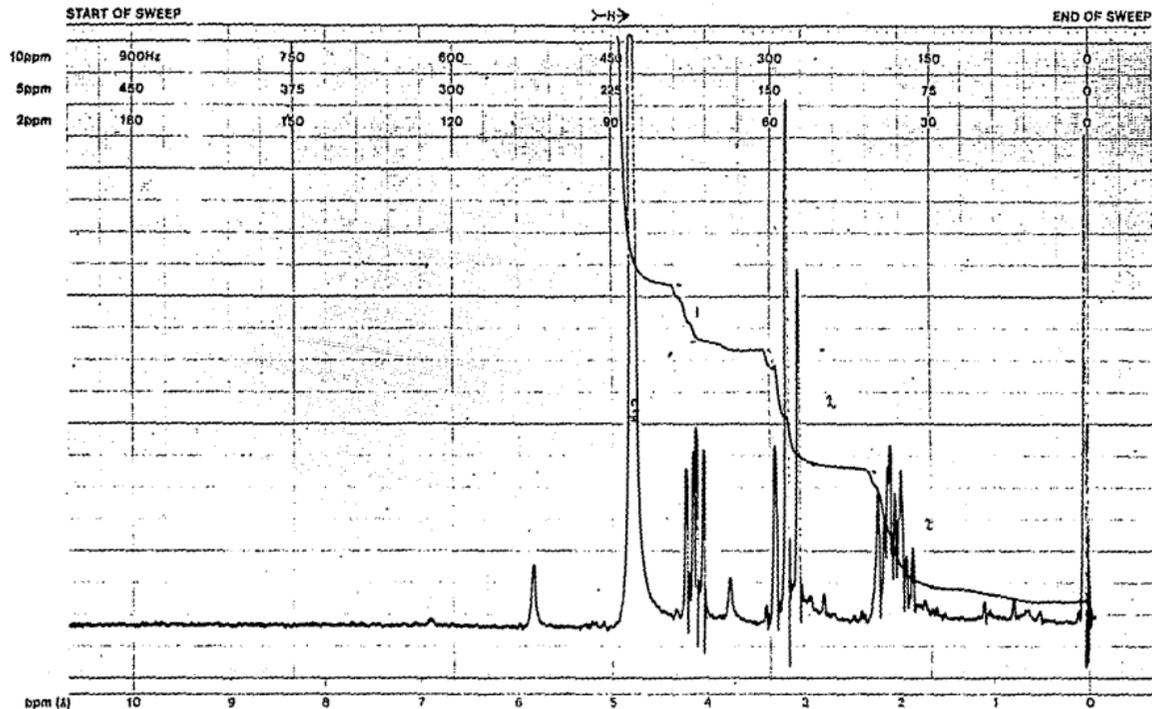


LOCK POS. _____ ppm	SPECTRUM AMPL. <u>6200</u>	SWEEP TIME <u>5</u> min	NUCLEUS <u>¹H</u>	SAMPLE: <u>see structure</u>	OPERATOR <u>L. Casella</u>
LOCK POWER _____ mG	FILTER <u>0.5</u> mc	SWEEP WIDTH <u>10</u> ppm	ZERO REF. <u>TMS</u>	<chem>OC1=CC=C(C=C1)O</chem>	DATE <u>6-V-89</u>
DECOUPLE POS. _____ ppm	RF POWER <u>0.045</u> mG	END OF SWEEP <u>0</u> ppm	SAMPLE TEMP <u>CA</u> C	SOLVENT: <u>DMSO</u>	SPECTRUM NO. <u>938</u>
		<u>No H₂O signal here 20 ppm.</u>			

EM-390 90 MHz NMR SPECTROMETER

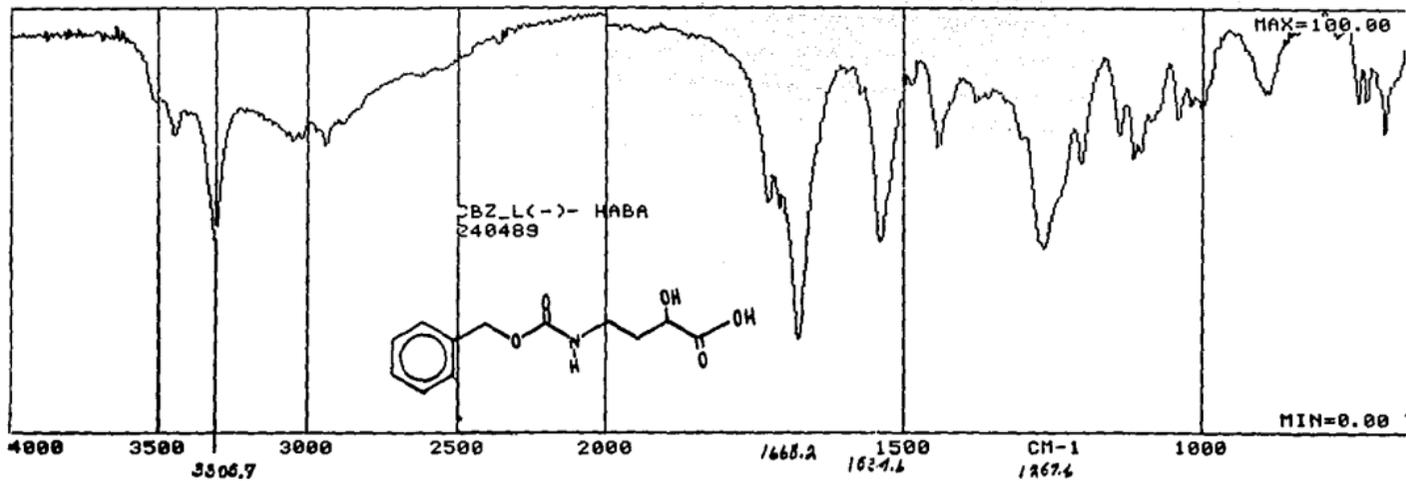


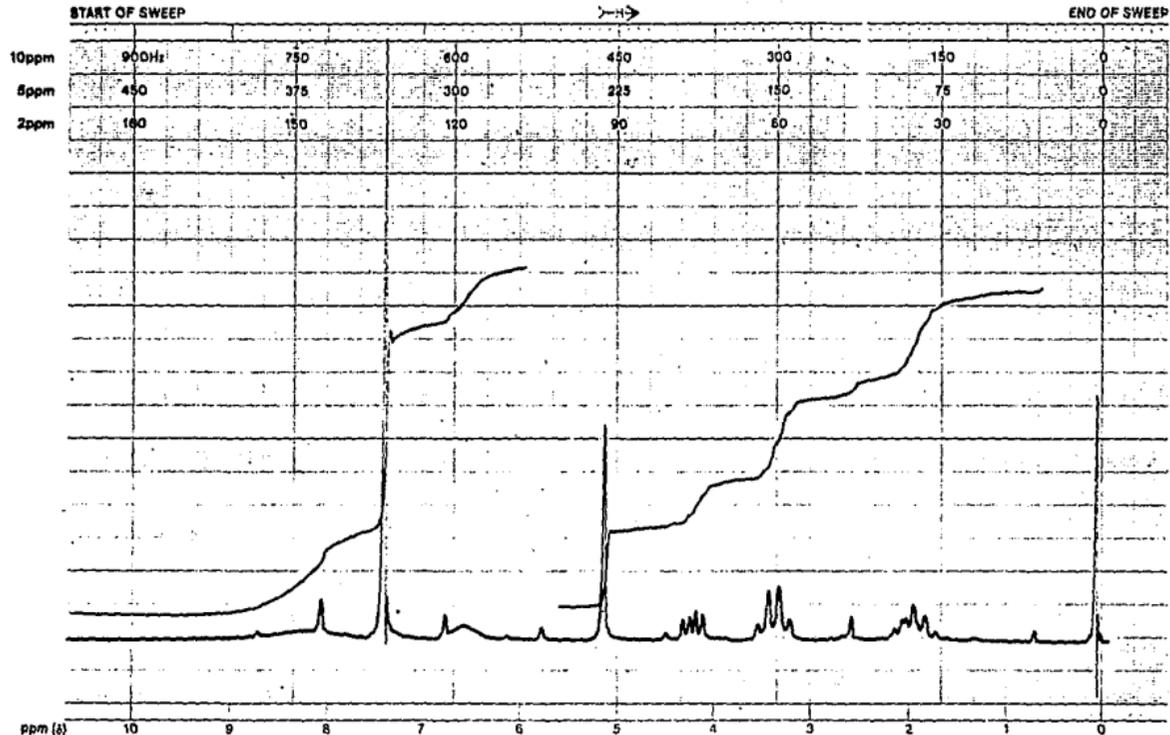
varian instrument division palo alto, california



EM-390 90 MHz NMR SPECTROMETER

LOCK POS. _____ ppm SPECTRUM AMPL. 5000 SWEEP TIME 5 min NUCLEUS H SAMPLE: OX-NABA OPERATOR L. G. 576
 LOCK POWER _____ mG FILTER 0.05 sec SWEEP WIDTH 10 ppm ZERO REF. DSS CC1=CC=C(C=C1)O DATE 16-0-89
 DECOUPLE POS. _____ ppm RF POWER 0.05 mG END OF SWEEP 0 ppm SAMPLE TEMP. TA SOLVENT: D2O SPECTRUM NO. 939
 No H₂O signal hasta 20ppm. Per Problemas de Solubilidad. No se usó el tubo 14cm con D₂O





LOCK POS. _____ ppm SPECTRUM AMPL. 2000 SWEEP TIME 5 min NUCLEUS ¹H SAMPLE: CB2-108 OPERATOR L. G. H. 6
 LOCK POWER _____ mG FILTER _____ sec SWEEP WIDTH 10 ppm ZERO REF. TMS Resonance DATE 12-27-69
 DECOUPLE POS. _____ ppm
 DECOUPLING POWER _____ mG RF POWER _____ mG END OF SWEEP 0 ppm SAMPLE TEMP. TA °C SOLVENT: CCl₄ + DMSO SPECTRUM NO. 931
+D₂O

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Wilson and Gisvold
 " Textbook of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry "
 Eight Edition
 Robert F. Doerge, Ph.D
 U.S.A. (1980).
- 2.- Goodman y Gilman
 " Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica "
 Pág. 1141-1156
 Sexta Edición
 Editorial Médica Panamericana
 México, D.F. (1981).
- 3.- Raymond E. Kirk and Donal F. Othmer " Eneyelopedia of Chemical Tecnology "
 Ed. The Intersciencen, vol. 2; pp. 809-852 (1951).
- 4.- Florey Kaus " Analytical Profiles of Drug Substances " Academic Press pp.
 37-71 U.S.A. (1974).
- 5.- Hiroshi Kawaguchi, Takayuki Naito, Susumu Nacagawa. " BB-K8 A New Semisyn-
 thetic Aminogluco-side Antibiotics " The Journal of Antibiotics; 25 (12);
 695-708 (1972).
- 6.- Takayuki Naito, Susumu Nacagawa, Yoshio Abe " Configurational and Positio-
 nal Isomers of BB-K8 " The Journal of Antibiotics; 26 (5), 297-301 (1973).
- 7.- Hans Plieninger, Günter Ege, Rolf Fischer und Weiner Hoffman " Synthese in -
 4-Stellung Carbáthoxy-Substituierter Cyclohexenone " Chem. Ber. 94; 2106-
 2114 (1961).

- 8.- Uzi Ravid, Robert M. Silverstein and Leverett R. Smith " Synthesis of The Enantiomers of 4-Substituted γ -Lactones with Known Absolute Configuration " Tetrahedron; 34: pp. 1449-1452 (1974).
- 9.- M. Taniguchi, K.Koga and S. Yamada " Stereoselective Synthesis of D-Ribose from L-Glutamic Acid. " Tetrahedron; 30; 3547-3552 (1974).
- 10.- Marc Larchevegue et Julien Lalande " Synthèse Enantiospécifique du 5-Hexadécanolide, Pheromone de " vespa orientalis " " Tetrahedron; 40 (6). - 1061-1065 (1984).
- 11.- O. Cervinka and L. Hubo " Absolute Configurations of γ -Butyrolactone- γ -Carboxylic Acid, γ -Valerolactone- γ -Carboxylic Acid " Collection Czechoslov. Chem. Commun. 33; 2927-2932 (1968).
- 12.- Kenji Koga, Masao Taniguchi and Shun-ichi Yamada " A new synthesis of D-ribose from L-glutamic acid " Tetrahedron Letters; 3; 263-266 (1971).
- 13.- Takayuki Naito and Susumu Nakagawa (Bristol-Myers Co) " A process for the preparation of γ -amino- α -hydroxybutyric acid " U.K.-1 466 001. 2-March. 1977. Appl. 203-56. 8 may. 1974.
- 14.- C.L. Arcus and J. Kenyon " The Mechanism of the Hofmann Reaction " Journal Chem. Soc; 916-920 (1939).
- 15.- Vogel Arthur
Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry
Page: 1128-1311
Fourth Edition
Longman Inc
New York (1978).
- 16.- Richard Henry Scheriber (Bristol-Myers Company) " Process for the preparation of 1-[L(-)- γ -Amino- α -Hydroxybutyric]- Kanamycin A, U.S. - 3 974 137, 10-Aug-1976. Appl. 472 781 23-May. 1974.

- 17.- A. Kapoor " Recent Trends in the Synthesis of Linear Peptides " Journal of Pharmaceutical Science; 59; (1), 695-808 (1972).
- 18.- Yukio Hriuchi, Eiichi Akita and Teiichiro Ito " Synthesis of (S) -4-amino-2-hydroxy-n-butyric acid and Its N-Phtaloyl Derivative " Agr. Biol. - Chem; 40 (8), 2649-2650 (1976).
- 19.- Toshio Yoneta, Seiichi Shibahara, Shunso Fukatsu " A New Synthesis of L-4-amino-2-hydroxybutyric acid. " Bull. Chem. Soc. Jap; 51 (11). 3296-3297 (1978).
- 20.- Thanun M. Pyriadi and H. James Harwood " Use of Acetyl Chloride- Triethylamine and Acetic Anhydride- Triethylamine Mixtures in the Synthesis of α -Isonalaminides from Maleic Acids " J. Org. Chem.; 36 (6), pp. 821-823 (1971).
- 21.- F. Campagna, A. Carotti, G. Casini. " A Convenient Synthesis of Nitriles from Primary Amides Under Mild Conditions " Tetrahedron Letters; 21 pp. 1812-1816 (1977).
- 22.- Kiroko Sato, Tekanori Kusumi. " Synthesis of 4-amino-2-hydroxybutanoic - Acid and Its 3-Methyl Derivative " Bull. Chem. Soc. Jap. 49 (10); 2815-2816 (1976).
- 23.- Yasuhiro Yamada and Hirotsuke Okada " Synthesis of DL-4-Amino-2-hydroxybutyric Acid" Agr. Biol. Chem. 40 (7); 1437-1438 (1976).