



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

212755
(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
C 07 H 15/22

(22) Přihlášeno 17 04 75
(21) (PV 2681-75)
(32) (31) (33) Právo přednosti od 23 05 74
(472780) Spojené státy americké
(40) Zveřejněno 31 08 81
(45) Vydáno 15 08 84

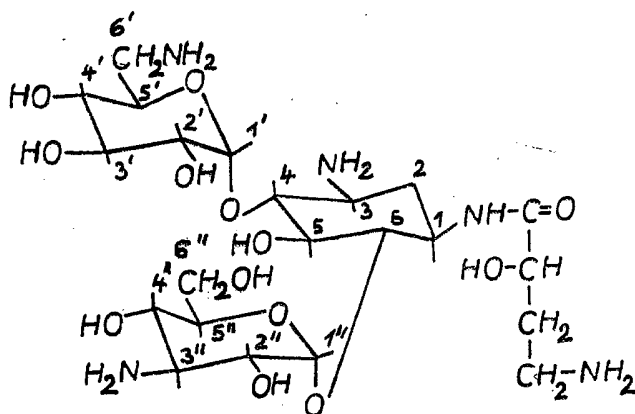
(72)
Autor vynálezu NAITO TAKAYUKI, NAKAGAWA SUSUMU a OKA MASAHIRO, TOKIO
(Japonsko)
(73)
Majitel patentu BRISTOL-MYERS COMPANY, NEW YORK, N. Y. (Sp. st. a.)

(54) Způsob výroby 1-[L-(—)- γ -amino- α -hydroxybutyryl]-kanamycinu A

1

2

Předložený vynález se týká způsobu výroby 1-[L-(—)- γ -amino- α -hydroxybutyryl]-kanamycinu A vzorce IV:



(IV)

V kanamycinu A jsou obsaženy 4 primární aminoskupiny v polohách 1, 3, 6' a 3''. Bylo zjištěno, že nejvíce reaktivní je 6'-aminoskupina, následuje 1-aminoskupina, to se zřetelím na reakce s elektrifilním činidlem. Obě aminoskupiny v polohách 3 a 3'' jsou méně reaktivní než kterákoli z aminoskupin v polohách 1 nebo 6', ale reagují rovněž za

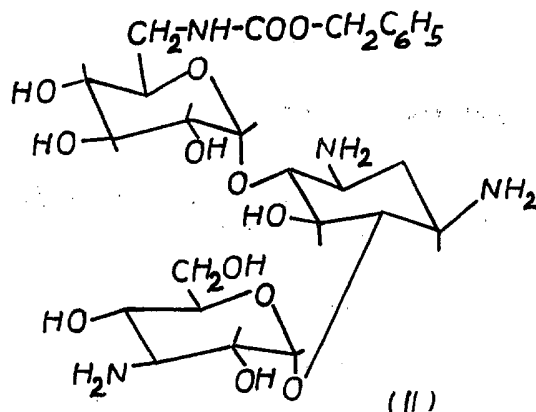
vzniku nežádoucích acylovaných látek, vznikajících v malých výtěžcích.

Podle toho je cílem tohoto vynálezu nalézt výhodnější postup, než jak se dosud používá v tomto směru podle amerických patentových spisů 3 781 268 a 3 974 137, přičemž je třeba, aby při tomto postupu docházelo k selektivnějšímu acylování 1-amino-

skupiny ve srovnání s dalšími aminoškupinami v molekule.

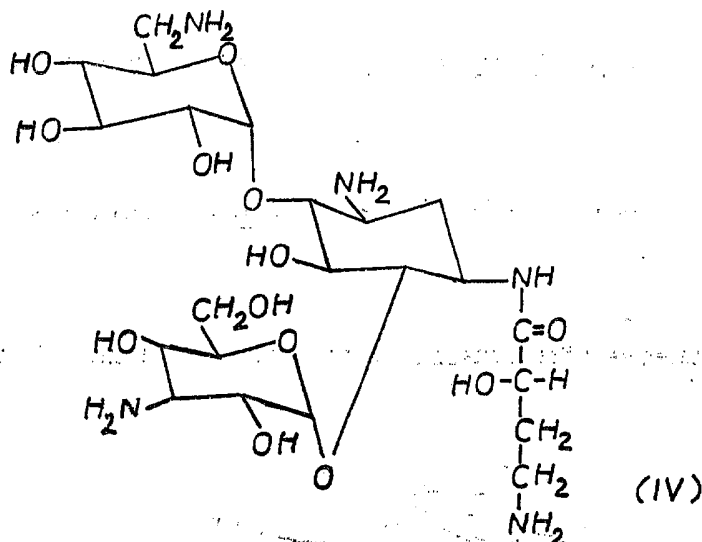
Předmětu tohoto vynálezu se dosáhlo nalezením způsobu přípravy sloučeniny uve-

deného zde vzorce IV, přičemž se tento postup vyznačuje tím, že zahrnuje postupně reakční stupně tak, že se v prvním stupni působí na sloučeninu vzorce II



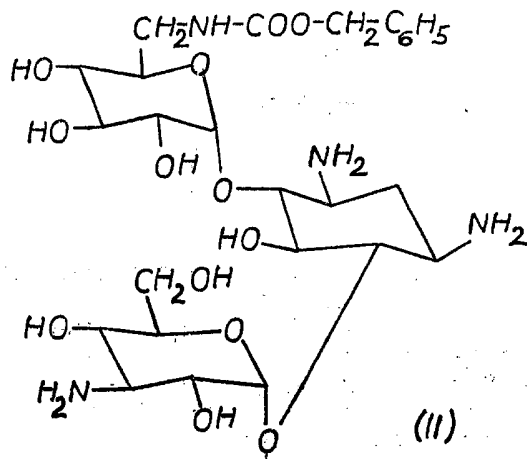
Cíle tohoto vynálezu bylo dosaženo tím, že vynález vytváří způsob výroby 1-[L-(-)-

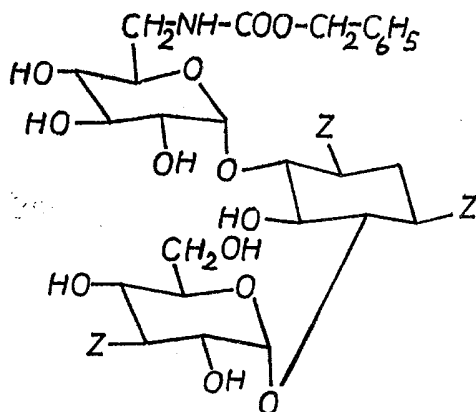
-γ-amino-α-hydroxybutyryl]-kanamycinu A vzorce IV



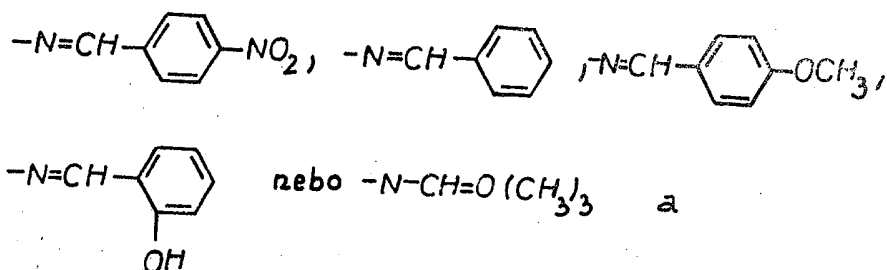
jehož podstata spočívá v tom, že v prvním stupni postupu se působí na 6'-N-benzyloxykarbonylkanamycin A vzorce II

aldehydem ze skupiny, kterou tvoří benzaldehyd, salicylaldehyd, p-nitrobenzaldehyd, p-methoxybenzaldehyd a pivaldehyd v molárním poměru 1 mol 6'-N-benzyloxykarbonylkanamycinu A vzorce II na 3 moly aldehydu v prostředí absolutního ethanolu, methanolu, n-propanolu, methylenchloridu, 2-propanolu, n-butanolu, sek.butanolu, terc.butylalkoholu, tetrahydrofuranu, dioxanu, dimethylformamidu nebo acetonu či jejich směsí nebo směsí uvedených rozpouštědel s vodou za teploty v rozmezí od 5°C až do teploty varu pod zpětným chladičem po dobu od 30 minut do 5 hodin za vzniku 6'-karbobenzoxy-1,3,3"-trialdehydokanamycinu A obecného vzorce III



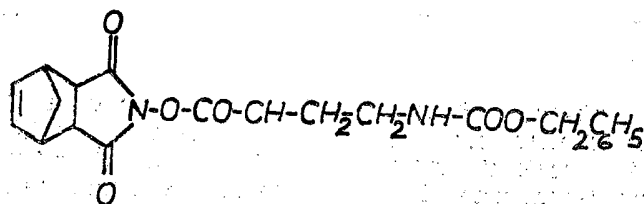


kde Z znamená zbytek vzorce



načež se ve druhém stupni působí na 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-tri-aldehydokanamycin A obecného vzorce III bezprostředně bez

isolování N-hydroxy-6-nonbornen-2,3-dikarboxyimidesterem kyseliny L-γ-benzyloxykarbonylamino-α-hydroxymáselné vzorce XX

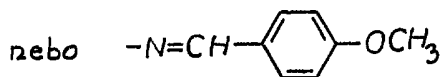
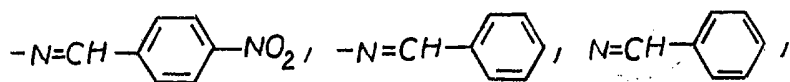


(XX)

v poměru 1 mol 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-tri-aldehydokanamycinu A vzorce III na 0,5 mol N-hydroxy-6-nonbornen-2,3-dikarboxyimidesteru kyseliny L-γ-benzyloxykarbonylamino-α-hydroxymáselné vzorce XX za teploty v rozmezí od -10°C do $+35^\circ\text{C}$ po dobu jedné hodiny v těchž rozpouštědlech, která byla uvedena v prvním stupni, načež se organické rozpouštědlo odstraní a zbytek se bezprostředně hydrogenuje vodíkem za přítomnosti kovového katalyzátoru ze skupiny, kam patří palladium, platina, Raney-ův nikl, rhodium, ruthenium a nikl v prostředí vody nebo rozpouštědla mísitelného s vodou ze skupiny, kterou tvoří voda a dioxan, tetrahydrofuran, dimethylether ethylenglykolu a dimethylether propylenglykolu za hodnoty pH 3 až 5 za vzniku 1-[L-(-)-γ-amino-α-

-hydroxybutyryl]-kanamycinu A vzorce IV.

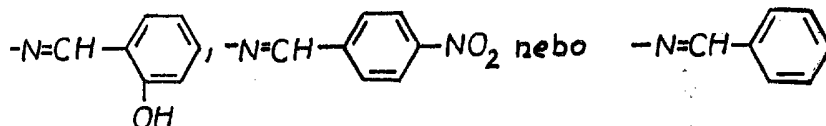
Je výhodné, když se v prvním stupni postupu působí na 6'-N-benzyloxykarbonylkanamycin A vzorce II aldehydem ze skupiny, kterou tvoří benzaldehyd, salicylaldehyd, p-nitrobenzaldehyd a p-methoxybenzaldehyd v poměru 1 mol 6'-N-benzyloxykarbonylkanamycinu A vzorce II na 3 moly aldehydu v prostředí absolutního ethylalkoholu, methylalkoholu, p-propylalkoholu, isopropylalkoholu, methylenchloridu, n-butylalkoholu, sek.butylalkoholu, terc.butylalkoholu, tetrahydrofuranu, dioxanu, dimethylformamidu nebo acetonu za teploty v rozmezí od 5°C do 40°C po dobu 30 minut až 5 hodin za vzniku 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-tri-aldehydokanamycinu A obecného vzorce III, kde Z znamená zbytek vzorce



a ve druhém stupni se působí na 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-trialdehydokanamycin A obecného vzorce III bezprostředně v reakční směsi nebo po izolování N-hydroxy-6-norbornen-2,3-dikarboximidesterem kyseliny L-γ-benzyloxykarbonylamino-α-hydroxymáselné vzorce XX v poměru 1 mol 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-tri-aldehydokanamycinu A vzorce III na 0,5 až 1 mol N-hydroxykarbonylamino-α-hydroxymáselné vzorce XX v teplotním rozmezí od +5 °C do +35 °C po dobu jedné hodiny až 3 hodin v soustavě rozpouštědel, jak jsou uvedena v prvním stupni, načež se rozpouštědlo oddestiluje a zbytek se hydrogenuje bezprostředně vodíkem za přítomnosti kovového katalyzátoru ze skupiny, kterou tvoří palladium, platina, Raney-ův nikl, rhodium, ruthenium a nikl ve vodě nebo v prostředí rozpouštědel mísitelných s vodou, jako je voda a dioxan, tetrahydrofuran, dimethylester ethylenglyko-

lu a dimethylether propylenglykolu za hodnoty pH 3 až 5 za vzniku 1-[L-(—)-γ-amino-α-hydroxybutyryl]-kanamycinu A vzorce IV.

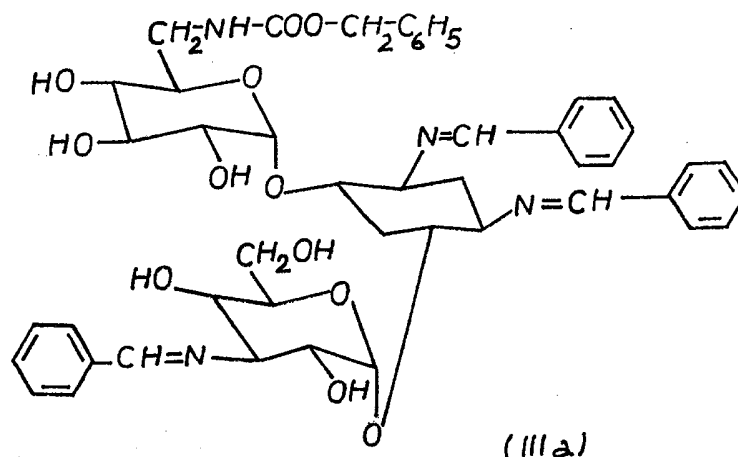
Dále je výhodné, když se v prvním stupni působí na 6'-N-benzyloxykarbonylkanamycin A vzorce II aldehydem ze skupiny, kterou tvoří benzaldehyd, salicylaldehyd, a p-nitrobenzaldehyd, v poměru 1 mol 6'-N-benzyloxykarbonylkanamycinu A vzorce II na asi 3 moly aldehydu v prostředí absolutního ethylalkoholu, methylalkoholu, n-propylalkoholu, isopropylalkoholu, n-butylalkoholu, sek.butylalkoholu, terc.butylalkoholu, tetrahydrofuranu, dioxanu, methylenchloridu, dimethylformamidu nebo acetonu nebo jejich směsí, či jejich směsí s vodou za teploty v rozmezí 5 °C až 40 °C po dobu 30 minut až 5 hodin za vzniku 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-tri-aldehydokanamycinu A obecného vzorce III, kde Z znamená zbytek vzorce



načež se ve druhém stupni působí na 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-tri-aldehydokanamycin A vzorce III bezprostředně v reakční směsi nebo po izolaci N-hydroxy-6-norbornen-2,3-dikarboximidesterem kyseliny L-γ-benzyloxykarbonylamino-α-hydroxymáselné vzorce XX v poměru 1 mol 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-tri-aldehydokanamycinu A vzorce III na 0,5 mol až 1 mol N-hydroxy-6-norbornen-2,3-dikarboximidesteru kyseliny L-γ-benzyloxykarbonylamino-α-hydroxymáselné vzorce XX v teplotním rozmezí od +5 °C do +35 °C stupňů Celsia po dobu jedné hodiny až 3 hodin v soustavě rozpouštědel, jak jsou uvedena v prvním stupni, načež se rozpouštědlo oddestiluje a zbytek se hydrogenuje bezprostředně vodíkem za přítomnosti kovového katalyzátoru ze skupiny, kterou tvo-

ří palladium, platina, Raney-ův nikl, rhodium, ruthenium a nikl, ve vodě nebo v prostředí rozpouštědla mísitelného s vodou, jako je voda a dioxan, tetrahydrofuran, dimethylether ethylenglykolu a dimethylether propylenglykolu za hodnoty pH od asi 4 za vzniku 1-[L-(—)-γ-amino-α-hydroxybutyryl]-kanamycinu A vzorce IV.

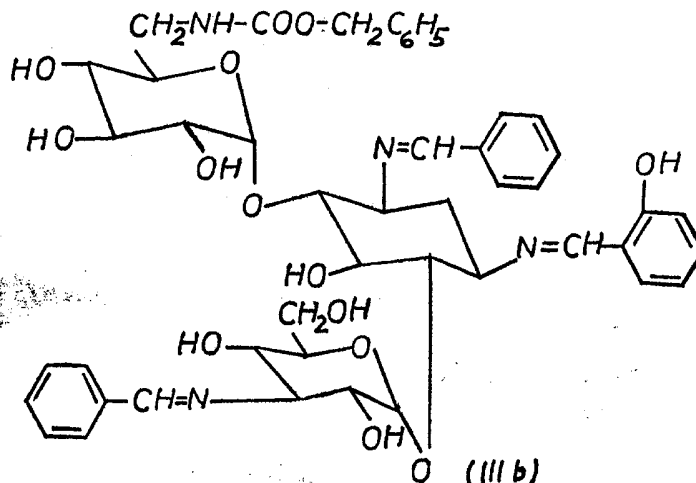
Dále je výhodné, když se v prvním stupni působí na 6'-N-benzyloxykarbonylkanamycin A vzorce II benzaldehydem v poměru 1 mol 6'-N-benzyloxykarbonylkanamycinu A vzorce II na 3 moly benzaldehydu ve směsi vody a tetrahydrofuranu v poměru 1 : 1 za teploty od 20 °C do 30 °C po dobu 2 až 4 hodiny za pH 10 za vzniku 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-tri-salicylkanamycinu A vzorce IIIa



a na 6'-karbobenzoxy-1,3,3''-trisalicylkanamycin A vzorce IIIa se působí ihned po přípravě nebo po izolování N-hydroxy-6-norbornen-2,3-dikarboximidesterem kyseliny L- γ -benzyloxykarobnylamino- α -hydroxymásečné vzorce XX v poměru 1 mol 6'-karbobenzoxy-1,3,3''-trisalicylkanamycinu A vzorce IIIa na 0,6 až 0,75 mol N-hydroxy-6-norbornen-2,3-dikarboximidesteru kyseliny L- γ -benzyloxykarobnylamino- α -hydroxymásečné vzorce XX za teploty v rozmezí 20° Celsia až 30 °C po dobu 1 hodiny až 3 hodin v rozpouštědlech, jak byla uvedena v předchozím stupni, ve směsi methylenchloridu, methylalkoholu a vody nebo ve směsi dimethylformamidu, acetonu a vody, načež se rozpouštědlo oddestiluje ve vakuu, přidáním

vodného roztoku amoniaku se hodnota pH upraví na 4 a zbytek se bezprostředně in situ hydrogenuje vodíkem za normálního tlaku a za přítomnosti palladia na uhlí za vzniku 1-[L-(—)- γ -amino- α -hydroxybutyryl]-kanamycinu A vzorce IV.

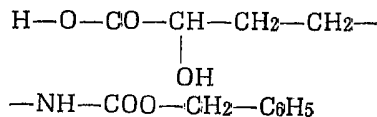
Dále je výhodné, když se v prvním stupni působí na 6'-N-benzyloxykarobnylkanamycin A vzorce II salicylaldehydem v poměru 1 mol x'-N-benzyloxykarobnylkanamycinu A vzorce II na 3 moly solicylaldehydu ve směsi vody a tetrahydrofuranu v poměru 1:1 za teploty 20 °C až 30 °C po dobu 2 až 4 hodin za pH 8 za vzniku 6'-karbobenzoxy-1,3,3''-tri-o-hydroxybenzalkanamycinu vzorce IIIb



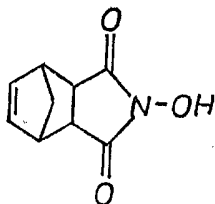
a na 6'-karbobenzoxy-1,3,3''-tri-o-hydroxybenzalkanamycin A vzorce IIIb se působí ihned po přípravě nebo po izolování N-hydroxy-6-norbornen-2,3-dikarboximidesterem kyseliny L- γ -benzyloxykarobnylamino- α -hydroxymásečné vzorce XXX v poměru 1 mol 6'-karbobenzoxy-1,3,3''-tri-o-hydroxybenzalkanamycinu A vzorce IIIb na 0,6 až 0,75 mol N-hydroxy-6-norbornen-2,3-dikarboximidesteru kyseliny L- γ -benzyloxykarobnylamino- α -hydroxymásečné vzorce XX za

teploty v rozmezí 20 °C až 30 °C po dobu 1 hodiny až 3 hodin v prostředí rozpouštědel popsaných v prvním stupni nebo ve směsi dimethylformamidu, acetonu a vody, načež se organické rozpouštědlo oddestiluje ve vakuu, přidáním vodného roztoku amoniaku se hodnota pH upraví na 4 a zbytek se hydrogenuje bezprostředně vodíkem za normálního tlaku a za přítomnosti palladia na uhlí za vzniku 1-[L-(—)- γ -amino- α -hydroxybutyryl]-kanamycinu A vzorce IV.

Dále je výhodné, když se ve druhém stupni působí na 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-tri-aldehydokanamycin A vzorce III in situ nebo po izolaci kyselinou L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymáselnou vzorce VI a N-hydroxy-5-norbornen-endo-2,3-dikarboximidem vzorce XIX



(VI)



(XIX)

s následujícím přidáním dicyklohexylkarbodiimidu v poměru 1 mol 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-tri-aldehydokanamycinu A vzorce III na 0,5 až 1,0 mol kyseliny L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymáselné vzorce VI a dicyklohexylkarbodiimidu, a 0,005 až 0,25 mol N-hydroxy-5-norbornen-endo-2,3-dikarboximidu vzorce XIX v teplotním rozmezí od -10°C do $+35^\circ\text{C}$ po dobu 10 hodin v rozpouštědlech, jak byla popsána v prvním stupni, načež se oddestiluje organické rozpouštědlo a zbytek se hydrogenuje bezprostředně, jak je popsáno v bodech 1 až 3, za vzniku 1-[L-(-)- γ -amino- α -hydroxybutyryl]-kanamycinu A vzorce IV.

Dále je výhodné, když na 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-tri-aldehydokanamycin A vzorce III se působí bezprostředně nebo po izolaci kyselinou L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymáselnou vzorce VI a N-hydroxy-5-norbornen-endo-2,3-dikarboximidem vzorce XIX a následujícím přidáním dicyklohexylkarbodiimidu v poměru 1 mol 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-tri-aldehydokanamycinu A vzorce III na 0,5 až 0,85 mol kyseliny L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymáselné vzorce VI a dicyklohexylkarbodiimidu a 0,05 až 0,425 mol N-hydroxy-5-norbornen-endo-2,3-dikarboximidu vzorce XIX v teplotním rozmezí od $+5^\circ\text{C}$ do 25°C po dobu 1 hodiny až 3 hodin v rozpouštědlech, jak byla popsána v prvním stupni.

Dále je výhodné, když se ve druhém stupni působí na 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-tri-aldehydokanamycin A vzorce III bezprostředně po reakci kyselinou L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymáselnou vzorce XIX s následujícím přidáním dicyklohexylkarbodiimidu v poměru 1 mol 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-tri-aldehydokanamycinu A vzorce III na 0,5 až 0,8 mol kyseliny L- γ -benzyloxykar-

bonylamino- α -hydroxymáselné vzorce VI a dicyklohexylkarbodiimidu a 0,05 až 0,425 mol N-hydroxy-5-norbornen-endo-2,3-dikarboximidu vzorce XIX v teplotním rozmezí od $+15^\circ\text{C}$ do $+30^\circ\text{C}$ po dobu 15 až 25 hodin.

Dále je výhodné, když se ve druhém stupni působí na 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-trisilylcylanamycin A vzorce IIIa in situ nebo po izolaci kyselinou L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymáselnou vzorce VI a N-hydroxy-5-norbornen-endo-2,3-dikarboximidem vzorce XIX za míchání a s následujícím přidáním dicyklohexylkarbodiimidu v poměru 1 mol 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-trisilylcylanamycinu A vzorce IIIa na 0,6 až 0,75 mol kyseliny L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymáselné vzorce VI a dicyklohexylkarbodiimidu a 0,06 až 0,375 mol N-hydroxy-5-norbornen-endo-2,3-dikarboximidu vzorce XIX v teplotním rozmezí $+25^\circ\text{C}$ až $+35^\circ\text{C}$ po dobu 15 až 25 hodin ve směsi tetrahydrofuranu a vody v poměru 1 : 1.

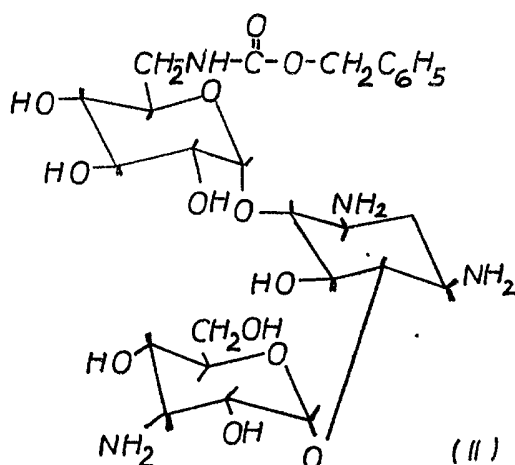
Dále je výhodné, když se ve druhém stupni působí na 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-tri-o-hydroxybenzalkanamycin A vzorce IIIb in situ nebo po izolaci kyselinou L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymáselnou vzorce VI a N-hydroxy-5-norbornen-endo-2,3-dikarboximidem vzorce XIX za míchání a s následujícím přidáním dicyklohexylkarbodiimidu v poměru 1 mol 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-tri-o-hydroxybenzalkanamycinu A vzorce IIIb na 0,6 až 0,75 mol kyseliny L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymáselné vzorce VI a dicyklohexylkarbodiimidu a 0,06 až 0,375 mol N-hydroxy-5-norbornen-endo-2,3-dikarboximidu vzorce XIX v teplotním rozmezí $+20^\circ\text{C}$ až 30°C po dobu 15 až 25 hodin ve směsi tetrahydrofuranu a vody v poměru 9 : 1.

Sloučenina 1-N-[L-(-)- γ -amino- α -hydroxybutyryl] kanamycin A vzorce IV se vyznačuje vynikající antibakteriální účinností, která se jeví být vyšší, než je účinnost samotného kanamycinu A. V následujících dvou tabulkách poměru 1 mol sloučeniny vzorce III na asi 0,5 až 1,0 molů každé ze sloučenin vzorce VI a karbodiimidu, a asi 0,005 až 0,25 mol sloučeniny vzorce XIX v teplotním rozmezí od asi -10 až asi do $+35$ stupňů Celsia, ale s výhodou od asi $+5^\circ\text{C}$ do asi 25°C po nejméně 10 hodin v soustavě rozpouštědel, jak jsou popsána ve stupni A, načež se organická rozpouštědla odstraní, a zbytek se hydrogenuje in situ, jak to zde bylo popsáno výše, za vzniku sloučeniny vzorce IV.

Výhodné provedení postupu podle tohoto vynálezu s přihlédnutím k výše uvedené modifikaci zahrnuje použití poměru 1 molu sloučeniny vzorce III na asi 0,5 až 0,85 mol každé ze sloučenin vzorce VI a dicyklohexylkarbodiimidu, a asi 0,05 až 0,425 mol sloučeniny vzorce XIX v rozmezí od $+5^\circ\text{C}$ do asi 25°C po 1 až 3 hodiny v soustavě rozpouštědel, jak je popsána ve stupni A, nebo

jinak alternativně použití poměru 1 molu sloučeniny vzorce III na asi 0,5 až 0,8 molů každé ze sloučenin vzorce VI a dicyklohexylkarbodiimidu, a asi 0,05 až 0,425 mol sloučeniny vzorce XIX v rozmezí od +15 °C do +30 °C po 15 až 25 hodin. Nejvýhodnější podmínky představuje poměr 1 molu sloučeniny vzorce III k asi 0,6 až 0,75 mol každé ze sloučenin vzorce VI a dicyklohexylkarbodiimidu a asi 0,06 až 0,375 mol sloučeniny vzorce XIX v rozmezí 20 až 30 °C po 15 až 25 hodin.

Rovněž tvoří část podle tohoto vynálezu nový a zlepšený způsob přípravy výchozí látky, tedy sloučeniny vzorce II



Postup se vyznačuje tím, že se působí na volnou bázi kanamycinu A N-benzyloxykarbonyloxy-5-norbornen-2,3-dikarboximidem v molárním poměru od asi 0,5 do asi 1,5 molů této právě uvedené látky na mol kanamycinu A, nebo zvláště v poměru asi 1:1. Následuje čištění produktu, například extrakcí organickým rozpouštědlem za použití takového rozpouštědla, jako je n-butylalkohol s následujícím chromatografickým vodné fáze.

Výše uvedená reakce se s výhodou provádí v organickém rozpouštědle, mísitelném s vodou, jako je například směs tetrahydrofuranu a vody, s výhodou o koncentraci tetrahydrofuranu 40 až 60 % v teplotním rozmezí od asi 0° do asi 25 °C, nebo s výhodou od asi 5 do asi 10 °C po nejvýše 6 hodin, ale s výhodou po dobu asi 4 hodin.

Sloučenina vzorce IV, tj. 1-N-[L-(-)-γ-amino-α-hydroxybutyryl]kanamycin A (BB-K8) se vyznačuje vynikající antibakteriální účinností, jež se zdá být vyšší, než je účinnost samotného kanamycinu A. V dalších 2 tabulkách jsou uvedeny hodnoty minimální inhibiční koncentrace kanamycinu A a sloučeniny vzorce IV (BB-K8) proti četným gram-positivním a gram-negativním mikroorganismům, jak byly získány postupem ředění na agaru podle Steers-e (tabulka 1) a postupem dvojnásobného ředění (tabulka 2). Jako prostředí byl použit agar podle Mullera a Hintonu při zjišťování ve spojitosti s tabulkou 1, a infusní zápara ze srdce při studiích ve spojitosti s tabulkou 2.

Tabulka 1

(minimální inhibiční koncentrace mg/ml)

Mikroorganismus	kanamycin A [6-8198]	Sloučenina IV (BB-K8, šarže č. 4)
Alk. faecalis A-9423	16	8
A-20648	nad 125	nad 125
Ent. cloacae A-0656	4	4
Ent. species A-20364	nad 125	2
Eent. hafniae 1 A-20674	1	1
E. coli A-2636	2	1
A-2066	16	4
A-20665	nad 125	1
A-20507	32	2
A-20520	nad 125	4
A-20365	nad 125	1
A-20684	2	2
A-20682	nad 125	2
A-20683	nad 125	8
A-20681	nad 125	2
A-15119	4	4
K. pneumoniae A-0967	4	4
K. species A-20328	nad 125	2
A-20330	32	32
A-20634	nad 125	4
K. pneumoniae A-20680	nad 125	4
A-0077	1	1
Pr. mirabilis A-9900	2	2
Pr. morgani A-15-153	2	2
vulgaris A-9555	2	1
rettgeri A-9636	0,25	0,25
mirabilis A-20645	4	4

Mikroorganismus	kanamycin A (6-8198)	Sloučenina IV (BB-K8, šarže č. 4)
Alk. faecalis A-9423	16	8
A-20648	nad 125	nad 125
Ent. cloacae A-0656	4	4
species A-20364	nad 125	2
hafniae 1 A-20674	1	1
E. coli A-0636	2	1
A-20664	16	4
A-20665	nad 125	1
A-20507	32	2
A-20520	nad 125	4
A-20365	nad 125	1
A-20684	2	2
A-20682	nad 125	2
A-20683	nad 125	8
A-20681	nad 125	2
A-15119	4	4
K. pneumoniae A-0967	4	4
species A-20328	nad 125	2
A-20330	32	32
A-20634	nad 125	4
K. pneumoniae A-20680	nad 125	4
A-0077	1	1
Pr. mirabilis A-9900	2	2
morganii A-15153	2	2
vulgaris A-9555	2	1
rettgeri A-9636	0,25	0,25
mirabilis A-20645	4	4
Pr. mirabilis A-20454	2	2
Providencia stuartii A-20615	2	1
alkalifaciens A-20676	1	1
Ps. aeruginosa A-20229	32	2
A-0943A	125	16
A-20653	nad 125	32
species A-20601	125, 63	16
A-20621	nad 125	nad 125
maltophilia A-20620	32	nad 125
Sal. enteritidis A-0531	1	0,5
derby A-20087	nad 125	1
Ser. marcescens A-20019	2	4
A-9933	4	8
A-20460	nad 125	4,2
A-20459	4	16
Shig. flexneri A-9684	4	4
Aeromonas A-20670	2	2
Arizona sp. A-20671	2	1
Citrobacter sp. A-20673	4	4
Edwardsiella sp. A-20678	4	4
Staph. aureus A-9606	1	1
A-4749	0,5	1
A-9537	2	1
A-20610	nad 125	2
A-20240	nad 125	8
A-15197	1	2
Prostředí Mueller-Hinton + 4% ovčí krve		
Str. faecalis A-9854	63	63
A-9575	125	nad 125
Str. pyogenes A-20200	32, 16	32
A-9604	125	125
A-15040	125	125
A-20065	125	125
D. pneumoniae A-9585	63, 32	63
A-20159	125	nad 125

Tabulka 2

minimální inhibiční koncentrace (mg/ml)

Organismus	kanamycin A (6-8196)	sloučenina IV (BB-K8 šarže č. 4)
<i>D. pneumoniae</i> $\pm 5\%$ séra		
A-0585	63	63
<i>Str. pyrogenes</i> $\pm 5\%$ séra		
A-9604	125	125
<i>Staph. aureus</i> Smith A-9537	0,5	0,5
A-9497	0,5	0,5
A-20239	125	4
A-20240	125	4
<i>Enter. cloacae</i> A-0656	2	2
species A-20364	125	2
<i>K. pneumoniae</i> A-9867	2	4
<i>E. coli</i> K-12 ML1410 A-20361	2	4
K-12 ML1630 A-20363	125	2
K-12 A-9632	2	1
A-20664	32	8
A-20665	125	8
<i>Pr. mirabilis</i> A-9900	2	16
morganii A-15153	4	16
vulgaris A-9436	1	2
<i>Ps. aeruginosa</i> A-20227	4	1
species A-20499	63	4
aeruginosa A-20653	125	4
aeruginosa A-20653	125	125
<i>Ser. marcescens</i> A-20019	2	4
A-20141	16	16

Z výše uvedených údajů o hodnotách minimální inhibiční koncentrace je patrné, že sloučenina vzorce IV (BB-K8) se vyznačuje výhodnějšími vlastnostmi se zřetelem na účinnost, než kanamycin A, zvláště v případě organismů, resistentních na kanamycin A.

Hodnoty minimálních inhibičních koncentrací lze rovněž dobře porovnat s výsledky in vivo pro všechny 3 organismy, na něž byl testován kanamycin a sloučenina vzorce IV.

Sloučenina IV a kanamycin A jsou rovněž stejně účinné při infekcích myši, způsobených kmeny *E. coli* A-15119 a *Staph. aureus* A-9537, senzitivními na kanamycin

A. Ačkoliv z hodnot CD_{50} (léčivá dávka pro 50% smrtelně infikovaných myši) se dá odvodit, že sloučenina vzorce IV je poněkud méně účinná ve srovnání s kanamycinem A, nemá tento malý rozdíl zřejmě vůbec důležitost, protože hladiny dávek byly značně zředěné (pětinásobné ředění).

Proti kmenům *E. coli* A-20520, resistentním na kanamycin, není příliš při testech in vivo kanamycin A účinný — jak se dalo předpokládat — zatím co u sloučeniny vzorce IV se jeví zřetelný ochranný účinek. Sloučenina vzorce IV je asi desetkrát účinnější proti kmenům *E. coli* při podávání čtyřdenním režimem, než dvoudenním.

Srovnání účinností sloučeniny vzorce IV a kanamycinu A in vitro a in vivo

Látka	Počet testů	<i>Staphylococcus aureus</i> A-9537		<i>Escherichia coli</i> A-15119		<i>Escherichia coli</i> A-20520	
		MIC	CD_{50}^b	MIC	CD_{50}	MIC	CD_{50}
Sloučenina vzorce IV	1	1	2,0 . 2	2	2 . 2	2	66 . 2
	2	— ^c	—	—	—	—	5 . 4
Kanamycin A	1	2	0,5 . 2	4	4 . 2	125	200 . 2
	2	—	—	—	—	—	200 . 4

MIC = minimální inhibiční koncentrace ($\mu\text{g/ml}$). Testy byly provedeny, jak to popisuje Chisholm a spol., *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*, 1929, str. 244 (1970). Použité prostředí: agar Mueller-Hinton

^b CD_{50} = léčivá dávka (dosis curativa), 50 % (mg/kg při použití násobeno počtem použitých). Myšim se podává za 1 a 4 hodiny po infikování subkutánně při dvou podáních, a za 0, 2, 4 a 6 hodin po infikování při čtyřech podáních. Jinak byly testy provedeny, jak to popisují Price a spol., *J. of Antibiotics*, 22, 1 (1969).

^c = netestováno

Sloučenina vzorce IV je cennou látkou jako antibakteriální činidlo, výživná přísada do krmiva pro zvířata, terapeuticky použitelná látka pro drůbež, zvířata i lidi, a zvláště se hodí k léčbě infekčních onemocnění, způsobených gram-negativními i gram-positivními mikroorganismy.

Při orálním podávání se hodí sloučenina vzorce IV jako pomocný prostředek při předoperativním sterilisování střevního traktu. V tlustém střevě tím dojde k omezení růstu jak aerobní, tak anaerobní flory, pokud je citlivá na tuto látku. Ve spojení s dostačujícím mechanickým třením je tato látka vhodná k přípravě a úpravě lékařského náčiní.

Při podávání lidem je sloučenina vzorce IV účinná při bakteriálních infekcích za parenterálního podávání v dávkovacím rozsahu od asi 250 mg až asi 3000 mg denně za rozdělení této dávky na 3 až 4 denně. Obvykle se sloučenina vyznačuje účinností při podávání každých 12 hodin v dávce asi 5,0 až 7,5 mg na kg hmotnosti těla.

Popis vhodných provedení

Příklad 1

Anhydrid kyseliny 5-norbornen-endo-2,3-dikarboxylové (XVIII)

Postupuje se podle údajů O. Dielse a K. Aldera, Ann. Chem. **460**, 98 (1928). Do míchané suspenze 98,1 g (1 mol) anhydridu kyseliny maleinové v 500 ml suchého benzenu se přidává po kapkách za chlazení 66,1 gramu (1 mol) cyklopentadienu; za míchání se z reakční směsi vyloučí krystalická sraženina, jež se odsaje a krystalisací ze směsi ligroinu (což je v podstatě n-hexan) a benzenu 1:1 se získá 116 g (71%) sloučeniny, jejíž složení je uvedeno v názvu, b. t. 164 až 166 °C (literatura uvádí 164 až 165 °Celsia).

Příklad 2

N-hydroxy-5-norbornen-endo-2,3-dikarboximid

Příprava se provádí podle postupu L. Bauera a S. V. Miarky, J. Org. Chem. **24**, 1293 (1959). 115 g (0,7 molu) výše uvedeného norbornenového anhydridu (XVIII) se přidá do roztoku hydroxylaminu, připraveného přidáním 47,5 g (0,45 mol) uhlíkatu sodného do roztoku 60,5 g (0,87 mol) hydrochloridu hydroxylaminu v 140 ml vody, a reakční směs se zahřívá hodinu na 60 až 70 °Celsia, načež se ponechá stát v ledniče přes noc. Krystaly, které se tím vyloučí, se odsají, promyjí se za použití 120 ml vychlazeného 5 N roztoku kyseliny chlorovodíkové, a sušením se získá 84,9 g (70%) sloučeniny vzorce XIX, b. t. 172 °C. Matečný loup se okyslí na pH 2 a extrahuje se chloroformem

(deset podílů po 70 ml). Zahuštěním chloroformového extraktu se získá druhý podíl sloučeniny vzorce XIX (7,2 g, 6%), b. t. 170 až 172 °C.

Příklad 3

N-hydroxy-5-norbornen-2,3-dikarboximidový ester kyseliny L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymásečné (XX)

Za teploty 10 °C se přidá 2,065 (0,01 mol) dicyklohexylkarbodiimidu do míchaného roztoku 2,53 g (0,01 mol) kyseliny L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymásečné a 1,79 g (0,01 mol) sloučeniny vzorce XIX v 50 ml suchého tetrahydrofuranu. Reakční směs se míchá za teploty místnosti přes noc, vysrážená dicyklohexylmočovina se odsaje, promyje se tetrahydrofuranem, filtrát a podíly z promývání se spojí, a zahuštěním ve vakuu se získá 4,5 g olejovitého zbytku, a z toho na koloně se silikagelem za použití ethylesteru kyseliny octové k eluování se dále získá 4,0 g (96%) aktivního esteru XX ve formě bezbarvého oleje. Infračervené spektrum: 3300, 1820, 1780, 1735, 1720, 1695 cm^{-1} . NMR-spektrum v CDCl_3 + 1 kapka D_2O : δ (v ppm) 1,63 (2 H, q, $J = 9$ Hz), 2,15 (2H, m), 3,40 (6H, m), 4,60 (1H, d-d, $J = 7$ a 5 Hz), 5,13 (2H, s), 6,20 (2H, široký pás), 7,40 (5H, s).

Příklad 4

N-benzyloxykarbonyloxy-5-norbornen-2,3-dikarboximid (XVII)

K míchanému roztoku 2,64 g (0,066 mol) hydroxidu sodného v 50 ml vody se přidá za chlazení na 10 °C 3,58 g (0,02 mol) N-hydroxy-5-norbornen-2,3-dikarboximidu XIX, a k získanému roztoku se přikapává během 40 minut za teploty 0 až 5 °C 6,82 g (0,04 mol) benzyloxykarbonylchloridu, načež se reakční směs míchá 4 hodiny za teploty místnosti. Přidáním 20 ml n-hexanu se z reakční směsi vysráží pevný podíl, který se odfiltruje a suší na vzduchu. Krystalizací surového produktu ze směsi benzenu a n-hexanu se získá 5,1 g (81%) bezbarvých prismatických látek XVII, b. t. 121 až 122 °C. Infračervené spektrum (v KBr): 1810, 1780, 1740, 1630 cm^{-1} . NMR-spektrum (v acetonu- d_6): δ (v ppm): 1,66 (2H, široký s), 2,45 (4H, m), 5,37 (2H, s), 6,12 (2H, t, $J = 1,5$ Hz), 7,48 (5H, s).

Analýsa:

pro $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_5$

vypočteno:

65,17 % C, 4,83 % H, 4,47 % N

nalezeno:

65,50 % C, 4,73 % H, 4,44 % N

Příklad 5

6'-N-benzyloxykarbonylkanamycin A (II)

K míchanému roztoku 4,84 g (0,01 mol) volné báze kanamycinu A v 50 ml 50% vodného tetrahydrofuranu se přidává v několika dávkách během hodiny za teploty 7 °C 3,14 g (0,01 mol) sloučeniny vzorce XVII. Reakční směs se dále míchá 4 hodiny, načež se zahuštěním ve vakuu oddestiluje rozpouštědlo, zbylý vodný roztok se zředí přidáním 150 ml vody a vše se extrahuje dvěma dávkami po 100 ml butanolu, nasyceného vodou. Vrstva butanolu se promyje za použití 100 ml vody, a zahuštěním ve vakuu se získá 1,78 g poly-6'-N-benzyloxykarbonylkanamycinu A. Vodný podíl, jakož i podíly

Frakce celková	Dílčí frakce ve zkumavce č.	eluováno	množství g	Totožnost
1	106-144	0,1 N vodný NH ₃	3,44 (56 %)	6'-N-benzyl- oxykarbonyl- kanamycin A
2	203-212	0,3 N vodný NH ₃	0,54 (11 %)	regenerovaný kanamycin

Takto připravený 6'-N-benzyloxykarbonylkanamycin A (II) je velmi čistý a homogenní, jak bylo zjištěno chromatografickým na tenké vrstvě silikagelu. B. t. 217 až 219 °C. Fysikálně-chemické vlastnosti jsou totožné s vlastnostmi autentického vzorku.

Příklad 6

1-N-[L-(—)-γ-amino-α-hydroxybutyryl]-kanamycin A (BB-K8, IV); příprava přes Schiffovu bázi s benzaldehydem

K míchanému roztoku 6,19 g (0,01 mol) 6'-N-benzyloxykarbonylkanamycinu A (II) v 50 ml 50% vodného tetrahydrofuranu se přidají 3 ml (0,03 mol) benzaldehydu, reakční směs se míchá 3 hodiny za teploty místnosti, ochladí se na 5 °C, a přidá se k ní roztok 4 g (0,01 mol) sloučeniny vzorce XX v 50 ml tetrahydrofuranu, načež se reakční směs míchá hodinu při 5 °C, její pH se upraví přidáním 6 N roztoku kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 2, reakční směs se míchá další hodinu za teploty místnosti, načež se organické rozpouštědlo oddestilu-

z promývání se spojí, a zahuštěním ve vakuu asi na 50 ml se získá vodný roztok, který se pustí kolonou iontoměničové pryskyřice CG-50 (amoniový cyklus, 140 ml), a kolona se postupně vyvíjí za použití 200 ml vody, 1,9 litru 0,05 N vodného roztoku amoniaku, 1,9 litru 0,1 N vodného roztoku amoniaku, a posléze litru 0,3 N vodného roztoku amoniaku. Podíly z eluování se jímají ve formě frakcí po 20 ml, a rozdělí se na 2 části se zřetelem na hodnoty R_f při chromatografování na tenké vrstvě (S-114, 6'-N-benzyloxykarbonylkanamycin A, R_f 0,23 a kanamycin, R_f 0,07). Každý z těchto dvou sloučených podílů se zahustí ve vakuu, a zbytek se suší rovněž ve vakuu nad kyslíčným fosforečným.

je za sníženého tlaku. Získaný vodný roztok se protřepá dvěma podíly po 20 ml methylenchloridu, pH se upraví přidáním 10% vodného roztoku amoniaku na hodnotu 4, a po přidání 1,25 g 10% palladia na uhlí se roztok hydrogenuje přes noc za atmosférického tlaku a za teploty místnosti. Katalyzátor se odfiltruje, promyje se za použití 20 ml vody, filtrát se spojí s podíly z promývání, hodnota pH se upraví na 8 přidáním 10% vodného roztoku amoniaku, a roztok se prolije kolonou pryskyřice CG-50 (amoniový cyklus, 200 ml) načež se kolona eluuje za použití 400 ml vody, 1,2 litru 0,1 N roztoku amoniaku, 2,06 litru 0,3 N roztoku amoniaku, 0,92 litru 0,5 N roztoku amoniaku a posléze 1,2 litru 1,0 N roztoku amoniaku. Podíly z eluování se jímají po 20 ml, a spojí se podle hodnot R_f při chromatografování na tenké vrstvě silikagelu (S-110, vyvolávání ninhydrinem), a testy na Petriho miskách za použití B. subtilis PCI 219 a P. aeruginosa A 9343. Každá ze sloučených frakcí se zahustí ve vakuu a suší se dále lyofilizováním.

Frakce	Zkumavka č.	Koncentrace NH ₃ při eluování	váha/výtěžek	bio-výtěžek	identifikace
1	90-99	0,3 N	1603 mg (33 %)	1490 mg (30 %) ¹	regenerovaný kanamycin
2	152-161	0,3 N	483 mg (8 %)		BB-K29
3	162-169	0,3 N	376 mg (6 %)	196 mg (3 %) ²	BB-K29 + BB-K8
4	170-197	0,3—0,5 N	1877 mg (30 %)	1350 mg (23 %) ²	BB-K8 2 BB-K11
5	198-203	0,5 N	100 mg (2 %)		BB-K11
6	238-257	1,0 N	146 mg (2 %)		diacylovaná sloučenina

pozn.:

¹ testováno na *B. subtilis* PCI 219

² testováno na *K. pneumoniae* A 20680, sensitivní na BB-K8 s vysokou resistencí na kanamycin, BB-K11 a BB-K29.

Frakce 4 (1,877 g) se rozpustí v 10 ml iontů zbavené vody, pH tohoto roztoku se upraví na hodnotu 6 přidáním 10% roztoku chlorovodíku, roztok se adsorbuje na koloně iontoměniče CG-50 (amoniový cyklus, 15 ml), jež se eluuje za použití 100 ml $\times \times$ 0,3 N roztoku amoniaku a 200 ml 0,5 N roztoku amoniaku. Eluát se jímá ve formě frakcí po 20 ml, přičemž zkumavky 6, a dále 8 až 17 dávají pozitivní reakci s ninhydriem. Obsah zkumavek 8 až 17 se spojí, a celek se zahustí ve vakuu na objem asi 1 mililitr, ke koncentrátu se přidají 3 ml me-

thylalkoholu, a po filtraci se filtr promyje za použití 0,5 ml 75% vodného methanolu. Filtrát a podíly z promývání se spojí a po zředění přidáním 10 ml methylalkoholu se reakční směs ponechá stát přes noc za teploty místnosti. Amorfni sraženina, jež se vyloučí, se odfiltruje, filtrát se očkuje, a získají se tím bezbarvé krystaly látky IV, jež je totožná s autentickým vzorkem. Zahuštěním filtrátu ve vakuu se získá zbytek, který se lyofilizuje, přičemž výtěžky a testy, provedené u každého podílu, jsou uvedeny v následující tabulce.

IV	Množství	Test			
		B. subtilis	K. pneumoniae	B. subtilis	K. pneumoniae
amorfni prášek	70 mg	737 μ /mg	927 μ /mg	0,9 %	1,1 %
krystaly	1093 mg	1163 μ /mg	1087 μ /mg	19 %	19 %
lyofilizovaný prášek	180 mg	608 μ /mg	504 μ /mg	1,9 %	1,6 %

Příklad 7

Příprava L-(—)- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymásečné kyseliny (VI)

Do roztoku 5,2 g (0,13 mol) hydroxidu sodného v 50 ml vody se přidá 7,4 g (0,062 mol) kyseliny L-(—)- γ -amino- α -hydroxymásečné, a do tako připraveného roztoku se za míchání přikapává během 30 minut za chlazení na 0 až 5 °C 11,7 g (0,068 mol) karbo-benzoxychloridu, načež se reakční směs za téže teploty míchá ještě hodinu. Dále se reakční směs protřepe s etherem (50 ml), její pH se upraví na hodnotu 2 přidáním zředěného roztoku kyseliny chlorovodíkové, a vše se extrahuje čtyřmi dávkami po 80 ml etheru. Roztoky v etheru se spojí, promyjí se malým množstvím nasyceného roztoku chloridu sodného, a po vysušení bezvodým

síranem sodným a filtraci se filtrát zahustí ve vakuu. Získaný zbytek se krystaluje z benzenu; získá se tím 11,6 g (74 %) bezbarvých destiček o b. t. 78,5 až 79,5 °C, $[\alpha]_D - 4,5^\circ$ (c = 2, methanol). Infračervené spektrum (v KBr): ν /C=O 1740, 1690 cm^{-1} . NMR-spektrum (acetone- d_6) δ (v ppm na tetramethylsilan): 2,0 (2H, m), 3,29 (2H, d-d, J = 6,7, a 12 Hz), 4,16 (1H, d-d, J = 4,5 a 8 Hz), 4,99 (2H, s), 6,2 (2H, široký pás), 7,21 (5H, s)

Analýza:

pro C₁₂H₁₅NO₅

vypočteno:

56,91 % C, 5,97 % H, 5,53 % N

nalezeno:

56,66 % C, 5,97 % H, 5,47 % N

Příklad 8

N-hydroxysukcinimidoester kyseliny
L-(—)- γ -benzyloxykarbonylamino- α -
-hydroxymáselné (VII)

Roztok 10,6 g (0,042 mol) látky VI a 4,8 g (0,042 mol) N-hydroxysukcinimidu, jehož přípravu popisuje G. W. Anderson a spol., J. Am. chem. Soc. **86**, 1839 (1964), v 200 ml ethylesteru kyseliny octové se ochladí na 0 °C, přidá se 8,6 g (0,042 mol) dicyklohexylkarbodiimidu, a reakční směs se nechá v ledničce přes noc. Vyloučená dicyklohexylmočovina se odfiltruje, filtrát se zahustí asi na 50 ml za sníženého tlaku, čímž se získají bezbarvé krystalky látky VII, které se odfiltrují. Ve výtěžku 6,4 g se získá sloučenina o b. t. 121 až 122,5 °C. Zahuštěním filtrátu ve vakuu do sucha, a promytím zbytku za použití 20 ml směsi benzenu a n-hexanu se získá další podíl látky VII. Celkový výtěžek činí 13,4 g (92 %), $[\alpha]_D^{1,5}$ ($c = 2$, CHCl_3). Infračervené spektrum (ν KBr) $\nu/\text{C}=\text{O}$ 1810, 1755, 1740, 1680 cm^{-1} , NMR-spektrum (aceton- d_6) δ (v ppm, přepočteno na tetramethylsilan): 2,0 (2H, m), 2,83 (4H, s), 3,37 (2H, d-d, $J = 6,4$ a 12,5 Hz), 4,56 (1H, m), 4,99 (2H, s), 6,3 (2H, široký signal), 7,23 (5H, s).

Analýza:

pro $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_7$

vypočteno:

54,85 % C, 5,18 % H, 8,00 % N

nalezeno:

54,79 % C, 5,21 % H, 8,14 % N

54,70 % C, 5,20 % H, 8,12 % N

Příklad 9

Příprava N-(benzyloxykarbonyloxy)-
sukcinimidu

V roztoku 9 g (0,22 mol) hydroxidu sodného v 200 ml vody se rozpustí 23 g (0,2 mol) N-hydroxysukcinimidu, a do získaného roztoku se za míchání přikapává 34 g (0,2 mol) karbobenzoychloridu za neustálého chlazení vodou, načež se reakční směs míchá přes noc za teploty místnosti, čímž se vyloučí karbobenzoxyderivát, který se odfiltruje, promyje se vodou a suší se na vzduchu, výtěžek 41,1 g (82 %). Překrystalováním z benzenu a n-hexanu (10 : 1) se získají bezbarvá prismata o b. t. 78 až 79 °C.

Příklad 10

Příprava 6'-karbobenzoxykanamycinu A (II)

Roztok 42,5 g (90 mmol) volné báze kanamycinu A v 450 ml vody a 500 ml dimethylformamidu se ochladí pod 9 °C, a za energického míchání se přikapává během doby asi 2 hodin roztok 22,4 g (90 mmol) N-(benzyloxykarbonyloxy)sukcinimidu v 500 ml dimethylformamidu. Reakční směs se míchá za chlazení na -10° až 0 °C přes noc, načež se míchá za teploty místnosti 1 den, dále se reakční směs zahustí za sníženého tlaku a za teploty pod 50 °C, olejovitý zbytek se rozpustí ve směsi 500 ml vody a 500 ml butylalkoholu, filtrací reakční směsi se odstraní nerozpustné podíly, filtrát se rozdělí na 2 vrstvy, načež se butanolová vrstva i vodná vrstva zpracují za použití v tom kterém případě 500 ml butanolu, nasyceného vodou (dvakrát 500 ml) a vody, nasycené butanolem (dvakrát 500 ml), to za použití postupu, který je obdobný protiproudnému vytřepávání. Tři vodné vrstvy se spojí a po zahuštění do sucha za sníženého tlaku se získá olejovitý zbytek, jehož část krystaluje stáním za teploty místnosti. Ke zbytku, obsahujícímu krystaly, se přidá přibližně 100 ml methylalkoholu, jímž se rozpustí olej, který se dá takto oddělit od krystalů, a po přidání 300 ml ethanolu se reakční směs uchovává za teploty místnosti přes noc; získá se tím krystalická hmota, ze které se krystaly odfiltrují, a tento produkt o váze 44 g obsahuje malé množství kanamycinu A, jak je to patrné z chromatografie na tenké vrstvě za použití soustavy n-propylalkohol-pyridin-kyselina octová-voda (15 : 10 : 3 : 12) k vyvíjení a ninhydrinu jako testovacího činidla při postřiku.

Surový produkt se rozpustí v 300 ml vody, a roztok se chromatografuje na koloně iontoměničové pryskyřice CG-50 (průměr 30 milimetrů, amoniový cyklus, 500 ml). Kolona se vymývá 0,1 N roztokem amoniaku za jímání frakcí po 10 ml. Očekávaný produkt je obsažen ve zkumavkách číslo 10 až 190, zatím co kanamycin A byl regenerován z pomaleji se pohybujících frakcí, a polohový isomer, případně polohové isomery produktu jsou, jak se zdá, obsaženy v rychleji se pohybujících frakcích. Frakce 10 až 110 se spojí, a zahuštěním do sucha za sníženého tlaku se získá 24,6 g (45 %) bezbarvého produktu, tj. 6'-karbobenzoxykanamycinu A (II), který počíná tát a zbarvovat se při 204 °Celsia s rozkladem za teploty 212 °C, kdy se též z tajícího vzorku vyvíjí plyn. $[\alpha]_D^{+109}$ ($c = 2$, H_2O).

Chromatografie na tenké vrstvě silikagelu F 254 za detegování ninhydrinem:

Použitá soustava rozpouštědel	Hodnoty R _f			
	6'-karbobenzoxy-kanamycin A		kanamycin A	
n-propylalkohol-pyridin-kyselina octová-voda (15 : 10 : 3 : 12)	0,42 (hlavní)	0,33 (menší)	0,15	0,04
aceton-kyselina octová-voda (20 : 6 : 74)	0,24		0,14	
chloroform-methylalkohol-koncentrovaný vodný roztok amoniaku-voda (1 : 4 : 2 : 1)	0,76		0,50	
methylester kyseliny octové-n-propylalkohol-koncentrovaný vodný amoniak (45 : 105 : 60)	0,22 ⁺		0,04 ⁺	

⁺ Detekce anthronem a kyselinou sírovou.

Bylo zjištěno, že konečný produkt je doprovázen dvěma složkami, obsaženými také v podstatně menším množství, to za použití chromatografie na tenké vrstvě a jedné ze soustav pro vyvíjení. Avšak konečný produkt byl použit bez jakéhokoli čištění pro přípravu BB-K8 (IV).

Příklad 11

Příprava kyseliny

L-(—)- γ -amino- α -hydroxymáselné z ambutyrosinu A nebo B, či jejich směsí

Reakční směs 5,0 g ambutyrosinu A, viz americký patentový spis 3 541 078, 17. XI. 1970, a 160 ml 0,5 N roztoku hydroxidu sodného se zahřívá hodinu k varu pod zpětným chladičem. Hydrolyzáte se neutralizuje přidáním 6 N roztoku kyseliny chlorovodíkové, načež se provede chromatografie na koloně CG-50 (amoniový cyklus). Potřebná kyselina L-(—)- γ -amino- α -hydroxymáselná se izoluje vyvoláním kolony vodou s následujícím odstraněním vody lyofilisováním. Kyselina L-(—)- γ -amino- α -hydroxymáselná je charakterisována jako krystalická látka o b. t. 212,5 až 214,5 °C (viz sloupec 2, ř. 31 až 38 amerického patentového spisu 3 541 078).

Příklad 12

Příprava kyseliny

L-(—)- γ -amino- α -hydroxymáselné z kyseliny DL- α -hydroxy- γ -ftalimidomáselné

A) Sůl kyseliny L- α -hydroxy- γ -ftalimidomáselné s dehydroabietylaminem:

K roztoku 25 g (0,1 mol) kyseliny 2-hydroxy- γ -ftalimidomáselné, viz Y. Saito a spol., Tetrahedron Letters 1970, 4863, v 200 ml ethylalkoholu se přidá roztok 29 g (0,1 mol)

dehydroabietylaminu v 130 ml ethylalkoholu. Roztok se energicky protřepává minutu, nechá se stát 5 hodin za teploty místnosti, a během té doby se vyloučí jemné krystalky. Ty se odfiltrují, promyjí se za použití 50 mililitrů ethylalkoholu, a sušením na vzduchu se získá 30,1 g (56 %) diastereoisomeru soli s dehydroabietylamínem, b. t. 93 až 94° Celsia, $[\alpha]_D^{24} = +15^\circ$ (c = 2,5, methylalkohol). Krystalisací z 300 ml ethylalkoholu se získá 23,2 g (43 %) čistého produktu o b. t. 94 až 95 °C, $[\alpha]_D^{24} = +10,8^\circ$ (c = 2,5, methylalkohol). Další krystalisací se již hodnota bodu tání ani specifické rotace nemění.

Analýza:

pro C₃₂H₄₂N₂O₅ · H₂O

vypočteno:

69,54 % C, 8,02 % H, 5,07 % N

nalezeno:

69,58 % C, 7,08 % H, 5,07 % N

B) Kyselina L-(—)- γ -amino- α -hydroxymáselná

K roztoku 1,5 g (0,014 mol) uhlíčitanu sodného v 40 ml vody se přidá 5,3 g (0,01 mol) soli kyseliny L- α -hydroxy- γ -ftalimidomáselné s dehydroabietylamínem a 60 ml etheru, reakční směs se energicky míchá, až zmizí veškeré pevné podíly, vrstva etheru se oddělí, vodný podíl se promyje za použití dvou dávek etheru po 20 ml, načež se vodný podíl zahustí ve vakuu na 15 ml. Ke koncentrátu se přidá 10 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové, a reakční směs se zahřívá 10 hodin do varu pod zpětným chladičem; po ochlazení se odfiltruje kyselina ftalová, filtrát se zahustí za sníženého tlaku, zbytek se rozpustí v 10 ml vody, a získaný roztok se zahustí do sucha. Tento postup se opakuje dvakrát, čímž se odstraní

nadbytek kyseliny chlorovodíkové, zbylý sirup se rozpustí v 10 ml vody, a filtrováním se odstraní malé podíly nerozpustné kyseliny italové. Filtrát se absorbuje na koloně IR-120 (ve vodíkovém cyklu, rozměry 1 cm na 35 cm), kolona se promyje za použití 300 mililitrů vody, a eluuje se 1 N roztokem amoniaku. Eluát se jímá formou frakcí po 15 mililitrech. Frakce, pozitivní na ninhydrin, tj. 10 až 16, se spojí, a zahuštěním za sníženého tlaku se získá sirup, který postupně krystaluje. Krystaly se trituruje s ethanolem, potom se odsají a sušením ve vakuu v eksikátoru se získá 0,78 g (66 %) kyseliny L-(—)- γ -amino- α -hydroxymáselní, b. t. 206 až 207 °C, $[\alpha]_D^{24}$ -29° ($c = 2,5$, H₂O). Infračervené spektrum připravené látky je totožné s autentickým vzorkem, připraveným z ambutyrosinu.

Příklad 13

Příprava 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-tri-p-nitrobenzalkanamycinu A (IIIc)

Za teploty 24 °C se suspenduje v 500 ml absolutního ethanolu 9,0 g (14,5 mmol) 6'-karbobenzoxo-kanamycinu A, a k suspensi se přidá 8,7945 g (58,2 mmol) p-nitrobenzaldehydu. Reakční směs se zahřívá do varu pod zpětným chladičem, a během té doby se mění vzezření směsi za vzniku čirého, žlutého roztoku, ale dalším varem pod zpětným chladičem se začne rychle vylučovat bílá pevná hmota. Reakční směs se zahřívá k varu pod zpětným chladičem celkem 3 hodiny, potom se ochladí, vyloučený produkt se odsaje, promyje se malým množstvím absolutního ethanolu, a ve výtěžku 14,0 g (94,5 %) se získá bílá, krystalická látka o b. t. 233–234° (nekor.), což je produkt IIIc, jehož složení je uvedeno v názvu.

Analýsa:
pro C₄₇H₅₁N₇O₁₉

vypočteno:
55,46 % C, 5,05 % H, 9,63 % N

nalezeno:
55,39 % C, 5,08 % H, 9,60 % N

Příklad 14

Příprava 1-N-[L-(—)- γ -amino- α -hydroxybutyryl]-kanamycinu A (IV)

5,0 g (4,91 mmol) 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-tri-p-nitrobenzalkanamycinu A se

rozpustí v 50 ml dimethylformamidu za teploty 24 °C. Odděleně se za stejné teploty rozpustí v 20 ml dimethylformamidu 2,064 g (5,895 mmol) N-hydroxysukcinimidoesteru kyseliny L-(—)- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymáselné, a tento roztok se přidává za energického míchání během 75 minut do roztoku Schiffovy báze IIIc. Vzniklá reakční směs se míchá přes noc za teploty 24 °C, načež se za použití parního ejektoru odpaří roztok prudce do sucha za teploty asi 40 °C. Dále pak opakovaným prudkým odpařením s 100 ml methylalkoholu se takto získá vazký olej, který se rozpustí v 100 mililitrech směsi dioxanu a vody 1 : 1, přidá se 10 ml ledové kyseliny octové, roztok se přelije do Parrovy baňky objemu 500 ml, přidá se palladium na uhlí (2,5 g, koncentrace Pd 5 %), a redukce se provádí 4 hodiny za teploty 24 °C a za tlaku 3,1 atm. Celkový pokles tlaku v této době (uzavřená nádobka) činí 6 atm, počítaje v to občasné znovunatlačení vodíku. Reakční směs se potom filtruje vrstvou infusoriové hlínky, ta se promyje třemi podíly po 50 ml 50% vodního dioxanu, spojené filtráty se prudce odpaří do sucha, zbytek se azeotropně oddestiluje s 100 ml n-butylalkoholu, a posléze se ještě dvojím prudkým oddestilováním s methylalkoholem získá vazký olej, který se rozpustí v 30 ml methylalkoholu, a získaný roztok se pomalu vlije do 1000 ml studeného (5 až 10 °C) diethyletheru za energického míchání. Reakční směs se dále míchá jako suspence 30 minut v ledové lázni, vyloučená sraženina se odsaje a bezprostředně vysuší ve vakuovém exsikátoru nad kyslíčnickem fosforečným. Produkt se získá ve výtěžku 4,9620 g. Podle chromatografie na tenké vrstvě je patrné, že v produktu je hlavně obsažena sloučenina vzorce IV, tj. kanamycin A, nějaké stopy disubstituovaného a trisubstituovaného kanamycinu A, počítaje v to určitý podíl kyseliny 4-amino-2-hydroxymáselné.

Za použití skleněné kolony 40 na 100 mm s náplní Amberlite ARC-50 (amoniový cyklus, typ I, 100/200 mesh) s ložem objemu asi 980 mm se produkt dělí na různé frakce, přičemž se na koloně dělí 4,600 g surového produktu jako směsi za rozpuštění této v 1 ml vody. Kolona se eluuje gradientem vody proti 2 N roztoku amoniaku, přičemž eluát se odebírá ve frakcích objemu 15 ml. Jímá se celkem 295 frakcí, kolona se potom promyje 1,5 litrem 3 N roztoku amoniaku. Odpovídající frakce se spojí na základě hodnot optických rotací, a lyofilisováním se odtud získá pevný produkt.

29		30			
Frakce č.	Složení	Váha, g	Korekce na váhu celku, v sur. g	Bio-test	% výtěžek
120-150	kanamycin A	1,1654	1,257	809	42,6
201-224	BB-K29	0,40	0,43	—	
228-241	BB-K8	0,6523	0,7036	786 ±101 ⁺	19,2 ⁺⁺

pozn.:

⁺ průměr čtyř testů na Petriho misce, $\pm$ standardní odchylka

⁺⁺ vezme-li se zřetel na regenerovaný kanamycin A, pak konverse na BB-K8 (látku IV) odpovídá 33,5 %.

Při tomto pokuse činil poměr BB-K8/kanamycin A 0,45.

Sloučenina vzorce IV, jak se získá při tomto postupu, je totožná s autentickým vzorkem, jak se též získá postupem podle související přihlášky č. 221 378. Látka má b. t. 194 °C (za rozkl.), $[\alpha]_D^{21} = +85^\circ$ (c = 2, H₂O). Relativní účinnosti proti B. subtilis (akarová destička) = 960 mcg/mg (standard: kanamycin A jako volná báze).

Analýsa:

pro C₂₂H₄₃N₅O₁₃ · 2H₂CO₃

vypočteno:

40,62 % C, 6,68 % H, 9,87 % N

nalezeno:

40,21 % C, 6,96 % H, 9,37 % N
39,79 % C, 6,87 % H, 9,4 % N

Příklad 15

Příprava soli 1-N-[L-(—)-γ-amino-α-hydroxybutyryl]kanamycinu A s ekvivalentem kyseliny sírové

1 mol 1-N-[L-(—)-γ-amino-α-hydroxybutyryl]kanamycinu A se rozpustí v 1 až 3 litrech vody, a z roztoku se filtrací oddělí různé nerozpustné pevné podíly, načež se po ochlazení za míchání přidá roztok 1 molu kyseliny sírové v 500 ml vody, a reakční směs se míchá 30 minut. Po přidání vychlazeného ethanolu se reakční směs míchá, až dojde k vysrážení, načež se pevné podíly odsají. Podle provedených zjištění je to odpovídající monosulfát, tedy sůl s ekvivalentem kyseliny sírové.

Příklad 16

Příprava soli 1-N-[L-(—)-γ-amino-α-hydroxybutyryl]kanamycinu A se dvěma ekvivalenty kyseliny sírové (tedy disulfát, BB-K8 · 2H₂SO₄)

Ve 125 ml vody, zbavené iontů, se rozpustí 35 g 1-N-[L-(—)-γ-amino-α-hydroxybutyryl]kanamycinu A; hodnota pH činí podle zjištění přibližně 9,0, a sníží se na 7 až 7,5 přidáním 50% (objemově) kyseliny sírové.

Přidá se dále 8,5 g aktivního uhlí Darco G-60, a reakční směs se míchá za teploty místnosti po 30 minut. Vhodnou filtrací se odstraní aktivní uhlí, jež se promyje za použití 40 ml vody; vodný podíl z promývání se přidá k filtrátu.

Spojené podíly z filtrace a promývání se okyslí přidáním 50% kyseliny sírové (objemově) na pH 2 až 2,6, což je doprovázeno vývojem velkého množství kysličníku uhličitého. Roztok se evakuuje za míchání po 20 minut, aby se tím odstranily poslední podíly kysličníku uhličitého.

K odplyněnému roztoku se přidá 8,5 g aktivního uhlí Darco G-60, a reakční směs se míchá 30 minut za teploty místnosti; potom se aktivní uhlí odfiltruje vhodnou filtrací, promyje se za použití 35 ml vody, zbavené iontů, načež se vodný podíl z promývání přidá k filtrátu.

U spojeného podílu z filtrátu a promývání se přidáním 50% roztoku kyseliny sírové (objemově) upraví hodnota pH na 1 až 1,3, a získaný roztok se vlije za prudkého míchání během 10 minut do 600 až 800 ml methanolu (3 až 4 objemy methanolu), reakční směs se míchá 5 minut za hodnoty pH 1 až 1,3, prolíje se sítem s oky 100 mesh, míchá se po 2 minuty, a nechá se usadit 5 minut. Největší podíl kapaliny nad sedimentem se oddekantuje, zbývající suspence vhodným zařízením filtruje, pevný podíl se promyje za použití 200 ml methanolu, a suší se ve vakuu 24 hodin při 50 °C. Výtěžek amorfního NN-K8 ve formě soli se dvěma ekvivalenty kyseliny sírové činí 32 až 34 %, $[\alpha]_D^{22} = +74,75^\circ$ (H₂O), látka se rozkládá za teploty 220 až 223 °C.

Elementární analyza (přepočteno na sušinu)+

%C	32,7	33,5	32,3		33,5
%N	8,78	8,7	8,2	8,8	8,97
%S	8,75	8,9	7,8	8,85	82,

+ obsah vody dle K. Fischera: 2,33, 1,79, 2,87 % (teorie pro monohydrát: 2,25 % H₂O). Tato sůl je hygroskopická, ale nerozplývá se. Po skladování alikvotní části na vzduchu za teploty místnosti po 18 hodin se zvýší obsah vody na 9,55, 9,89 % (teorie pro penta-hydrát 10,33 % H₂O).

Příklad 17

1-N-[L-(—)- γ -amino- α -hydroxybutyryl]-kanamycin A (tj. látka vzorce IV) postupem bez Schiffovy báze jako meziproduktu

K míchanému roztoku 1,36 g (2,2 mmol) 6'-N-karbobenzoxykanamycinu (II) v 60 ml 50% vodného roztoku tetrahydrofuranu se přikapává 930 mg (2 mmol) aktivního esteru vzorce XX v 10 ml tetrahydrofuranu během 30 minut na teploty místnosti. Reakční směs se míchá přes noc, načež se hydrogenuje za přítomnosti 1,0 g 10% palladia na uhlí za atmosférického tlaku a za teploty místnosti. Po skončení hydrogenaci se katalyzátor odfiltruje a promyje vodou, filtrát a podíly z promývání se spojí, načež se oddestiluje ve vakuu organické rozpouštědlo. Získaný vodný roztok se prolíje kolonou 70 mililitrů iontoměniče CG-50 (amoniový cyklus), a sloupec kolony se postupně promývá za použití 400 ml vody, 500 ml 0,1 N roztoku amoniaku, 500 ml 0,3 N roztoku amoniaku, litru 0,5 N roztoku amoniaku a posléze 500 ml 1 N roztoku amoniaku. Eluát se jímá formou frakcí po 20 ml, a rozdělí se na odpovídající podíly na podkladě hodnot R_f na destičkách se silikagelem (S-110, detekce ninhydrinem), a testováním na destičkách s agarem proti B. subtilis PCI a K. pneumoniae typ 22 3030 A 20680. Každý podíl sloučených frakcí se zahustí ve vakuu a lyofilizuje.

Příklad 18

6'-karbobenzoxy-1,3,3"-trisalicylalkanamycin A

V 500 ml absolutního ethanolu se suspenduje při 24 °C 9,0 g (14,5 mmol) 6'-karbobenzoxykanamycinu A, a přidá se 58,2 mmol salicylaldehydu. Reakční směs se zahřívá k varu pod zpětným chladičem, a během té doby se suspenze mění na čirý, žlutý roztok, ale během varu se rychle začne vylučovat bílá, pevná hmota. Reakční směs se zahřívá k varu pod zpětným chladičem po 3 hodiny, potom se ochladí, produkt se odfiltruje a promyje malým množstvím absolutního ethanolu. Bod tání po překrystalování ze směsi tetrahydrofuranu-methylalkoholu a heptanu 4 : 1 : 5 činí po vysušení 196 až 198 °Celsia.

Analýza:

pro C₄₇H₅₄N₄O₁₆

vypočteno:

60,62 % C, 4,86 % H, 6,02 % N

nalezeno:

58,67 % C, 5,73 % H, 5,98 % N

Obsah vody dle K. Fischera: 2,45

Analýza s korekcí na vodu:

nalezeno:

60,14 % C, 5,60 % H, 6,13 % N

Příklad 19

Příprava 1-N-[L-(—)- γ -amino- α -hydroxybutyryl]-kanamycinu A postupem in situ

Ve vhodném zařízení se rozmíchá 1000 g (1,074 molu) 6'-karbobenzoxy-1,3,3"-trisalicylalkanamycinu A v 11 400 ml tetrahydrofuranu za teploty 22 až 25 °C, přidá se za míchání 600 ml vody, během 10 minut se suspenze rozpustí, načež se do roztoku přidá v pevné formě 181,5 g (0,716 molu) kyseliny 4-benzyloxykarbonylamino-2-hydroxymásečné a 0,12 molu N-hydroxy-5-norbornen-2,3-dikarboximidu; hodnota pH je v rozmezí 5,5 až 6,0. Za udržování teploty v rozmezí 22 až 25 °C se přidá 162,3 g (0,787 molu) dicyklohexylkarbodiimidu, rozpuštěného v 3000 ml suchého tetrahydrofuranu, suspenze se míchá 24 hodin při 22 až 25 °C, načež se ochlazením na 0 až 5 °C získá ve dvou hodinách krystalická dicyklohexylmčovina.

Pevný vyloučený podíl se odfiltruje, podíl na filtru se promyje za použití 800 ml směsi tetrahydrofuranu a vody 95/5, podíly z filtrátu a promývání se spojí, celkový objem se zahustěním ve vakuu sníží na 3000 ml, přidá se 4000 ml methanolu, a opět se zahustěním ve vakuu sníží objem na 3000 ml.

K takto získanému roztoku se přidá 2000 mililitrů absolutního methanolu teploty 40 °Celsia, načež se roztok očkuje přidáním 6'-karbobenzoxy-1,3,3"-trisalicylalkanamycinu A, a po ochlazení se nechá krystalovat 0,5 až 1 hodinu. Přidá se 2000 ml vody během 30 minut za dobrého míchání, což trvá za teploty 22 až 25 °C 2 hodiny. Teplota se dále sníží na hodinu na 0 až 5 °C.

Pevné podíly se odfiltrují, promyjí se za použití 900 ml vychlazené směsi methanolu a vody 2:1, dále za použití 800 ml methanolu, a uchovají se filtráty i podíly z promývání. Jako pevný podíl se získá v podstatě regenerovaný 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-trisalicylalkanamycin A.

Výše uvedené podíly z filtrace se zředí přidáním 1000 ml vody, ke zředěnému roztoku se přidá 2000 ml methylenchloridu, a za teploty 25 °C se sníží pH na 1,8 až 2,0 přidáním 6 N roztoku kyseliny chlorovodíkové, a na této hodnotě pH se udržuje reakční směs 30 minut.

Vrstva methylenchloridu se oddělí, vodný podíl se promyje další dávkou 2000 ml methylenchloridu, spojené organické fáze se uchovávají pro případné regenerování salicylaldehydu.

Hodnota pH vodného podílu se zvýší na

Pokus	mol% N-hydroxy-5-norbornen-2,3-dikarboximidu	Výtěžek (%) sloučeniny IV
1	0	9,33
2	2	20,07
3	10	31,72
4	50	36,52
5	100	36,01

Z výše uvedených výsledků je patrné, že při reakci vzniká sloučenina vzorce IV i tehdy, provádí-li se reakce vůbec bez N-hydroxy-5-norbornen-2,3-dikarboximidu. Avšak rovněž je zřejmé, že nejlepších výtěžků sloučeniny vzorce IV se dosahuje za použití mol-% N-hydroxy-5-norbornen-2,3-dikarboximidu od 10 až do 50 % z použitého molárního množství kyseliny 4-benzyloxykarbonylamino-2-hydroxymáselné, jak se tato použije při acylační reakci. Přesný mechanismus, jak probíhá acylování blokovaného kanamycinu A, není znám. Avšak bylo pozorováno, že za přítomnosti N-hydroxy-5-norbornen-2,3-dikarboximidu se dosahují lepší výtěžky, než jak byly dosahovány dříve.

Příklad 21

Příprava 1-N-[L-(—)- γ -amino- α -hydroxybutyryl]kanamycinu A (látko vzorce IV)

Za teploty 45 °C se rozpustí v 55 ml dimethylformamidu 18,6 g (20,0 mmol) 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-trisalicylalkanamycinu A, a k získanému roztoku se přidá 7,3 ml vody a 102 ml acetonu. Roztok se ochladí na 25 °C, načež se najednou přidá 50 ml roztoku 9,9 mmol esteru N-hydroxysukcinimidu a kyseliny L-(—)- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymáselné acetonu. Reakční směs se míchá 40 hodin přibližně za teploty 25 °C, dále se přidá 150 ml vody a několik málo krystalků 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-trisalicylalkanamycinu A, a reakční směs se míchá

3,5 až 4,0 přidáním koncentrovaného vodného roztoku amoniaku, a získaný roztok se hydrogenuje za teploty místnosti za tlaku vodíku 0,35 MPa za přítomnosti 5% palladia na uhlí. Bio-výtěžek očekávaného produktu v roztoku činí 30 až 45% teorie.

Příklad 20

Příprava sloučeniny vzorce IV za použití různých mol-% N-hydroxy-5-norbornen-2,3-dikarboximidu za udržování dalších mol-% obsahů stejných

Při postupu podle příkladu 20 se nahradí 0,12 mol N-hydroxy-5-norbornen-2,3-dikarboximidu, tamže použitého, dále uvedenými různými mol-%, to za vzniku dále uvedených výtěžků (v %) sloučeniny vzorce IV

hodinu při 25 °C a dále ještě 3 hodiny při 0 až 5 °C. Nadbytek, jakož i nezreagovaná Schiffova báze salicylaldehydu vykrystalují a zachytí se filtrací na filtru. Podíl na filtru se promyje za použití 60 ml 50% vodného acetonu, načež se tento podíl vysuší a získá se tím 9,4 g regenerované Schiffovy báze o b. t. (surová látka) 170 až 185 °C.

Filtrát z výše uvedené reakce se smíchá s 40 ml methylenchloridu, hodnota pH se upraví z 6,2 na 2,0, a tím se odstraní další výchozí materiál. Vrstvy se oddělí, a vodný podíl se extrahuje dvěma podíly po 40 ml methylenchloridu, potom se pH vodné vrstvy upraví na 3,7, a malý podíl acetonu i methylenchloridu se odstraní destilací ve vakuu. Vodný roztok se hydrogenuje za přítomnosti 3,0 g 5% palladia na uhlí jako katalyzátoru 24 hodin za teploty 15 °C a za tlaku 0,35 MPa vodíku, načež se reakční směs filtruje vrstvou infusoriové hlíny, čímž se odstraní katalyzátor, objem filtrátu se upraví na 100 ml, a odebere se z tohoto podílu vzorek 1 ml k testování na Petriho misce a papírovém kotoučku. Podle prvního testu činí obsah látky vzorce IV 1936 mcg/ml, podle druhého testu 2325 mcg/ml, což odpovídá výtěžku 33,4% konečného produktu.

Zbývajících 99 ml roztoku se zahustí na objem asi 30 ml, a provede se chromatografie na koloně, jak to zde bylo dříve již popsáno, například v příkladu 14. Spojené frakce, obsahující látku vzorce IV, o celkovém objemu 500 ml se zahustí na objem asi 20 ml, k tomuto koncentrátu se přidá 45 ml

methyloalkoholu a potom po kapkách asi 25 mililitrů isopropylalkoholu k vyvolání krystalizace produktu. Krystalický materiál se zachytí na filtru, promyje se směsí methyloalkoholu a isopropylalkoholu 50 : 50, a sušením se dále získá 2,31 g BB-K8, tedy látky

vzorci IV. Podle testu na Petriho misce lze zjistit obsah 836 mcg/mg, což odpovídá čistotě 83,6 % a skutečnému výtěžku čisté látky vzorce IV 33,3 %, přepočteno na 9,9 mmolu výchozí látky.

Tabulka I

Srovnání akutních toxicit aminoglykosidů

Zvíře	Způsob podávání	BB-K8		LD ₅₀ (mg/báze/kg)		Gentamycin cit. 2	Tobramycin cit. 3	Neomycin cit. 2
		bis-hydrogensíran	síran	Kanamycin 1	citace 2			
myš	i.v.	232	225	262	225	75	56	40
	i.p.	1470	1750	1394	1125	430	—	225
	subk.	1838	1850	1368	1350	485	367	275
	per os	—	>8000	>8300	>8000	>9050	>8000	>8000
krysa	i.v.	—	175	—	—	—	133	—
	subk.	>2205	2700	—	—	—	973	—
	per os	—	>8000	—	—	—	>7000	—
pes	i.v.	—	287	—	—	—	—	—
	i.m.	—	>500	—	—	—	—	—
králík	i.v.	—	186	—	—	—	—	—
	i.m.	>735	—	—	—	—	—	—
opice	i.m.	>735	>1000	—	—	—	—	—

Biologická účinnost sloučeniny vzorce IV, jež je označována jako amikacin, byla sledována celou řadou autorů v četných sděleních. Z nejzávažnějších lze citovat: G. D. Overturf, J. Wilkinsová a R. Ressler, J. Infect. Diseases **129**, 353 (1974) testovali 9 antibiotik na 114 kmenů *Providencia* (*alcalifaciens*, *stuartii* atd.); zjistili, že uvedené mikroorganismy jsou často resistantní, zvláště na tetracyklin a chloramfenikol, přičemž streptomycin a ampicilin se vyznačují také nižší a nedostačující účinností. Karbenicilin a kanamycin má v některých případech 100 procentní účinnost, jindy nulovou a jedinou látkou z testovaných antibiotik, jež je suverénně 100% účinná, je amikacin. Dále J. Clarke, R. Libke, C. Regamey a W. Kirby popisují v Clin. Pharmacology and Therapeutics **15**, 610 (1974), že se amikacin vyznačuje ve srovnání s kanamycinem podstatně větší účinností proti kmenům *Pseudomonas*, produkujícím enzymy, deaktivující gentamycin, tobramycin a kanamycin. Farmakokineticky parametry amikacinu a kanamycinu jsou jinak prakticky totožné. Japonští autoři S. Mitsuhashi, H. Kawabe, S. Iyobe, T. Tanaka a M. Inoue, Japan. J. Antibiotics **27**, 189 (1974) sledovali antibakteriální účinnost amikacinu ve srovnání s dalšími an-

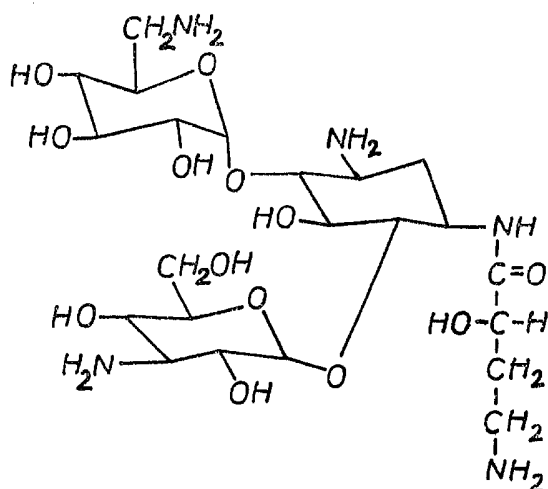
tibiotiky; zjistili vysokou účinnost sledované látky na Staphylokoky a gram-negativní bacily s tím, že amikacin je účinnější než kanamycin A, zvláště proti *Pseudomonas aeruginosa*; vyznačuje se v tomto případě účinností i proti kmenům, resistantním na gentamycin. Jinak jsou účinnosti amikacinu a gentamicinu přibližně shodné. K podobným výsledkům došli další japonští autoři ve sděleních z téhož časopisu, **27**, str. 193, 202, 212, 218, 223, 226, 234, 238, 337, 343, 377, 343, 366, 382, 389, 392, 401, 354, 370, 328.

J. P. Buyniski a M. E. Blerwagen, Res. Comm. in Chem. Pathology and Pharmacology zjistili, že při intravenózní infuzi kanamycinu nebo amikacinu v dávkách 30 mg/kg není ovlivněn krevní tlak v aortě, srdeční rychlost ani charakter kardiogramu.

Výsledky klinických zkoušek jsou patrné ze sdělení, které publikovali C. J. R. Mantas, H. S. Trujillo a R. G. Londono, P. A. Uribe, E. L. de Vidal a N. J. Agudelo v J. Intern. Med. Res. **3**, 223, (1975); 15 kojenců ve stáří 2 až 21 dnů bylo léčeno při projevu infekce (*E. coli*) amikacinem v denních dávkách od 126 do 350 mg podle hmotnosti dítěte. 14 dětí bylo vyléčeno; nebyly pozorovány ani systemické, ani lokální projevy léčby.

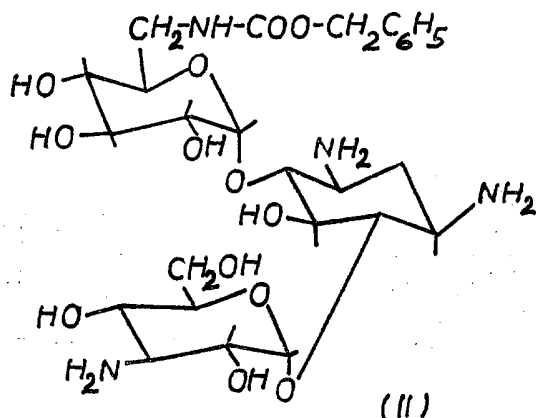
PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby 1-[L-(-)- γ -amino- α -hydroxybutyryl]-kanamycinu A vzorce IV



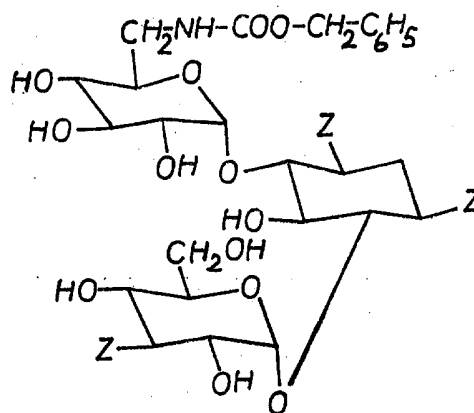
(IV)

vyznačený tím, že v prvním stupni postupu se působí na 6'-N-benzyloxykarbonylkanamycin A vzorce II

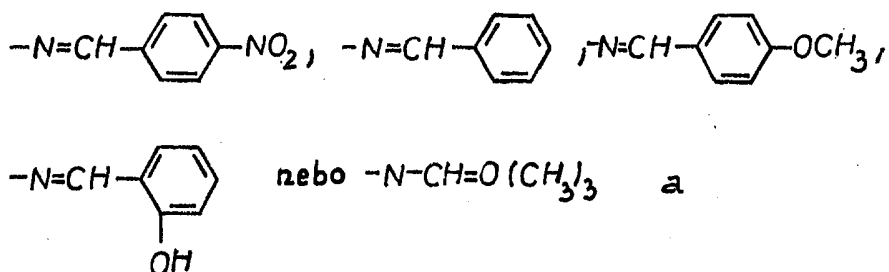


(II)

aldehydem ze skupiny, kterou tvoří benzaldehyd, salicylaldehyd, p-nitrobenzaldehyd, p-methoxybenzaldehyd a pivaldehyd v molárním poměru 1 mol 6'-N-benzyloxykarbonylkanamycinu A vzorce II na 3 moly aldehydu v prostředí absolutního ethanolu, methanolu, n-propanolu, methylenchloridu, 2-propanolu, n-butanolu, sek.butanolu, terc.-butylalkoholu, tetrahydrofuranu, dioxanu, dimethylformamidu nebo acetonu či jejich směsí nebo směsí uvedených rozpouštědel s vodou za teploty v rozmezí od 5 °C až do teploty varu pod zpětným chladičem po dobu od 30 minut do 5 hodin za vzniku 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-trialdehydokanamycinu A obecného vzorce III

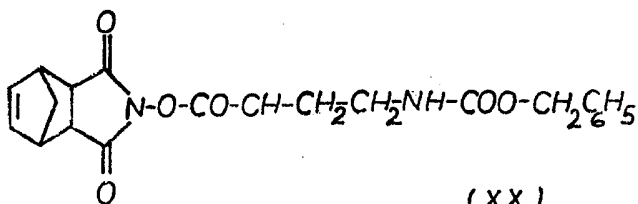


kde Z znamená zbytek vzorce



načež se ve druhém stupni působí na 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-tri-aldehydokanamycin A obecného vzorce III bezprostředně bez iso-

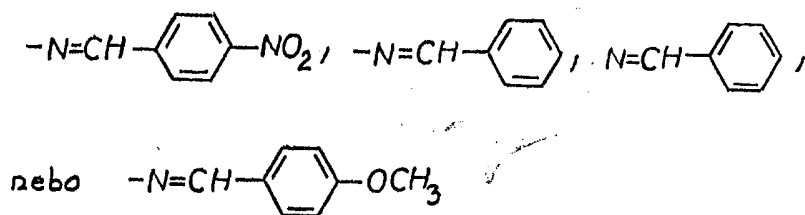
lování N-hydroxy-6-norbornen-2,3-dikarboximidesterem kyseliny L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymáslé vzorce XX



(XX)

v poměru 1 mol 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-trialdehydokanamycinu A vzorce III na 0,5 mol N-hydroxy-6-norbornen-2,3-dikarboximid-esteru kyseliny L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymásebné vzorce XX za teploty v rozmezí od -10°C do $+35^\circ\text{C}$ po dobu jedné hodiny v těchto rozpouštědlech, která byla uvedena v prvním stupni, načež se organické rozpouštědlo odstraní a zbytek se bezprostředně hydrogenuje vodíkem za přítomnosti kovového katalyzátoru ze skupiny, kam patří palladium, platina, Raneyův nikl, rhodium, ruthenium a nikl v prostředí vody nebo rozpouštědla mísitelného s vodou ze skupiny, kterou tvoří voda a dioxan, tetrahydrofuran, dimethylether ethylenglykolu a dimethylether propylenglykolu za hodnoty pH 3 až 5 za vzniku 1-[L-(—)- γ -amino- α -hydroxybutyryl]-kanamycinu A vzorce IV.

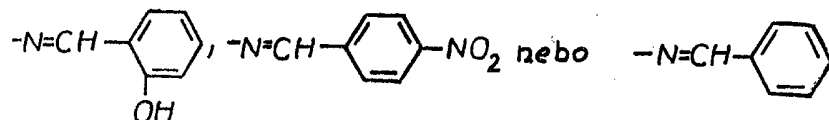
2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se v prvním stupni postupu působí na 6'-N-benzyloxykarbonylkanamycin A vzorce II aldehydem ze skupiny, kterou tvoří benzaldehyd, salicylaldehyd, p-nitrobenzaldehyd a p-methoxybenzaldehyd v poměru 1 mol 6'-N-benzyloxykarbonylkanamycinu A vzorce II na 3 moly aldehydu v prostředí absolutního ethylalkoholu, methylalkoholu, n-propylalkoholu, isopropylalkoholu, methylenchloridu, n-butylalkoholu, sek.-butylalkoholu, terc.-butylalkoholu, tetrahydrofuranu, dioxanu, dimethylformamidu nebo acetonu za teploty v rozmezí od 5°C do 40°C po dobu 30 minut až 5 hodin za vzniku 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-tri-aldehydokanamycinu A obecného vzorce III, kde Z znamená zbytek vzorce



a ve druhém stupni se působí na 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-tri-aldehydokanamycin A obecného vzorce III bezprostředně v reakční směsi nebo po izolování N-hydroxy-6-norbornen-2,3-dikarboximidesterem kyseliny L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymásebné vzorce XX v poměru 1 mol 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-tri-aldehydokanamycinu A vzorce III na 0,5 až 1 mol N-hydroxy-6-norbornen-2,3-dikarboximidesteru kyseliny L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymásebné vzorce XX v teplotním rozmezí od $+5^\circ\text{C}$ Celsia do $+35^\circ\text{C}$ po dobu jedné hodiny až 3 hodin v soustavě rozpouštědel, jak jsou uvedena v prvním stupni, načež se rozpouštědlo oddestiluje a zbytek se hydrogenuje bezprostředně vodíkem za přítomnosti kovového katalyzátoru ze skupiny, kterou tvoří palladium, platina, Raneyův nikl, rhodium, ruthenium a nikl ve vodě nebo v prostředí rozpouštědel mísitelných s vodou, jako je voda a dioxan, tetrahydrofuran, dime-

thylether ethylenglykolu a dimethylether propylenglykolu za hodnoty pH 3 až 5 za vzniku 1-[L-(—)- γ -amino- α -hydroxybutyryl]-kanamycinu A vzorce IV.

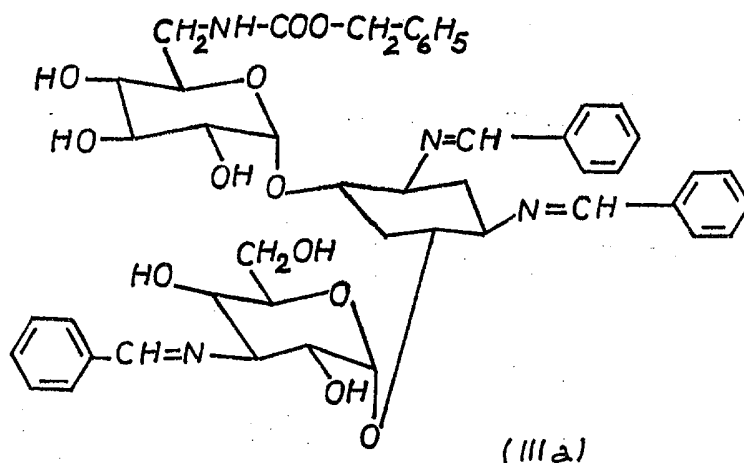
3. Způsob podle bodu 1 nebo 2, vyznačený tím, že se v prvním stupni působí na 6'-N-benzyloxykarbonylkanamycin A vzorce II aldehydem ze skupiny, kterou tvoří benzaldehyd, salicylaldehyd a p-nitrobenzaldehyd, v poměru 1 mol 6'-N-benzyloxykarbonylkanamycinu A vzorce II na asi 3 moly aldehydu v prostředí absolutního ethylalkoholu, methylalkoholu, n-propylalkoholu, isopropylalkoholu, n-butylalkoholu, sek.-butylalkoholu, terc.-butylalkoholu, tetrahydrofuranu, dioxanu, methylenchloridu, dimethylformamidu nebo acetonu nebo jejich směsí, či jejich směsí s vodou za teploty v rozmezí 5°C až 40°C po dobu 30 minut až 5 hodin za vzniku 6'-karbobenzoxo-1,3,3"-tri-aldehydokanamycinu A obecného vzorce III, kde Z znamená zbytek vzorce



načež se ve druhém stupni působí na 6'-karbobenzoxy-1,3,3"-tri-aldehydokanamycin A vzorce III bezprostředně v reakční směsi nebo po izolaci N-hydroxy-6-norbornen-2,3-dikarboximidesterem kyseliny L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymásečné vzorce XX v poměru 1 mol 6'-karbobenzoxy-1,3,3"-tri-aldehydokanamycinu A vzorce III na 0,5 mol až 1 mol N-hydroxy-6-norbornen-2,3-dikarboximidesteru kyseliny L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymásečné vzorce XX v teplotním rozmezí od $+5^\circ\text{C}$ do $+35^\circ\text{C}$ po dobu jedné hodiny až 3 hodin v soustavě rozpouštědel, jak jsou uvedena v prvním stupni, načež se rozpouštědlo oddestiluje a zbytek se hydrogenuje bezprostředně vodíkem za přítomnosti kovového katalyzátoru ze skupiny, kterou tvoří palladium, platina,

Raneyův nikl, rhodium, ruthenium a nikl, ve vodě nebo v prostředí rozpouštědla mísi-
telného s vodou, jako je voda a dioxan, tetrahydrofuran, dimethylether ethylenglykolu a dimethylether propylenglykolu za hodnoty pH od asi 4 za vzniku 1-[L-(—)- γ -amino- α -hydroxybutyryl]-kanamycinu A vzorce IV.

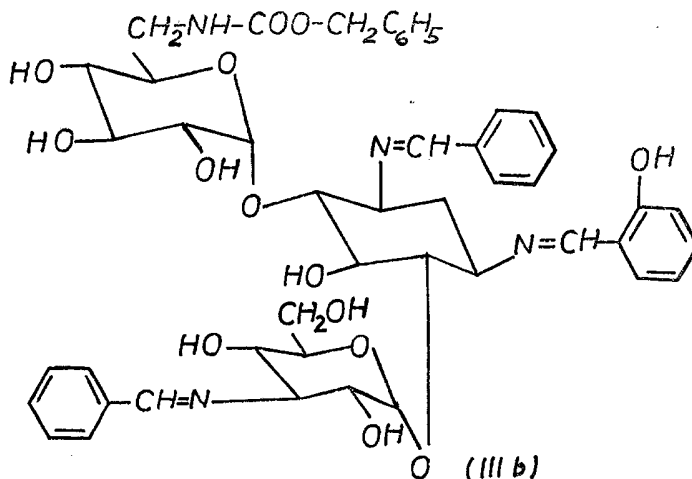
4. Způsob podle bodů 1 až 3, vyznačený tím, že se v prvním stupni působí na 6'-N-benzyloxykarbonylkanamycin A vzorce II benzaldehydem v poměru 1 mol 6'-N-benzyloxykarbonylkanamycinu A vzorce II na 3 moly benzaldehydu ve směsi vody a tetrahydrofuranu v poměru 1 : 1 za teploty od 20°C Celsia do 30°C po dobu 2 až 4 hodiny za pH 10 za vzniku 6'-karbobenzoxy-1,3,3"-trisalicylalkanamycinu A vzorce IIIa



a na 6'-karbobenzoxy-1,3,3"-trisalicylalkanamycin A vzorce IIIa se působí ihned po přípravě nebo po izolování N-hydroxy-6-norbornen-2,3-dikarboximidesterem kyseliny L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymásečné vzorce XX v poměru 1 mol 6'-karbobenzoxy-1,3,3"-trisalicylalkanamycinu A vzorce IIIa na 0,6 až 0,75 mol N-hydroxy-6-norbornen-2,3-dikarboximidesteru kyseliny L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymásečné vzorce XX za teploty v rozmezí 20°C Celsia až 30°C po dobu 1 hodiny až 3 hodin v rozpouštědlech, jak byla uvedena v předchozím stupni, ve směsi methylenchloridu, methylalkoholu a vody nebo ve směsi dimethylformamidu, acetonu a vody, načež se rozpouštědlo oddestiluje ve vakuu, přidáním

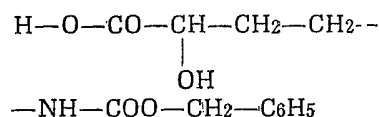
vodného roztoku amoniaku se hodnota pH upraví na 4 a zbytek se bezprostředně in situ hydrogenuje vodíkem za normálního tlaku a za přítomnosti palladia na uhlí za vzniku 1-[L-(—)- γ -amino- α -hydroxybutyryl]-kanamycinu A vzorce IV.

5. Způsob podle bodů 1 až 3, vyznačený tím, že se v prvním stupni působí na 6'-N-benzyloxykarbonylkanamycin A vzorce II salicylaldehydem v poměru 1 mol 6'-N-benzyloxykarbonylkanamycinu A vzorce II na 3 moly salicylaldehydu ve směsi vody a tetrahydrofuranu v poměru 1 : 1 za teploty 20°C až 30°C po dobu 2 až 4 hodin za pH 8 za vzniku 6'-karbobenzoxy-1,3,3"-tri-o-hydroxybenzalkanamycinu A vzorce IIIb

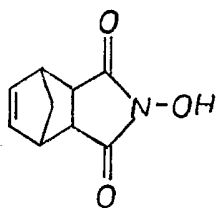


a na 6'-karbobenzoxy-1,3,3''-tri-o-hydroxybenzalkanamycin A vzorce IIIb se působí ihned po přípravě nebo po izolování N-hydroxy-6-norbornen-2,3-dikarboximidestrem kyseliny L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymásečné vzorce XXX v poměru 1 mol 6'-karbobenzoxy-1,3,3''-tri-o-hydroxybenzalkanamycinu A vzorce IIIb na 0,6 až 0,75 mol N-hydroxy-6-norbornen-2,3-dikarboximidesteru kyseliny L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymásečné vzorce XX za teploty v rozmezí 20 °C až 30 °C po dobu 1 hodiny až 3 hodin v prostředí rozpouštědel popsaných v prvním stupni nebo ve směsi dimethylformamidu, acetonu a vody, načež se organické rozpouštědlo oddestiluje ve vakuu, přidáním vodného roztoku amoniaku se hodnota pH upraví na 4 a zbytek se hydrogenuje bezprostředně vodíkem za normálního tlaku a za přítomnosti palladia na uhlí za vzniku 1-[L-(—)- γ -amino- α -hydroxybutyryl]-kanamycinu A vzorce IV.

6. Způsob podle bodů 1 až 3, vyznačený tím, že se ve druhém stupni postupu působí na 6'-karbobenzoxy-1,3,3''-tri-aldehydokanamycin A vzorce III in situ nebo po izolaci kyselinou L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymásečnou vzorce VI a N-hydroxy-5-norbornen-endo-2,3-dikarboximidem vzorce XIX



(VI)



(XIX)

s následujícím přidáním dicyklohexylkarbodiimidu v poměru 1 mol 6'-karbobenzoxy-1,3,3''-tri-aldehydokanamycinu A vzorce III na 0,5 až 1,0 mol kyseliny L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymásečné vzorce VI a dicyklohexylkarbodiimidu, a 0,005 až 0,25 mol N-hydroxy-5-norbornen-endo-2,3-dikarboximidu vzorce XIX v teplotním rozmezí od -10 °C do +35 °C po dobu 10 hodin v rozpouštědlech, jak byla popsána v prvním stupni, načež se oddestiluje organické rozpouštědlo a zbytek se hydrogenuje bezprostředně, jak je popsáno v bodech 1 až 3, za vzniku 1-[L-(—)- γ -amino- α -hydroxybutyryl]-kanamycinu A vzorce IV.

7. Způsob podle bodu 6, vyznačený tím, že na 6'-karbobenzoxy-1,3,3''-tri-aldehydokanamycin A vzorce III se působí bezprostředně nebo po izolaci kyselinou L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymásečnou vzorce VI a N-hydroxy-5-norbornen-endo-2,3-dikarboximidem vzorce XIX s následujícím přidáním dicyklohexylkarbodiimidu v poměru 1 mol 6'-karbobenzoxy-1,3,3''-tri-aldehydokanamycinu A vzorce III na 0,5 až 0,85 mol kyseliny L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymásečné vzorce VI a dicyklohexylkarbodiimidu a 0,05 až 0,425 mol N-hydroxy-5-norbornen-endo-2,3-dikarboximidu vzorce XIX v teplotním rozmezí od +5 °C do 25 °C po dobu 1 hodiny až 3 hodin v rozpouštědlech, jak byla popsána v prvním stupni.

8. Způsob podle bodů 6 a 7, vyznačený tím, že se ve druhém stupni působí na 6'-karbobenzoxy-1,3,3''-tri-aldehydokanamycin A vzorce III bezprostředně po reakci kyselinou L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymásečnou vzorce VI a N-hydroxy-5-norbornen-endo-2,3-dikarboximidem vzorce XIX s následujícím přidáním dicyklohexylkarbodiimidu v poměru 1 mol 6'-karbobenzoxy-1,3,3''-tri-aldehydokanamycinu A vzorce III na 0,5 až 0,8 mol kyseliny L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymásečné vzorce VI a dicyklohexylkarbodiimidu a 0,05 až 0,425 mol N-hydroxy-5-norbornen-endo-2,3-dikarboximidu vzorce XIX v teplotním roz-

mezi od $+15^{\circ}\text{C}$ do $+30^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 až 25 hodin.

9. Způsob podle bodu 4, vyznačený tím, že se ve druhém stupni působí na 6'-karbobenzoxy-1,3,3''-trisalicylalkanamycin A vzorce IIIa in situ nebo po izolaci kyselinou L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymáseľnou vzorce VI a N-hydroxy-5-norbornen-endo-2,3-dikarboximidem vzorce XIX za míchání a s následujícím přidáním dicyklohexylkarbodiimidu v poměru 1 mol 6'-karbobenzoxy-1,3,3''-trisalicylalkanamycinu A vzorce IIIa na 0,6 až 0,75 mol kyseliny L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymáseľné vzorce VI a dicyklohexylkarbodiimidu a 0,06 až 0,375 mol N-hydroxy-5-norbornen-endo-2,3-dikarboximidu vzorce XIX v teplotním rozmezí $+25^{\circ}\text{C}$ až $+35^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 až 25 hodin ve směsi tetrahydrofuranu a vody v poměru 1:1.

10. Způsob podle bodu 5, vyznačený tím, že se ve druhém stupni působí na 6'-karbobenzoxy-1,3,3''-tri-o-hydroxybenzalkanamycin A vzorce IIIb in situ nebo po izolaci kyselinou L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymáseľnou vzorce VI a N-hydroxy-5-norbornen-endo-2,3-dikarboximidem vzorce XIX za míchání a s následujícím přidáním dicyklohexylkarbodiimidu v poměru 1 mol 6'-karbobenzoxy-1,3,3''-tri-o-hydroxybenzalkanamycinu A vzorce IIIb na 0,6 až 0,75 mol kyseliny L- γ -benzyloxykarbonylamino- α -hydroxymáseľné vzorce VI a dicyklohexylkarbodiimidu a 0,06 až 0,375 mol N-hydroxy-5-norbornen-endo-2,3-dikarboximidu vzorce XIX v teplotním rozmezí $+20^{\circ}\text{C}$ až 30°C po dobu 15 až 25 hodin ve směsi tetrahydrofuranu a vody v poměru 9:1.