

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **12.10.2001**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **18.10.2000**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/691540**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu:
(Věstník č: 6/2004)
(86) PCT číslo: **PCT/US2001/032119**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/032918**

(21) Číslo dokumentu:

2003-1095

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :
C 07 H 17/08
A 61 K 31/7048
A 61 P 31/04

(71) Přihlašovatel:

ORTHO-MCNEIL PHARMACEUTICAL, INC.,
Raritan, NJ, US
KOSAN BIOSCIENCES, INC., Hayward, CA, US

(72) Původce:

Hlasta Denis, Doylestown, PA, US
Henninger Todd C., Neshanic Station, NJ, US
Grant Eugene B., Flemington, NJ, US
Khosla Chaitin, Palo Alto, CA, US
Chu Daniel T. W., Santa Clara, CA, US
Ashley Gary, Alameda, CA, US

(74) Zástupce:

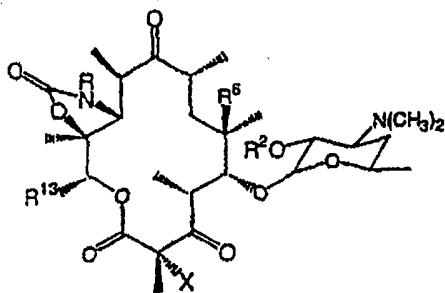
Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000

(54) Název přihlášky vynálezu:

Ketolidové protibakteriální přípravky

(57) Anotace:

Ketolidové sloučeniny uvedeného vzorce, kde X znamená atom vodíku nebo kalogenid z rodiny makrolidových součenin, meziproducty použité při jejich výrobě a farmaceutické při jejich výrobě a farmaceutické přípravky, které je obsahují. Sloučeniny jsou analogy erythromycinu použitelné k léčbě bakteriálních a protozoárních infekcí a v léčbě dalších chorobných stavů postihujících žaludeční motilitu.



CZ 2003 - 1095 A3

KETOLIDOVÉ PROTIBAKTERIÁLNÍ PŘÍPRAVKY

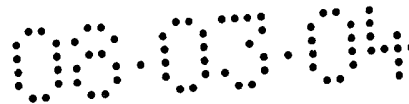
Tato přihláška si nárokuje prioritu z patentové přihlášky Spojených Států č. 09/548 568, podané 13. dubna 2000, č. 09/548 584, podané 13. dubna 2000, č. 09/550 045, podané 14. dubna 2000 a č. 09/551 162, podané 14. dubna 2000, přičemž každá z nich je v úplnosti zahrnuta v tomto textu formou odkazu.

Oblast techniky

Tento vynález se týká skupiny ketolidových protibakteriálních přípravků makrolidové rodiny, meziproduktů použitých v jejich výrobě a farmaceutických přípravků, které je obsahují. Sloučeniny jsou analogy erythromycinu použitelné v léčbě bakteriálních a protozoárních infekcí a v léčbě dalších chorobných stavů postihujících žaludeční motilitu.

Dosavadní stav techniky

Polyketidy jsou rodinou přírodních produktů, která zahrnuje mnoho sloučenin, které mají antibiotické a další farmakologické vlastnosti. Erythromyciny jsou skupinou makrolidových antibiotik původně objevených v r. 1952 v metabolických produktech kmene *Streptomyces erythreus*. Antibiotikum se vyskytuje v různých glykosylovaných formách nazývaných A, B, C a D. Od jejich objevu se mnoho odborníků snažilo připravit deriváty molekuly, aby se zlepšily nebo modifikovaly její vlastnosti. V centru zájmu velké části této práce byly chemické modifikace přirozeně vznikající molekuly erythromycinu. Například klaritromycin je polosyntetické

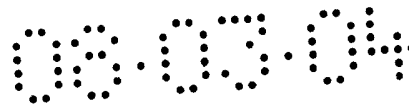


antibiotikum, které je vytvořeno chemickou modifikací hydroxylové skupiny v C-6 poloze -OMe.

Ketolidy jsou deriváty erythromycinu, kde C-3 sacharid, kladinóza, je chemicky odstraněn a výsledná volná hydroxylová skupina je konvertována na ketoskupinu. Například patent Spojených Států č. 6 124 269 popisuje ketolidy s cyklickou karbamátovou skupinou v C-11 a C-12 a O-alkylarylovou skupinou v C-6. Patent Spojených Států č. 5 635 485 také popisuje ketolidy s cyklickou karbamátovou skupinou v C-11 a C-12, ale které mají skupinu -OMe v C-6 a alkylarylovou skupinu na dusíku karbamátové skupiny. Nicméně kvůli složitosti makrolidové molekuly je úsilí lékařské chemie produkovat deriváty omezeno druhy modifikací, které mohou být k přirozeně se vyskytujícím erythromycinům a jejich prekurzorům vytvářeny.

Nedávný objev a izolace modulárních polyketidových syntáz („PKS“) rozšířil rozsah makrolidových struktur, které mohou být vytvářeny. PKS jsou vícefunkční enzymy příbuzné syntázám mastných kyselin, které katalyzují tvorbu polyketidových řetězců prostřednictvím opakovaných reakcí mezi jejich acylthioestery.

PKS z *S. erythraea* je soustava tří vícefunkčních proteinů kódovaných třemi samostatnými geny a je popsána v patentech Spojených Států č. 5 824 513, 6 004 787, 6 060 234 a 6 063 561. PKS produkt *S. erythraea* je 6-deoxyerythronolid B, který je následovně zpracován dalšími upravujícími enzymy za vzniku erythromycinů A až D. Společná soustava genu PKS a genů pro upravující enzymy je nazývána skupinou biosyntetických genů (klastr biosyntetických genů). Skupina biosyntetických genů PKS *S. erythraea* je popsána autory Donadio et al. v práci *Industrial Microorganisms: Basic and Applied Molecular Genetics*, 1993, R. H. Balz, G. D. Hegeman a P. I. Skatrud (vyd.), Amer. Soc. Microbiol.



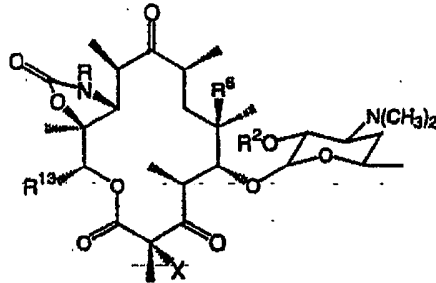
Rekombinantní metody, které používají vektory kódující celou řadu PKS, včetně PKS z *S. erythraea*, pro tvorbu nových polyketidů, jsou popsány v patentu Spojených Států č. 5 672 491, 5 830 750, 5 672 491, 5 712 146, 5 962 290, 6 022 731, 6 066 721 a 6 077 696. PCT přihláška č. WO 98/01546 popisuje další způsoby modifikace zaváděcí domény a tedy měnící se povahu spouštěcích (iniciačních) jednotek, které zahajují syntézu polyketidu. Byly popsány způsoby přípravy polyketidů v bezbuněčném systému, například v patentu Spojených Států č. 6 080 555 a PCT přihlášce č. WO 97/02358. S použitím těchto technik byly publikovány analogy erythromycinu, kde byla přirozeně se vyskytující ethylová skupina v C-13 nahrazena dalšími skupinami, například v PCT přihláškách č. WO 97/23630, WO 98/01571, WO 99/35157, WO 00/03986 a WO 00/44761.

Vzhledem k alarmujícímu zvýšení výskytu kmenů rezistentních na antibiotika používaná v současnosti, existuje potřeba nových sloučenin, které mají antibiotickou aktivitu, obzvláště proti rezistentním kmenům. Předkládaný vynález splňuje tuto potřebu poskytnutím nových derivátů erythromycinu. Tyto sloučeniny jsou obecně produktem polosyntetických nebo chemických modifikací analogů erythromycinu přirozeně se nevyskytujících, které jsou výsledkem manipulace skupiny PKS genů.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález se týká nových sloučenin, o kterých se předpokládá, že mají antibakteriální aktivitu proti širokému spektru bakteriálních kmenů a jsou tedy použitelné pro léčbu

bakteriálních infekcí u lidí a zvířat. Předkládaný vynález se týká sloučenin vzorce:



kde:

X je atom vodíku nebo halogenid,

R^2 je atom vodíku, acylová skupina nebo skupina chránící hydroxyskupinu,

R^6 je atom vodíku, hydroxylová skupina nebo skupina $-OR^a$, kde R^a je substituovaná nebo nesubstituovaná skupina vybraná ze skupiny, kterou tvoří alkylová skupina obsahující 1 až 10 atomů uhlíku, alkenylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku, alkynylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku, arylová skupina, heterocyklová skupina, arylalkylová skupina obsahující 1 až 10 atomů uhlíku v alkylové části, arylalkenylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkenylové části, arylalkynylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkynylové části, heterocykloalkylová skupina obsahující 1 až 10 atomů uhlíku v alkylové části, heterocykloalkenylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkenylové části a heterocykloalkynylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkynylové části,

R^{13} je atom vodíku nebo substituovaná nebo nesubstituovaná skupina, kde skupina je vybraná ze skupiny, kterou tvoří methylová skupina, alkylová skupina obsahující 3 až 10 atomů uhlíku, alkenylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku,



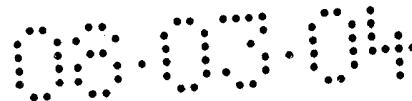
alkynylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku, arylová skupina, heterocyklová skupina, arylalkylová skupina obsahující 1 až 10 atomů uhlíku v alkylové části, arylalkenylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkenylové části, arylalkynylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkylové části, heterocykloalkylová skupina obsahující 1 až 10 atomů uhlíku v alkylové části, heterocykloalkenylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkenylové části a heterocykloalkynylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkylové části a

R je atom vodíku nebo substituovaná nebo nesubstituovaná skupina, kde skupina je vybraná ze skupiny, kterou tvoří alkylová skupina obsahující 1 až 10 atomů uhlíku, alkenylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku, alkylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku, arylová skupina, heterocyklová skupina, arylalkylová skupina obsahující 1 až 10 atomů uhlíku v alkylové části, arylalkenylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkenylové části, arylalkynylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkylové části, heterocykloalkylová skupina obsahující 1 až 10 atomů uhlíku v alkylové části, heterocykloalkenylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkenylové části a heterocykloalkynylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkylové části,

a jejich farmaceuticky přijatelné soli, estery a formy předléčiv.

Podrobný popis výhodných provedení

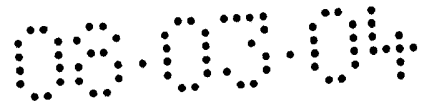
Předkládaný vynález se týká nových erythromycinových derivátů a jejich meziproduktů. Obecně mají sloučeniny podle vynálezu antibakteriální aktivitu proti grampozitivním,



gramnegativním a anaerobním baktériím a jsou použitelné jako širokospektrá antibakteriální agens pro léčbu bakteriálních infekcí u lidí a zvířat. Tyto sloučeniny jsou účinné proti různým kmenům včetně, ale bez omezení, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, enterokoků, *Moraxella catarrhalis* a *H. Influenzae*. Příklady infekcí, které mohou být léčeny, zahrnují v populaci získanou pneumonii, infekce horní a dolní části respiračního traktu, kožní infekce a infekce měkkých tkání, meningitidu, nozokomiální dlouhotrvající infekce a infekce kostí a kloubů.

Mnoho sloučenin podle vynálezu obsahují jedno nebo více chirálních center. Všechny stereoizomery jsou zahrnuty v rozsahu vynálezu, stejně jako čisté sloučeniny a také směsi stereoizomerů. Podobně také všechny geometrické izomery jsou zahrnuty v rozsahu vynálezu. Kde mají sloučeniny podle tohoto vynálezu alespoň jedno chirální centrum, mohou v souladu s tím existovat jako enantiomery. Kde sloučeniny mají dvě nebo více chirálních center, mohou dodatečně existovat jako diastereoizomery. Rozumí se, že všechny takové izomery a jejich směsi jsou zahrnuty v rozsahu předkládaného vynálezu. Kromě toho, některé krystalické formy sloučenin mohou existovat jako polymorfní formy a předpokládá se, že jako takové jsou zahrnuty v předkládaném vynálezu. Navíc některé sloučeniny mohou tvořit solváty s vodou (tj. hydráty) nebo běžnými organickými rozpouštědly a předpokládá se, že takové solváty jsou také zahrnovány do rozsahu tohoto vynálezu.

Pro použití v lékařství se soli sloučenin podle tohoto vynálezu týkají netoxických „farmaceuticky přijatelných solí“. Nicméně další soli mohou být použitelné pro přípravu sloučenin podle tohoto vynálezu nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí. Vhodné farmaceuticky přijatelné soli sloučenin zahrnují kyselé adiční soli, které mohou například být vytvořeny



smícháním roztoku sloučeniny s roztokem farmaceuticky přijatelné kyseliny, jako je například chlorovodíková kyselina, sírová kyselina, fumarová kyselina, maleinová kyselina, jantarová kyselina, octová kyselina, benzoová kyselina, citronová kyselina, vinná kyselina, uhličitá kyselina nebo fosforečná kyselina. Kromě toho, kde sloučeniny podle vynálezu nesou kyselou skupinu, jejich vhodné farmaceuticky přijatelné soli mohou zahrnovat soli alkalických kovů, např. sodné nebo draselné soli, soli kovů alkalických zemin, např. vápenaté nebo hořečnaté soli a soli vytvořené s vhodnými organickými ligandy, např. kvartérní amonné soli. Zástupci farmaceuticky přijatelných solí zahrnují následující: acetát, benzensulfonát, benzoát, hydrouhličitan, bisulfát, bitartrát, borát, bromid, edetát vápenatý, kamsylát, karbonát, chlorid, klavulanát, citrát, dihydrochlorid, edetát, edisylát, estolát, esylát, fumarát, gluceptát, glukonát, glutamát, glykolylarsanilát, hexylresorcinát, hydrabamin, hydrobromid, hydrochlorid, hydroxynaftoát, jodid, isethionát, laktát, laktobionát, laurát, malát, maleát, mandelát, mesylát, methylbromid, methylnitrát, methylsulfát, slizan, napsylát, nitrát, amonná sůl N-methylglukaminu, oleát, pamoát (embonát), palmitát, pantothenát, fosfát/difosfát, polygalakturonát, salicylát, stearát, sulfát, subacetát, sukcinát, tannát, tartrát, teoklát, tosylát, triethiodid a valerát.

Předkládaný vynález zahrnuje do svého rozsahu předléčiva sloučenin podle tohoto vynálezu. Obecně tato předléčiva jsou funkční deriváty sloučenin, které jsou snadno přeměnitelné *in vivo* na požadovanou sloučeninu. Ve způsobech léčení podle předkládaného vynálezu, termín „podávání“ zahrnuje léčbu různých popsaných chorobných stavů specificky popsanou sloučeninou nebo sloučeninou, která nemusí být specificky popsána, ale která se konvertuje na specifikovanou sloučeninu



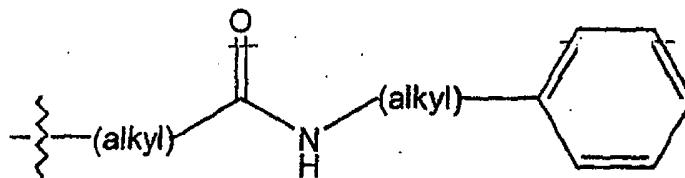
in vivo po podávání pacientovi. Obvyklé postupy pro selekci a přípravu vhodných derivátů předléčiv jsou popsány například v práci „Design of Prodrugs“, vyd. H. Bundgaard, Elsevier, 1985.

Dále v textu jsou uvedeny definice různých termínů používaných pro popis tohoto vynálezu. Tyto definice platí pro termíny, jak jsou použity v tomto popisu, není-li ve specifických příkladech uvedeno jinak, buď individuálně nebo jako část větší skupiny.

Když je konkrétní skupina „substituovaná“ (např. cykloalkylová skupina, arylová skupina, heterocyklylová skupina, heteroarylová skupina), tato skupina může mít jeden nebo více substituentů, výhodně jeden až pět substituentů, výhodněji jeden až tři substituenty, nejvýhodněji dva substituenty, nezávisle vybrané ze seznamu substituentů. Předpokládá se, že definice kteréhokoliv substituentu nebo proměnné v konkrétní lokalizaci v molekule je nezávislá na jejích definicích kdekoliv jinde v téže molekule. Rozumí se, že substituenty a charakter substitucí sloučenin podle tohoto vynálezu mohou být vybrány odborníkem v oboru za vzniku sloučenin, které jsou chemicky stabilní a které mohou být snadno syntetizovány technikami v oboru známými a také metodami uvedenými dále v tomto textu. Příklady vhodných substituentů jsou alkylová skupina, alkenylová skupina, alkynylová skupina, arylová skupina, atom halogenu, trifluormethoxyskupina, trifluormethylová skupina, hydroxyskupina, alkoxyskupina, cykloalkyloxyskupina, heterocyklooxyskupina, alkanoylová skupina, alkanoyloxyskupina, aminoskupina, alkylaminoskupina, arylalkylaminoskupina, cykloalkylaminoskupina, heterocykloaminoskupina, dialkylaminoskupina, alkanoylaminoskupina, thioskupina, alkylthioskupina, cykloalkylthioskupina, heterocyklo-

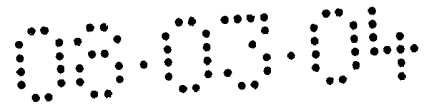
thioskupina, ureidoskupina, nitroskupina, kyanoskupina, karboxyskupina, carboxylalkylová skupina, karbamylová skupina, alkoxykarbonylová skupina, alkylthionoskupina, arylthionoskupina, alkylsulfonylová skupina, sulfon-amidoskupina, aryloxyskupina, apod. kromě skupin jinak specifikovaných v tomto textu. Substituent může být dále substituován, například atomem halogenu, hydroxyskupinou, alkylovou skupinou, alkoxyskupinou, arylovou skupinou, substituovanou arylovou skupinou, substituovanou alkylovou skupinou, substituovanou arylalkylovou skupinou apod.

Podle standardního názvosloví použitého v tomto popise je koncová část označeného postranního řetězce popsána jako první, pak následuje přilehlá funkční skupina k bodu připojení. Tak například substituent „skupina fenyl(alkyl)amido(alkyl)“ se vztahuje ke skupině vzorce



Termín „pacient“, jak se v tomto textu používá, se týká živočicha, výhodně savce, nejvýhodněji člověka, který je objektem léčby, pozorování nebo experimentu.

Termín „terapeuticky účinné množství“, jak se v tomto textu používá, znamená to množství účinné sloučeniny nebo farmaceutického přípravku, které vyvolá biologickou nebo léčivou reakci v tkáňovém systému, živočišném nebo humánním, která je vyhledávána vědcem, veterinářem, lékařem nebo jiným klinikem, která zahrnuje zmírnění symptomů onemocnění nebo léčeného chorobného stavu.



Termín „přípravek“, jak se v tomto textu používá, je zamýšlen pro označení produktu obsahujícího specifikované složky ve specifikovaném množství a také kteréhokoliv produktu, který je důsledkem, přímo nebo nepřímo, kombinace specifikovaných složek ve specifikovaném množství.

Termín „alkylová skupina“ se týká uhlovodíků s přímým nebo s rozvětveným řetězcem. Termín „alkenylová skupina“ se týká uhlovodíku s přímým nebo s rozvětveným řetězcem s alespoň jednou dvojnou vazbou mezi dvěma atomy uhlíku. Termín „alkynylová skupina“ se týká uhlovodíku s přímým nebo s rozvětveným řetězcem s alespoň jednou trojnou vazbou mezi dvěma atomy uhlíku.

Termíny „substituovaná alkylová skupina“, „substituovaná alkenylová skupina“ nebo „substituovaná alkynylová skupina“ se týkají příslušné alkylové skupiny, alkenylové skupiny nebo alkynylové skupiny substituované jedním nebo více substituenty. Názorné příklady substituentů jsou, ale bez omezení, alkylová skupina, alkenylová skupina, alkynylová skupina, arylová skupina, atom halogenu, trifluormethylová skupina, trifluormethoxyskupina, hydroxyskupina, alkoxyskupina, cykloalkoxyskupina, heterocyklooxyskupina, oxoskupina, skupina alkanoyl(-C(=O)alkyl), aryloxyskupina, alkanoyloxyskupina, aminoskupina, alkylaminoskupina, arylaminoskupina, arylalkylaminoskupina, cykloalkylaminoskupina, heterocykloaminoskupina, disubstituované aminy, ve kterých dva substituenty aminoskupiny jsou vybrány ze skupiny, kterou tvoří alkylová skupina, arylová skupina nebo arylalkylová skupina, alkanoylaminoskupina, aroylaminoskupina, arylalkanoylaminoskupina, substituovaná alkanoylaminoskupina, substituovaná arylaminoskupina, substituovaná arylalkanoylaminoskupina, thiolová skupina, alkylthioskupina, arylthioskupina, arylalkylthioskupina, cykloalkylthioskupina,

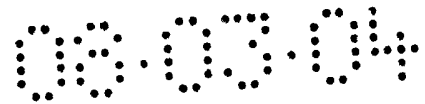
heterocyklothioskupina, alkylthionoskupina, arylthionoskupina, arylalkylthionoskupina, alkylsulfonylová skupina, arylsulfonylová skupina, arylalkylsulfonylová skupina, sulfonamid skupina (např. SO_2NH_2), substituovaná sulfonamid skupina, nitroskupina, kyanoskupina, karboxyskupina, karbamylová skupina (např. CONH_2), substituovaná karbamylová skupina (např. skupina $-\text{C}(=\text{O})\text{NRR}'$, kde R a R' jsou každý nezávisle atom vodíku, alkylová skupina, arylová skupina, arylalkylová skupina apod.), alkoxykarbonylová skupina, arylová skupina, substituovaná arylová skupina, guanidinoskupina a heterocyklová skupina, jako je například indoylová skupina, imidazolylová skupina, furylová skupina, thienylová skupina, thiazolylová skupina, pyrrolidylová skupina, pyridylová skupina, pyrimidylová skupina apod. Kde je to použitelné, substituent může být dále substituován, například atomem halogenu, alkylovou skupinou, alkoxykupinou, arylovou skupinou nebo arylalkylovou skupinou apod.

Termín „acylová skupina“ se týká skupiny R-CO- , kde R je alkylová skupina, typicky nižší alkylová skupina obsahující 1 až 6 atomů uhlíku.

Termíny „halogen“, „atom halogenu“ nebo „halogenid“ se týkají atomu fluoru, atomu chloru, atomu bromu a atomu jodu.

Termín „arylová skupina“ se týká monocyklických nebo bicyklických aromatických uhlovodíkových skupiny majících 6 až 12 atomů uhlíku v kruhové části, jako je například fenylová skupina, naftylová skupina a bifenylová skupina apod., každá z nich může být substituovaná.

Termíny „alkylarylová skupina“ nebo „arylalkylová skupina“ se týkají arylové skupiny navázané prostřednictvím alkylové skupiny, jako je například benzylová skupina. Podobně, „arylalkenylová skupina“ a „arylalkynylová skupina“ se týkají



arylové skupiny navázané prostřednictvím alkenylové skupiny nebo alkynylové skupiny, v daném pořadí.

Termín „substituovaná arylová skupina“ se týká arylové skupiny substituované například jedním až čtyřmi substituenty, jako je například substituovaná a nesubstituovaná alkylová skupina, alkenylová skupina, alkynylová skupina a arylová skupina, atom halogenu, trifluormethoxyskupina, trifluormethylová skupina, hydroxyskupina, alkoxyskupina, cykloalkyloxyskupina, heterocyklooxyskupina, alkanoylová skupina, alkanoyloxyskupina, aminoskupina, alkylaminoskupina, arylalkylaminoskupina, cykloalkylaminoskupina, heterocykloaminoskupina, dialkylaminoskupina, alkanoylaminoskupina, thioskupina, alkylthioskupina, cykloalkylthioskupina, heterocyklothioskupina, ureidoskupina, nitroskupina, kyanoskupina, karboxyskupina, karboxyalkylová skupina, karbamylová skupina, alkoxykarbonylová skupina, alkylthionoskupina, arylthionoskupina, alkylsulfonylová skupina, sulfonamidoskupina, aryloxyskupina, apod. Substituent může být dále substituován, například atomem halogenu, hydroxyskupinou, alkylovou skupinou, alkoxyskupinou, arylovou skupinou, substituovanou arylovou skupinou, substituovanou alkylovou skupinou, substituovanou arylalkylovou skupinou apod.

Termín „cykloalkylová skupina“ se týká volitelně substituovaných, saturevaných cyklických uhlovodíkových kruhových systémů, výhodně obsahujících 1 až 3 kruhy a 3 až 7 uhlíků v kruhu, které mohou být dále kondenzovány s nesaturevaným karbocyklickým kruhem obsahujícím 3 až 7 atomů uhlíku. Příkladné skupiny jsou cyklopropylová skupina, cyklobutylová skupina, cyklopentylová skupina, cyklohexylová skupina, cykloheptylová skupina, cyklooktylová skupina, cyklononylová skupina, cyklodecylová skupina a adamantylová skupina. Příkladné substituenty zahrnují jednu nebo více



alkylových skupin nebo jednu nebo více skupin popisovaných výše jako substituenty alkylové skupiny.

Termíny „heterocyklus“, „heterocyklický“ a „heterocyklová skupina“ se týkají volitelně substituované, úplně satureované nebo nesatureované, aromatické nebo nearomatické cyklické skupiny, která je například monocyklický kruhový systém se 4 až 7 členy, bicyklický kruhový systém se 7 až 11 členy nebo tricyklický kruhový systém s 10 až 15 členy, který má alespoň jeden heteroatom v kruhu obsahujícím alespoň jeden atom uhlíku. Každý kruh heterocyklické skupiny obsahující heteroatom může mít 1, 2 nebo 3 heteroatomy vybrané z atomů dusíku, atomů kyslíku a atomů síry, přičemž heteroatomy dusíku a síry mohou být také volitelně oxidovány. Atomy dusíku mohou být volitelně ve formě kvartérního dusíku. Heterocyklická skupina může být připojena ve kterémkoliv heteroatomu nebo atomu uhlíku.

Příkladné monocyklické heterocyklické skupiny jsou pyrrolidinylová skupina, pyrrolylová skupina, indolylová skupina, pyrazolylová skupina, oxetanylová skupina, pyrazolinylová skupina, imidazolylová skupina, imidazolinylová skupina, imidazolidinylová skupina, oxazolylová skupina, oxazolidinylová skupina, isoxazolinylová skupina, isoxazolylová skupina, thiazolylová skupina, thiadazolylová skupina, thiazolidinylová skupina, isothiazolylová skupina, isothiazolidinylová skupina, furylová skupina, tetrahydrofurylová skupina, thienylová skupina, oxadiazolylová skupina, piperidinylová skupina, piperazinylová skupina, 2-oxo-piperazinylová skupina, 2-oxopiperidinylová skupina, 2-oxo-pyrrolidinylová skupina, 2-oxazepinylová skupina, azepinylová skupina, 4-piperidonylová skupina, pyridinylová skupina, N-oxopyridylová skupina, pyrazinylová skupina, pyrimidinylová skupina, pyridazinylová skupina, tetrahydropyranylová skupina,

tetrahydrothiopyranylová skupina, tetrahydrothiopyranylsulfonová skupina, morfolinylová skupina, thiomorfolinylová skupina, thiomorfolinylsulfoxidová skupina, thiomorfolinylsulfonová skupina, 1,3-dioxolanová skupina, 1-dioxo-thienylová skupina, dioxanylová skupina, thientanylová skupina, thiiranylová skupina, triazinylová skupina, triazolylová skupina apod. výhodné heterocyklové skupiny jsou pyridinylová skupina, pyrazinylová skupina, pyrimidinylová skupina, pyrrolylová skupina, pyrazolylová skupina, imidazolylová skupina, thiazolylová skupina, oxazolylová skupina, isoxazolylová skupina, thiadiazolylová skupina, oxadiazolylová skupina, thienylová skupina, furanylová skupina, chinolinylová skupina, isochinolinylová skupina, apod.

Příkladné bicyklické heterocyklické skupiny jsou benzothiazolylová skupina, benzoxazolová skupina, benzothienylová skupina, chinuklidinylová skupina, chinolinylová skupina, N-oxido-chinolinylová skupina, tetrahydroisochinolinylová skupina, isochinolinylová skupina, benzimidazolylová skupina, benzopyranylová skupina, indolizinylová skupina, benzofurylová skupina, chromonylová skupina, kumarinylová skupina, cinnolinylová skupina, chinoxalinylová skupina, indazolylová skupina, pyrrolopyridinylová skupina, furopyridinylová skupina (jako například furo[2,3-c]pyridinylová skupina, furo[3,2-b]pyridinylová skupina nebo furo[2,3-b]pyridinylová skupina), imidazopyridinylová skupina (jako například imidazo[4,5b]pyridinylová skupina nebo imidazo[4,5-c]pyridinylová skupina), dihydroisindolylová skupina, dihydrochinazolinylová skupina (jako například 3,4-dihydro-4-oxochinazolinylová skupina), benzisothiazolylová skupina, benzisoxazolylová skupina, benzodiazinylová skupina, benzofurazanylová skupina, benzothiopyranylová skupina, benzpyrazolylová skupina,

dihydrobenzofurylová skupina, dihydrobenzothienylová skupina, dihydrobenzothiopyranylová skupina, dihydrobenzothiopyranylsulfonová skupina, dihydrobenzopyranylová skupina, indolinylová skupina, isochromanylová skupina, isoindolinylová skupina, naftyridinylová skupina, ftalazinylová skupina, piperonylová skupina, purinylová skupina, pyridopyridylová skupina, chinazolinylová skupina, tetrahydrochinolinylová skupina, thienofurylová skupina, thienopyridylová skupina, thienothienylová skupina apod.

Termín „heteroarylová skupina“ se týká aromatického heterocyklu.

Termíny „substituovaná heterocyklová skupina“ nebo „substituovaná heteroarylová skupina“ se týkají příslušné skupiny (heterocyklové skupiny nebo heteroarylové skupiny) substituované jedním nebo více substituenty. Příkladné substituenty zahrnují jednu nebo více alkylových skupin nebo jednu nebo více skupin popsaných jako substituenty alkylové skupiny. Substituovaná heterocyklová skupina nebo heteroarylová skupina může být substituovaná monooxoskupinou za vzniku například 4-oxo-1H-chinolinové skupiny. Substituovaná heterocyklová skupina nebo heteroarylová skupina může také být substituovaná substituovanou arylovou skupinou nebo druhou substituovanou heterocyklovou skupinou za vzniku například 4-fenylimidazol-1-ylové skupiny nebo 4-(pyridin-3-yl)imidazol-1-ylové skupiny.

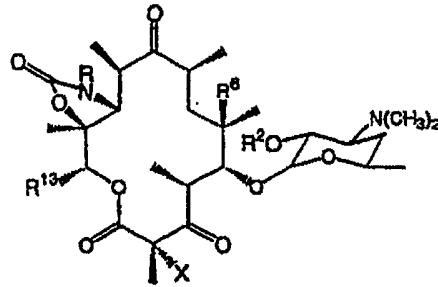
Termín „skupina chránící hydroxyskupinu“ se týká skupin v oboru pro takový účel známých. Běžně používané hydroxyskupinu chránící skupiny jsou popsány například v práci T. H. Greene a P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 2. vydání, John Wiley & Sons, New York, 1991, která je v tomto textu zahrnuta formou odkazu. Příkladné skupiny chránící hydroxylovou skupinu jsou, ale bez omezení,

tetrahydropyranylová skupina, benzylová skupina, methylthiomethylová skupina, ethythiomethylová skupina, pivaloylová skupina, fenylsulfonylová skupina, trifenylmethylová skupina, trisubstituovaná silylová skupina, jako je například trimethylsilylová skupina, triethylsilylová skupina, tributylsilylová skupina, tri-isopropylsilylová skupina, t-butyl dimethylsilylová skupina, tri-t-butylsilylová skupina, methyldifenylsilylová skupina, ethyldifenylsilylová skupina, t-butyl difenylsilylová skupina apod., acylová skupina a aroylová skupina, jako je například acetylová skupina, pivaloylbenzoylová skupina, 4-methoxybenzoylová skupina, 4-nitrobenzoylová skupina a alifatická acylarylová skupina apod.

Kromě uvedených substitucí ve výše popsáných skupinách mohou sloučeniny podle vynálezu obsahovat další substituce, kde je to vhodné. Například hlavní řetězec erythromycinu nebo substituenty hlavního řetězce mohou být dále substituované (např. nahrazením jednoho z atomů vodíku nebo derivatizací skupiny bez atomu vodíku) jedním nebo více substituenty, jako je například alkylová skupina obsahující 1 až 5 atomů uhlíku, alkoxy skupina obsahující 1 až 5 atomů uhlíku, fenylová skupina nebo funkční skupina. Názorné příklady vhodných funkčních skupin jsou, ale bez omezení, alkohol, sulfonová kyselina, fosfin, fosfonát, fosfonová kyselina, thiol, keton, aldehyd, ester, ether, amin, kvartérní amonium, imin, amid, imid, imidoskupina, nitroskupina, karboxylová kyselina, disulfid, karbonát, isokyanát, karbodiimid, karboalkoxy skupina, karbamát, acetal, ketal, boronát, kyanohydrin, hydrazon, oxim, hydrazid, enamín, sulfone, sulfid, sulfenylová skupina a atom halogenu.

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu

Výhodná provedení sloučenin podle předkládaného vynálezu zahrnují sloučeniny vzorce I



(vzorec I)

kde:

X je atom vodíku nebo fluorid,

R^2 je atom vodíku, skupina $-COCH_3$ nebo $-CO$ fenylová skupina,

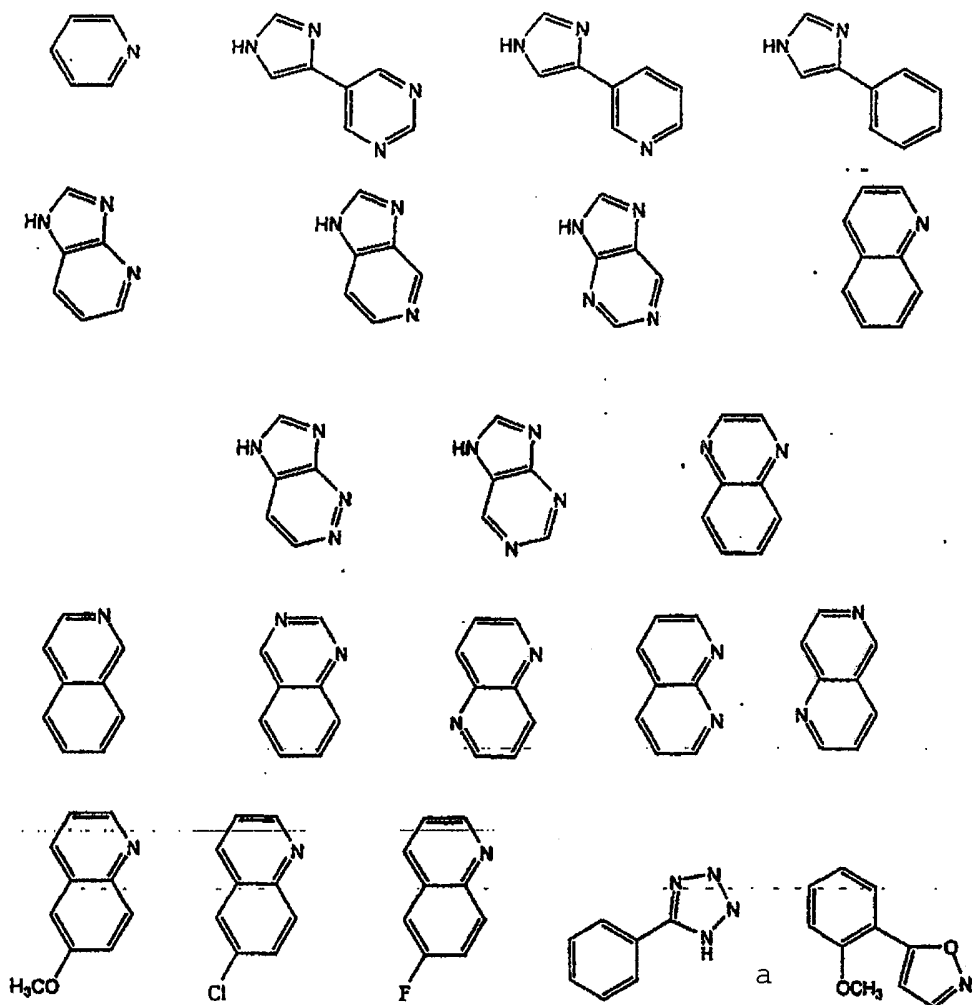
R^{13} je methylová skupina, propylová skupina, vinylová skupina, butylová skupina, 3-butenylová skupina, 3-hydroxybutylová skupina, 2-fluoroethylová skupina nebo 2-azidoethylová skupina,

R^6 je skupina $-OR^a$, kde R^a je atom vodíku, alkylová skupina obsahující 1 až 5 atomů uhlíku nebo skupina $-YZ$

kde Y je alkylová skupina obsahující 1 až 10 atomů uhlíku, alkenylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku nebo alkynylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku, výhodněji alkylová skupina obsahující 3 až 6 atomů uhlíku, alkenylová skupina obsahující 3 až 6 atomů uhlíku nebo obsahující alkynylová skupina 3 až 6 atomů uhlíku a Z je substituovaná arylová skupina, nesubstituovaná arylová skupina, substituovaná heterocyklová skupina nebo nesubstituovaná heterocyklová skupina, výhodněji substituovaná nebo nesubstituovaná heteroarylová skupina,

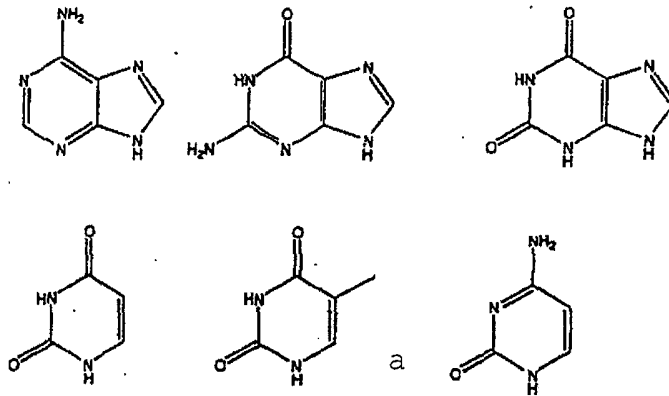
R je atom vodíku nebo R^a .

Názorné příklady výhodných substituovaných a nesubstituovaných heterocyklů pro R^6 nebo R zahrnují, ale bez omezení,



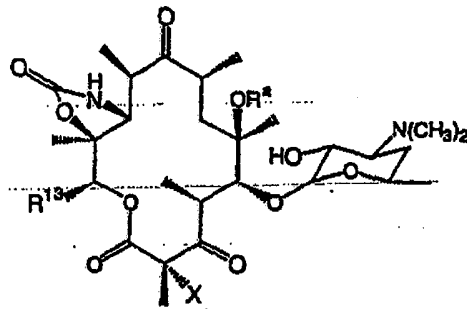
kde substituovaná nebo nesubstituovaná heteroarylová skupina nebo její tautomerní formy mohou být připojeny na kterémkoliv vhodném atomu.

Další příklady substituovaných nebo nesubstituovaných heterocyklů pro R^6 nebo R zahrnují báze nukleových kyselin a jejich deriváty, jako je například



kde báze nukleové kyseliny nebo derivát může být připojen na kterémkoliv vhodném atomu.

Obzvláště výhodné sloučeniny podle předkládaného vynálezu zahrnují:

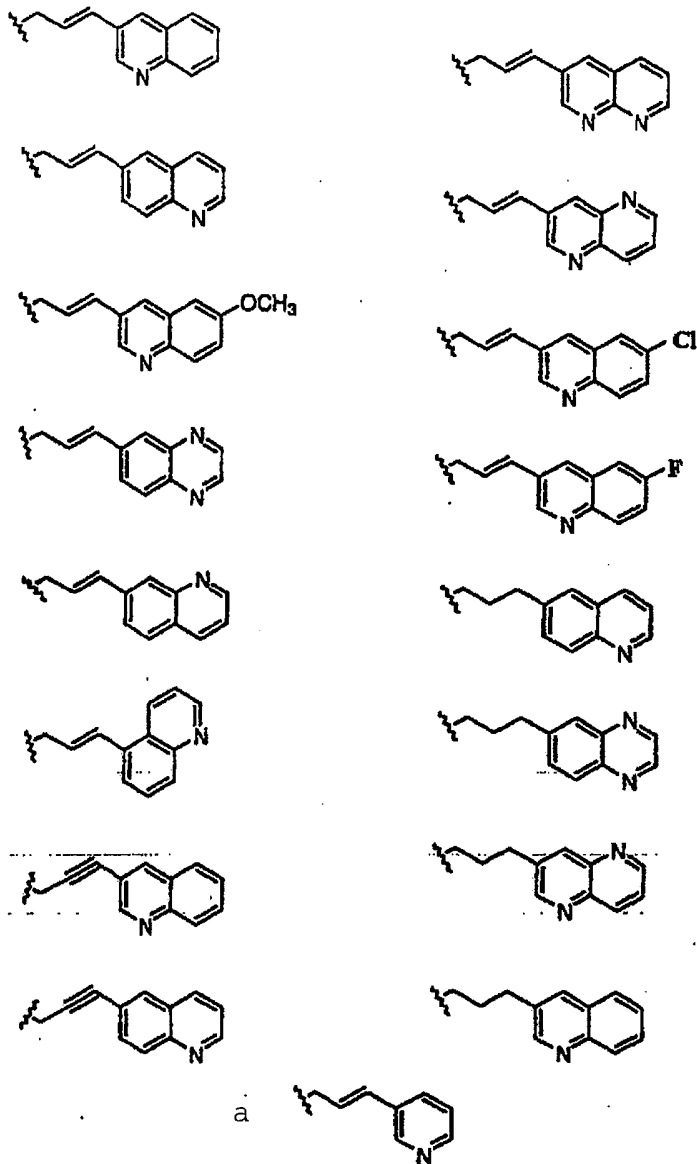


(vzorec II)

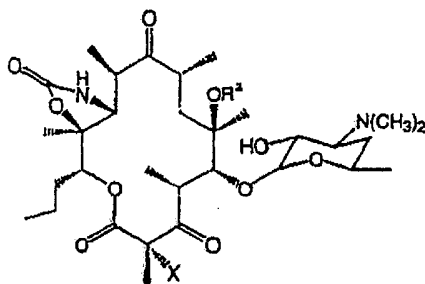
kde X je atom H nebo atom F,

R^{13} je methylová skupina, propylová skupina nebo vinylová skupina a

R^a je vybraný ze skupiny, kterou tvoří

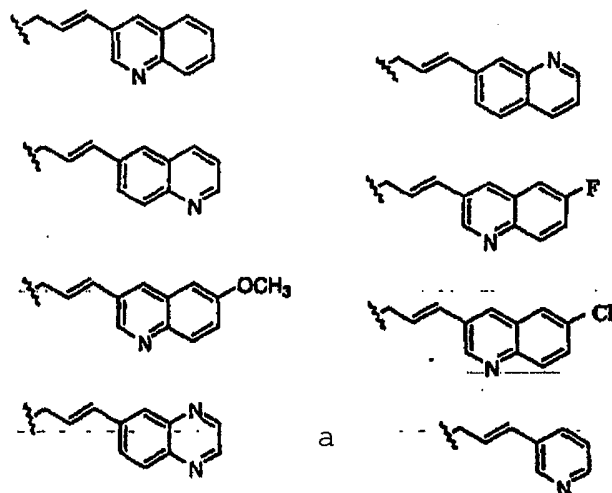


Obzvláště výhodné sloučeniny podle předkládaného vynálezu zahrnují sloučeniny vzorce III



(vzorec III)

kde X je atom vodíku nebo fluorid a R^a je vybraný ze skupiny, kterou tvoří



Obzvláště výhodné jsou sloučeniny vzorce I, kde:

X je atom vodíku nebo fluorid,

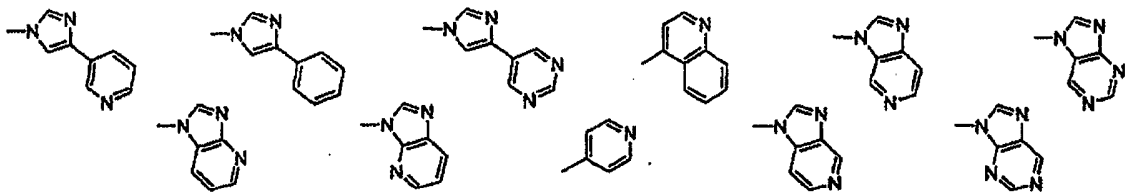
R je atom vodíku,

R² je atom vodíku, skupina -COCH₃ nebo -COfenylová skupina,

R¹³ je methylová skupina, propylová skupina nebo vinylová skupina, a,

R⁶ je vybrán ze skupiny, kterou tvoří 3-(chinolin-3-yl)prop-2-enylová skupina, 3-(chinolin-3-yl)prop-2-ynylová skupina, 3-(chinolin-6-yl)prop-2-enylová skupina, 3-(chinolin-6-yl)prop-2-ynylová skupina, 3-(chinolin-7-yl)prop-2-enylová skupina, 3-fenylprop-2-enylová skupina, 3-(naft-1-yl)prop-2-enylová skupina, 3-(naft-1-yl)prop-2-ynylová skupina, 3-(naft-2-yl)prop-2-ynylová skupina, 5-fenylpent-4-en-2-ynylová skupina, 3-(fur-2-yl)prop-2-ynylová skupina, 3-(thien-2-yl)prop-2-enylová skupina, 3-(karbazol-3-yl)prop-2-enylová skupina a 3-(chinoxalin-6-yl)prop-2-enylová skupina.

Obzvláště výhodné skupiny pro R jsou atom H, fenylová skupina, alkylová skupina obsahující 1 až 8 atomů uhlíku nebo alkenylová skupina obsahující 1 až 8 atomů uhlíku volitelně substituovaná jedním nebo více substituenty vybranými ze skupiny, kterou tvoří fenylová skupina, hydroxyskupina a následující substituované heterocyklové skupiny.



Biosyntéza

Aglykonové meziprodukty mohou být připraveny metodami popsanými v patentech Spojených Států č. 5 672 491, 5 830 750, 5 843 718, 5 712 146, 5 962 290, 6 022 731, 6 066 721, 6 077 696 a 6 080 555, které jsou všechny v tomto textu zahrnuty formou odkazu. V jednom provedení může být „nepřirozený“ prekurzor erythromycinu připraven způsobem, ve kterém je vhodný substrát thioesteru diketidu poskytnut syntázou 6-deoxyerythronolidu B („DEBS“), která není schopná působit na svůj přírodní substrát, propionyl CoA, díky mutaci v ketosyntázové doméně modulu 1 DEBS. Tato rekombinantní DEBS může být exprimována v přirozeném hostiteli, který normálně vytváří erythromycin, *Saccharopolyspora erythraea*, nebo celá skupina PKS genů může být vložena plazmidem do vhodného hostitele, jako je například *S. coelicolor* (viz např. Jacobsen et al, Science 277: 367-369, 1997) nebo *S. lividans*, který byl modifikován tak, aby se odstranil celý jeho endogenní aktinorodinový aparát pro syntézu polyketidu. Vhodným hostitelem by byla například *S. coelicolor* CH999/pJRJ2, která

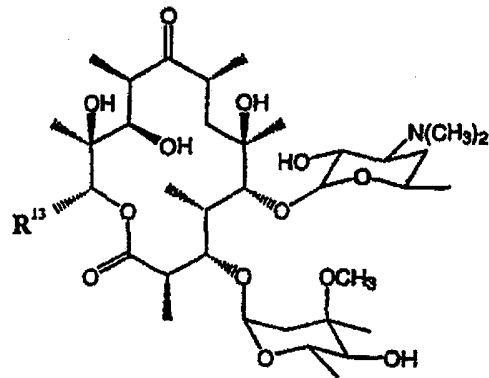
exprimuje mutantu 6-DEB syntázy mající inaktivovanou ketosyntázu modulu 1.

Bezbuněčný systém, jak byl popsán v patentu Spojených Států č. 6 080 555 a PCT přihlášce č. WO 97/02358, může také být použit pro produkci relevantních PKS proteinů rekombinantně a provádět jejich sekreci nebo lyzovat buňky, které je obsahují. Typický bezbuněčný systém by zahrnoval vhodnou PKS, NADPH a vhodný pufr a substráty vyžadované pro katalytickou syntézu polyketidů.

Dále, vhodné substráty thioesteru diketidu mohou být poskytovány PKS enzymům jiným, než 6-DEB syntáze ze *Saccharopolyspora erythraea*. Další PKS enzymy zahrnují 6-DEB syntázu z *Micromonospora megalomicea* a její KS1' derivát popsáný v patentových přihláškách Spojených Států č. 60/190 024 a 60/158 305, oleandolidovou PKS a její KS1' derivát popsáný v PCT přihlášce č. Spojených Států 99/24478 a narbonolidovou PKS a její KS1' derivát popsáný v publikaci PCT WO 99/61599, každá z nich je zahrnuta v tomto textu formou odkazu.

Co se týče aglykonových meziproduktů, kde R¹³ je methylová skupina, výživa s diketidy není nutná, protože požadovaný aglykon může být tvořen rekombinantní hostitelskou buňkou *Streptomyces coelicolor* CH999/PCK7, jak je dále popsáno v tomto textu.

Takto připravené aglykony jsou pak přidány k fermentační půdě pro kmeny *Saccharopolyspora erythraea*, které glykosylují v polohách C-3 a C-5, hydroxylují v poloze C-12 a volitelně hydroxylují v poloze C-6, v závislosti na použitém kmenu. Výhodná provedení hydroxylací a glykosylací jsou sloučeniny obecného vzorce



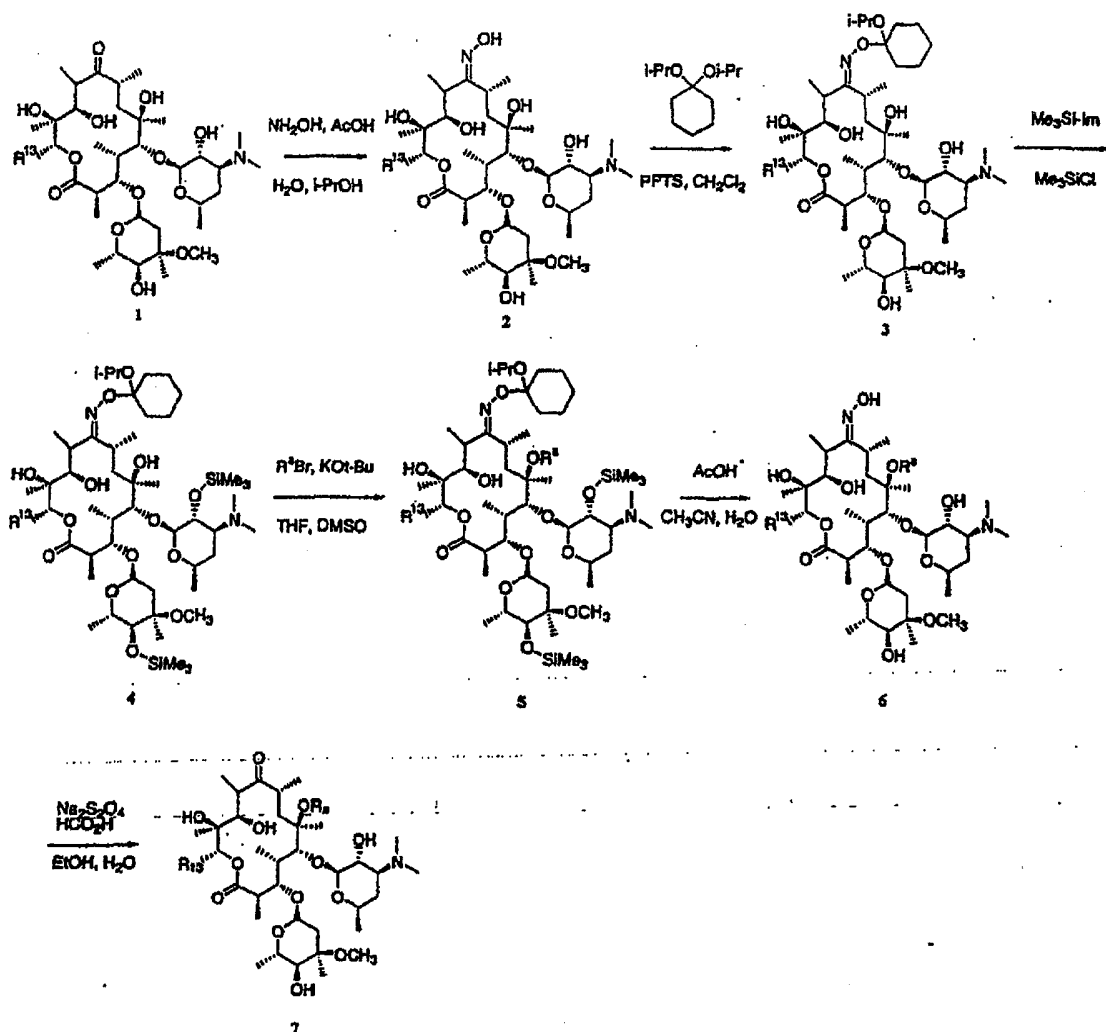
kde R^{13} je jak bylo popsáno dříve. Tyto a další „nepřirozené“ erythromycinové sloučeniny popsané detailně výše, jsou použity jako výchozí látky pro další chemickou syntézu.

Chemická syntéza

Biosynteticky derivovaná výchozí látka je dále modifikována chemickou syntézou. Následné modifikace zahrnují halogenaci v C-2, vytvoření ketoskupiny v C-3, vytvoření cyklického karbamátu v C-11 a C-12, derivaci v C-6 hydroxylové skupině (kde v této poloze existuje hydroxylová skupina) a jejich kombinace. Všechny výsledné sloučeniny (včetně všech meziproductů) jsou považovány za část předkládaného vynálezu.

Když existuje hydroxylová skupina v C-6 poloze biologicky derivované výchozí látky, je typicky modifikována alkylovou skupinou. Schéma 1 ukazuje jeden způsob alkylace C-6 hydroxylové skupiny vycházející z biologicky derivovaného C-13 modifikovaného erythromycinu A.

Schéma 1



Stručně, C-9 ketoskupina výchozí erythromycinové sloučeniny 1 je chráněna skupinou chránící ketoskupinu, výhodně konverzí ketoskupiny na derivatizovaný oxim ($=\text{NOR}'$, kde R' je substituovaná nebo nesubstituovaná skupina, jako je například alkylová skupina obsahující 1 až 12 atomů uhlíku, cykloalkylová skupina obsahující 3 až 12 atomů uhlíku, arylová skupina obsahující 6 až 10 atomů uhlíku a heteroarylová skupina). Výhodný derivatizovaný oxim je vzorce $=\text{NOR}'$, kde R' je isopropoxycyklohexylová skupina, jako ve sloučenině 3. Alternativně místo vytvoření oximu může být C-9 ketoskupina redukována na hydroxylovou skupinu, která může být volitelně

chráněna selektivní skupinou chránící hydroxylovou skupinu před alkylací v C-6 hydroxylové skupiny.

Hydroxylové skupiny sacharidů (polohy 2' a 4'') jsou chráněny s použitím činidel, jako je například acetanhydrid, anhydrid kyseliny benzoové, benzylchloroformiát, hexamethyldisilazan nebo trialkylsilylchlorid v aprotickém rozpouštědle. Názorné příklady aprotických rozpouštědel zahrnují dichlormethan, chloroform, tetrahydrofuran, N-methylpyrrolidon, dimethylsulfoxid („DMSO“), dimethylformamid („DMF“) a trimethylsilylimidazol. Výhodná chránící činidla zahrnují trimethylsilylchlorid v trimethylsilylimidazolu.

Výsledná sloučenina 4 se reaguje s alkylačním agens, jako jsou například alkylhalogenidy, sulfonáty a tosyláty, v přítomnosti báze za vzniku sloučeniny 5. Výhodná alkylační činidla zahrnují alkylbromid R^aBr , jako je například methylbromid, allylbromid, propargylbromid, 2-fluoroethylbromid, cinnamylbromid a krotonylbromid. Vhodné báze zahrnují hydroxid draselný, hydrid sodný, isopropoxid draselný, t-butoxid draselný a aprotické rozpouštědlo.

Jakmile je alkylace C-6-hydroxylové skupiny dokončena, sacharidové zbytky a makrolidový kruh mohou být zbaveny chránící skupiny. Deprotekce glykosidových skupin je prováděna tak, jak bylo popsáno v práci T. H. Greene a P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, níže. Podobné podmínky mají za následek konverzi derivatizovaného oximu na =NOH. Jestliže tvorba nederivatizovaného oximu není současné s deprotekcí, je konverze na oxim prováděna odděleně.

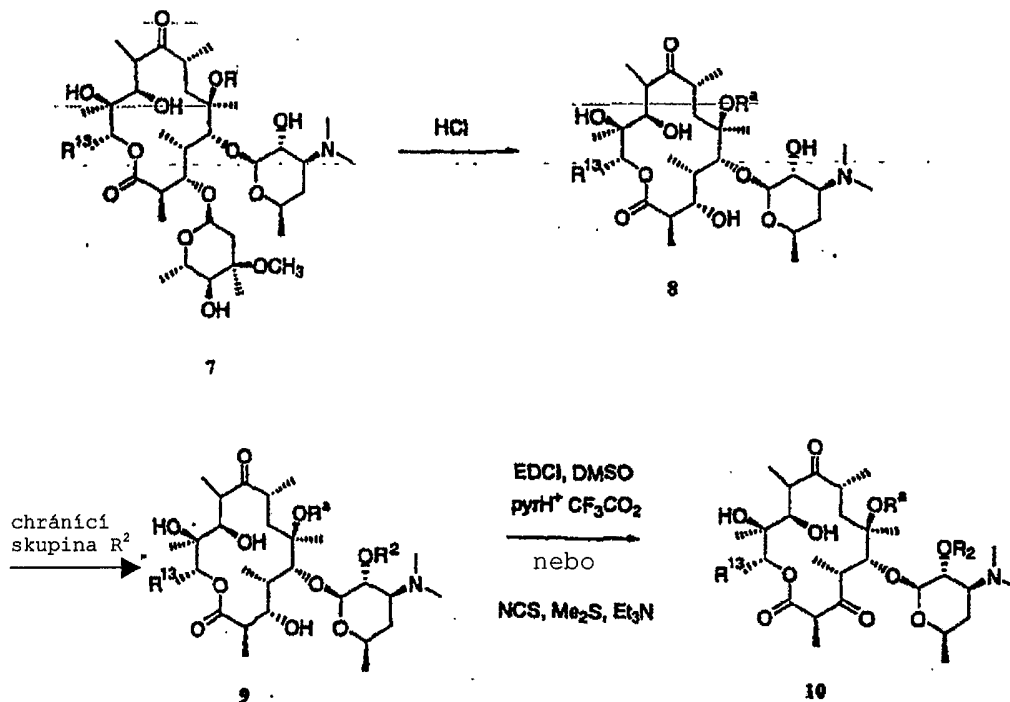
Oxim je odstraněn a konvertován na ketoskupinu standardními metodami v oboru známými. Deoximační činidla zahrnují anorganické sloučeniny oxidů síry, jako je například hydrogensířičitan sodný, pyrosířičitan sodný, thiosíran sodný,

apod. v tomto případě jsou použita protická rozpouštědla, jako je například voda, methanol, ethanol, isopropanol, trimethylsilanol a jejich směsi. Obecně je deoximační reakce prováděna v přítomnosti organické kyseliny, jako je například mravenčí kyselina. Produkt deoximační reakce je sloučenina 7, C-6 alkylovaný derivát výchozí látky.

C-6 alkylovaná sloučenina 7 může být dále modifikována. Například, když R^a je allylová skupina, může být podrobena působení oxidem osmičelým za vzniku 2,3-dihydroxypropylové sloučeniny, který může být dále esterifikována na každém atomu kyslíku. 6-O-allylová sloučenina může také být oxidována m-chlor-peroxybenzoovou kyselinou v aprotickém rozpouštědle za vzniku epoxysloučeniny, která může být otevřena aminy nebo heteroarylovými sloučeninami obsahujícími atom N. Alternativně může být allylový postranní řetězec oxidován ve Wackerových podmínkách za vzniku substituentu $-O-CH_2C(=O)CH_3$ nebo ozonizován za vzniku aldehydu. Aldehyd pak může být konvertován na oxim, který se dále může reagovat s dehydratačním činidlem v aprotickém rozpouštědle za získání nitrilu. Alternativně, aldehyd může být reagován s vhodným aminem a redukován v přítomnosti borohydridového redukčního činidla za vzniku aminu.

Výhodnou modifikací sloučeniny 7 je tvorba ketoskupiny v C-3, jak znázorněno na schématu 2.

Schéma 2

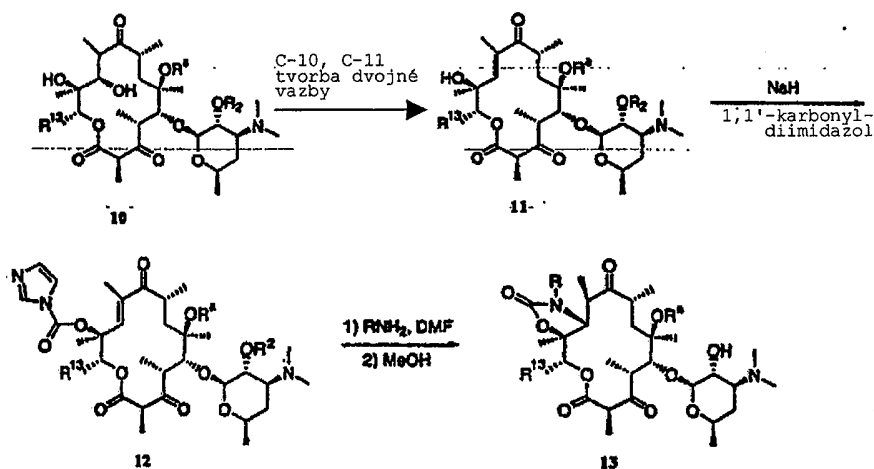


C-3 sacharid je odstraněn kyselinou, výhodně vodnou HCl nebo deglykosylačním enzymem za zisku odpovídajícího derivátu deskladinózy 8. Vhodné kyseliny zahrnují chlorovodíkovou, sírovou, chloroctovou, trifluoroctovou apod., v přítomnosti alkoholu a vody. Reakční časy jsou typicky 0,5 až 24 hodin při teplotě přibližně mezi -10 a 35 °C. Volná hydroxylová skupina zbývající sacharidové skupiny („desamin“) v poloze C-5 erythromycinového hlavního řetězce je selektivně chráněna chránicí skupinou, jako je například acetanhydrid nebo anhydrid kyseliny benzoové (příčemž R² je Ac nebo Bz). C-3 hydroxylová skupina je oxidována na ketoskupinu za zisku sloučeniny 10. V tomto postupu je použito oxidační činidlo, jako je například N-chlorsukcinimid-dimethylsulfid nebo karbodiimid-dimethylsulfoxid. Typicky je sloučenina 9 přidána k předem vytvořenému komplexu N-chlorsukcinimidu a dimethylsulfidu v chlоровaném rozpouštědle, jako je například methylenchlorid v -10 až 25 °C. Po míchání po dobu 0,5 až 4

hodin byl přidán terciální amin, jako je například triethylamin, za vzniku odpovídajícího ketonu.

Sloučenina 10 může také být dále modifikována výhodně cyklickým karbamátem v polohách C-11 a C-12. Jeden způsob vytvoření karbamátové skupiny je ukázán ve schématu 3.

Schéma 3



Krátce, sloučenina 11 je připravena ze sloučeniny 10, například dvoufázovým postupem. Nejdříve je C-11 hydroxylová skupina přednostně konvertována na odstupující skupinu reakcí s alkyl nebo arylsulfonylchloridem, jako je například methansulfonylchlorid, v přítomnosti organické báze, jako je například pyridin. V příštím kroku je odstupující skupina odstraněna působením diazabicykloundekanu ve vhodném rozpouštědle, jako je například aceton, za vzniku dvojné vazby mezi C-10 a C-11. Sloučenina 11 se reaguje s 1,1'-karbonyldiimidazolem, a pak aminem RNH₂. Odstranění chránící skupiny 2'-hydroxylové skupiny je provedeno methanolem za zisku sloučeniny 13. Alternativně, sloučenina 10 může být reagována s 1,1'-karbonyldiimidazolem v přítomnosti báze, jako je například hydrid sodný, za zisku sloučeniny 12 přímo, která

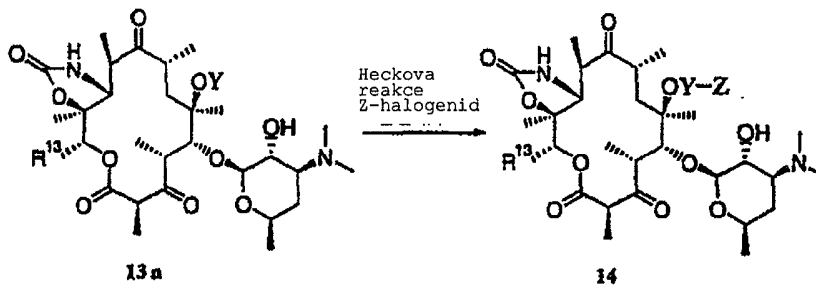
pak může být reagována s RNH_2 za vzniku požadovaného produktu, sloučeniny 13.

Výhodná provedení sloučenin podle vynálezu obecně zahrnují substituovanou arylovou skupinou nebo heterocyklovou skupinou v R nebo R^a . Co se týče sloučenin, kde R je substituovaná arylová skupina nebo heterocyklová skupina, R^a je výhodně alkylová skupina obsahující 1 až 10 atomů uhlíku a výhodněji alkylová skupina obsahující 1 až 5 atomů uhlíku, přičemž je nejvýhodnější CH_3 . Aby se získaly sloučeniny, kde R je substituovaná arylová skupina nebo heterocyklová skupina, je použit odpovídající amin, RNH_2 , jak bylo popsáno ve schématu 3. Názorné příklady vhodných -R skupin jsou, ale bez omezení: chinolin-4-ylbutylová skupina, 4-fenylimidazol-1-ylbutylová skupina, 4-(pyridin-3-yl)imidazol-1-ylbutylová skupina, 4-(pyridin-3-yl)-imidazol-1-ylbutylová skupina, pyridin-4-ylbutylová skupina, 3H-imidazo[4,5-b]pyridin-3-ylbutylová skupina, 1H-imidazo[4,5-b]pyridin-1-ylbutylová skupina, 1H-imidazo[4,5-c]pyridin-1-ylbutylová skupina, 3H-imidazo[4,5-c]pyridin-3-ylbutylová skupina, 1H-imidazo[4,5c]pyridin-1-ylbutylová skupina, purin-7-ylbutylová skupina, purin-9-ylbutylová skupina a 1H-imidazo[4,5-b]pyridin-1-ylbut-2-enylová skupina a 4-(pyrimidin-5-yl)imidazol-1-ylbutylová skupina.

Co se týče sloučenin, kde R^a je substituovaná arylová skupina nebo heterocyklová skupina, R je výhodně atom vodíku. Ačkoli tyto sloučeniny mohou být vytvořeny kterýmkoliv vhodným způsobem, je výhodná dvoustupňová modifikace v C-6 hydroxylové skupině. Obecně, je C-6 hydroxylová skupina modifikována tak, jak bylo popsáno výše ve schématu 1 kromě toho, že alkylbromid YBr , kde Y je alkenylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku nebo alkynylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku, výhodněji alkenylová skupina obsahující 3 až 6 atomů

uhlíku nebo alkynylová skupina obsahující 3 až 6 atomů uhlíku, je použit ve výchozí alkylační reakci v C-6 hydroxylové skupině. Výsledný produkt je dále modifikován tak, jak bylo popsáno ve schématech 2 a 3 a vyplývá z něj sloučenina 13a.

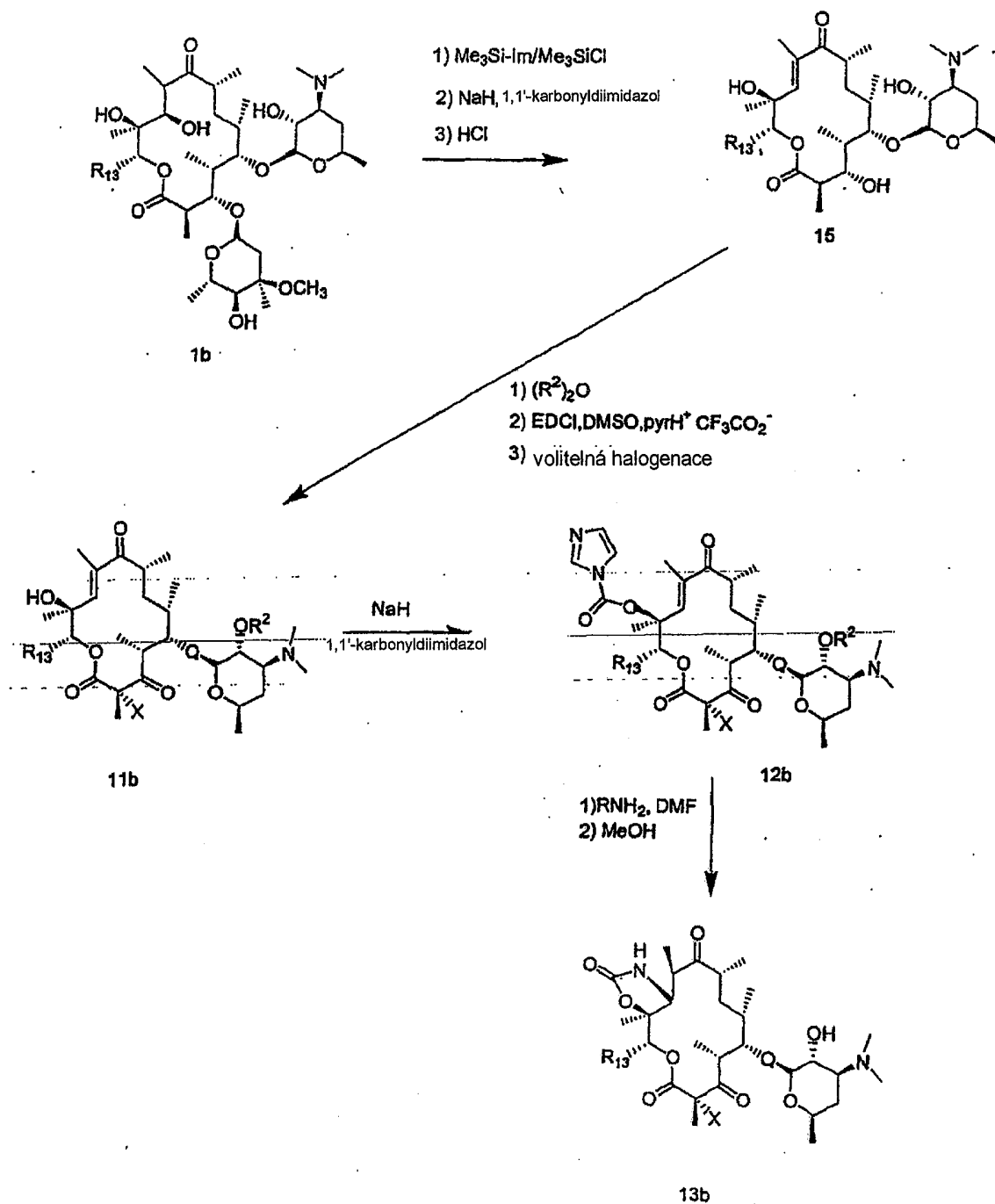
Schéma 4



Jak je ukázáno ve schématu 4, sloučenina 13a se reaguje se Z-halogenidem v Heckových podmínkách (Pd(II) nebo Pd(0), fosfin a amin nebo anorganická báze) za vzniku sloučeniny 14, přičemž Z je kondenzován k Y. V těchto sloučeninách skupina -YZ dohromady je R^a. Názorné příklady -YZ jsou, ale bez omezení: 3-(chinolin-3-yl)prop-2-enylová skupina, 3-(chinolin-3-yl)prop-2-ynylová skupina, 3-(chinolin-6-yl)prop-2-enylová skupina, 3-(chinolin-6-yl)prop-2-ynylová skupina, 3-(chinolin-7-yl)prop-2-enylová skupina, 3-fenylprop-2-enylová skupina, 3-(naft-1-yl)prop-2-enylová skupina, 3-(naft-1-yl)prop-2-ynylová skupina, 3-(naft-2-yl)prop-2-ynylová skupina, 5-fenylpent-4-en-2-ynylová skupina, 3-(fur-2-yl)prop-2-ynylová skupina, 3-(thien-2-yl)prop-2-enylová skupina, 3-(karbazol-3-yl)prop-2-enylová skupina a 3-(chinoxalin-6-yl)prop-2-enylová skupina. Tyto deriváty mohou být volitelně redukovány, například vodíkem a palladiem na uhlí, za vzniku odpovídající sloučeniny, kde se jedna nebo více dvojných nebo trojných vazeb mezi dvěma atomy uhlíku v Y stane úplně saturevanou (např. propenylová skupina na propylovou skupinu).

Co se týče sloučenin, kde R^6 je atom vodíku (místo OR^a), je výhodný způsob výroby C-3 ketoderivátů a derivátů C-11,12-cyklického karbamátu popsán ve schématu 5.

Schéma 5



V těchto sloučeninách je vytvořena dvojná vazba mezi uhlíky 10 a 11 za vzniku sloučeniny 15 před tvorbou ketoskupiny v C-3. Výsledná ketosloučenina může být volitelně halogenována v tomto bodě nebo ketosloučenina může být reagována s 1,1 karbonyldimidazolem za vzniku sloučeniny 12b. Reakce sloučeniny 12b s aminem RNH_2 , následovaná odstraněním chránicí skupiny na sacharidu desosaminu má za následek derivát cyklického karbamátu, sloučeninu 13b.

Tento modifikovaný protokol je také výhodný při přípravě C-3 ketoderivátů a derivátů C-11,12-cyklického karbamátu, kde R^{13} je vinylová skupina. Co se týče těchto sloučenin, výchozí alkylace v C-6 hydroxylové skupině (výhodně za vzniku $-\text{OCH}_3$ v této poloze) je dosažena tak, jak bylo popsáno ve schématu 1. C-3 ketoderiváty a deriváty C-11,12-cyklického karbamátu jsou pak připraveny tak, jak bylo popsáno ve schématu 5.

Všechny konečné sloučeniny, které jsou výsledkem reakcí popsaných ve schématech 1 až 5, mohou být volitelně halogenovány v C-2 za vzniku odpovídajících halogenovaných protějšků. Výhodné způsoby zahrnují ošetření požadované sloučeniny báží a elektrofilním halogenačním činidlem, jako je například pyridiniumperbromid nebo N-fluorbenzensulfonimid. Halogenované protějšky sloučenin 13 a 14 mohou být vytvořeny halogenací příslušné sloučeniny nebo halogenací jejího příslušného prekurzoru, sloučeniny 11, před vytvořením cyklického karbamátu. Jestliže jsou požadované sloučeniny halogenované protějšky sloučeniny 14, je výhodné halogenovat sloučeninu 14 místo halogenace sloučeniny 11.

Způsoby použití

Tento vynález dále poskytuje způsob léčení bakteriálních infekcí nebo zvýšení aktivity dalších antibakteriálních agens

u teplokrevných živočichů, který zahrnuje podávání zvířatům sloučeniny podle vynálezu samotné nebo ve směsi s ředidlem nebo ve formě léku podle vynálezu.

Když jsou sloučeniny použity pro výše uvedený účel, mohou být smíchány s jedním nebo více farmaceuticky přijatelnými nosiči, např. rozpouštědly, ředidly, apod. a mohou být podávány perorálně v takových formách, jako jsou tablety, tobolky, dispergovatelné prášky, granule nebo suspenze obsahující například přibližně od 0,5 % do 5 % suspendujícího činidla, sirupy obsahující například přibližně od 10 % do 50 % cukru a elixíry obsahující například přibližně od 20 % do 50 % ethanolu, apod., nebo parenterálně ve formě sterilních roztoků nebo suspenzí pro injekci obsahujících přibližně od 0,5 % do 5 % suspendujícího činidla v izotonickém médiu. Tyto farmaceutické přípravky mohou obsahovat například přibližně od 0,5 % až do přibližně 90 % účinné složky v kombinaci s nosičem, obvykleji mezi 5 % a 60 % (hmotnostními).

Přípravky pro topickou aplikaci mohou mít formu kapalin, krémů nebo gelů, obsahujících terapeuticky účinnou koncentraci sloučeniny podle vynálezu smíchané s dermatologicky přijatelným nosičem.

Při výrobě přípravků v perorální lékové formě může být použito kterékoliv z obvyklých farmaceutických médií. Tuhé nosiče zahrnují škrob, laktózu, fosfát vápenatý, mikrokrytalickou celulózu, sacharózu a kaolín, zatímco tekuté nosiče zahrnují sterilní vodu, polyethylenglykoly, neiontové surfaktanty a jedlé oleje, jako je například kukuřičný, arašídový a sezamový olej, jak jsou vhodné pro typ účinné složky a požadovanou konkrétní formu podávání. Mohou být výhodně zahrnována adjuvancia obvykle používaná při přípravě farmaceutických přípravků, jako jsou například aromatizační

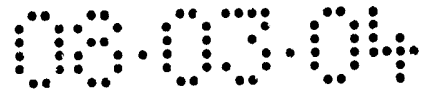
činidla, barviva, konzervační činidla a antioxidanty, například vitamín E, askorbová kyselina, BHT a BHA.

Výhodné farmaceutické přípravky z hlediska snadnosti přípravy a podávání jsou tuhé přípravky, konkrétně tablety a tobolky plněné tuhým látkou nebo tekutinou. Je výhodné perorální podávání sloučenin.

Tyto účinné sloučeniny mohou také být podávány parenterálně nebo intraperitoneálně. Roztoky nebo suspenze těchto účinných sloučenin jako volné báze nebo farmakologicky přijatelné soli mohou být připraveny ve vodě vhodně smíchány se surfaktantem, jako je například hydroxypropylcelulóza. Disperze mohou také být připraveny v glycerolu, tekutých polyethylenglykolech a jejich směsi v olejích. V běžných podmínkách uskladnění a použití mohou tyto přípravky obsahovat konzervační činidlo pro prevenci růstu mikroorganismů.

Farmaceutické formy vhodné pro injekční použití zahrnují sterilní vodné roztoky nebo disperze a sterilní prášky pro nepředvídanou přípravu sterilních injekčních roztoků nebo disperzí. Ve všech případech musí být forma sterilní a musí být tekutá do takového rozsahu, který umožní snadné použití v injekční stříkačce. Musí být stabilní v podmínkách výroby a uskladnění a musí být konzervována proti kontaminujícímu působení mikroorganismů, jako jsou například bakterie a plísně. Nosič může být rozpouštědlo nebo disperzní médium obsahující například vodu, ethanol, polyol (např. glycerol, propylenglykol a tekutý polyethylenglykol), jejich vhodné směsi a rostlinné oleje.

Účinná dávka použité účinné složky se může měnit v závislosti na konkrétní použité sloučenině, způsobu podávání a závažnosti léčeného chorobného stavu. Nicméně obecně jsou získány uspokojivé výsledky, když jsou sloučeniny podle vynálezu podávány v denní dávce přibližně od 0,1 mg/kg do



přibližně 400 mg/kg tělesné hmotnosti zvířete, výhodně podávané jednou denně nebo v rozdělených dávkách dvakrát až čtyřikrát denně nebo ve formě s prodlouženým uvolňováním. Pro většinu velkých savců je celková denní dávka přibližně od 0,07 g do 7,0 g, výhodně přibližně od 100 mg do 1000 mg. Lékové formy vhodné pro vnitřní použití obsahují přibližně od 100 mg do 500 mg účinné sloučeniny v těsné směsi s tuhým nebo tekutým farmaceuticky přijatelným nosičem. Toto schéma dávek může být upraveno za vzniku optimální terapeutické reakce. Například několik rozdělených dávek může být podáváno denně nebo dávka může být proporcionálně redukována, jako indikováno potřebami terapeutické situace.

Výroba výše uvedených farmaceutických přípravků a léků je prováděna kterýmkoliv způsobem v oboru známým, například smícháním účinné složky (účinných složek) s ředidlem (ředidly) za vzniku farmaceutické kompozice (např. granulátu), a pak zformováním kompozice do léku (např. tablet).

Obecné protokoly

Sloučeniny podle vynálezu mohou být připraveny s použitím meziproduktů tvořených chemicko-biosyntetickým postupem zahrnujícím rekombinantní hostitelské buňky a metody organické chemie. Kroky tohoto chemicko-biosyntetického postupu jsou popsány obecně níže, následované podrobným popisem každého kroku ve vyjmenovaných příkladech.

V prvním obecném kroku způsobu je připraven derivát sloučeniny, 6-deoxyerythronolid B („6-dEB“), fermentací rekombinantní hostitelské buňky *Streptomyces*. Fermentace poskytující 15-methyl-6-deoxyerythronolid B a 14,15-dehydro-6-deoxyerythronolid B vyžaduje, aby byly fermentující buňky krmeny syntetickým diketidovým meziproduktem. Příprava těchto

syntetických diketidů je popsána v příkladu 1. Tyto syntetické diketidy jsou substráty pro 6-deoxyerythronolid B syntázu („DEBS“), která je neschopná působit na svůj přírodní substrát (propionyl CoA) díky mutaci v doméně ketosyntázy modulu 1 DEBS. Tato rekombinantní DEBS je poskytnuta plazmidem pJRJ2 v *Streptomyces coelicolor* CH999. *S. coelicolor* CH999 je popsán v patentu Spojených Států č. 5 672 491, zahrnuto v tomto textu formou odkazu. Derivát *S. coelicolor* CH999, *S. coelicolor* K39-02, který byl geneticky modifikován tak, aby obsahoval gen *ptpA*, je popsán v patentové přihlášce Spojených Států č. 09/181 833, zahrnuté v tomto textu formou odkazu, může také být použit za tímto účelem. Plazmid pJRJ2 kóduje geny *eryAI*, *eryAII* a *eryAIII*, gen *eryAI* obsažený v plazmidu obsahuje nulovou mutaci *KS1*. Nulová mutace *KS1* zabraňuje tvorbě 6-deoxyerythronolidu B produkovaného genem divokého typu, pakliže není poskytnut exogenní substrát. Plazmid pJRJ2 a postup použití plazmidu pro přípravu nových C-13-substituovaných erythromycinů jsou popsány v PCT publikacích č. 99/03986 a 97/02358, v patentu Spojených Států č. 6 080 555 a 6 066 721 a v patentové přihlášce Spojených Států poř. Č. 09/311 756, podaný 14. května 1999, každá z nich je zahrnuta v tomto textu formou odkazu. Poskytované exogenní substráty mohou být připraveny uvedenými metodami a zahrnují sloučeniny popsané v PCT patentové přihlášce č. PCT/US00/02397 a v patentové přihlášce Spojených Států poř. Č. 09/492 733, obě podané 27. ledna 2000, původci G. Ashley et al., a obě jsou zahrnuty v tomto textu formou odkazu. Mohou také být použity geny PKS jiné než *ery* geny, vhodné geny zahrnují *KS1* nulovou mutaci obsahující geny PKS oleandolidu a megalomicinu popsané v patentové přihlášce Spojených Států poř. Č. 09/_____, podané 4. října 2000, nazvané Recombinant Megalomicin Biosynthetic Genes, původci Robert McDaniel a Yana Volchegursky, 60/158 305, podané 8. října 1999 a 09/428 517,

podané 28. října, 1999 a PCT patentové přihlášce č. US99/24478, podané 22. října, 1999, každá z nich je zahrnuta v tomto textu formou odkazu.

Fermentace pro produkci 14-nor-6-deoxyerythronolidu B nevyžaduje výživu diketidem, protože požadovaná sloučenina je tvořena rekombinantní hostitelskou buňkou *Streptomyces coelicolor* CH999/PCK7. Plazmid pCK7 je popsán v patentu Spojených Států č. 5 672 491 a obsahuje geny DEBS. Může také být použit derivát plazmidu pCK7, pKOS011-26. Hostitelská buňka obsahující pKOS011-26 a rekombinantní gen ptpA je nazvána *S. coelicolor* 27-26/pKOS011-26. Tyto hostitelské buňky produkují jak 6-deoxyerythronolid B tak 14-nor-6-deoxyerythronolid díky inkorporaci propionyl CoA a acetyl CoA, které oba slouží jako substráty pro DEBS.

Fermentace *Streptomyces coelicolor* CH999/PJRJ2 a *S. coelicolor* CH999/PCK7 je popsána v příkladu 2. Izolace 6-deoxyerythronolidových produktů, které jsou důsledkem této fermentace, je také popsána v příkladu 2.

Izolované produkty jsou pak přidány k fermentačnímu médiu kmenů *Saccharopolyspora erythraea*, aby se vytvářely další použitelné meziprodukty sloučenin podle vynálezu. Kmeny *S. erythraea* katalyzují biosyntézu a připojení sacharidových zbytků k polohám C-3 a C5 6-dEB derivátů sloučenin. Tyto kmeny také obsahují funkční produkt genu eryK, a tak hydroxylojí 6-dEB deriváty sloučenin v poloze C-12. Kmeny se liší, pokud jde o to, zda je vytvářen funkční produkt genu eryF. Jestliže je tomu tak, pak jsou vytvářené sloučeniny hydroxylovány také v poloze C-6. Jestliže tomu tak není, pak je tvořen derivát 6-deoxyerythromycin A. Tyto *S. erythraea* fermentace jsou popsány v příkladu 3, spolu s izolací erythromycin A derivátu sloučeniny z fermentačního média.

Izolované produkty jsou pak použity jako výchozí látky v chemické syntéze sloučenin podle vynálezu. Co se týče erythromycin A derivátů sloučenin podle vynálezu, které obsahují 6-hydroxylovou skupinu, příklady 4 až 6, 11 a 16 popisují postup alkylace sloučenin, aby vznikl C-6-O-alkylový, C-6-O-allylový a C-6-O-propargylový meziprodukt.

Co se týče sloučenin podle vynálezu, které jsou deriváty erythromycinu A, které obsahují C-6-O-alkylové skupiny, příklady 7 až 9 popisují způsob výroby 10,11-anhydrosloučenin podle vynálezu.

Příklad 10 popisuje způsob výroby C-2 halogenovaných sloučenin podle vynálezu. Konkrétně, sloučenina, která má být halogenována, je podrobena působení báze a elektrofilního halogenačního činidla, jako je například pyridiniumperbromid nebo N-fluorbenzensulfonimid. Příklad 12 popisuje postup odstranění sacharidu kladinózy z derivátů erythromycinu A obsahujících C-6-O-allylovou skupinu a oxidaci výsledné C-3-hydroxylové skupiny na keton. Příklad 13 ukazuje konverzi sloučenin obsahujících C-6-O-allylovou skupinu na několik použitelných meziproduktů v syntéze sloučenin podle vynálezu. Příklad 14 popisuje syntézu sloučeniny vzorce I, kde $R = H$, $R^2 = H$, $X = H$ a $R^6 = O$ -allylová skupina. Příklad 15 popisuje postup konverze makrolidů obsahující 6-O-allylovou skupinu a funkční skupiny 11,12-cyklického karbamátu na sloučeniny vzorce I prostřednictvím Heckovy reakce a následné odstranění chránící skupiny sacharidu desosaminu. Příklad 16 popisuje alkylation sloučenin na 6-O-propargylové meziprodukty a příklad 17 popisuje konverzi 6-O-propargylové skupiny na 6-O-propynylheteroarylové sloučeniny vzorce I.

Co se týče sloučenin podle vynálezu, které jsou deriváty erythromycinu A, a které neobsahují C-6 hydroxylovou skupinu, příklady 18 až 20 popisují způsob výroby 10,11-anhydro-

sloučenin podle vynálezu. Tyto reakční postupy jsou ukázány ve schématech 5 a 6.

Příklad 21 popisuje postup syntézy 1H-imidazo[4,5-b]pyridin-1-(4-amino-2-butenu), aminu použitého v syntéze sloučenin podle vynálezu, kde R = 1H-imidazol[4,5-b]pyridin.

Postup konverze 10,11-anhydrosloučenin na karbamátové deriváty sloučenin podle vynálezu je popsán v příkladech 22 a 23. Aminy použité v syntéze karbamátových derivátů sloučenin vzorce I jsou buď komerčně dostupné nebo mohou být snadno připraveny tak, jak bylo popsáno v Denis et al, Bioorg. Med. Chem. Lett., 9: 3075-3080, 1999.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava thioesterů diketidu

V tomto příkladu byly popsány způsoby použité pro přípravu N-acetylcysteaminthioesterů („NACS“) používaných pro výživu rekombinantních hostitelských buněk *Streptomyces*, aby tvořily meziprodukty 15-methyl a 14,15-dehydro-6-deoxyerythronolidu B. Protokoly pro syntézy popsané níže byly také popsány v patentové přihlášce Spojených Států poř. Č. 09/492 733, původci G. Ashley, M. Burlingame a I. Chan-Kai, v tomto textu zahrnuto formou odkazu.

Tak (2S,3R)-2-methyl-3-hydroxyhexanoát NACS (Příprava E), který byl použit pro přípravu meziproduktu 15-methyl-6-

deoxyerythronolidu B, byl připraven reakcí (4S)-N-[(2S,3R)-2-methyl-3-hydroxyhexanoyl]-4-benzyl-2-oxazolidinonu (Příprava D) s N-acetylcysteaminem (Příprava B). N-acetylcysteamin byl dále připraven z N,S-diacetylcysteaminu (Příprava A). (4S)-N-[(2S,3R)-2-methyl-3-hydroxyhexanoyl]-4-benzyl-2-oxazolidinon (Příprava D) byl připraven z (4S)-N-propionyl-4-benzyl-2-oxazolidinonu (propionyl-nox, Příprava C).

Podobným způsobem, (2S,3R)-2-methyl-3-hydroxy-4-pentenoát NACS (Příprava G), který byl použit pro přípravu meziprojektu 14,15-dehydro-6-deoxyerythronolidu B, byl připraven reakcí (4S)-N-[(2S,3R)-2-methyl-3-hydroxy-4-pentenoyl]-4-benzyl-2-oxazolidinonu (Příprava F) s N-acetylcysteaminem (Příprava B). (4S)-N-[(2S,3R)-2-methyl-3-hydroxy-4-pentenoyl]-4-benzyl-2-oxazolidinon (Příprava F) byl připraven z (4S)-N-propionyl-4-benzyl-2-oxazolidinonu (propionyl-nox, Příprava C).

A: Příprava N,S-diacetylcysteaminu

50,0 g hydrochloridu cysteaminu bylo vloženo do trojhrdlé baňky s kulatým dnem o objemu 1 l vybavené magnetickým míchadlem, 2 adičními nálevkami a pH elektrodou. Bylo přidáno 300 ml vody a míchaný roztok byl ochlazen na ledu. pH bylo upraveno na 8,0 přidáním 8N KOH. Do jedné adiční nálevky bylo vloženo 125 ml acetanhydridu a do druhé adiční nálevky bylo vloženo 350 ml 8N KOH. Acetanhydrid byl po kapkách přidáván k roztoku cysteaminu, přičemž 8N KOH byl přidáván tak, aby udržoval reakci pH na 8 ± 1 . Poté, co bylo přidání acetanhydridu ukončeno, pH bylo upraveno na 7,0 s použitím 1N HCl a směs byla ponechána za míchání po dobu 75 minut na ledu. Tuhý NaCl byl přidán do dosažení saturace a roztok byl 4-krát extrahován s použitím 400 ml porcí CH_2Cl_2 . Organické extrakty byly spojeny, usušeny nad MgSO_4 , filtrovány a koncentrovány za sníženého tlaku za zisku 68,9 g (97%

výtěžek) bledě žlutého oleje, který krystalizuje při stání ve 4 °C.

B: Příprava N-acetylcysteaminu

42,64 g N,S-diacetylcysteaminu bylo vloženo do baňky s kulatým dnem o objemu 2 l vybavené magnetickým míchadlem a rozpuštěno v 1400 ml vody. Baňka byla naplněna N₂ a směs byla ochlazená v ledové lázni. Bylo přidáno 49,42 g hydroxidu draselného a směs byla míchána po dobu 2 hodin na ledu v inertní atmosféře. pH bylo upraveno na 7 s použitím 6N HCl a tuhý NaCl byl přidán do dosažení saturace. Směs byla extrahována 7-krát s 500 ml porcemi CH₂Cl₂. Organické extrakty byly spojeny, usušeny nad MgSO₄, filtrovány a koncentrovány za sníženého tlaku za zisku 30,2 g (96% výtěžek) produktu. Tato látka byla destilována okamžitě před použitím, teplota varu 138-140 °C/7 mmHg.

C: Příprava (4S)-N-propionyl-4-benzyl-2-oxazolidinonu (propionyl-nox)

Suchá trojhrdlá baňka s kulatým dnem o objemu 1 l vybavená adiční nálevkou o objemu 500 ml a míchadlem byla naplněna 20 g (4S)-4-benzyl-2-oxazolidinonu, uzavřena septem a naplněna dusíkem. Kanylou bylo přidáno 300 ml bezvodého THF a výsledný roztok byl ochlazen v lázni se suchým ledem a isopropanolem o teplotě -78 °C. Do adiční nálevky bylo přidáno kanylou 78 ml n-butyllithia (1,6 M v hexanu), který byl přidáván pomalým proudem k reakci. Injekční stříkačkou bylo rychle přidáno 8,0 ml destilovaného propionylchloridu (teplota varu 77 až 79 °C). Reakce byla ponechána za míchání po dobu 30 minut v lázni se suchým ledem a isopropanolem.

Reakce byla odstraněna z chladné lázně, ponechána zahřát se na > 0 °C a zastavena 50 ml saturovaného vodného NH_4Cl . Směs byla koncentrována na suspenzi na rotační odparce. Suspenze byla třikrát extrahována 250 ml porcemi ethyletheru. Organické extrakty byly spojeny a promyty po 50 ml saturovaného vodného NaHCO_3 a solanky, usušeny nad MgSO_4 , filtrovány a koncentrovány za vzniku žlutého oleje. Látka krystalizovala při stání. Krystaly byly triturovány jednou chladným hexanem o teplotě -20 °C za vzniku 21,0 g (80% výtěžek) bílé krystalické látky, tt. 41-43 °C. APCI-MS: $m/z = 234$ (MH^+), 178, 117. ^1H NMR (360 MHz, CDCl_3) δ 7,2-7,4 (5H, m), 4,67 (1H, m, H_4), 4,14-4,22 (2H, m, H_5), 3,30 (1H, dd, $J = 3,13$ Hz, benzylový), 2,89-3,03 (2H, m, H_2'), 2,77 (1H, dd, $J = 9,13$, benzylový), 1,20 (3H, t, $J = 7$ Hz, H_2').

D: Příprava (4S)-N-[(2S,3R)-2-methyl-3-hydroxyhexanoyl]-4-benzyl-2-oxazolidinonu

Suchá trojhrdlá baňka s kulatým dnem o objemu 2 l vybavená adiční nálevkou o objemu 500 ml, teploměrem pro měření nízkých teplot a míchadlem byla naplněna 19,84 g N-propionyl-oxazolidinonu, uzavřena septem a naplněna dusíkem. Kanylou bylo přidáno 100 ml bezvodého dichlormethanu a výsledný roztok byl ochlazen na -65 °C v lázni se suchým ledem a isopropanolem. Do adiční nálevky bylo přidáno kanylou 100 ml dibutylborontriflátu (1,0 M v dichlormethanu), který byl přidáván pomalým proudem k reakci. Injekční stříkačkou bylo po kapkách přidáváno 15,6 ml triethylaminu při udržování teploty reakce pod -10 °C. Reakce pak byla přenesena do ledové lázně a ponechána za míchání v 0 °C po dobu 30 minut. Po tomto období byla reakce vrácena do lázně se suchým ledem a isopropanolem a ponechána vychladnout na -65 °C. Injekční stříkačkou bylo

rychle přidáno 8,6 ml butyraldehydu a reakce byla ponechána za míchání po dobu 30 minut.

Reakce byla přenesena do ledové lázně a do adiční nálevky bylo přidáno 100 ml 1M vodného fosfátového roztoku, pH 7,0, (fosfátový roztok se skládal ze stejného molárního množství hydrogen- a dihydrogenfosforečnanu draselného). Fosfátový roztok byl přidán co nejrychleji při udržování teploty reakce pod 10 °C. Do adiční nálevky pak bylo přidáno 300 ml methanolu, který byl přidáván co nejrychleji při udržování teploty reakce pod 10 °C. Nakonec bylo do adiční nálevky přidáno 300 ml směsi methanolu a 30% peroxidu vodíku v poměru 2:1. Směs byla přidávána po kapkách, aby se zajistilo, že teplota byla udržována pod 10 °C. Reakce byla míchána po dobu jedné hodiny po dokončení přidávání. Rozpouštědlo pak bylo odstraněno na rotační odparce, dokud nezůstala suspenze. Suspenze byla 4-krát extrahována 500 ml porcemi ethyletheru. Spojené organické extrakty byly promyty po 250 ml saturovaného vodného hydrouhličitanu sodného a solanky. Extrakt pak byl usušen nad MgSO₄, filtrován a koncentrován za vzniku bledě žlutého oleje. Látka pak byla podrobena chromatografii na SiO₂ s použitím 2:1 směsi hexanu a ethylacetátu (produkt R_f = 0,4) s poskytnutím 22,0 g (85% výtěžek) sloučeniny uvedené v názvu jako bezbarvého oleje.

APCI-MS: m/z 306 (MH⁺), ¹H NMR (360 MHz, CDCl₃) δ 7,2-7,4 (5H, m, fenyl), 4,71 (1H, m, H₄), 4,17-4,25 (2H, m, H₅), 3,96 (1H, m, H₃'), 3,77 (1H, dq, J = 2,5, 7 Hz, H₂'), 3,26 (1H, dd, J = 4,13 Hz, benzyl), 2,79 (1H, dd, J = 9, 13 Hz, benzyl), 1,5-1,6 (2H, m, H₄'), 1,3-1,5 (2H, m, H₅'), 1,27 (3H, d, J = 7 Hz, 2'-Me), 0,94 (3H, t, J = 7 Hz, H₆').

E: Příprava thioesteru N-acetylcysteaminu (2S,3R)-2-methyl-3-hydroxyhexanoátu

N-acetylcysteamin byl destilován ve 130 °C/7 mm Hg za vzniku bezbarvé kapaliny při teplotě místnosti. Suchá trojhrdlá baňka s kulatým dnem o objemu 1 l vybavená adiční nálevkou o objemu 500 ml a míchadlem byla uzavřena septem a naplněna dusíkem. Do baňky pak bylo injekční stříkačkou přidáno 10,7 ml N-acetylcysteaminu a kanylou 400 ml bezvodého THF. Směs byla ochlazená lázní se směsí MeOH a ledu. Injekční stříkačkou bylo po kapkách přidáváno 64 ml butyllithia, 1,6M v hexanu, což mělo za následek tvorbu bílého precipitátu. Po míchání po dobu 30 minut bylo injekční stříkačkou po kapkách přidáváno 51 ml trimethylaluminia, 2,0M v hexanu. Reakce se stala čirou po přidání trimethylaluminia a byla ponechána za míchání dalších 30 minut. Během tohoto období 20,5 g (0,068 mol) (4S)-N-[(2S,3R)-2-methyl-3-hydroxyhexanoyl]-4-benzyl-2-oxazolidinonu bylo vloženo v dusíkové atmosféře a rozpuštěno v 100 ml bezvodého THF, tento roztok pak byl přenesen pomalým proudem kanylou do reakce. Výsledná reakční směs se změnila na žlutozelenou barvu a byla ponechána za míchání po dobu 1 hodiny. Reakce byla ukončena, když výchozí látka už nemohla být déle sledována chromatografickou analýzou na tenké vrstvě (přibl. 1 hodina).

Reakce byla podrobena působení dostatečného množství saturované šťavelové kyseliny za vzniku neutrální reakce při zkoušení pH papírkem (přibližně 90 ml). Rozpuštědla pak byla odstraněna na rotační odparce za vzniku bílá suspenze. Suspenze byla extrahována šestkrát 250 ml porcemi ethyletheru. Organické extrakty byly spojeny a promyty solankou, usušeny nad MgSO₄, filtrovány a koncentrovány za vzniku bledě žlutého oleje. Thioesterový produkt byl purifikován velmi rychlou chromatografií na SiO₂ s použitím směsi hexanu a EtOAc 1:1 až

do eluce 4-benzyl-2-oxazolidinonu. V tomto bodu byl systém rozpouštědel změněn na 100% EtOAc za vzniku čistých frakcí thioesteru diketidu. Frakce s produktem byly spojeny a koncentrovány za vzniku 14,9 g (89% výtěžek) sloučeniny uvedené v názvu. Tato sloučenina je nazývána thioester propyldiketidu v příkladu 2.

APCI-MS: m/z 248 (MH^+), 1H NMR (360 MHz, $CDCl_3$) δ 95,8 (š s, 1H), 3,94 (dt, 1H), 3,46 (m, 2H), 3,03 (dt, 2H), 2,71 (dq, 1H), 1,97 (s, 3H), 1,50 (m, 2H), 1,37 (m, 2H), 1,21 (d, 3H), 0,94 (t, 3H).

F: Příprava (4S)-N-[(2S,3R)-2-methyl-3-hydroxy-4-pentenoyl]-4-benzyl-2-oxazolidinonu

Suchá trojhrdlá baňka s kulatým dnem o objemu 2 l vybavená adiční nálevkou o objemu 500 ml, teploměrem pro měření nízkých teplot a míchadlem byla naplněna 20,0 g propionyloxazolidinonu a uzavřena septem a naplněna dusíkem. Bylo přidáno 100 ml bezvodého dichlormethanu a výsledný roztok byl ochlazen na $-15\text{ }^\circ\text{C}$ v lázni se směsí methanolu a ledu. Bylo přidáno 100 ml dibutylborontriflátu, 1,0M v dichlormethanu, pomalým proudem prostřednictvím adiční nálevky takovou rychlostí, aby se udržovala teplota reakce pod $3\text{ }^\circ\text{C}$. Injekční stříkačkou bylo po kapkách přidáváno 17,9 ml diisopropylethylaminu, opět se udržovala vnitřní teplota pod $3\text{ }^\circ\text{C}$. Reakce pak byla ochlazená na $-65\text{ }^\circ\text{C}$ s použitím lázně se suchým ledem a isopropanolem. Akrolein byl přidáván injekční stříkačkou po dobu 5 minut. Reakce byla ponechána za míchání po dobu 30 minut po dokončení přidání.

Reakce pak byla přenesena do ledové lázně a do adiční nálevky bylo přidáno 120 ml (0,1 mol) 1M vodného fosfátového roztoku, pH 7,0 (fosfátový roztok se skládal ze stejného

molárního množství hydrogen- a dihydrogenfosforečnanu draselného). Fosfátový roztok byl přidáván co nejrychleji při udržování teploty reakce pod 10 °C. Do adiční nálevky pak bylo přidáno 400 ml methanolu, který byl přidán co nejrychleji při udržování teploty reakce pod 10 °C. Konečně bylo do adiční nálevky přidáno 400 ml směsi methanolu a 30% peroxidu vodíku 2:1 počátečním přidáváním po kapkách za udržování teploty pod 10 °C. Reakce byla míchána po dobu jedné hodiny. Rozpouštědlo bylo odstraněno s použitím rotační odparky za vzniku suspenze. Suspenze byla 4-krát extrahována 500 ml porcemi ethyletheru. Organické extrakty byly spojeny a promyty po 250 ml saturovaného hydrouhličitanu sodného a solanky, pak usušeny nad MgSO₄, filtrovány a koncentrovány za vzniku bledě žlutého oleje. Titrace hexanem indukovala krystalizaci. Rekrystalizace z etheru přidáním hexanu měla za následek 13,67 g (55% výtěžek) produktu.

¹H NMR (360 MHz, CDCl₃) δ 7,2-7,4 (m, 5H), 5,86 (ddd, 1H), 5,35 (dt, 1H), 5,22 (dt, 1H), 4,71 (m, 1H), 4,51 (m, 1H), 4,21 (m, 2H), 3,89 (dq, 1H), 3,26 (dd, 1H), 2,80 (dd, 1H), 1,25 (d, 3H).

G: Příprava thioesteru N-acetylcysteaminu (2S,3R)-2-methyl-3-hydroxy-4-pentenoátu

N-acetylcysteamin byl destilován ve 130 °C/7 mm Hg za vzniku bezbarvé kapaliny při teplotě místnosti. Suchá trojhrdlá baňka s kulatým dnem o objemu 1 l vybavená adiční nálevkou o objemu 500 ml a míchadlem byla uzavřena septem a naplněna dusíkem. Do baňky pak bylo injekční stříkačkou přidáno 7,5 ml N-acetylcysteaminu a kanylou 500 ml bezvodého THF. Reakce pak byla ochlazena lázní se směsí MeOH a ledu. Injekční stříkačkou bylo po kapkách přidáváno 44 ml

butyllithia, 1,6M v hexanu. Bílý precipitát byl vytvářen, jak bylo přidáváno n-BuLi. Po míchání po dobu 30 minut bylo injekční stříkačkou po kapkách přidáváno 35,5 ml (0,071 mol) trimethylaluminia, 2,0 M v hexanu. Reakce se stala čirou po přidání trimethylaluminia a byla ponechána za míchání dalších 30 minut. 13,6 g (4S)-N-[(2S,3R)-2-methyl-3-hydroxy-4-pentenoyl]-4-benzyl-2-oxazolidinonu z Přípravy F bylo vloženo v dusíkové atmosféře a rozpuštěno v 50 ml bezvodého THF a tento roztok pak byl přenesen pomalým proudem kanylou do reakce. Výsledná reakční směs se změnila na žlutozelenou barvu a byla ponechána za míchání po dobu 1 hodiny. Bylo usouzeno, že reakce byla ukončena, když výchozí látka už nemohla být déle sledována chromatografií na tenké vrstvě (přibl. 30 minut.).

Bylo přidáno dostatečné množství saturované šťavelové kyseliny za vzniku neutrální reakce při zkoušení pH papírkem (přibližně 60 ml). Rozpouštědla pak byla odstraněna na rotační odparce za vzniku bílé suspenze. Suspenze byla extrahována šestkrát 250 ml porcemi ethyletheru. Organické extrakty byly spojeny, promyty solankou, usušeny nad MgSO₄, filtrovány a koncentrovány za vzniku bledě žlutého oleje. Thioester pak byl purifikován velmi rychlou chromatografií na SiO₂. Kolona byla promývána směsí hexanu a ethylacetátu 1:1 až do eluce oxazolidinonu. V tomto bodu eluent byl změněn na 100% ethylacetát za vzniku čistých frakcí s produktem. Frakce byly spojeny a koncentrovány za vzniku 7,7 g (71% výtěžek) produktu, sloučeniny uvedené v názvu. Tento produkt je nazýván thioester vinyldiketidu v příkladu 2.

¹H NMR (360 MHz, CDCl₃) δ 5,82 (ddd, 1H), 5,78 (š s, 1H), 5,32 (dt, 1H), 5,21 (dt, 1H), 4,47 (m, 1H), 3,45 (m, 2H), 3,04 (m, 2H), 2,81 (dq, 1H), 1,96 (s, 3H), 1,22 (d, 3H).

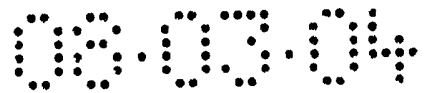
Příklad 2

Příprava erythronolidů

A: Příprava 14,15-dehydro-6-deoxyerythronolidu B

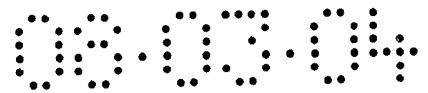
Streptomyces coelicolor CH999/PJRJ2 byl popsán v patentech Spojených Států č. 6 066 721 a 6 080 555, každý z nich je v tomto textu zahrnut formou odkazu. Plazmid pJRJ2 kóduje mutovanou formu DEBS, ve které byla ketosyntázová doména modulu 1 (KS1) inaktivována prostřednictvím mutagenese (KS1'). Kmeny *S. coelicolor* obsahující tento plazmid, kterým byl podáván thioester vinyldiketidu připravený podle příkladu 1, produkují 14,15-dehydro-6-deoxyerythronolid B.

Dvacet izolátů *S. coelicolor* CH999/PJRJ2 bylo testováno na schopnost konvertovat thioester vinyldiketidu na 14,15-dehydro-6-deoxyerythronolid B. Zmražený zásobní roztok se spórami byl naředěn, nanesen na misky s R2YE agarem obsahujícím 50 mg/l thiostreptonu a spóry byly pěstovány ve 30 °C po dobu 5 dnů, aby se získaly jednotlivé kolonie. Každý litr R2YE média obsahuje 103 g sacharózy, 10 g glukózy, 10,12 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,25 g K_2SO_4 , 0,1 g „Casamino acids“ (kasaminokyseliny, směs aminokyselin z kyselé hydrolyzy kaseinu), 5 g kvasinkového extraktu, 5,73 g pufru TES (N-tris[hydroxymethyl]methyl-2-aminoethansulfonová kyselina, od firmy Sigma), 22 g agaru (když je obsažen) a 2 ml roztoku stopových prvků. Po autoklávování bylo přidáno 10 ml 5 g/l (0,5%) KH_2PO_4 , 8 ml 2,5 M $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 15 ml 200 g/l (20%) L-prolinu a 7 ml 1N NaOH. Každý litr roztoku stopových prvků obsahuje 1 mg $ZnSO_4$, 1 mg $FeSO_4$, 1 mg $MnCl_2$ a 1 mg $CaCl_2$. V R2YE mediu byl vynechán TES, když byly kultury pěstovány v bioreaktorech s kontrolovaným pH.



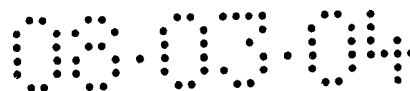
Kolonie byly nanášeny na sekundární misky pro amplifikaci, pak přeneseny na misky s čerstvým R2YE agarem obsahujícím 50 mg/l thioestru, aby vytvořily myceliový porost, tzv. „trávník“. Podávání diketidů („krmení“) těmto myceliím *Streptomyces coelicolor* CH999/PJRJ2 bylo prováděno tak, jak bylo popsáno dříve. 14,15-dehydro-6-deoxyerythronolid B tvořený v těchto kulturách byl izolován homogenizací a ethylacetátovou extrakcí z agarů, na kterém byly kultury pěstovány. Analýza HPLC/MS s převráceným poměrem fází těchto extraktů byla prováděna s použitím modulu s rozpouštědly Beckman 127s vybaveného ODS kolonou Beckman Ultrasphere (4,6 mm x 150 mm) a gradientem vody a acetonitrilu jako mobilní fází. 14,15-dehydro-6-deoxyerythronolid B byl identifikován hmotovou spektrometrií (PESciex API100LC) a kvantifikován s použitím evaporativního detektoru rozptýleného světla (Alltech 500ELSD). Vysoce produkující izoláty množené na miskách a jako zmražené suspenze spór byly opakovaně testovány, aby se určila jejich stabilita během uskladnění.

Z dvaceti izolátů *Streptomyces coelicolor* CH999/PJRJ2 testovaných na schopnost přestavět thioester vinyldiketidu na 14,15-dehydro-6-deoxyerythronolid B, pět izolátů bylo neproduktivních a jeden izolát tvořil > 6 mg/l produktu. Vysoce produktivní izolát byl propagován (množen) jak na agarovém médiu (přenášen kličkou na nové médium vždy po 10 dnech) a jako zmražený zásobní roztok spór. Reizolace kmene vedla ke značné variabilitě mezi jednotlivými izoláty, když byl kmen uložený jako zmražený zásobní roztok spór. Když byl kmen uchovávaný při teplotě místnosti na R2YE agaru, pak tato variabilita vůbec nebyla pozorována. Segregace produkční schopnosti kmene během uskladnění jako zmražené suspenze spór byla již dříve pozorována, avšak mechanismus, který ji způsobuje, není znám.



Propagace kmene na agarovém médiu a jako zmražené suspenze mycélií zachovávala produkční schopnost izolátu. Následně byla tedy připravena buněčná banka tak, že se naočkovalo přibližně 10 mm² agregátu mycélia do 50 ml R2YE obsahujícího 50 µg/ml thiostreptonu a třepalo (skříňová třepačka série 25, New Brunswick) při 200-250 rpm ve 28-30 °C v 250 ml baňkách s přepážkami po dobu 48 hodin. Buňky byly mikroskopicky vyšetřeny, 25 ml 90% glycerolu bylo přimícháno do kultury a alikvoty o objemu 1 ml byly zmrazeny v kapalném dusíku a uloženy při teplotě -80 °C. Tento postup byl použit pro uskladnění jak kmenů *Streptomyces coelicolor* tak i *Saccharopolyspora erythraea*.

14,15-dehydro-6-deoxyerythronolid B může být produkován v protřepávaných lahvích. Startovací kultura *Streptomyces coelicolor* CH999/PJRJ2 byla vytvořena přidáním 1 ml zmraženého zásobní roztoku do 50 ml R2YE obsahujícího 50 µg/ml thiostreptonu a přibližně 1 ml/l protipěněního přípravku B (Baker). Startovací kultury *S. coelicolor* K39-02/pJRJ2 mohou volitelně obsahovat 50 µg/ml apramycinu. Kultury byl třepány při 200-250 rpm v 28-30 °C po 48 hodin (skříňová třepačka série 25, New Brunswick). Produkční kultura byla připravena naočkováním 10 ml očkovací kultury do 500 ml média S01 (volitelně lze použít R6 médium bez pufru) obsahující 50 µg/ml thiostreptonu. Každý litr média S01 obsahoval 51,5 g sacharózy, 0,25 g K₂SO₄, 0,1 g kasaminokyselin, 5 g kvasinkového extraktu, 5,73 g TES pufru, 0,96 g propionátu sodného a 2 ml roztoku stopových prvků. Po autoklávování bylo přidáno 10 ml 0,5 % (5 g/l) KH₂PO₄, 8 ml 2,5 M CaCl₂.6H₂O, 7,5 ml 20% (200 g/l) L-prolinu a 7 ml 1N NaOH. TES byl vynechán v S01 médiu, když kultivace probíhaly v bioreaktorech s řízeným pH.



R6 médium bylo také použito pro produkční kultury. Každý litr R6 média obsahoval 103 g sacharózy, 0,25 g K_2SO_4 , 10,12 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,1 g kasaminokyselin, 5 g kvasinkového extraktu, 5,73 g TES pufru, 0,96 g propionátu sodného a 2 ml roztoku stopových prvků. Po autoklávování bylo přidáno 10 ml 0,5% KH_2PO_4 , 8 ml 2,5 M $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 15 ml 20% L-prolinu a 7 ml 1N NaOH. TES byl vynechán v R6 médiu, když byly kultury pěstovány v bioreaktorech s řízeným pH.

Kultura byla pěstována po dobu 36-48 hodin při 200-250 rpm a teplotě 28-30 °C. Do kultury pak byla dodána 4-pentynová kyselina (Fluka, 25 mg/l) a 1mM thioester vinyldiketidu (3 ml 4,67 mg/ml diketidu v 10% DMSO (Sigma)) a kultura byla pěstována další 4 dny. Pro dodávání („krmení“) diketidu do R6 média, diketid byl typicky přidán 24-48 hodin po inokulaci, když hladina glukózy klesla na 0,5 g/l nebo nižší, přičemž koncentrace glukózy může být analyzována, aby bylo možné načasovat dodávání přesněji. 14,15-dehydro-6-deoxyerythronolid B byl získán z kultury extrakcí na pevné fázi s pryskyřicí XAD a elucí ethanolem.

Pro velkoobjemovou produkci 14,15-dehydro-6-deoxyerythronolidu B byla startovací kultura *Streptomyces coelicolor* K39-02/pJRJ2 připravena tak, že se naočkoval 1 ml zmraženého mycelia do 2,8 l baňky s přepážkami obsahující 500 ml R2YE, volitelně s 50 µg/ml apramycinu, 50 µg/ml thiostreptonu a 1 ml/l protipěňivého činidla B a kultura se třepala při 150-200 rpm a 28-30 °C pro přibližně 2 dny (plošinová třepačka Innova). 10 l bioreaktor s míchanou nádrží (B. Braun A-10) byl připraven, naplněn 10 l média R6, autoklávovaného při 121 °C po dobu 30 minut a ponechaného vychladnout, a pak byl bioreaktor inokulován 500 ml (2 %) startovací kultury.

Teplota byla udržována na 30 °C a míchání 3 Rushtonovými turbínovými míchadly bylo nastaveno na 500-750 rpm, provzdušňování 0,5-2 l/minutu a pH nastaveno a udržováno na 7,00 prostřednictvím automatického přidávání 1N NaOH nebo 1N H₂SO₄. Spotřeba glukózy, rozpuštěný kyslík, pH a hmota buněk byly monitorovány. Když koncentrace glukózy klesla pod 0,1 g/l, do kultury byla doplněna 4-pentynová kyselina a (25-50 µg/ml) a 2,5 g thioester vinylidketidu v 50 ml DMSO. Řízené doplňování glukózy udržovalo koncentraci glukózy na 0-2 g/l (cílová koncentrace byla 0,5 g/l). Titry 14,15-dehydro-6-deoxyerythronolidu B byly monitorovány pomocí HPLC/MS a kultury byly sklizeny centrifugací, když bylo dosaženo maximálního titru. Postup byl ještě dále rozšířen na 100 l s použitím 150 l bioreaktoru BioLafitte.

14,15-dehydro-6-deoxyerythronolid B byl purifikován extrakcí na pevné fázi. Fermentační médium bylo ochlazené na 4-15 °C a byl přidán ethanol (0,1 l/l média). Médium bylo vyčiřeno centrifugací a nanášeno na kolonu s XAD-16 pryskyřicí (Rohm a Haas) (1 kg XAD/1 g 14,15-dehydro-6-deoxyerythronolidu B) při průtoku 2-4 ml/cm².minuta. Nasycená pryskyřice v koloně pak byla promyta 2 objemy kolony 15% (objem/objem) ethanolu ve vodě a 14,15-dehydro-6-deoxyerythronolid B byl z pryskyřice eluován acetonem a odebírán jako frakce o objemu 1/2 kolony. Frakce obsahující 14,15-dehydro-6-deoxyerythronolid B byly identifikovány chromatografií na tenké vrstvě (ethylacetát: hexan 1:1) a HPLC/MS.

Acetonové frakce obsahující 14,15-dehydro-6-deoxyerythronolid B byly sloučeny a těkavé látky byly odstraněny za sníženého tlaku. Výsledná vodná směs byla extrahována ethylacetátem. Ethylacetátový extrakt byl promyt saturovaným NaHCO₃ a solanka byla usušena nad síranem sodným nebo hořečnatým, filtrována a koncentrována do sucha za sníženého

tlaku. Surová látka byla čištěna chromatografií na silikagelu s použitím gradientu hexanů a ethylacetátu. Frakce obsahující produkt byly sloučeny a koncentrovány na žlutý olej, který spontánně krystalizoval.

Rekrystalizace z ether-hexanu poskytla čistý 14,15-dehydro-6-deoxyerythronolid B. Hmotnostní spektrometrie poskytla $[M+H]^+$ 385. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): 213,67 (C9), 177,51 (C1), 134,80 (C14), 116,58 (C15), 79,40 (C3), 76,47 (C5), 74,11 (C13), 70,84 (C11), 43,80 (C2), 43,16 (C10), 41,48 (C12), 39,58 (C8), 37,61 (C7), 37,42 (C4), 35,56 (C6), 16,60 (6Me), 14,55 (2Me), 13,34 (8Me), 9,20 (12Me), 6,91 (4Me), 6,30 (10Me).

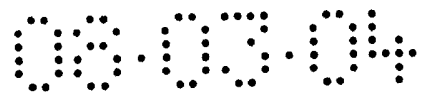
B: Příprava 15-methyl-6-deoxyerythronolidu B

Vysoce produktivní izolát *Streptomyces coelicolor* K39-02/pJRJ2 byl použit pro přípravu 15-methyl-6-deoxyerythronolidu B v míchaných kultivačních nádobách. Startovací kultura *Streptomyces coelicolor* K39-02/pJRJ2 byla připravena přidáním 1 ml zmraženého zásobního roztoku do 50 ml R2YE obsahujícího 50 $\mu\text{g/ml}$ thiostreptonu (a volitelně apramycinu). Kultura byla třepána při 200-250 rpm v 28-30 °C po dobu 36-48 hodin. Produkční kultura byla připravena naočkováním 1 ml startovací kultury do 50 ml S01 nebo R6 média obsahujícího 50 $\mu\text{g/ml}$ thiostreptonu (a volitelně apramycinu). Protipěňivé činidlo bylo přidáno v množství 1 ml/l. Kultura byla pěstována po dobu 36-48 hodin při 200-250 rpm a 28-30 °C. Do kultury byla doplněna 4-pentynová kyselina (Fluka, 25-50 mg/l) a 1 μM thioester propyldiketidu (3 ml 4,67 mg/ml diketid v 10% DMSO (Sigma)) a pěstována po dobu 4-7 dalších dnů. 15-methyl-6-deoxyerythronolid B byl získán z kultury extrakcí ethylacetátem, když byl dosažen maximální titr.

Pro přípravu 15-methyl-6-deoxyerythronolidu B ve velkém měřítku byla startovací kultura *Streptomyces coelicolor* K39-02/pJRJ2 připravena zaočkováním 1 ml zmraženého mycelia do 2,8 l baňky s přepážkami obsahující 500 ml R2YE a baňka byla třepána při 150-200 rpm a 28-30 °C po dobu 2 dnů. Byl připraven bioreaktor o objemu 10 l s míchanou nádrží, naplněn 10 l S01 nebo R6 média, autoklávovaného při 121 °C po dobu 30 minut a vychladlého, a pak inokulován 400-500 ml startovací kultury.

Teplota byl udržována na 28-30 °C s mícháním pomocí 3 Rushtonových turbínových míchadel při 500-750 rpm, provzdušňováním přibližně 1 l/minuta a pH regulovaným na 7,00 prostřednictvím automatického přidávání 1N NaOH nebo 1N H₂SO₄. Spotřeba glukózy, rozpuštěný kyslík, pH a buněčná hmota byly monitorovány. Když koncentrace glukózy klesla pod 0,1 g/l, do kultury byla doplněna 4-pentynová kyselina 25 µg/ml a 2,5 g thioester propylidketidu v 50 ml DMSO. Řízené doplňování glukózy udržovalo koncentraci glukózy přibližně 0,5 g/l. Titry 15-methyl-6-deoxyerythronolidu B byly monitorovány pomocí HPLC/MS a kultury byly sklizeny centrifugací, když byl dosažen maximální titr. Postup byl zvětšen na měřítko 100 l s použitím 150 l bioreaktoru BioLafitte.

15-methyl-6-deoxyerythronolid B byl purifikován extrakcí na pevné fázi. Fermentační médium bylo ochlazeno na 4-15 °C a byl přidán ethanol (0,1 l/l média). Médium bylo vyčeřeno centrifugací a nanášeno na kolonu s XAD-16 pryskyřicí (Rohm a Haas) (1 kg XAD/1 g 15-methyl-6-deoxyerythronolidu B) při průtoku 2-4 ml/cm².minuta. Nasycená pryskyřice v koloně pak byla promyta 2 objemy kolony 15% (objem/objem) ethanolu ve vodě a 15-methyl-6-deoxyerythronolid B byl z pryskyřice eluován acetonem a odebírán jako frakce o objemu 1/2 kolony. Frakce obsahující 15-methyl-6-deoxyerythronolid B byly



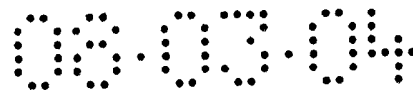
identifikovány chromatografií na tenké vrstvě (ethylacetát: hexany 1:1) a HPLC/MS.

Acetonové frakce obsahující 15-methyl-6-deoxyerythronolid B byly sloučeny a těkavé látky byly odstraněny za sníženého tlaku. Výsledná vodná směs byla extrahována ethylacetátem. Ethylacetátový extrakt byl promyt saturovaným NaH_2CO_3 a solanka byla usušena nad síranem sodným nebo hořečnatým, filtrována a koncentrována do sucha za sníženého tlaku. Surová látka byla čištěna chromatografií na silikagelu s použitím gradientu hexanů a ethylacetátu. Frakce obsahující produkt byly sloučeny a koncentrovány na žlutý olej, který spontánně krystalizoval. Rekrystalizace z ether-hexanu poskytla čistý 15-methyl-6-deoxyerythronolid B. Hmotnostní spektrometrie poskytla $[\text{M}+\text{H}]^+$ 401.

C: Příprava 14-nor-6-deoxyerythronolidu B

Patent Spojených Států č. 5 712 146, zahrnutý formou odkazu v tomto textu, popisuje přípravu rekombinantní hostitelské buňky, *Streptomyces coelicolor* CH999/PCK7. Patent ukazuje, že když rekombinantní kmen je pěstován na R2YE médiu, kmen vytváří směs 6-deoxyerythronolidu B a 14-nor-6-deoxyerythronolidu B (který je také znám jako 8,8a-deoxyoleandolid). Příbuzný kmen, *S. coelicolor* 27-26/pKOS011-26 obsahuje modifikovaný pCK7 plazmid a rekombinantní gen ptpA.

Vysoce produktivní izolát *Streptomyces coelicolor* 27-26/pKOS011-26 byl použit pro přípravu 14-nor-6-deoxyerythronolidu B v míchaných kultivačních nádobách. Startovací kultura *Streptomyces coelicolor* 27-26/pKOS011-26 byla připravena přidáním 1 ml zmrazeného zásobního roztoku do 50 ml R2YE obsahujícího 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ thiostreptonu (a volitelně apramycinu). Kultura byla třepána při 200-250 rpm v 28-30 °C



po dobu 36-48 hodin. Produkční kultura byla připravena naočkováním 1 ml startovací kultury do 50 ml S01 nebo R6 média obsahujícího 50 µg/ml thioestreptonu (a volitelně apramycinu). Kultura byla pěstována po dobu 36-48 hodin při 200-250 rpm a 28-30 °C. Do kultury byla doplněna 4-pentynová kyselina (Fluka, 25-50 mg/l) a kultura byla pěstována po dobu 4 dalších dnů. 14-nor-6-deoxyerythronolid B byl získán z kultury extrakcí ethylacetátem.

Pro přípravu 14-nor-6-deoxyerythronolidu B ve větším měřítku byla startovací kultura *Streptomyces coelicolor* 27-26/pKOS011-26 připravena zaočkováním 1 ml zmraženého mycelia do 2,8 l baňky s přepážkami obsahující 500 ml R2YE a baňka byla třepána při 150-200 rpm a 28-30 °C po dobu 2 dnů. Byl připraven bioreaktor s míchanou nádrží o objemu 10 l, naplněn 10 l R2YE média bez glukózy, autoklávovaného při 121 °C po dobu 30 minut a vychladlého, a pak inokulován 400-500 ml startovací kultury. Protipěnové činidlo bylo přidáno v 1 ml/l.

Teplota byl udržována na 28-30 °C s mícháním pomocí 3 Rushtonových turbínových míchadel při 500-750 rpm, provzdušňováním přibližně 1 l/minuta a pH regulovaným na 7,00 prostřednictvím automatického přidávání 1N NaOH nebo 1N H₂SO₄. Spotřeba glukózy, rozpuštěný kyslík, pH a buněčná hmota byly monitorovány. Řízené doplňování glukózy udržovalo koncentraci glukózy přibližně 0,5 g/l. Titry 14-nor-6-deoxyerythronolidu B byly monitorovány pomocí HPLC/MS a kultury byly sklizeny centrifugací, když byl dosažen maximální titr. Postup byl zvětšen na měřítko 100 l s použitím 150 l bioreaktoru BioLafitte.

14-nor-6-deoxyerythronolid B byl purifikován extrakcí na pevné fázi. Fermentační médium bylo ochlazeno na 4-15 °C a byl přidán ethanol (0,1 l/l média). Médium bylo vyčeřeno

centrifugací a nanese na kolonu s XAD-16 pryskyřicí (Rohm a Haas) (1 kg XAD/1 g 14-nor-6-deoxyerythronolidu B) při průtoku 2-4 ml/cm².minuta. Nasycená pryskyřice v koloně pak byla promyta 2 objemy kolony 15% (objem/objem) ethanolu ve vodě a 14-nor-6-deoxyerythronolid B byl z pryskyřice eluován acetonem a odebírán jako frakce o objemu 1/2 kolony. Frakce obsahující 14-nor-6-deoxyerythronolid B byly identifikovány chromatografií na tenké vrstvě (ethylacetát: hexany 1:1) a pomocí HPLC/MS.

Acetonové frakce obsahující 14-nor-6-deoxyerythronolid B byly sloučeny a těkavé látky byly odstraněny za sníženého tlaku. Výsledná vodná směs byla extrahována ethylacetátem. Ethylacetátový extrakt byl promyt saturovaným NaH₂CO₃ a solanka byla usušena nad síranem sodným nebo hořečnatým, filtrována a koncentrována do sucha za sníženého tlaku. Surová látka byla čištěna velmi rychlou chromatografií na koloně SiO₂ a vyvíjena ethylacetátem/hexany. Rekrytalizace z ether-hexanu poskytla čistý 15-methyl-6-deoxyerythronolid B. Hmotnostní spektrometrie ukázala [M+H]⁺ 373.

Příklad 3

Příprava erythromycinů

Deriváty 6-DEB připravené v příkladu 2, preparace A-C, byly konvertovány na erythromycinové deriváty s použitím rekombinantního kmene *Saccharopolyspora erythraea*. Pro produkci erythromycinů majících jak C-6 tak C-12 hydroxylovou skupinu, byl použit kmen *S. erythraea* K40-67. Tento kmen byl vytvořen transformací kmene *S. erythraea* schopného produkce vysoké hladiny erythromycinu A plazmidem odvozeným z pWHM3

obsahujícím mutovanou eryA1 sekvenci kódující inaktivovanou KS1 doménu. Homologní rekombinací byly získány výsledné transformanty, které nebyly schopny produkovat 6-deoxyerythronolid B. Pro produkci erythromycinových derivátů majících pouze 12-hydroxylovou skupinu byl použit kmen *S. erythraea* K39-07. Tento kmen byl zkonstruován z kmene K40-67 přerušením genu *eryF* hydroxylázy. Oba kmeny byly fermentovány v podstatě podobných podmínkách, jak jsou popsány dále.

Fermentace byly prováděny v 10 l (a 150 l) bioreaktorech. 1 ml alikvot zmraženého mycelia *S. erythraea* K40-67 byl použit k zaočkování startovací kultury do 500 ml R2YE média. Kultury byly třepány při 150-200 rpm v 28-30 °C ve 2,8 l Fernbachových baňkách s přepážkami po 48 hodin. Byl připraven bioreaktor s 10 l míchanou nádrží, naplněn 10 l média R2YE (70 l v případě 150 l fermentace), autoklávovaného ve 121 °C po dobu 45 minut a ponechaného vychladnout, a pak inokulován 200 ml (1,4 l v případě 150 l fermentace) startovací kultury. Teplota byla udržována na 28-30 °C s mícháním pomocí 3 Rushtonových turbínových míchadel při 500-700 rpm, provzdušňováním přibližně 1 l/minuta a pH regulovaným na 7,2 pomocí automatického přidávání 1N NaOH nebo 1N H₂SO₄. Tvorba pěny byla potlačena přidáním protipěnového činidla 1 ml/l. Hodnota pH byla řízena, aby se zabránilo případné degradaci produktu na enolether a spiroketal. Spotřeba sacharózy, výdej glukózy, rozpuštěný kyslík, pH a absorbance při 600 nm (odpovídající buněčné hmotě) byly monitorovány. Po 24-36 hodinách bylo do kultury přidáno 300 mg (1,62 g v případě 150 l fermentace) sloučeniny 6-dEB derivátu připravené podle preparace A-C tohoto příkladu rozpuštěné ve 3 ml (15 ml v případě 150 l fermentace) 100% ethanolu. Fermentace pokračovala dalších 68-85 hodin. Fermentační médium bylo sklizeno centrifugací. Titry

analogů erythromycinu A, B, C a D v průběhu fermentace byly určovány analýzou elektrosprejové MS.

Produkované sloučeniny byly purifikovány extrakcí na pevné fázi. Fermentační médium bylo upraveno na pH 8,0 přidávkem NaOH a ochlazeno na 4-15 °C a byl přidán ethanol (0,1 l/l média). Médium bylo vyčereño centrifugací a naneseo na kolonu s XAD-16 pryskyřicí (Rohm a Haas) (1 kg XAD/1 g erythromycinového derivátu) při průtoku 2-4 ml/cm².minuta. Nasycená pryskyřice v koloně pak byla promyta 2 objemy kolony 15% (objem/objem) ethanolu ve vodě a derivát erythromycinu byl z pryskyřice eluován acetonem a odebírán jako frakce o objemu 1/2 kolony. Frakce obsahující derivát erythromycinu byly identifikovány chromatografií na tenké vrstvě a HPLC/MS.

Acetonové frakce obsahující derivát erythromycinu byly sloučeny a těkavé látky byly odstraněny za sníženého tlaku. Výsledná vodná směs byla extrahována ethylacetátem. Ethylacetátový extrakt byl promyt saturovaným Na₂HCO₃ a solanka byla usušena nad síranem sodným nebo hořečnatým, filtrována a koncentrována do sucha za sníženého tlaku. Surová látka byla čištěna velmi rychlou chromatografií (methylenchlorid/methanol/triethylamin). Tato látka pak sloužila jako výchozí látka pro postupy chemické derivatizace popsané v následujících příkladech. Čisté produkty mohou být získány použitím odstředivého protiproudového dělení (např. s použitím speciální centrifugy Coil Planet Centrifuge, jak bylo popsáno ve WO 91/16334, zahrnuté v tomto textu formou odkazu).

Sloučeniny připravené tímto postupem byly následující: (i) 14-norerythromycin A, (ii) 14,15-dehydroerythromycin A, (iii) 15-methylerythromycin A, (iv) 14-nor-6-deoxy-erythromycin A, (v) 14,15-dehydro-6-deoxy-erythromycin A, a (vi) 15-methyl-6-deoxy-erythromycin A. Když byly použity pro přípravu 3-deskladinóza-3-oxoderivátů, nebyly deriváty erythromycinu A

odděleny od derivátů erythromycinu C, místo toho byly použity směsi sloučenin A a C jako výchozí látky pro chemickou derivatizaci.

Příklad 4

Příprava A: 14-norerythromycin A-9-oxim

Roztok 0,621 g, 80% čistota, 14-norerythromycinu A, 0,5 ml 50% vodného roztoku hydroxylaminu a 0,2 ml octové kyseliny ve 2 ml isopropanolu byl udržován v 50 °C po dobu 22 hodin. Byl extrahován směsí chloroformu a ethanolu (3/2), promyt hydrouhličitanem sodným, solankou a usušen nad MgSO₄. Filtrace a evaporace ve vakuu poskytla 0,65 g surového produktu jako bílé pevné látky, který byl použit přímo pro další přeměnu.

Příprava B: 14-norerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxycyklohexyl)]oxim

K roztoku 0,65 g výše uvedeného surového 14-noreythromycin A-9-oximu a 0,95 ml 1,1-diisopropoxycyklohexanonu ve 2 ml methylenchloridu bylo přidáno 0,333 g pyridinium-p-toluensulfonátu (PPTS) ve 2 ml methylenchloridu. Po míchání přes noc byla směs extrahována (směs chloroformu a ethanolu, 3:2), promyta (NaHCO₃-H₂O, solanka) a usušena (MgSO₄). Po filtraci a evaporaci ve vakuu byl surový produkt opakovaně ošetřen toluenem a isopropanolem za zisku 0,74 g produktu, který byl použit přímo pro příští reakci.

Příprava C: 2',4''-bis-(O-trimethylsilyl)-14-norerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxycyklohexyl)]oxim

K roztoku 0,74 g 14-norerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxycyklohexyl)]oximu v 6 ml methylenchloridu bylo přidáno 0,33 ml roztoku trimethylsilylimidazolu a 0,18 ml trimethylsilylchloridu ve 2 ml methylenchloridu v 0 °C. Po 5 minutách míchání byl přidán ethylacetát, roztok byl promyt (NaHCO₃-H₂O, solanka) a usušen (MgSO₄). Velmi rychlá chromatografie na silikagelu (10:1 hexan:aceton, 1% triethylamin) poskytla 0,50 g čistého produktu jako bílé pevné látky. Hmotová spektrometrie poskytla [M+H⁺] = 1020.

Příprava D: 2',4''-bis-(O-trimethylsilyl)-6-O-methyl-14-norerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxycyklohexyl)]oxim

Roztok 0,3 g (0,29 mmol) 2',4''-bis-O-trimethylsilyl-14-norerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxycyklohexyl)]oximu v 1,4 ml směsi methylsulfoxidu a tetrahydrofuranu 1:1 (DMSO/THF) byl podroben působení 0,3 ml 2M roztoku methylbromidu v etheru a ochlazen na 10 °C. Byla přidávána směs 1M roztoku terc-butoxidu draselného v 0,6 ml THF a 0,6 ml DMSO po dobu 6 hodin s použitím injekční pumpy. Reakce pak byla naředěna ethylacetátem, promyta saturovaným NaHCO₃, solankou a usušena nad MgSO₄. Filtrace a evaporace ve vakuu poskytla 0,29 g produktu jako bílé pevné látky. Hmotová spektrometrie dala [M+H⁺] = 1034.

Příprava E: 6-O-methyl-14-norerythromycin A-9-oxim

Směs 0,29 g 6-O-methyl-2',4''-bis-O-trimethylsilyl-14-norerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxycyklohexyl)]oximu, 3,6 ml octové kyseliny, 6 ml acetonitrilu a 3 ml vody byla míchána při teplotě místnosti po dobu 4,5 hodiny. Směs byla

evaporována do sucha s použitím toluenu za vzniku 0,24 g surového produktu jako bílé pevné látky, která byla použita přímo pro příští krok bez další purifikace.

Příprava F: 6-O-methyl-14- norerythromycin A

Směs 0,24 g 6-O-methyl-14-norerythromycin A-9-oximu, 0,45 g, 85% čistota, hydrosulfitu sodného, 3 ml vody, 3 ml ethanolu a 0,07 ml mravenčí kyseliny byla udržována v 85 °C po dobu 8 hodin. Reakce byla přivedena na pH 8 s 1N NaOH a extrahována ethylacetátem. Organický extrakt byl promyt solankou, usušen nad MgSO₄, filtrován a koncentrován za zisku 0,2 g surového produktu jako bílé pevné látky. Hmotová spektrometrie dala [M+H⁺] = 735.

Příklad 5

Příprava A: 14,15-dehydroerythromycin A-9-oxim

Suspenze 1,984 g (47% čistota, 1,2 mmol) 14,15-dehydroerythromycinu A v 6 ml 2-propanolu byla podrobena působení 1,97 ml 50% vodného hydroxylaminu a míchána až do rozpuštění. Bylo přidáno 0,62 ml octové kyseliny a směs byla míchána po dobu 25 hodin v 50 °C. Po ochlazení na teplotu místnosti byl přidán saturovaný NaHCO₃ a směs byla koncentrována ve vakuu, aby se odstranil isopropanol. Výsledná vodná směs byla třikrát extrahována 250 ml porcemi CHCl₃. Organické extrakty byly spojeny, promyty saturovaným NaHCO₃, vodou a solankou, a pak usušeny nad MgSO₄, filtrovány a koncentrovány za zisku 0,92 g produktu.

Příprava B: 14,15-dehydroerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxy-cyklohexyl)]oxim

0,92 g oximu z bodu (A) bylo rozpuštěno v 6,2 ml CH_2Cl_2 a podrobena působení 1,23 g 1,1-diisopropoxycyklohexanu a 0,464 g pyridinium-p-toluensulfonátu po dobu 15 hodin při teplotě místnosti. Směs byla naředěna 160 ml CH_2Cl_2 , pak postupně promyta saturovaným NaHCO_3 , vodou a solankou. Organická fáze byla usušena nad MgSO_4 , filtrována a evaporována za zisku hnědého sirupu. Chromatografie na silikagelu (gradient od toluenu ke směsi toluenu a acetonu 1:1 +1% Et_3N) poskytla 0,998 g produktu.

Příprava C: 2',4''-bis(O-trimethylsilyl)-14,15-dehydroerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxycyklohexyl)]oxim

Roztok 998 mg (9,96) 14,15-dehydroerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxycyklohexyl)]oximu v 11,25 ml CH_2Cl_2 byl ochlazen na ledu v inertní atmosféře a podroben působení roztoku 0,24 ml chlortrimethylsilanu a 0,44 ml 1-trimethylsilylimidazolu. Po 30 minutách byla reakce naředěna 250 ml ethylacetátu a promyta postupně saturovaným NaHCO_3 , vodou a solankou. Organická fáze byla usušena nad MgSO_4 , filtrována a evaporována za zisku 1,002 g produktu.

Příprava D: 2',4''-bis(O-trimethylsilyl)-6-O-methyl-14,15-dehydroerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxycyklohexyl)]oxim

Roztok 1,00 g (20,7 mmol) 2',4''-bis-O-trimethylsilyl-14,15-dehydroerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxycyklohexyl)]oximu v 9,69 ml 1:1 směs tetrahydrofuranu a methylsulfoxidu byl ochlazen na 10 °C a podroben působení 0,97 ml 2,0 M methylbromidu v etheru v inertní atmosféře. Pomalu byla přidána směs 1,94 ml methylsulfoxidu a 1,94 ml 1,0 M

terc-butoxidu draselného v tetrahydrofuranu. Reakce byla monitorována chromatografií na tenké vrstvě (silikagel, 10:1 směs toluenu a acetonu) a byla považována za ukončenou po přidání 1,6 molárního ekvivalentu bázi. Reakce byla naředěna 200 ml ethylacetátu a 70 ml saturovaného NaHCO₃. Směs byla přenesena do dělicí nálevky, naředěna 850 ml ethylacetátu a 280 ml saturovaného NaHCO₃, pak byla promyta postupně vodou a solankou. Organická fáze byla usušena nad MgSO₄, filtrována přes Celit a evaporována za zisku 21,2 g surového 6-O-methyl-2',4"-bis-O-trimethylsilyl-14,15-dehydroerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxycyklohexyl)]oximu. S ním bylo pokračováno dále bez další purifikace.

Příprava E: 6-O-methyl-14,15-dehydroerythromycin A-9-oxim

Roztok 1,0 g 6-O-methyl-2',4"-bis-O-trimethylsilyl-14,15-dehydroerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxycyklohexyl)]oxim v 9,8 ml směsi 2:1 acetonitrilu a vody byl podroben působení 5,3 ml octové kyseliny a míchán po dobu 8 hodin při teplotě místnosti. Směs byla koncentrována ve vakuu, pak opakovaně koncentrována po přidání toluenu za zisku 0,797 g surového 6-O-methyl-14,15-dehydroerythromycin A-9-oximu.

Příprava F: 6-O-methyl-14,15-dehydroerythromycin A

Roztok 0,797 g 6-O-methyl-14,15-dehydroerythromycin A-9-oximu a 1,02 g 85% hydrosulfitu sodného v 7,5 ml směsi ethanolu a vody 1:1 byl vložen do inertní atmosféry. Po kapkách bylo přidáváno 0,186 ml mravenčí kyseliny a směs byla míchána v 80 °C po dobu 3 hodin. Po ochlazení na teplotu místnosti bylo pH reakce upraveno na pH 10 s 6N NaOH a směs byla třikrát extrahována 150 ml porcemi ethylacetátu. Organické extrakty byly spojeny a promyty postupně saturovaným

NaHCO₃, vodou a solankou. Organická fáze byla usušena nad MgSO₄, filtrována a evaporována za zisku 0,68 g 6-O-methyl-14,15-dehydroerythromycinu A vhodného pro další konverze.

Příklad 6

Příprava A: 15-methylerythromycin A-9-oxim

Suspenze 20,0 g 15-methylerythromycinu A (85% čistota, 22,6 mmol) ve 40 ml 2-propanolu byla podrobena působení 20,5 ml 50% vodného hydroxylaminu a míchána až do rozpuštění. Bylo přidáno 6,41 ml octové kyseliny a směs byla míchána po dobu 15 hodin v 50 °C. Po ochlazení na teplotu místnosti byl přidán saturovaný NaHCO₃ a směs byla koncentrována ve vakuu, aby se odstranil isopropanol. Výsledná vodná směs byla třikrát extrahována 250 ml porcemi CHCl₃. Organické extrakty byly spojeny, promyty saturovaným NaHCO₃, vodou a solankou, a pak usušeny nad MgSO₄, filtrovány a koncentrovány za zisku 20,5 g surového produktu. Analýza LC/MS ukázala 94:6 směs E a Z oximů, [M+H]⁺ = 764.

Příprava B: 15-methylerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxycyklohexyl)]oxim

20,5 g surového oximu uvedeného výše bylo rozpuštěno v 55 ml CH₂Cl₂ a podrobeno působení 27,3 ml 1,1-diisopropoxycyklohexanu a 9,8 g pyridinium-p-toluensulfonátu po dobu 15 hodin při teplotě místnosti. Směs byla naředěna 160 ml CH₂Cl₂, pak byla promyta postupně saturovaným NaHCO₃, vodou a solankou. Organická fáze byla usušena nad MgSO₄, filtrována a evaporována za zisku hnědého sirupu. Chromatografie na

silikagelu (gradient 2:1 až 3:2 směsi hexanu a acetonu + 1% Et₃N) poskytla 18,0 g produktu.

Příprava C: 2',4"-bis-O-trimethylsilyl-15-methylerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxycyklohexyl)]oxim

Roztok 9,00 g (9,96 mmol) 15-methylerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxycyklohexyl)]oximu ve 25 ml CH₂Cl₂ byl ochlazen na ledu v inertní atmosféře a podroben působení roztoku 1,89 ml chlortrimethylsilanu a 3,65 ml 1-trimethylsilylimidazolu v 8 ml CH₂Cl₂. Po 30 minutách byla reakce naředěna 250 ml ethylacetátu a promyta postupně saturovaným NaHCO₃, vodou a solankou. Organická fáze byla usušena nad MgSO₄, filtrována a evaporována. Surový produkt byl purifikován chromatografií na silikagelu (gradient od hexanu ke 10:1 směsi hexanu a acetonu + 1% Et₃N), poskytující 7,8 g produktu.

Příprava D: 2',4"-bis-O-trimethylsilyl-6-O-methyl-15-methylerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxycyklohexyl)]oxim

Roztok 21,7 g (20,7 mmol) 2',4"-bis-O-trimethylsilyl-15-methylerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxycyklohexyl)]oximu ve 41,4 ml tetrahydrofuranu byl ochlazen na 10 °C a podroben působení 41,4 ml methylsulfoxidu a 20,7 ml 2,0 M methylbromidu v etheru v inertní atmosféře. Byla přidána směs 41,4 ml methylsulfoxidu a 41,4 ml 1,0 M terc-butoxidu draselného v tetrahydrofuranu rychlostí přibl. 20 ml za hodinu. Reakce byla monitorována chromatografií na tenké vrstvě (silikagel, 10:1 směs toluenu a acetonu) a byla považována za ukončenou po přidání 1,6 molárního ekvivalentu bází. Reakce byla naředěna 200 ml ethylacetátu a 70 ml saturovaného NaHCO₃. Směs byla přenesena do dělicí nálevky, naředěna 850 ml ethylacetátu a 280 ml saturovaného NaHCO₃, pak byla promyta postupně vodou a

solankou. Organická fáze byla usušena nad $MgSO_4$, filtrována přes Celit a evaporována za zisku 21,2 g surového 6-O-methyl-2',4"-bis-O-trimethylsilyl-15-methylerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxycyklohexyl)]oximu. S ním bylo pokračováno bez další purifikace.

Příprava E: 6-O-methyl-15-methylerythromycin A-9-oxim

Roztok 21,2 g 6-O-methyl-2',4"-bis-O-trimethylsilyl-15-methylerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxycyklohexyl)]oximu ve 110 ml acetonitrilu byl podroben působení 55 ml vody a 67 ml octové kyseliny a míchán po dobu 8 hodin při teplotě místnosti. Směs byla koncentrována ve vakuu, pak opakovaně koncentrována po přidání toluenu za zisku 19,7 g 6-O-methyl-15-methylerythromycin A-9-oximu.

Příprava F: 6-O-methyl-15-methylerythromycin A

Roztok 19,7 g 6-O-methyl-15-methylerythromycin A-9-oximu a 23,1 g 85% hydrosulfitu sodného ve 280 ml 1:1 směsi ethanolu a vody byl vložen do inertní atmosféry. Po kapkách bylo přidáváno 3,75 ml mravenčí kyseliny a směs byla míchána v 80 °C po dobu 4,5 hodiny. Po ochlazení na teplotu místnosti byla reakce podrobena působení saturovaného $NaHCO_3$ a extrahován třikrát 400 ml porcemi ethylacetátu. Organické extrakty byly spojeny a promyty postupně saturovaným $NaHCO_3$, vodou a solankou. Organická fáze byla usušena nad $MgSO_4$, filtrována a evaporována za zisku 15,1 g 6-O-methyl-15-methylerythromycinu A vhodného pro další konverzi.

Příklad 7

Příprava A: 6-O-methyl-3-deskladinosyl-14-norerythromycin A

Směs 77 mg 6-O-methyl-14-norerythromycinu A, 0,073 ml 12N HCl a 2 ml vody byla míchána při teplotě místnosti po dobu 3 hodin. Směs byla přivedena na pH 8 s 8N KOH a extrahována ethylacetátem. Organický extrakt byl promyt solankou, usušen nad MgSO₄, filtrován a evaporován. Zbytek byl podroben chromatografii na silikagelu (3:1 směs hexanu a acetonu, 1% triethylamin) za vzniku 42 mg čistého produktu jako bílé pevné látky. Hmotová spektrometrie dala [M+H⁺] = 576.

Příprava B: 2'-O-acetyl-6-O-methyl-3-deskladinosyl-14-norerythromycin A

Směs 73 mg 6-O-methyl-3-deskladinosyl-14-norerythromycinu A, 20 mg uhličitanu draselného, 14 μl acetanhydridu a 1 ml acetonu byla míchána při teplotě místnosti po dobu 18 hodin. Byl přidán ethylacetát, směs byla promyta vodou a solankou, usušena nad MgSO₄, filtrována a evaporována. Zbytek byl podroben chromatografii na silikagelu (3:1 směs hexanu a acetonu, 1% triethylamin) za získání 71 mg čistého produktu jako bílé pevné látky. Hmotová spektrometrie dala [M+H⁺] = 618.

Příprava C: 2'-O-acetyl-6-O-methyl-3-deskladinosyl-3-oxo-14-norerythromycin A

Roztok 99 mg 2'-O-acetyl-6-O-methyl-3-deskladinosyl-14-norerythromycinu A a 206 mg hydrochloridu 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylkarbodiimidu (EDC) ve 2 ml dichlormethanu byl podroben působení 0,21 ml DMSO a ochlazen na 5 °C. Byl přidán roztok 208 mg pyridiniumtrifluoracetátu ve

2 ml dichlormethanu prostřednictvím dávkovací pumpy během 4 hodin. Pak byl přidán ethylacetát, roztok byl promyt saturovaným NaHCO_3 , vodou, solankou a usušen nad MgSO_4 , filtrován a evaporován. Zbytek byl podroben chromatografii na silikagelu (3:1 směs hexanu a acetonu, 1% triethylamin) za zisku 94 mg čistého produktu jako bílé pevné látky. Hmotová spektrometrie dala $[\text{M}+\text{H}^+] = 616$.

Příprava D: 2'-O-acetyl-6-O-methyl-3-deskladinosyl-3-oxo-11-O-methansulfonyl-14-norerythromycin A

K roztoku 93 mg 2'-O-acetyl-6-O-methyl-3-deskladinosyl-3-oxo-14-norerythromycinu A v 1 ml suchého pyridinu bylo přidáno 0,057 ml methansulfonylchloridu v 5 °C. Po 3 hodinách v 5 °C reakce byla zahřáta na teplotu místnosti a udržována dalších 15 hodin. Směs byla naředěna ethylacetátem, 2x promyta saturovaným NaHCO_3 , 3x vodou, solankou a usušena nad MgSO_4 , filtrována a evaporována. Zbytek byl podroben chromatografii na silikagelu (2:1 směs hexanu a acetonu, 1% triethylamin) za zisku 72 mg čistého produktu jako bílé pevné látky. Hmotová spektrometrie dala $[\text{M}+\text{H}^+] = 695$.

Příprava E: 2'-O-acetyl-6-O-methyl-3-deskladinosyl-3-oxo-10,11-anhydro-14-norerythromycin A

Roztok 73 mg 2'-O-acetyl-6-O-methyl-3-deskladinosyl-3-oxo-11-O-methansulfonyl-14-norerythromycinu A v 1 ml acetonu byl podroben působení 32 μl diazabicykloundecenu při teplotě místnosti po dobu 18 hodin. Směs byla naředěna ethylacetátem, promyta saturovaným NaHCO_3 , vodou, solankou a usušena nad MgSO_4 , filtrována a evaporována. Zbytek byl podroben chromatografii na silikagelu (2:1 směs hexanu a acetonu,

1% triethylamin) za zisku 50 mg čistého produktu jako bílé pevné látky. Hmotová spektrometrie dala $[M+H]^+ = 598$.

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 207,02, 204,50, 169,63, 168,72, 142,52, 139,40, 101,87, 80,61, 80,02, 77,14, 72,66, 71,48, 69,09, 63,56, 51,35, 50,56, 47,12, 40,61, 39,73, 37,36, 30,36, 21,32, 21,06, 20,96, 20,67, 18,45, 14,34, 13,89, 13,55, 13,45.

Příklad 8

Příprava A: 2'-O-benzoyl-6-O-methyl-14,15-dehydroerythromycin
A

Roztok 668 mg 6-O-methyl-14,15-dehydroerythromycinu A, 385 mg anhydridu kyseliny benzoové a 0,25 ml triethylaminu v 3,6 ml CH_2Cl_2 byl míchán po dobu 2 dnů. Po přidání saturovaného $NaHCO_3$ byla směs třikrát extrahována CH_2Cl_2 . Organické extrakty byly spojeny a evaporovány do sucha a produkt byl purifikován chromatografií s oxidem křemičitým (90:9:1 směs toluenu a acetonu a Et_3N) za vzniku 477 mg produktu, LC-MS ukazuje $[M+H]^+ = 850,6$.

Příprava B: 2'-O-benzoyl-6-O-methyl-4",11-bis(O-methansulfonyl)-14,15-dehydroerythromycin A

Roztok 549 mg 2'-O-benzoyl-6-O-methyl-14,15-dehydroerythromycinu A a 0,50 ml methansulfonylchloridu v 2,39 ml pyridinu byl míchán po dobu 24 hodin, a pak byl naředěn CH_2Cl_2 a saturovaným $NaHCO_3$. Směs byla třikrát extrahována CH_2Cl_2 . Organické extrakty byly spojeny a evaporovány do sucha a produkt byl purifikován chromatografií s oxidem křemičitým (90:9:1 směs toluenu a acetonu a Et_3N) za vzniku 530 mg produktu, LC-MS ukazuje $[M+H]^+ = 1006,5$.

Příprava C: 2'-O-benzoyl-6-O-methyl-4"-O-methansulfonyl-10,11-anhydro-14,15-dehydroerythromycin A

Směs 59 mg 2'-O-benzoyl-6-O-methyl-4",11-bis(O-methansulfonyl)-14,15-dehydroerythromycinu A a 0,018 ml diazabicykloundecenu v 0,195 ml acetonu byla míchána po dobu 24 hodin, pak usušena ve vakuu. Produkt byl purifikován chromatografií s oxidem křemičitým (90:9:1 směs toluenu a acetonu a Et₃N) za vzniku 50 mg produktu, LC-MS ukazuje [M+H]⁺ = 910,5.

Příprava D: 2'-O-benzoyl-6-O-methyl-3-deskladinosyl-10,11-anhydro-14,15-dehydroerythromycin A

Směs 337 mg 2'-O-benzoyl-6-O-methyl-4"-O-methansulfonyl-10,11-anhydro-14,15-dehydroerythromycinu A, 1,5 ml acetonitrilu a 6,9 ml 3N HCl byla míchána po dobu 22 hodin. Acetonitril byl odstraněn ve vakuu, pH vodného zbytku bylo upraveno na 12 přidáním NaOH a produkt byl extrahován použitím 4 porcí CH₂Cl₂. Spojené extrakty byly usušeny a evaporovány. Produkt byl purifikován chromatografií s oxidem křemičitým (gradient 96:4 CH₂Cl₂/MeOH až 95:4:1 CH₂Cl₂/MeOH/Et₃N) za vzniku 197 mg, [M+H]⁺ = 674,4.

Příprava E: 2'-O-benzoyl-6-O-methyl-3-deskladinosyl-3-oxo-10,11-anhydro-14,15-dehydroerythromycin A

Suspenze 226 mg 2'-O-benzoyl-6-O-methyl-3-deskladinosyl-10,11-anhydro-14,15-dehydroerythromycinu A a 427 mg Dess-Martinova jodistanu ve 14,6 ml CH₂Cl₂ byla míchána po dobu 1 hodiny. Směs byla naředěna CH₂Cl₂ a sáurovaným NaHCO₃. Produkt byl extrahován použitím 3 porcí CH₂Cl₂ a extrakty byly spojeny,

usušeny a evaporovány. Chromatografie na silikagelu (90:9:1 směs toluenu a acetonu a Et₃N) poskytla 168 mg produktu. [M+H]⁺ = 672,4.

¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 206,78, 203 (br), 168,19, 165,08, 141,36, 139,58, 132,74, 131,51, 130,46, 129,79, 128,25, 120,18, 102,09, 80,79, 80,40, 78,70, 72,52, 71,91, 69,19, 63,76, 51,10, 50,54, 47,08, 40,73, 39,87, 37,77, 31,23, 22,13, 20,98, 18,52, 14,28, 14,15, 13,55.

Příklad 9

Příprava A: 6-O-methyl-3-deskladinosyl-15-methylerythromycin A

Směs 15,1 g 6-O-methyl-15-methylerythromycinu A a 280 ml 0,5N HCl byla míchána při teplotě místnosti po dobu 3 hodin. pH bylo upraveno na 9 přidáním 6N NaOH a výsledný precipitát byl sebrán filtrací ve vakuu, promyt vodou a usušen. Filtrát byl třikrát extrahován 400 ml porcemi ethylacetátu. Organické extrakty byly spojeny, promyty postupně saturovaným NaHCO₃, vodou a solankou, pak usušeny nad MgSO₄, filtrovány a evaporovány za vzniku dalšího produktu. Spojené surové produkty byly podrobeny chromatografii na silikagelu za zisku 9,35 g čistého 6-O-methyl-3-deskladinosyl-15-methylerythromycinu A. ES-LC/MS ukazuje [M+H]⁺ = 605.

Příprava B: 2'-O-acetyl-6-O-methyl-3-deskladinosyl-15-methylerythromycin A

Roztok 2,92 ml acetanhydridu v 35 ml ethylacetátu byl po kapkách přidáván k roztoku 9,35 g 6-O-methyl-3-deskladinosyl-15-methylerythromycinu A ve 40 ml ethylacetátu. Směs byla míchána po dobu 30 minut po dokončení přidávání, pak byla

koncentrována. Chromatografie na silikagelu (2:1 směs hexanu a acetonu) poskytla 8,35 g 2'-O-acetyl-6-O-methyl-3-deskladinosyl-15-methylerythromycinu A. ES-LC/MS ukazuje $[M+H]^+ = 647$.

Příprava C: 2'-O-acetyl-6-O-methyl-3-deskladinosyl-3-oxo-15-methylerythromycin A

Roztok 8,3 g 2'-O-acetyl-6-O-methyl-3-deskladinosyl-15-methylerythromycinu A a 16,51 g hydrochloridu 1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl)karbodiimidu v 64 ml dichlormethanu a 15,47 ml methylsulfoxidu byl vložen do inertní atmosféry a ochlazen na ledu. Byl přidán roztok 16,63 g pyridiniumtrifluoracetátu v 64 ml dichlormethanu takovou rychlostí, aby přidání bylo kompletní během 4 hodin a reakce byla monitorována chromatografií na tenké vrstvě. Kompletní reakce byla pozorována po přidání 73% roztoku, a tak reakce pak byla zastavena přidáním 600 ml ethylacetátu a 200 ml saturovaného NaHCO_3 . Organická vrstva byla sebrána a promyta postupně saturovaným NaHCO_3 , vodou a solankou, pak usušena nad MgSO_4 , filtrována a evaporována za zisku 8,4 g surového produktu. Chromatografie na silikagelu (3:1 směs hexanu a acetonu) poskytla 6,75 g 2'-O-acetyl-6-O-methyl-3-deskladinosyl-3-oxo-15-methylerythromycinu A. ES-LC/MS ukazuje $[M+H]^+ = 645$.

Příprava D: 2'-O-acetyl-6-O-methyl-3-deskladinosyl-3-oxo-11-O-methansulfonyl-15-methylerythromycin A

5,68 ml methansulfonylchloridu bylo přidáváno po kapkách k roztoku 6,73 g 2'-O-acetyl-6-O-methyl-3-deskladinosyl-3-oxo-15-methylerythromycinu A ve 35 ml pyridinu v 0 °C. Směs byla přivedena na teplotu místnosti a zastavena přidáním 700 ml

ethylacetátu a 200 ml saturovaného NaHCO₃. Organická vrstva byla sebrána a promyta postupně saturovaným NaHCO₃, vodou a solankou, pak usušena nad MgSO₄, filtrována a evaporována za zisku 8,2 g surového produktu. Chromatografie na silikagelu (5:2 směs hexanu a acetonu) poskytla 5,04 g 2'-O-acetyl-6-O-methyl-3-deskladinosyl-3-oxo-11-O-methansulfonyl-15-methylerythromycinu A. ES-LC/MS ukazuje [M+H]⁺ = 723.

Příprava E: 2'-O-acetyl-6-O-methyl-3-deskladinosyl-3-oxo-10,11-anhydro-15-methylerythromycin A

5,22 ml 1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-enu bylo přidáváno po kapkách k roztoku 5,03 g 2'-O-acetyl-6-O-methyl-3-deskladinosyl-3-oxo-11-O-methansulfonyl-15-methylerythromycinu A ve 23 ml acetonu. Roztok byl koncentrována po dobu 4,5 hodiny a zbytek byl podroben chromatografii na silikagelu (5:2 směs hexanu a acetonu) za vzniku 3,72 g 2'-O-acetyl-6-O-methyl-3-deskladinosyl-3-oxo-10,11-anhydro-15-methylerythromycinu A. ES-LC/MS ukazuje [M+H]⁺ = 627.

Příklad 10

Syntéza 2'-O-acetyl-6-O-methyl-3-deskladinosyl-3-oxo-10,11-anhydro-2-fluor-15-methylerythromycinu A

Roztok 198 mg (0,316 mmol) 2'-O-acetyl-6-O-methyl-3-deskladinosyl-3-oxo-10,11-anhydro-15-methylerythromycinu A v 2,1 ml tetrahydrofuranu v inertní atmosféře byl ochlazen na -78 °C a podroben působení 0,931 ml 1,0 M terc-butoxidu draselného v tetrahydrofuranu. Směs byla míchána po dobu 5 minut a bylo přidáno 230 mg roztoku N-fluorbenzensulfonimidu

v 0,5 ml tetrahydrofuranu ve třech částech pod dobu 2 hodin. Po přidání byla reakce ponechána zahřát se na teplotu místnosti a udržována dalších 5 hodin. Byl přidán vodný K_2CO_3 a směs byla třikrát extrahována 50 ml porcemi CH_2Cl_2 . Organické extrakty byly spojeny, usušeny nad $MgSO_4$, filtrovány a evaporovány. Chromatografie na silikagelu (90:9:1 směs toluenu a acetonu a Et_3N) poskytla 95 mg produktu jako bílé pevné látky. ES-LC/MS: $[M+H]^+ = 645$. ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 206,95, 203,02 (br), 169,77, 166,08 (d, JCF = 23 Hz), 141,71, 138,43, 101,63, 98,02 (d, JCF = 203 Hz), 80,09 (br), 79,71, 78,27, 73,26, 71,52, 69,08, 63,33, 49,18, 40,61, 40,32, 41,79, 40,61, 40,32, 31,56, 31,47, 30,50, 24,37 (d, JCF = 23 Hz), 23,19, 22,63, 20,95, 20,68, 19,80, 19,47, 14,10, 14,00, 13,55.

Příklad 11

Příprava A: konverze sloučeniny 4 na sloučeninu 7, kde X = H, R^{13} = propylová skupina a R^a = allylová skupina

Krok 1: Roztok 7,8 g (7,44 mmol) 2',4''-bis-O-trimethylsilyl-15-methylerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxy-cyklohexyl)]oximu ve 30 ml tetrahydrofuranu byl ochlazen na ledu a podroben působení 30 ml methylsulfoxidu a 2,58 ml čerstvě destilovaného allylbromidu v inertní atmosféře. Směs 29,8 ml methylsulfoxidu a 1,0 29,8 ml M terc-butoxidu draselného v tetrahydrofuranu byla přidávána rychlostí 1,33 molárních ekvivalentů bází za hodinu. Reakce byla monitorována chromatografií na tenké vrstvě (silikagel, 10:1 směs toluenu a acetonu) a byla považována za ukončenou po přidání 3,6 molárních ekvivalentů bází. Reakce byla naředěna 700 ml ethylacetátu a postupně promyta saturovaným $NaHCO_3$, vodou a solankou. Organická fáze byla usušena nad $MgSO_4$, filtrována a

evaporována za zisku 8,08 g surového 6-O-allyl-2',4''-bis-O-trimethylsilyl-15-methylerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxy-cyklohexyl)]oximu. S ním bylo pokračováno bez další purifikace.

Krok 2: Roztok 8,08 g 6-O-allyl-2',4''-bis-O-trimethylsilyl-15-methylerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxy-cyklohexyl)]oximu ve 42 ml acetonitrilu byl podroben působení 21 ml vody a 24 ml octové kyseliny a míchán po dobu 18 hodin při teplotě místnosti. Směs byla koncentrována po přidání 2-propanolu, pak opakovaně po přidání toluenu za zisku 7,7 g surového produktu. Chromatografie na silikagelu (gradient 2:1 až 1:1 směsi hexanu a acetonu + 1% Et₃N) poskytla 3,75 g 6-O-allyl-15-methylerythromycin A-9-oximu.

Krok 3: Roztok 3,75 g 6-O-allyl-15-methylerythromycin A-9-oximu a 5,37 g 85%hydrosulfitu sodného v 66 ml směsi ethanolu a vody 1:1 byl vložen do inertní atmosféry. Bylo po kapkách přidáváno 0,845 ml mravenčí kyseliny a směs byla míchána v 80 °C po dobu 3,5 hodin. Po ochlazení na teplotu místnosti bylo pH reakce upraveno na pH 10 s 6N NaOH a směs byla třikrát extrahována 150 ml porcemi ethylacetátu. Organické extrakty byly spojeny a promyty postupně saturovaným NaHCO₃, vodou a solankou. Organická fáze byla usušena nad MgSO₄, filtrována a evaporována za zisku 3,42 g 6-O-allyl-15-methylerythromycinu A vhodného pro další konverzi.

Příprava B: Konverze sloučeniny 4 na sloučeninu 7, kde X = H, R¹³ = methylová skupina a R^a = allylová skupina

Krok 1: Roztok 202 mg 2',4''-bis-O-trimethylsilyl-14-norerythromycin A-9-[O-(1 isopropoxycyklohexyl)]oximu v 0,4 ml tetrahydrofuranu, 0,4 ml DMSO a 0,04 ml etheru byl ochlazen na 10 °C a podroben působení 0,035 ml čerstvě destilovaného

allylbromidu v inertní atmosféře. Směs 0,4 ml methylsulfoxidu a 0,4 ml 1,0 M terc-butoxidu draselného v tetrahydrofuranu byla přidávána rychlostí 0,22 ml za hodinu. Reakce byla monitorována chromatografií na tenké vrstvě (silikagel, 5:1 směs toluenu a acetonu). Reakce byla naředěna ethylacetátem a promyta postupně saturovaným NaHCO_3 , vodou a solankou. Organická fáze byla usušena nad MgSO_4 , filtrována a evaporována za zisku 222 mg surového 6-O-allyl-2',4"-bis-O-trimethylsilyl-14-norerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxycyklohexyl)]oximu. S ním bylo pokračováno bez další purifikace.

Krok 2: Roztok 222 mg 6-O-allyl-2',4"-bis-O-trimethylsilyl-14-norerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxycyklohexyl)]oximu ve 4 ml acetonitrilu byl podroben působení 2 ml vody a 2,4 ml octové kyseliny a míchán po dobu 18 hodin při teplotě místnosti. Směs byla koncentrována po přidání 2-propanolu, pak opakovaně po přidání toluenu za zisku 220 mg surového 6-O-allyl-14-norerythromycin A-9-oximu.

Krok 3: Roztok 220 mg 6-O-allyl-14-norerythromycin A-9-oximu a 322 mg 85% hydrosulfitu sodného ve 4 ml 1:1 směsi ethanolu a vody byl vložen do inertní atmosféry. Bylo po kapkách přidáváno 0,050 ml mravenčí kyseliny a směs byla míchána v 80 °C po dobu 15 hodin. Po ochlazení na teplotu místnosti pH reakce bylo upraveno na pH 10 s 6N NaOH a směs byla třikrát extrahována 150 ml porcemi ethylacetátu. Organické extrakty byly spojeny a promyty postupně saturovaným NaHCO_3 , vodou a solankou. Organická fáze byla usušena nad MgSO_4 , filtrována a evaporována za zisku 156 mg 6-O-allyl-14-norerythromycinu A vhodného pro další konverzi.

Další provedení: Další provedení sloučeniny 7, kde R^a je allylová skupina a má další C-13 substituenty (např. R^{13} je 3-butenylová skupina, butylová skupina, benzylová skupina, vinylová skupina, 2-azidoethyllová skupina, 2-fluoroethyllová

skupina nebo 3-hydroxybutylová skupina), mohou být připravena podobně.

Příklad 12

Konverze sloučeniny 7 na sloučeninu 10 (viz schéma 2)

Krok 1. Směs 77 mg surové sloučeniny připravené v příkladu 11, 0,073 ml 12N HCl a 2 ml vody byla míchána při teplotě místnosti po dobu 3 hodin. Směs byla přivedena na pH 8 s 8N KOH a extrahována ethylacetátem. Organický extrakt byl promyt solankou, usušen nad $MgSO_4$, filtrován a evaporován. Zbytek byl podroben chromatografii na silikagelu (3:1 směs hexanu a acetonu, 1% triethylamin) za vzniku 42 mg čistého produktu jako bílé pevné látky.

Krok 2. Aby se chránila skupina 2'OH, byla směs 73 mg výše uvedené sloučeniny, 20 mg uhličitanu draselného, 14 μ l acetanhydridu a 1 ml acetonu míchána při teplotě místnosti po dobu 18 hodin. Byl přidán ethylacetát, směs byla promyta vodou a solankou, usušena nad $MgSO_4$, filtrována a evaporována. Zbytek byl podroben chromatografii na silikagelu (3:1 směs hexanu a acetonu, 1% triethylamin) za získání 71 mg čistého produktu jako bílé pevné látky.

Krok 3. Roztok 99 mg sloučeniny, která je výsledkem kroku 2, a 206 mg hydrochloridu 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylkarbodiimidu (EDC) ve 2 ml dichlormethanu byl podroben působení 0,21 ml DMSO a ochlazen na 5 °C. Prostřednictvím dávkovací pumpy byl během 4 hodin přidán roztok 208 mg pyridiniumtrifluoracetátu ve 2 ml dichlormethanu. Pak byl přidán ethylacetát, roztok byl promyt saturovaným $NaHCO_3$, vodou, solankou a usušen nad $MgSO_4$, filtrován a evaporován. Zbytek byl podroben chromatografii na silikagelu (3:1 směs

hexanu a acetonu, 1% triethylamin) za zisku 94 mg čistého produktu (R^a je allylová skupina, R^2 je acetát a R^{13} je CH_3).

Krok 4. Aby se ochránila skupina $2'OH$, byl roztok 94 mg sloučeniny, která je výsledkem kroku 3, v 5 ml methanolu míchán při teplotě místnosti po dobu 24 hodin. Rozpouštědlo bylo odstraněno ve vakuu za vzniku požadovaného produktu (R^a je allylová skupina, R^2 je H a R^{13} je CH_3).

Další provedení: Další provedení sloučeniny 10, kde R^a je allylová skupina a má další C-13 substituenty (např. R^{13} je 3-butenylová skupina, butylová skupina, benzylová skupina, vinylová skupina, 2-azidoethylová skupina, 2-fluoroethylová skupina nebo 3-hydroxybutylová skupina), mohou být připravena podobně.

Příklad 13

Konverze ve skupině $-OR^a$

A. Allylová skupina \rightarrow propylová skupina

Roztok 0,2 mmol každé sloučeniny z kroků 3 nebo 4 příkladu 12 v ethanolu byl naplněn dusíkem a bylo přidáno 20 mg 10% palladia na uhlí. Směs pak byla naplněna vodíkem a reakční směs byla míchána přes noc pod pozitivním vodíkovým tlakem. Reakční směs byla filtrována a koncentrována ve vakuu za vzniku skla. Chromatografie na silikagelu (95:5:0,5 směs dichlormethanu, methanolu a ammonia) poskytla propylové deriváty sloučenin jako bílé pevné látky.

B. Allylová skupina \rightarrow CH_2CHO

Při teplotě $-78\text{ }^\circ\text{C}$ byl ozón probubláván roztokem 4,0 mmol každé sloučeniny z kroků 3 nebo 4 příkladu 12 ve 100 ml dichlormethanu po dobu 45 minut. Reakční směs pak byla sycena dusíkem po dobu 10 minut. Bylo přidáno 1,46 ml (20 mmol) dimethylsulfidu v $-78\text{ }^\circ\text{C}$ a reakční směs byla míchána po dobu 30 minut v $0\text{ }^\circ\text{C}$. Reakční směs byla koncentrována ve vakuu za vzniku bílé pěny, která byla použita bez další purifikace při zahřívání roztoku sloučeniny ve 40 ml (4,0 mmol) THF a 2,62 g (10,0 mmol) trifenylofosfinu v $55\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 2,5 hodin. Reakční směs byla koncentrována ve vakuu za vzniku bílé pěny. Chromatografie na silikagelu (1:1 směs acetonu a hexanu, pak 75:25:0,5 směs acetonu, hexanu a triethylaminu) poskytla požadovanou sloučeninu jako bílou pevnou látku.

C. Allylová skupina \rightarrow $\text{CH}_2\text{CH}=\text{NOH}$

K roztoku 0,08 mmol sloučeniny připravené v B, kde R^a je skupina $-\text{CH}_2\text{CHO}$, v 5 ml methanolu, bylo přidáno 31 μl (0,225 mmol) triethylaminu a 7,7 mg (0,112 mmol) hydrochloridu hydroxylaminu a reakční směs byla míchána po dobu 6 hodin při teplotě místnosti. Reakční směs byla nabrána do ethylacetátu a promyta vodným 5% hydrouhličitánem sodným a solankou, usušena nad sulfátem sodným a koncentrována ve vakuu za vzniku čirého skla. Chromatografie na silikagelu (95:5:0,5 směs dichlormethanu, methanolu a amoniaku) poskytla sloučeninu jako bílou pevnou látku.

D. $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{NOH} \rightarrow \text{CH}_2\text{CN}$

K roztoku v dusíkové atmosféře 0,267 mmol sloučeniny připravené v C v 5 ml THF bylo přidáno 83 μl (0,534 mmol)

diisopropylkarbodiimidu a 2,7 mg (0,027 mmol) CuCl a reakční směs byla míchána přes noc při teplotě místnosti. Reakční směs byla nabrána do ethylacetátu a promyta vodným 5% hydrouhličitanem sodným a solankou, usušena nad sulfátem sodným a koncentrována ve vakuu za vzniku čirého skla. Chromatografie na silikagelu (95:5:0,5 směs dichlormethanu, methanolu a amoniaku) poskytla požadovanou sloučeninu jako bílou pevnou látku.

E. $-\text{CH}_2\text{CHO} \rightarrow \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$

K roztoku 0,276 mmol sloučeniny připravené v B v 10 ml methanolu bylo přidáno 212 mg (2,76 mmol) acetátu amonného a směs byla ochlazená na 0 °C. Bylo přidáno 34 mg (0,553 mmol) kyanoborohydridu sodného a reakční směs byla míchána po dobu 30 hodin v 0 °C. Reakční směs byla nabrána do ethylacetátu a promyta vodným 5% uhličitanem sodným, vodným 2% tris(hydroxymethyl)aminomethanem a solankou, usušena nad sulfátem sodným, filtrována a koncentrována ve vakuu. Chromatografie na silikagelu (90:10:0,5 směs dichlormethanu, methanolu a amoniaku) poskytla požadovanou sloučeninu jako bílou pevnou látku.

F. $-\text{CH}_2\text{CHO} \rightarrow \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2$ -fenylová skupina

K roztoku 0,200 mmol sloučeniny připravené v B v 10 ml methanolu o teplotě 0 °C bylo přidáno 114 μl (2,00 mmol) octové kyseliny a 21 μl (2,00 mmol) benzylaminu a směs byla míchána po dobu 10 minut. Bylo přidáno 24,8 mg (0,400 mmol) kyanoborohydridu sodného a reakční směs byla míchána po dobu 16 hodin. Pak bylo přidáno dalších 24,8 mg (0,400 mmol) kyanoborohydridu sodného a míchání pokračovalo po dobu 5 hodin. Reakční směs byla nabrána do ethylacetátu a promyta

vodným 5% uhličitanem sodným, vodným 2% tris(hydroxymethyl)aminomethanem a solankou, usušena nad sulfátem sodným, filtrována a koncentrována ve vakuu. Chromatografie na silikagelu (95:5:0,5 směs dichlormethanu, methanolu a amoniaku) následovaná druhou chromatografií (50:50:0,5 směs acetonu, hexanu a triethylaminu) poskytla požadovanou sloučeninu jako bílou pěnu.

G. $-\text{CH}_2\text{CHO} \rightarrow \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ -fenylová skupina

K roztoku 0,200 mmol sloučeniny připravené v B v 10 ml methanolu o teplotě 0 °C bylo přidáno 114 μl (2,00 mmol) octové kyseliny a 218 μl (2,00 mmol) fenethylaminu a směs byla míchána po dobu 10 minut. Bylo přidáno 24,8 mg (0,400 mmol) kyanoborohydridu sodného a reakční směs byla míchána po dobu 16 hodin. Reakční směs byla nabrána do ethylacetátu a promyta vodným 5% uhličitanem sodným, vodným 2% tris(hydroxymethyl)aminomethanem a solankou, usušena nad sulfátem sodným, filtrována a koncentrována ve vakuu. Chromatografie na silikagelu (90:10:0,5 směs dichlormethanu, methanolu a amoniaku) poskytla požadovanou sloučeninu.

H. $-\text{CH}_2\text{CHO} \rightarrow \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}(\text{CO}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2$ -fenylová skupina

K roztoku 0,200 mmol sloučeniny připravené v B v 10 ml methanolu o teplotě 0 °C bylo přidáno 129 mg (0,600 mmol) hydrochloridu methylesteru L-fenylalaninu a směs byla míchána po dobu 10 minut. Bylo přidáno 924,8 mg (0,400 mmol) kyanoborohydridu sodného a reakční směs byla míchána po dobu 22 hodin. Reakční směs byla nabrána do ethylacetátu a promyta vodným 5% uhličitanem sodným, vodným 2% tris(hydroxymethyl)aminomethanem a solankou, usušena nad sulfátem sodným, filtrována a koncentrována ve vakuu.

Chromatografie na silikagelu (95:5:0,5 směs dichlormethanu, methanolu a amoniaku) poskytla požadovanou sloučeninu.

I. $-\text{CH}_2\text{CHO} \rightarrow$ skupina $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2-(4\text{-pyridyl})$

Požadovaná sloučenina byla připravena podle způsobu uvedeného v G, s výjimkou, že fenethylamin byl nahrazen 4-aminomethylpyridinem.

J. $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \rightarrow$ skupina $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2-(4\text{-chinolyl})$

K roztoku 0,15 mmol sloučeniny připravené v E ve 2 ml methanolu bylo přidáno 23 mg (0,15 mmol) 4-chinolin-karboxaldehydu, 8,6 μl (0,15 mmol) octové kyseliny a 9,4 mg (0,15 mmol) kyanoborohydridu sodného a reakční směs byla míchána po dobu 15 hodin. Reakční směs byla nabrána do ethylacetátu a promyta vodným 5% uhličitanem sodným, vodným 2% tris(hydroxymethyl)aminomethanem a solankou, usušena nad sulfátem sodným, filtrována a koncentrována ve vakuu. Chromatografie na silikagelu (95:10:0,5 směs dichlormethanu, methanolu a amoniaku) poskytla požadovanou sloučeninu.

K. Allylová skupina $\rightarrow -\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$ fenylová skupina

K roztoku 1,00 mmol 2' chráněné sloučeniny připravené v příkladu 12, 22 mg (0,100 mmol) acetátu palladnatého a 52 mg (0,200 mmol) trifenylfosfinu v 5 ml acetonitrilu v dusíkové atmosféře bylo přidáno 220 μl (2,00 mmol) jodbenzenu a 280 μl (2,00 mmol) triethylaminu a směs byla ochlazená na -78°C , odplyněna a nádoba uzavřena. Reakční směs pak byla zahřáta na 60°C po dobu 0,5 hodiny a míchána v 80°C po dobu 12 hodin, nabrána do ethylacetátu a dvakrát promyta vodným 5% hydrouhličitanem sodným, jednou vodným 2% tris(hydroxy-

methyloaminomethanem a jednou solankou, usušena nad sulfátem sodným, filtrována a koncentrována ve vakuu. Chromatografie na silikagelu (95:5:0,5 směs dichlormethanu, methanolu a amoniaku) poskytla požadovanou sloučeninu.

Odstranění chránicí skupiny bylo uskutečněno zahříváním v methanolu.

Další provedení sloučeniny 10 zahrnují ta provedení, kde R^2 je atom H, R^{13} je propylová skupina, butylová skupina, benzylová skupina, vinylová skupina, 3-butenylová skupina, 2-fluorethylová skupina, 2-azidoethylová skupina nebo 3-hydroxybutylová skupina. Další provedení zahrnují ty sloučeniny, kde R^a je člen tabulky 1.

Tabulka 1

$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -fenylová skupina	skupina $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$ (4-methoxyfenyl)
skupina $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$ (4-chlorfenyl)	skupina $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$ (3-chinolyl)
skupina $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	skupina $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OH}$
skupina $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_3$	skupina $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{OH}$
skupina $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$	skupina $-\text{CH}_2\text{CH}_2$ (1-morfolinyl)
skupina $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$	skupina $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})\text{NH}_2$
skupina $-\text{CH}_2\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_3$	skupina $-\text{CH}_2\text{F}$
skupina $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$	skupina $-\text{CH}_2\text{CH}_3$
skupina $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	skupina $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$
skupina $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$	skupina $-\text{CH}_2\text{SCH}_3$
-cyklopropylová skupina	skupina $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$
skupina $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{F}$	skupina $-\text{CH}_2$ -cyklopropylová skupina
skupina $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHO}$	skupina $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
skupina $-\text{CH}_2-$ (4-nitrofenyl)	skupina $-\text{CH}_2-$ (4-chlorfenyl)
skupina $-\text{CH}_2-$ (4-methoxyfenyl)	skupina $-\text{CH}_2-$ (4-kyanofenyl)

skupina $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})\text{OCH}_3$	skupina $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHC}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_3$
skupina $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_3$	skupina $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$
skupina $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	$-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHSO}_2$ -fenylová skupina
skupina $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CSi}(\text{CH}_3)_3$	skupina $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
skupina $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CCH}_3$	skupina $-\text{CH}_2$ -(2-pyridyl)
skupina $-\text{CH}_2$ -(3-pyridyl)	skupina $-\text{CH}_2$ -(4-pyridyl)
skupina $-\text{CH}_2$ -(4-chinolyl)	skupina $-\text{CH}_2\text{NO}_2$
skupina $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$	$-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})$ fenylová skupina
skupina $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$	skupina $-\text{CH}_2\text{Cl}\equiv$
$-\text{CH}_2\text{S}(\text{O})_2$ -fenylová skupina	skupina $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHBr}$
skupina $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$ -(4-chinolyl)	skupina $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -(4-chinolyl)
skupina $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$ -(5-chinolyl)	skupina $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ -(5-chinolyl)
skupina $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$ -(4-benzoxazolyl) nebo	skupina $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$ -(7-benzimidazolyl)

Příklad 14

Příprava 11,12-cyklického karbamátu 2'-O-benzoyl-6-O-allyl-11-amino-3-deskladinosyl-11-deoxy-3-oxo-15-methylerythromycinu A

A. 6-O-allyl-3-deskladinosyl-15-methylerythromycin A

Směs 6,58 g 6-O-allyl-15-methylerythromycinu A a 125 ml 0,5N HCl byla míchána při teplotě místnosti po dobu 20 hodin. pH bylo upraveno na 10 přidáním 6N NaOH a směs byla třikrát extrahována 225 ml porcemi ethylacetátu. Organické extrakty byly spojeny, postupně promyty saturovaným NaHCO_3 , vodou a solankou, pak usušeny nad MgSO_4 , filtrovány a evaporovány. Surový produkt byl podroben chromatografii na silikagelu (3:2 směs toluenu a acetonu + 1% Et_3N) za zisku 3,04 g čistého 6-O-

allyl-3-deskladinosyl-15-methylerythromycinu A. ES-LC/MS ukázala $[M+H]^+ = 617$.

B. 2'-O-benzyl-6-O-allyl-3-deskladinosyl-15-methylerythromycin A

2,43 g (3,86 mmol, 1,00 ekv.) 6-O-allyl-3-deskladinosyl-15-methylerythromycinu A a 1,78 g (7,72 mmol, 2,00 ekv.) anhydridu kyseliny benzoové bylo vloženo do baňky s kulatým dnem a naplněno N_2 . Bylo přidáno 17,5 ml ethylacetátu. Roztok byl míchán po dobu 3,5 hodiny, a pak byl naředěn 400 ml EtOAc a dvakrát promyt 150 ml saturovaného vodného $NaHCO_3$ a jednou po 150 ml vody a solanky. Organická fáze byla usušena nad $MgSO_4$, filtrována a koncentrována. Purifikace velmi rychlou chromatografií na silikagelu (3:1 směs hexanu a acetonu +1% Et_3N) poskytla 1,94 g (68,1%) požadovaného produktu jako bílé pevné látky. ES-LC/MS ukázala $[M+H]^+ = 721$. ^{13}C NMR (100,6 MHz, $CDCl_3$) δ 219,4, 174,3, 165,4, 135,3, 132,6, 130,8, 129,7, 128,2, 117,2, 99,7, 80,7, 79,0, 77,9, 77,7, 75,1, 74,3, 72,3, 69,0, 64,7, 63,3, 45,6, 43,9, 40,7, 37,9, 37,7, 35,7, 32,1, 30,8, 21,1, 20,2, 19,3, 18,1, 16,3, 15,1, 14,0, 12,4, 7,7.

C. 2'-O-benzoyl-6-O-allyl-3-deskladinosyl-3-oxo-15-methylerythromycin A

0,510 g (3,82 mmol, 1,50 ekv.) N-chlorsukcinimidu bylo rozpuštěno ve 13 ml bezvodého CH_2Cl_2 a ochlazeno na -10 °C v dusíkové atmosféře. Bylo přidáno 0,328 ml (4,46 mmol, 1,75 ekv.) methylsulfidu a reakce byla míchána po dobu 15 minut. Po kapkách byl přidáván roztok 1,87 g (2,55 mmol, 1,00 ekv.) 2'-O-benzoyl-6-O-allyl-3-deskladinosyl-15-methylerythromycinu A ve 13 ml bezvodého CH_2Cl_2 . Po 30 minutách bylo přidáno 0,355 ml (2,55 mmol, 1,00 ekv.) čerstvě destilovaného Et_3N a reakce byla

přivedena na 0 °C po dobu 30 minut. Reakční směs byla naředěna 400 ml EtOAc a promyta postupně po 100 ml saturovaného vodného NaHCO₃, vody a solanky. Organická vrstva byla usušena nad MgSO₄, filtrována, koncentrována a purifikována velmi rychlou chromatografií (9:1 směs hexanu a acetonu + 1% Et₃N) za vzniku 0,931 g (49,9%) požadovaného produktu jako bílé pevné látky. ES-LC/MS ukázala [M+H]⁺ = 719. ¹³C NMR (100,6 MHz, CDCl₃) δ 219,1, 206,1, 169,5, 165,3, 135,3, 132,7, 129,0, 129,7, 128,3, 117,4, 100,7, 78,5, 76,6, 75,3, 74,2, 72,1, 69,2, 69,0, 64,5, 63,7, 50,6, 45,3, 44,8, 40,7, 38,3, 37,8, 31,7, 31,0, 21,1, 20,2, 19,5, 18,1, 16,5, 14,5, 14,0, 12,6, 12,2.

D. 2'-O-benzoyl-6-O-allyl-3-deskladinosyl-3-oxo-11-O-methansulfonyl-15-methyl- erythromycin A

904 mg (1,24 mmol, 1,00 ekv.) 2'-O-benzoyl-6-O-allyl-3-deskladinosyl-3-oxo-15-methylerythromycinu A bylo rozpuštěno ve 4 ml čerstvě destilovaného pyridinu a ochlazeno na 0 °C. Po kapkách bylo přidáváno 0,478 ml (6,17 mmol, 5,00 ekv.) methansulfonylchloridu. Reakce byla ponechána zahřát se na teplotu místnosti a míchána přes noc. Směs byla naředěna 350 ml EtOAc a zastavena 100 ml saturovaného vodného NaHCO₃. Vrstvy byly odděleny a organická fáze byla promyta postupně po 100 ml vody a solanky. Organická fáze byla usušena nad MgSO₄, filtrována a koncentrována. Velmi rychlá chromatografie na silikagelu (4:1 směs hexanu a acetonu + 1% Et₃N) poskytla 741 mg (74,1%) požadované sloučeniny jako bílé pevné látky. ¹³C NMR (100,6 MHz, CDCl₃) δ 203,0, 168,9, 165,0, 137,6, 133,1, 130,3, 129,8, 128,5, 114,4, 108,8, 102,2, 91,1, 84,4, 81,6, 78,8, 72,2, 69,2, 64,3, 63,9, 52,1, 46,6, 45,8, 40,7, 38,8, 38,2, 35,9, 31,8, 30,9, 29,7, 24,8, 21,0, 19,6, 18,2, 15,5, 15,4, 13,8, 13,5.

E. 2'-O-benzoyl-6-O-allyl-3-deskladinosyl-3-oxo-10,11-anhydro-15-methylerythromycin A

705 mg (0,870 mmol, 1,00 ekv.) 2'-O-benzoyl-6-O-allyl-3-deskladinosyl-3-oxo-11-methansulfonyl-15-methylerythromycinu A bylo rozpuštěno ve 3 ml acetonu a po kapkách bylo přidáváno 0,651 ml (4,35 mmol, 5,00 ekv.) 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-enu. Reakce byla míchána při teplotě místnosti po dobu 6 hodin, a pak byla koncentrována. Velmi rychlá chromatografie na silikagelu (4:1 směs hexanu a acetonu + 1% Et₃N) poskytla 486 mg (78,0%) požadované sloučeniny jako bílé pevné látky. ¹³C NMR (100,6 MHz, CDCl₃) δ 210,1, 208,4, 170,2, 165,2, 141,0, 140,2, 136,3, 132,7, 130,4, 129,8, 128,2, 115,5, 100,6, 81,0, 78,7, 77,2, 73,8, 72,0, 69,1, 64,6, 63,3, 51,0, 47,4, 40,8, 39,4, 36,2, 31,9, 31,3, 23,6, 21,2, 21,1, 21,0, 19,4, 14,1, 13,9, 13,7, 13,1.

F. 11,12-cyklický karbamát 2'-O-benzoyl-6-O-allyl-11-amino-3-deskladinosyl-11-deoxy-3-oxo-15-methylerythromycinu A

227 mg (0,317 mmol, 1,00 ekv.) 2'-O-benzoyl-6-O-allyl-10,11-anhydro-3-deskladinosyl-3-oxo-15-methylerythromycinu A bylo rozpuštěno v 1,3 ml čerstvě destilovaného THF a ochlazeno na -15 °C v dusíkové atmosféře. Bylo přidáno 25 mg (0,634 mmol, 2,00 ekv.) hydridu sodného, 60% disperze v minerálním oleji, a reakce byla míchána po dobu 15 minut. Po kapkách byl přidáván roztok 140 mg (0,866 mmol, 3,00 ekv.) 1,1-karbonyldiimidazolu v 1,3 ml čerstvě destilovaného THF. Po míchání po dobu 30 minut byla reakce ponechána zahřát se na teplotu místnosti po dobu 1,5 hodiny. Směs byla naředěna 100 ml EtOAc a promyta postupně po 30 ml saturovaného vodného NaHCO₃, vody a solanky. Organická fáze byla usušena nad MgSO₄,

filtrována a koncentrována za vzniku 275 mg (100%) surového produktu, který byl rozpuštěn ve 2 ml ACN a 0,2 ml bezvodého THF. Byly přidány 2 ml saturovaného vodného hydroxidu amonného. Reakční nádoba byla uzavřena a míchána po dobu 2 dnů. Těkavé látky byly odstraněny za sníženého tlaku a zbytek byl opět rozpuštěn v 100 ml EtOAc. Roztok byl postupně promyt po 30 ml saturovaného vodného NaHCO₃, vody a solanky. Organická fáze byla usušena nad MgSO₄, filtrována a koncentrována. Velmi rychlá chromatografie surového produktu (4:1 směs hexanu a acetonu + 1% Et₃N) poskytla 184 mg (76,5%) požadovaného produktu.

Příklad 15

Příprava sloučenin vzorce I, kde R⁶ je skupina YZ, kde Y je skupina -CH₂-CH=CH- a Z jsou různé heteroarylové skupiny.

Příprava A: vzorec (I): X = atom H, R^a je skupina -CH-CH=CH- (3-chinolyl)

40 mg (0,0528 mmol, 1,0 ekv.) 11,12-cyklického karbamátu 2'-O-benzoyl-6-O-allyl-11-amino-3-deskladinosyl-11-deoxy-3-oxo-15-methylerythromycinu A, 14 mg (0,014 mmol, 0,5 ekv.) aduktu chloroformu a tris(dibenzylidenaceton)dipalladia (0), 17 mg (0,055 mmol, 1,0 ekv.) tri-*o*-tolylfosfinu a 72 μl (0,53 mmol, 10 ekv.) 3-bromchinolinu bylo vloženo do baňky s kulatým dnem, která byla naplněna N₂. Byl přidán 1 ml odplyněného acetonitrilu a 0,015 ml (0,11 mmol, 2,0 ekv.) čerstvě destilovaného Et₃N. Reakce byla zahřívána k varu pod zpětným chladičem po dobu 63 hodin. Směs byla ponechána zahřát se na teplotu místnosti a naředěna 40 ml EtOAc. Roztok byl promyt postupně po 10 ml saturovaného vodného NaHCO₃, vody a solanky.

Organická fáze byla usušena nad MgSO_4 , filtrována a koncentrována. Velmi rychlá chromatografie surového produktu (gradient 5:1 až 2:1 směsi hexanu a acetonu + 1% Et) poskytla 34 mg požadovaného produktu.

34 mg výše uvedeného produktu bylo rozpuštěno v 1 ml methanolu, nádoba byla uzavřena a zahřívána k varu pod zpětným chladičem v 80 °C po dobu 16 hodin. Těkavé látky byly odstraněny za sníženého tlaku. Velmi rychlá chromatografie (1:1 směs hexanu a acetonu + 1% Et_3N) poskytla ve dvou krocích 25 mg (61%) požadovaného produktu jako světležluté pevné látky. ES-LC/MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 780,5$. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 217,44, 205,37, 169,48, 157,69, 149,71, 147,61, 132,51, 129,96, 129,56, 129,15, 129,05, 128,49, 128,05, 126,70, 102,90, 83,42, 78,71, 76,42, 75,91, 70,22, 69,53, 65,83, 64,31, 58,12, 50,81, 46,29, 46,12, 45,05, 40,18 (2 C), 39,05, 37,31, 31,64, 28,19, 21,15, 20,18, 19,43, 18,05, 14,38, 14,11, 13,76, 13,63 (2 C).

Příprava B: vzorec (I): X = atom H, R^a je skupina $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ (3-(6-fluorchinolyl))

Tato sloučenina byla připravena podle způsobu přípravy A s použitím 3-brom-6-fluorchinolinu namísto 3-bromchinolinu. ES-LC/MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 798,5$. ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 217,49, 205,36, 169,54, 160,6 ($J_{\text{CF}} = 248$ Hz), 157,68, 149,05, 144,69, 131,84, 131,64 ($J_{\text{CF}} = 9$ Hz), 130,28, 129,63, 129,31, 128,7 ($J_{\text{CF}} = 10$ Hz), 119,20 ($J_{\text{CF}} = 27$ Hz), 110,87 ($J_{\text{CF}} = 22$ Hz), 102,94, 83,42, 78,77, 76,44, 75,91, 70,22, 69,55, 65,84, 64,24, 58,09, 50,83, 46,36, 46,06, 45,05, 40,18 (2 C) 39,04, 37,32, 31,63, 28,19, 21,16, 20,19, 19,46, 18,04, 14,37, 14,18, 13,76, 13,62 (2 C).

Příprava C: vzorec (I): X = atom H, R^a je skupina -CH₂-CH=CH-(3-(6-chlorchinolyl))

Tato sloučenina byla připravena podle způsobu přípravy A s použitím 3-brom-6-chlorchinolinu namísto 3-bromchinolinu. ES-LC/MS: [M+H]⁺ = 814,5. ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 217,48, 205,35, 169,55, 157,67, 149,90, 145,92, 132,42, 131,49, 130,80, 130,44, 129,92, 129,49, 129,46, 128,71, 126,57, 102,94, 83,41, 78,78, 76,45, 75,91, 70,22, 69,54, 65,83, 64,23, 58,07, 50,83, 46,39, 45,99, 45,04, 40,17 (2 C), 39,03, 37,32, 31,62, 31,53, 28,18, 21,16, 20,17, 19,49, 18,04, 14,36, 14,21, 13,76, 13,61 (2 C).

Příprava D: vzorec (I): X = atom H, R^a je skupina -CH₂-CH=CH-(4-isochinolyl)

Tato sloučenina byla připravena podle způsobu přípravy A s použitím 4-bromisochinolinu namísto 3-bromchinolinu. ES-LC/MS: [M+H]⁺ = 781. ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 217,19, 205,43, 169,75, 157,39, 152,07, 140,74, 133,61, 130,65, 130,44, 128,07, 127,72, 127,05, 126,89, 122,77, 102,85, 83,28, 78,74, 75,72, 70,22, 69,51, 65,88, 64,45, 58,10, 50,91, 46,07, 45,09, 40,18 (2 C) 38,99, 37,34, 31,48, 29,66, 28,28, 21,18, 20,39, 19,33, 14,53, 14,01, 13,86, 13,66, 13,62.

Příprava E: vzorec (I): X = atom H, R^a je skupina -CH₂-CH=CH-(3-pyridyl)

Tato sloučenina byla připravena podle způsobu přípravy A s použitím 3-brompyridinu namísto 3-bromchinolinu. LC/MS: [M+H]⁺ = 731. ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 217,39, 205,27, 169,50, 157,61, 148,81, 148,68, 132,63, 132,16, 129,65, 128,18, 123,46, 102,91, 83,36, 78,63, 76,35, 75,79, 70,20,

69,52, 65,83, 64,17, 58,06, 50,78, 46,28, 45,03, 40,16 (2 C),
38,96, 37,29, 31,64, 31,52, 28,19, 22,58, 21,14, 20,21, 19,42,
18,04, 1,35, 14,12, 14,05, 13,79, 13,61 (2 C).

Příprava F: vzorec (I): X = atom H, R^a je skupina -CH₂-CH=CH-
(3-(6-methylchinolyl))

Tato sloučenina byla připravena podle způsobu přípravy A
s použitím 3-brom-6-methylchinolinu namísto 3-bromchinolinu.
ES-LC/MS: [M+H]⁺ = 795. ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 217,37,
205,35, 169,47, 157,65, 148,82, 146,23, 136,45, 131,87,
131,37, 130,09, 129,51, 128,78, 128,22, 128,06, 126,86,
102,87, 83,40, 78,68, 75,91, 70,20, 69,47, 65,83, 64,33,
58,11, 50,81, 46,28, 45,04, 40,15 (2 C), 39,05, 37,31, 31,64,
28,24, 21,52, 21,14, 20,18, 19,45, 18,05, 14,38, 14,11, 13,77,
13,63 (2 C).

Příprava G: vzorec (I): X = atom H, R^a je skupina -CH₂-CH=CH-
(3-(6-aminochinolyl))

Tato sloučenina byla připravena podle způsobu přípravy A
s použitím 3-brom-6-aminochinolinu namísto 3-bromchinolinu.
ES-LC/MS: [M+H]⁺ = 796.

Příprava H: vzorec (I): X = atom H, R^a je skupina -CH₂-CH=CH-
(3-(5-isoxazol-3-yl)thienyl)

Tato sloučenina byla připravena podle způsobu přípravy A
s použitím 5-(isoxazol-3-yl)-2-bromthiofenu namísto 3-brom-
chinolinu.

Příprava I: vzorec (I): X = atom H, R^a je skupina -CH₂-CH=CH-
(6-chinolyl)

Tato sloučenina byla připravena podle způsobu přípravy A
s použitím 6-bromchinolinu namísto 3-bromchinolinu.

Příprava J: vzorec (I): X = atom H, R^a je skupina -CH₂-CH=CH-
(3-chinoxal-6-yl)

Tato sloučenina byla připravena podle způsobu přípravy A
s použitím 6-bromchinoxalinu namísto 3-bromchinolinu.

Příprava K: vzorec (I): X = atom H, R^a je skupina -CH₂-CH=CH-
(5-(N-(2-pyridyl)-2-furamidyl)

Tato sloučenina byla připravena podle způsobu přípravy A
s použitím N-(2-pyridyl)-5-brom-2-furamidu namísto 3-brom-
chinolinu.

Příprava L: vzorec (I): X = atom H, R^a je skupina -CH₂-CH=CH-
(1,8-naftyridin)

Tato sloučenina byla připravena podle způsobu přípravy A
s použitím 3-Br-1,8-naftyridinu namísto 3-bromchinolinu.

Příprava M: vzorec (I): X = atom H, R^a je skupina -CH₂-CH=CH-
(1,5-naftyridin)

Tato sloučenina byla připravena podle způsobu přípravy A
s použitím 3-Br-1,5-naftyridinu namísto 3-bromchinolinu.

Příprava N: vzorec (I): X = atom H, R^a je skupina -CH₂-CH=CH-
(1,6-naftyridin)

Tato sloučenina byla připravena podle způsobu přípravy A s použitím 3-Br-1,6-naftyridinu namísto 3-bromchinolinu.

Příprava O: vzorec (I): X = atom H, R^a je skupina -CH₂-CH=CH-(6-purinylyl)

Tato sloučenina byla připravena podle způsobu přípravy A s použitím 6-Br-purinu namísto 3-bromchinolinu.

Příprava P: vzorec (I): X = atom H, R^a je skupina -CH₂-CH=CH-2-(tetrazol-5-yl)fenyl)

Tato sloučenina byla připravena podle způsobu přípravy A s použitím 5-(2-bromfenyl)tetrazolu) namísto 3-bromchinolinu.

Příprava O: vzorec (I): X = atom H, R^a je skupina -CH₂-CH=CH-(3-(isoxazol-5-yl)-4-methoxyfenyl)

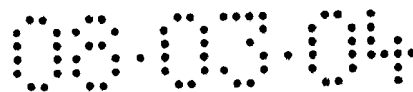
Tato sloučenina byla připravena podle způsobu přípravy A s použitím 5-(5-brom-2-methoxyfenyl)isoxazolu namísto 3-bromchinolinu.

Příprava R: vzorec (I): X = atom H, R^a je skupina -CH₂-CH=CH-(uracil-5-yl)

Tato sloučenina byla připravena podle způsobu přípravy A s použitím 5-bromuracilu namísto 3-bromchinolinu.

Příprava S: vzorec (I): X = atom H, R^a je skupina -CH₂-CH=CH-CH=CH-(uracil-5-yl)

Tato sloučenina byla připravena podle způsobu přípravy A s použitím 5-(2-bromvinyl)uracilu) namísto 3-bromchinolinu.



Příprava T: vzorec (I): X = atom H, R^a je skupina -CH₂-CH=CH-
(3-(6-methoxychinolyl))

Tato sloučenina byla připravena podle způsobu přípravy A s použitím 3-brom-6-methoxychinolinu namísto 3-bromchinolinu.

Příprava U: vzorec (I): X = atom H, R^a je skupina -CH₂-CH=CH-
(5-chinolyl)

Tato sloučenina byla připravena podle způsobu přípravy A s použitím 5-bromchinolinu namísto 3-bromchinolinu.

Příprava V: vzorec (I): X = atom H, R^a je skupina -CH₂-CH=CH-
(7-chinolyl)

Tato sloučenina byla připravena podle způsobu přípravy A s použitím 7-bromchinolinu namísto 3-bromchinolinu.

2-fluorované deriváty sloučenin vytvořených v přípravách A až S

Odpovídající 2-fluorované deriváty sloučenin popsaných v přípravách A až S mohou být připraveny počínaje s 11,12-cyklickým karbamátem 2'-O-benzoyl-6-O-allyl-11-amino-3-deskladinosyl-11-deoxy-3-oxo-2-fluor-15-methylerythromycinu A namísto 11,12-cyklického karbamátu 2'-O-benzoyl-6-O-allyl-11-amino-3-deskladinosyl-11-deoxy-3-oxo-15-methylerythromycinu A v příslušných přípravách. Názorný příklad NMR dat pro 2-fluorované deriváty je 2-fluorovaný protějšek sloučeniny vytvořené v přípravě A, kde R^a je skupina -CH₂-CH=CH- (3-chinolyl). LC/MS: [M+H]⁺ = 798,6. ¹⁹F NMR (CDCl₃, 376 MHz): δ -163,93. ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 217,97, 204,28 (J_{CF} = 27

Hz), 165,62 ($J_{CF} = 23$ Hz), 157,18, 149,71, 147,70, 132,65, 130,25, 129,53, 129,22, 129,12, 129,06, 128,15, 128,08, 126,78, 104,10, 98,02 ($J_{CF} = 206$ Hz), 83,40, 79,59, 79,37, 77,57, 70,41, 69,74, 65,85, 64,36, 58,11, 44,23, 40,83 ($J_{CF} = 1,5$ Hz), 40,25 (2 C), 39,04, 37,45, 31,37, 28,16, 25,30 ($J_{CF} = 22$ Hz), 21,19, 20,86, 19,54, 17,67, 15,46 ($J_{CF} = 1,7$ Hz), 13,82, 13,80, 13,29.

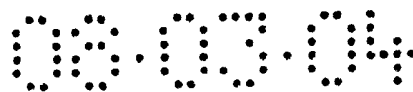
Propylové deriváty sloučenin vytvořených v přípravách A až S (kde Y je propylová skupina)

Odpovídající sloučeniny, kde propenylová skupina je redukována na propylovou skupinu mohou být připraveny tak, jak je uvedeno dále. Kterákoliv ze sloučenin vytvořených v přípravách A až S (včetně jejich C-2 fluorovaných protějšků) byla rozpuštěna ve 100 ml směsi 2:1 methanolu a ethylacetátu. Směs byla naplněna dusíkem a bylo přidáno 150 mg 10 % palladia na uhlí. Dusíková atmosféra byla nahrazena vodíkovou atmosférou a suspenze byla důkladně míchána při tlaku 101,325 kPa (1 atm) H_2 . Reakce byla monitorována chromatografií na tenké vrstvě a když byla ukončena, byla filtrována a koncentrována do sucha. Produkt byl purifikován chromatografií na silikagelu.

Příklad 16

Příprava 11,12-cyklického karbamátu 2'-O-benzoyl-6-O-propargyl-11-amino-3-deskladinosyl-11-deoxy-3-oxo-15-methylerythromycinu A

A. 6-O-propargyl-15-methylerythromycin A



Roztok 100 mg 2',4''-bis-O-trimethylsilyl-15-methylerythro-mycin A-9-[O-(1-isopropoxycyklohexyl)]oximu v 0,1 ml tetrahydrofuranu, 0,1 ml etheru a 0,1 ml DMSO byl ochlazen na 10 °C a podroben působení 0,028 ml 3-brom-1-(trimethylsilyl)-1-propynu v inertní atmosféře. Byla přidána směs 0,19 ml methylsulfoxidu a 1,0 M terc-butoxidu draselného v 0,38 ml tetrahydrofuranu rychlostí 2,0 molárních ekvivalentů bází za hodinu. Po 0,5 a 1 hodině bylo přidáno dalších 0,014 ml ekvivalentu TMS-propargylbromidu. Reakce byla monitorována chromatografií na tenké vrstvě (silikagel, 10:1 směs toluenu a acetonu) a byla považována za ukončenou po přidání 2,3 molárních ekvivalentů bází. Reakce byla naředěna 100 ml ethylacetátu a 30 ml saturovaného NaHCO₃ a promyta postupně saturovaným NaHCO₃, vodou a solankou. Organická fáze byla usušena nad MgSO₄, filtrována a evaporována. Surový produkt byl podroben chromatografii na silikagelu (40:1 směs hexanu a acetonu + 1% Et₃N) za zisku částečně purifikovaného 6-O-(3-trimethylsilyl)propargyl-2',4''-bis-O-trimethylsilyl-15-methylerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxycyklohexyl)]oximu.

Roztok 0,88 g nečistého 6-O-(3-trimethylsilyl)propargyl-2',4''-bis-O-trimethylsilyl-15-methylerythromycin A-9-[O-(1-isopropoxycyklohexyl)]oximu uvedeného výše ve 4,4 ml acetonitrilu byl podroben působení 2,2 ml vody a 2,5 ml octové kyseliny a míchán po dobu 24 hodin při teplotě místnosti. Směs byla koncentrována po přidání 2-propanolu, a pak opakovaně po přidání toluenu. Tato látka byla míchána s uhličitanem draselným a 6 ml methanolu po dobu 2,5 hodiny. Směs byla naředěna 200 ml ethylacetátu a promyta postupně saturovaným NaHCO₃, vodou a solankou. Organická fáze byla usušena nad MgSO₄, filtrována a evaporována za zisku produktu.

Roztok výsledného produktu a 0,59 g hydrosulfitu sodného v 7 ml 1:1 směsi ethanolu a vody byl vložen do inertní

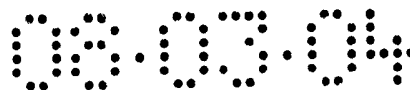
atmosféry. Po kapkách bylo přidáváno 0,096 ml mravenčí kyseliny a směs byla míchána v 80 °C po dobu 5 hodin. Po ochlazení na teplotu místnosti byla reakce upravena na pH 10 s 6N NaOH a třikrát extrahována 150 ml porcemi ethylacetátu. Organické extrakty byly spojeny a postupně promyty saturovaným NaHCO₃, vodou a solankou. Organická fáze byla usušena nad MgSO₄, filtrována a evaporována za zisku 6-O-propargyl-15-methylerythromycinu A vhodného pro další konverzi. Čistá látka může být připravena chromatografií na silikagelu.

B. 6-O-propargyl-3-deskladinosyl-15-methylerythromycin A

Směs 0,40 g 6-O-propargyl-15-methylerythromycinu A a 6 ml 0,6N HCl byla míchána při teplotě místnosti po dobu 17 hodin. pH bylo upraveno na 9 přidáním 6N NaOH a bylo přidáno 150 ml ethylacetátu. Organické extrakty byly postupně promyty saturovaným NaHCO₃, vodou a solankou, pak usušeny nad MgSO₄, filtrovány a evaporovány za vzniku dalšího produktu. Surový produkt byl podroben chromatografii na silikagelu za vzniku čistého 6-O-propargyl-3-deskladinosyl-15-methylerythromycinu A.

C. 2'-O-benzoyl-6-O-propargyl-3-deskladinosyl-15-methylerythromycin A

Roztok 0,16 g 6-O-propargyl-3-deskladinosyl-15-methylerythromycinu A a 0,12 g anhydridu kyseliny benzoové v 1,3 ml ethylacetátu byl míchán po dobu 17 hodin, pak byl postupně promyt saturovaným NaHCO₃, vodou a solankou. Roztok byl usušen nad MgSO₄, filtrován a evaporován. Surový produkt byl podroben chromatografii na silikagelu za zisku 2'-O-benzoyl-6-O-propargyl-3-deskladinosyl-15-methylerythromycinu A.



D. 2'-O-benzoyl-6-O-propargyl-3-deskladinosyl-3-oxo-15-methylerythromycin A

0,510 g (3,82 mmol, 1,50 ekv.) N-chlorsukcinimidu bylo rozpuštěno v 13 ml bezvodého CH_2Cl_2 a ochlazeno na $-10\text{ }^\circ\text{C}$ v dusíkové atmosféře. Bylo přidáno 0,328 ml (4,46 mmol, 1,75 ekv.) methylsulfidu a reakce byla míchána po dobu 15 minut. Po kapkách byl přidáván roztok 1,87 g (2,55 mmol, 1,00 ekv.) 2'-O-benzoyl-6-O-propargyl-3-deskladinosyl-15-methylerythromycinu A v 13 ml bezvodého CH_2Cl_2 . Po 30 minutách bylo přidáno 0,355 ml (2,55 mmol, 1,00 ekv.) čerstvě destilovaného Et_3N a reakce byla přivedena na $0\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 30 minut. Reakční směs byla naředěna 400 ml EtOAc a promyta postupně po 100 ml saturovaného vodného NaHCO_3 , vody a solanky. Organická vrstva byla usušena nad MgSO_4 , filtrována, koncentrována a purifikována chromatografií.

E. 2'-O-benzoyl-6-O-propargyl-3-deskladinosyl-3-oxo-11-O-methansulfonyl-15-methylerythromycin A

904 mg 2'-O-benzoyl-6-O-propargyl-3-deskladinosyl-3-oxo-15-methylerythromycinu A bylo rozpuštěno ve 4 ml čerstvě destilovaného pyridinu a ochlazeno na $0\text{ }^\circ\text{C}$. Po kapkách bylo přidáváno 0,478 ml (6,17 mmol, 5,00 ekv.) methansulfonylchloridu. Reakce byla ponechána zahřát se na teplotu místnosti a míchána přes noc. Směs byla naředěna 350 ml EtOAc a zastavena 100 ml saturovaného vodného NaHCO_3 . Vrstvy byly odděleny a organická fáze byla promyta postupně po 100 ml vody a solanky. Organická fáze byla usušena nad MgSO_4 , filtrována a koncentrována. Velmi rychlá chromatografie na silikagelu poskytla produkt.

F. 2'-O-benzoyl-6-O-propargyl-3-deskladinosyl-3-oxo-10,11-anhydro-15-methyl- erythromycin A

705 mg 2'-O-benzoyl-6-O-propargyl-3-deskladinosyl-3-oxo-11-methansulfonyl-15-methylerythromycinu A bylo rozpuštěno ve 3 ml acetonu a po kapkách bylo přidáváno 0,651 ml (4,35 mmol, 5,00 ekv.) 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-enu. Reakce byla míchána při teplotě místnosti po dobu 6 hodin, a pak byla koncentrována. Velmi rychlá chromatografie na silikagelu poskytla produkt.

G. 11,12-cyklický karbamát 2'-O-benzoyl-6-O-propargyl-11-amino-3-deskladinosyl-11-deoxy-3-oxo-15- methylerythromycinu A

227 mg 2'-O-benzoyl-6-O-propargyl-10,11-anhydro-3-deskladinosyl-3-oxo-15-methylerythromycinu A bylo rozpuštěno v 1,3 ml čerstvě destilovaného THF a ochlazeno na -15 °C v dusíkové atmosféře. Bylo přidáno 25 mg (0,634 mmol, 2,00 ekv.) hydridu sodného, 60% disperze v minerálním oleji, a reakce byla míchána po dobu 15 minut. Po kapkách byl přidáván roztok 140 mg 1,1-karbonyldiimidazolu v 1,3 ml čerstvě destilovaného THF. Po míchání po dobu 30 minut byla reakce ponechána zahřát se na teplotu místnosti po dobu 1,5 hodiny. Směs byla naředěna 100 ml EtOAc a promyta postupně po 30 ml saturovaného vodného NaHCO₃, vody a solanky. Organická fáze byla usušena nad MgSO₄, filtrována a koncentrována, a pak byl zbytek rozpuštěn ve 2 ml ACN a 0,2 ml bezvodého THF. Byly přidány 2 ml saturovaného vodného hydroxidu amonného. Reakční nádoba byla uzavřena a míchána po dobu 2 dnů. Těkavé látky byly odstraněny za sníženého tlaku a zbytek byl opět rozpuštěn ve 100 ml EtOAc. Roztok byl promyt postupně po 30 ml saturovaného vodného NaHCO₃, vody a solanky. Organická fáze byla usušena nad MgSO₄, filtrována a koncentrována. Velmi rychlá chromatografie poskytla produkt, cyklický karbamát.

Příklad 17

Syntéza sloučeniny vzorce (I): X = atom H, R⁶ = skupina O-3-(chinolin-3-yl)prop-2-ynyl

Příprava A: vzorec (I): X = atom H, R^a je skupina -CH₂-CC-(3-chinolyl)

Krok 1: 40 mg 11,12-cyklického karbamátu 2'-O-benzoyl-6-O-propargyl-11-amino-3-deskladinosyl-11-deoxy-3-oxo-15-methylerythromycinu A, 14 mg aduktu chloroformu a tris(dibenzylidenacetone)dipalladia (0), 17 mg tri-o-tolylfosfinu, jodidu mědi a 72 μ l (0,53 mmol, 10 ekv.) 3-bromchinolinu bylo vloženo do baňky s kulatým dnem, která byla naplněna N₂. Byla přidána 1 ml odplyněného acetonitrilu a 0,015 ml (0,11 mmol, 2,0 ekv.) čerstvě destilovaného Et₃N. Reakce byla zahřívána k varu pod zpětným chladičem po dobu 63 hodin. Směs byla ponechána zahřát se na teplotu místnosti a naředěna 40 ml EtOAc. Roztok byl promyt postupně po 10 ml saturovaného vodného NaHCO₃, vody a solanky. Organická fáze byla usušena nad MgSO₄, filtrována a koncentrována. Velmi rychlá chromatografie poskytla požadovaný produkt.

Krok 2: Výše uvedený produkt byl rozpuštěn v 1 ml methanolu, uzavřen a zahříván k varu pod zpětným chladičem v 80 °C po dobu 16 hodin. Těkavé látky byly odstraněny za sníženého tlaku. Velmi rychlá chromatografie poskytla požadovaný produkt.

Příprava sloučenin vzorce I, kde R^6 je skupina YZ, kde Y je propynylová skupina.

2-hydrogenované deriváty a 2-fluorované deriváty těchto sloučenin byly připraveny analogicky tak, jak bylo popsáno v přípravě A kromě toho, že byl použit vhodný halogenovaný heterocyklus namísto 3-bromchinolinu. Odpovídající sloučeniny, kde Y je propylová skupina, mohou také být připraveny z těchto sloučenin (včetně C-2 fluorovaných protějšků) redukcí propynylové skupiny, jak bylo popsáno v příkladu 15. Provedení s dalšími skupinami v R^{13} mohou být připravena podobným způsobem, jak bylo popsáno v tomto příkladu a příkladu 15.

Příklad 18

Syntéza 5-O-(2'-acetyldesosaminy)-10,11-anhydro-3,6-dideoxy-3-oxo-14-norerythronolidu A

Příprava A: 5-O-desosaminy-10,11-anhydro-6-deoxy-14-norerythronolid A

0,5 g směsi 6-deoxy-14-norerythromycinů A, B, C a D pocházejících z fermentace bylo rozpuštěno v 6 ml dichlormethanu a podrobena působení 0,144 ml chlortrimethylsilanu a 0,20 ml 1-trimethylsilylimidazolu. Po 10 minutách byla reakce podrobena působení 1N NaOH a byla třikrát extrahována dichlormethanem. Organické extrakty byly spojeny, promyty saturovaným NaCl, usušeny nad $MgSO_4$, filtrovány a evaporovány za zisku pěnivé látky. Tato látka byla rozpuštěna v 5 ml tetrahydrofuranu a podrobena působení 0,45 g 1,1'-karbonyldimidazolu a 50 mg hydridu sodného, 60% disperze v oleji promytá hexanem. Směs byla zahřívána v 70 °C

po dobu 1 hodiny, a pak byla ochlazená a podrobena působení 1N NaOH a extrahována třikrát ethylacetátem. Organické extrakty byly spojeny, promyty saturovaným NaCl, usušeny nad MgSO₄, filtrovány a evaporovány do sucha. Výsledný směr produktů byla rozpuštěna v 0,5 ml ethanolu a podrobena působení 1 ml 2% HCl ve vodě, aby se odštěpily 3-O-glykosylové skupiny. Produkt byl získán chromatografií. Hmotová spektrometrie poskytla $[M+H]^+ = 559$.

Příprava B: 5-O-(2'-acetyldesosaminy)-10,11-anhydro-6-deoxy-14-norerythronolid A

Roztok 0,5 g 5-O-desosaminy-10,11-anhydro-6-deoxy-14-norerythronolidu A v 10 ml acetonu byl podroben působení 0,10 ml acetanhydridu a 0,15 g uhličitanu draselného při teplotě místnosti po dobu 24 hodin, filtrován a koncentrován do sucha za zisku produktu. Hmotová spektrometrie poskytla $[M+H]^+ = 601$.

Příprava C: 5-O-(2'-acetyldesosaminy)-10,11-anhydro-3,6-dideoxy-3-oxo-14-nor-erythronolid A

Roztok 0,5 g 5-O-(2'-acetyldesosaminy)-10,11-anhydro-6-deoxy-14-norerythronolidu A a 1,0 g hydrochloridu 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylkarbodiimidu v 10 ml dichlormethanu byl podroben působení 1,0 ml methylsulfoxidu a ochlazen na 5 °C. Po kapkách byl přidáván roztok 1,0 g pyridiniumtrifluoracetátu v 10 ml dichlormethanu a směs byla míchána v 5 °C po dobu 2 hodin. Směs byla naředěna ethylacetátem, promyta vodou a saturovaným NaCl, a pak usušena nad MgSO₄, filtrována a evaporována do sucha. Produkt byl purifikován chromatografií. Hmotová spektrometrie poskytla $[M+H]^+ = 599$.

Příklad 19

Syntéza 5-O-(2'-acetyldesosaminyl)-10,11-anhydro-3,6-dideoxy-3-oxo-14,15-dehydroerythronolidu A

Příprava A: 5-O-desosaminyl-10,11-anhydro-6-deoxy-14,15-dehydroerythronolid A

0,5 g směsi 6-deoxy-14,15-dehydroerythromycinů A, B, C a D pocházejících z fermentace byla rozpuštěna v 6 ml dichlormethanu a podrobena působení 0,144 ml chlortrimethylsilanu a 0,20 ml 1-trimethylsilylimidazolu. Po 10 minutách byla reakce podrobena působení 1N NaOH a byla třikrát extrahována dichlormethanem. Organické extrakty byly spojeny, promyty saturovaným NaCl, usušeny nad MgSO₄, filtrovány a evaporovány za zisku pěnivé látky. Tato látka byla rozpuštěna v 5 ml tetrahydrofuranu a podrobena působení 0,45 g 1,1'-karbonyldimidazolu a 50 mg hydridu sodného, 60% disperze v oleji, promyté hexanem. Směs byla zahřívána v 70 °C po dobu 1 hodiny, a pak byla ochlazena a podrobena působení 1N NaOH a třikrát extrahována ethylacetátem. Organické extrakty byly spojeny, promyty saturovaným NaCl, usušeny nad MgSO₄, filtrovány a evaporovány do sucha. Výsledná směs produktů byla rozpuštěna v 0,5 ml ethanolu a podrobena působení 1 ml 2% HCl ve vodě, aby se odštěpily 3-O-glykosylové skupiny. Produkt byl získán chromatografií.

Příprava B: 5-O-(2'-acetyldesosaminyl)-10,11-anhydro-6-deoxy-14,15-dehydroerythronolid A

Roztok 0,5 g 5-O-desosaminyl-10,11-anhydro-6-deoxy-14,15-dehydroerythronolidu A v 10 ml acetonu byl podroben působení

0,10 ml acetanhydridu a 0,15 g uhličitanu draselného při teplotě místnosti po dobu 24 hodin, filtrován a koncentrován do sucha za zisku produktu.

Příprava C: 5-O-(2'-acetyldesosaminyl)-10,11-anhydro-3,6-dideoxy-3-oxo-14,15-dehydroerythronolid A

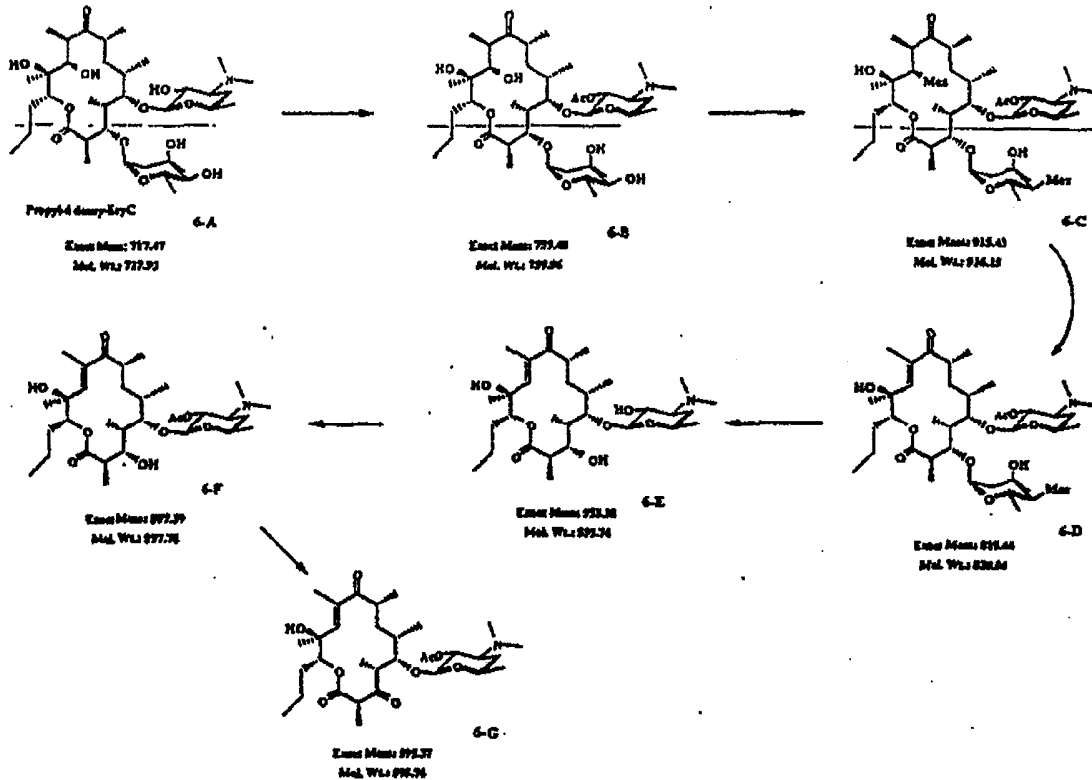
Roztok 0,5 g 5-O-(2'-acetyldesosaminyl)-10,11-anhydro-6-deoxy-14,15-dehydroerythronolidu A a 1,0 g hydrochloridu 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylkarbodiimidu v 10 ml dichlormethanu byl podroben působení 1,0 ml methylsulfoxidu a ochlazen na 5 °C. Po kapkách byl přidáván roztok 1,0 g pyridiniumtrifluoracetátu v 10 ml dichlormethanu a směs byla míchána v 5 °C po dobu 2 hodin. Směs byla naředěna ethylacetátem, promyta vodou a saturovaným NaCl, pak usušena nad MgSO₄, filtrována a evaporována do sucha. Produkt byl purifikován chromatografií.

Příklad 20

Syntéza 5-O-(2'-acetyldesosaminyl)-10,11-anhydro-3,6-dideoxy-3-oxo-15-methylerythronolidu A

Tento příklad je jedno provedení přípravy 3-oxo-10,11-anhydroprekurzoru erythromycinové sloučeniny, které chybí C-6 hydroxylová skupina, který byl použit pro přípravu 3-keto-11,12 karbamátových derivátů. Schéma 6 ilustruje tento protokol pro 6-deoxy-13-propylerythromycin C.

Schéma 6



Krok 1:

K roztoku 220 mg (0,307 mmol) sloučeniny 6-A v 5 ml dichlormethanu bylo přidáno 50 mg uhličitanu draselného a 100 μ l (0,9 mmol) acetanhydridu a reakce byla míchána při teplotě místnosti po dobu 16 hodin. Roztok byl filtrován, bylo přidáno 25 ml 1N hydroxidu sodného a 25 ml solanky a vodná vrstva byla 6-krát extrahována ethylacetátem. Spojené organické vrstvy byly usušeny nad sulfátem sodným, filtrovány a rozpouštědlo bylo odstraněno ve vakuu. Surový produkt 6-B byl přenesen do příštího kroku.

Krok 2:

Sloučenina 6-B, surový produkt z reakce 1, byla rozpuštěna v 5 ml pyridinu a bylo přidáno 70 μ l (0,9 mmol) mesylchloridu. Reakce byla míchána v -20 °C po dobu 2 dnů, nalita na 25 ml 1N hydroxidu sodného a 25 ml solanky a vodná vrstva byla 6-krát extrahována ethylacetátem. Spojené organické vrstvy byly usušeny nad sulfátem sodným, filtrovány a rozpouštědlo bylo odstraněno ve vakuu. Zbytek byl purifikován chromatografií na silikagelu (směs toluenu a acetonu = 3:1,1% hydroxid amonný) za zisku 190 mg (68%, ve dvou krocích) sloučeniny 6-C.

Krok 3:

190 mg (0,21 mmol) sloučeniny 6-C bylo rozpuštěno v 7 ml acetonu a bylo přidáno 63 μ l (0,42 mmol) DBU a reakce byla míchána při teplotě místnosti přes noc. Směs byla nalita na 25 ml 1N hydroxidu sodného a 25 ml solanky a vodná vrstva byla 6-krát extrahována ethylacetátem. Spojené organické vrstvy byly usušeny nad sulfátem sodným, filtrovány a rozpouštědlo bylo odstraněno ve vakuu. Surový produkt 6-D byl přenesen do příštího kroku.

Krok 4:

Ke sloučenině 6-D, surovému produktu z předešlého kroku, bylo přidáno 30 ml 3N chlorovodíkové kyseliny a 2 ml ethanolu a směs byla důkladně míchána po dobu 6 hodin. Bylo přidáno 5 ml 10N hydroxidu sodného a vodná vrstva byla 6-krát extrahována ethylacetátem. Spojené organické vrstvy byly usušeny nad sulfátem sodným, filtrovány a rozpouštědlo bylo odstraněno ve vakuu. Surový produkt 6-E byl přenesen do příštího kroku.

Krok 5:

Ke sloučenině 6-E, surovému produktu z předešlého kroku, v 5 ml dichlormethanu bylo přidáno 50 μ l (0,45 mmol) acetanhydridu a 100 mg uhličitanu draselného a směs byla důkladně míchána po dobu 9 hodin. Reakce byla filtrována, bylo přidáno 20 ml 1N hydroxidu sodného a 25 ml solanky a vodná vrstva byla 6-krát extrahována ethylacetátem. Spojené organické vrstvy byly usušeny nad sulfátem sodným, filtrovány a rozpouštědlo bylo odstraněno ve vakuu. Zbytek byl purifikován chromatografií na silikagelu (směs toluenu a acetonu = 3:1,1 % hydroxid amonný) za zisku 110 mg (89%, ve třech krocích) sloučeniny 6-F.

Krok 6:

110 mg (0,184 mmol) sloučeniny 6-F bylo rozpuštěno v 10 ml dichlormethanu a bylo přidáno 220 mg (0,53 mmol) Dess-Martinova činidla. Reakce byla míchána při teplotě místnosti po dobu 45 minut. Reakce byla zastavena 20 ml 1N hydroxidu sodného a 25 ml solanky a vodná vrstva byla 6-krát extrahována ethylacetátem. Spojené organické vrstvy byly usušeny nad sulfátem sodným, filtrovány a rozpouštědlo bylo odstraněno ve vakuu. Zbytek byl purifikován chromatografií na silikagelu (směs toluenu a acetonu, gradient = 6:1 až 3:1,1% hydroxid amonný) za zisku 94 mg (86%) sloučeniny 6-G. Sloučenina 6-G může být použita pro přípravu odpovídajících 11,12 karbamátových derivátů, jak bylo popsáno dříve.

Příklad 21

Syntéza 1-(4-amino-2-butenyl)-1H-imidazo[4,5-b]pyridinu

Příprava A: (E)-N-(4-brom-2-butenyl)ftalimid

Roztok 23 g (107,9 mmol) 1,4-dibrom-2-butenu a 16,39 g (118,7 mmol) uhličitanu draselného v 50 ml DMF byl při teplotě místnosti podroben působení 10 g (53,9 mmol) ftalimidu draselného. Po 10 minutách byla reakční směs ponechána za míchání po dobu 24 hodin, filtrována a koncentrována ve vakuu. Výsledný olej byl naředěn 200 ml ethylacetátu, promyt 2 x 100 ml saturovaného vodného jednosytného fosforečnanu sodného, usušen (MgSO_4) a koncentrován ve vakuu za vzniku rudého oleje. Purifikace velmi rychlou chromatografií (0 až 20% směs ethylacetátu a hexanu) poskytla 5,73 g sloučeniny uvedené v názvu, hmota (CI) $m/z = 303$ (M+H).

Příprava B: 1-[(E)-4-ftalimido-2-butenyl]-1H-imidazo[4,5-b]pyridin a 3-(E)-4-ftalimido-2-butenyl]-3H-imidazo[4,5-b]pyridin

Suspenze 1,02 g (25,4 mmol) NaH v 50 ml DMF při teplotě místnosti byla podrobena působení 2,90 g (24,4 mmol) 4-azabenzimidazolu. Po 10 minutách byla reakční směs podrobena působení roztoku 5,7 g (20,3 mmol) (E)-N-(4-brom-2-butenyl)ftalimidu v 5 ml DMF po dobu 30 minut. Reakční směs byla ponechána za míchání po dobu 1 hodiny, pak byla zastavena opatrným přidáním 5 ml vody a reakční směs byla koncentrována ve vakuu. Výsledný zbytek byl naředěn 50 ml CH_2Cl_2 , promyt 2 x 25 ml solanky, usušen (MgSO_4) a koncentrován ve vakuu za vzniku špinavě bílé pevné látky. Purifikace velmi rychlou

chromatografií (ethylacetát obsahující 3% NH_4OH) poskytla 2,08 g 3-[(E)-4-ftalimido-2-butenyl]-3H-imidazo[4,5-b]pyridinu. Změna chromatografického rozpouštědla na 5% směs methanolu a ethylacetátu obsahující 5% NH_4OH poskytla 1,66 g 1-[(E)-4-ftalimido-2-butenyl]-1H-imidazo[4,5-b]pyridin, hmota (CI) $m/z = 319$ (M+H).

Příprava C: 1-(4-amino-2-butenyl)-1H-imidazo[4,5-b]pyridin

Roztok 2,19 g (6,87 mmol) 1-[(E)-4-ftalimido-2-butenyl]-1H-imidazo[4,5-b]pyridinu ve 100 ml ethanolu při teplotě místnosti byl podroben působení 3,33 ml (68,7 mmol) monohydrátu hydrazinu. Po 10 minutách byla reakční směs zahřáta na 60 °C po dobu 2 hodin, ponechána vychladnout na 25 °C a znovu ochlazena na 0 °C v ledové lázni. Výsledná suspenze byla filtrována a filtrát byl koncentrována ve vakuu. Purifikace velmi rychlou chromatografií (6% směs NH_4OH a ethanolu) poskytla 0,92 g sloučeniny uvedené v názvu, hmota (CI) $m/z = 211$ (M+H).

Příklad 22

Sloučenina vzorce I, kde R^6 = skupina OCH_3 , R^{13} = n-propylová skupina, X = atom H, R = 1H-imidazo[4,5 b]pyridin-1-ylbutylová skupina (Sloučenina K v tabulce 2)

Krok 1: Sloučenina 12 (schéma 3), kde R^a = skupina CH_3 , R^{13} = n-propylová skupina, X = atom H, R^2 = acetylová skupina

Roztok 625 mg (1,00 mmol) sloučeniny 11, kde R^a = skupina CH_3 , R^{13} = n-propylová skupina, X = atom H, R^2 = acetylová skupina, v 8 ml N,N-dimethylformamidu v -10 °C v dusíkové

atmosféře byl podroben působení 80 mg (2,00 mmol) hydridu sodného, 60% (hmotnostní) v minerálním oleji. Po 30 minutách byla výsledná reakční směs podrobena působení 490 mg (3,02 mmol) 1,1'-karbonyldiimidazolu a reakční směs byla ponechána za míchání po dobu 2 hodin v -10 °C. Reakční směs byla zastavena 30 ml vody a extrahována 3 x 30 ml etheru. Spojené organické vrstvy byly promyty 30 ml vody a 30 ml solanky, usušeny nad sulfátem hořečnatým a koncentrovány ve vakuu za vzniku sloučeniny 12 jako špinavě bílé pěny.

Krok 2: Sloučenina vzorce I, kde R^6 = skupina OCH_3 , R^{13} = n-propylová skupina, X = atom H, R = 1H-imidazo[4,5-b]pyridin-1-ylbutylová skupina

Roztok 1,00 mmol sloučeniny 12, kde R^a = skupina CH_3 , R^{13} = n-propylová skupina, X = atom H, R^2 = acetylová skupina, a 570 mg (3,00 mmol) 1H-imidazo[4,5-b]pyridin-1-ylbutylaminu ve 4 ml N,N-dimethylformamidu byl zahříván na 60 °C po dobu 24 hodin. Reakční směs byla ponechána vychladnout na teplotu místnosti, naředěna 30 ml vody a extrahována 3 x 30 ml ethylacetátu. Spojené organické vrstvy byly promyty 2 x 30 ml vody a 30 ml solanky, usušeny nad sulfátem hořečnatým, filtrovány a koncentrovány ve vakuu za vzniku olejnatého zbytku. (Purifikace odpovídající sloučeniny, kde R^2 je cetylová skupina, může být dosaženo velmi rychlou chromatografií (0 až 5% methanol v dichlormethanu obsahující 1-2% koncentrovaný hydroxid amonný) na koloně se silikagelem). Zbytek byl rozpuštěn ve 20 ml methanolu a výsledná směs byla ponechána za míchání po dobu 18 hodin při teplotě místnosti. Reakční směs byla koncentrována ve vakuu a purifikace bylo dosaženo velmi rychlou chromatografií na silikagelu (95:5:0,5 směs dichlormethanu, methanolu a koncentrovaného hydroxidu amonného) za vzniku 487 mg (61%) sloučeniny uvedené v názvu.

Příklad 23

Sloučenina vzorce I, kde R^6 = skupina OCH_3 , R^{13} = n-propylová skupina, X = atom F, R = 1H-imidazo[4,5 b]pyridin-1-ylbutylová skupina (sloučenina O v tabulce 2)

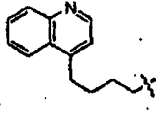
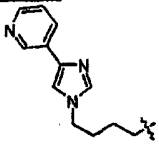
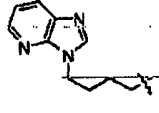
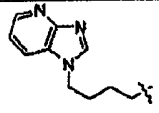
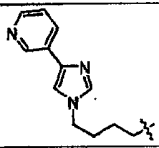
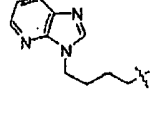
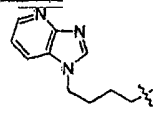
Sloučenina uvedená v názvu byla připravena tak, jak bylo popsáno v příkladu 21, kromě toho, že v kroku 1 byl použit C-2 fluorovaný protějšek sloučeniny 11, kde R^a = skupina CH_3 , R^{13} = n-propylová skupina, X = atom F, R^2 = acetylová skupina, místo nefluorované verze, kde R^a = skupina CH_3 , R^{13} = n-propylová skupina, X = atom H, R^2 = acetylová skupina. Výtěžek = 25 %. Stejným způsobem mohou být připraveny odpovídající sloučeniny s různými R^{13} substituenty (např. methylová skupina, vinylová skupina, butylová skupina, 3-butenylová skupina, 2-fluorethylová skupina, a 2-azidoethylová skupina) a/nebo různými R^6 substituenty (např. atom vodíku) počínaje vhodnou výchozí látkou.

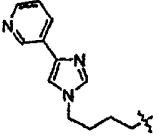
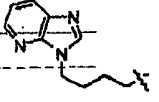
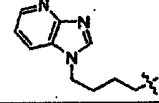
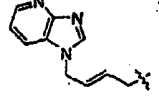
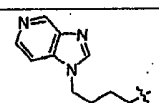
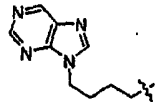
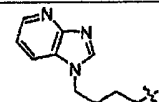
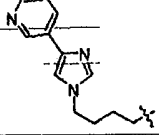
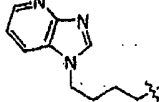
Mohou být připravena provedení s dalšími R skupinami (včetně skupin s jinými substitucemi v R^{13} a/nebo R^6 , a také jejich C-2 fluorovaných protějšků) analogickými postupy a metodami, jak bylo popsáno v příkladu 22 substitucí vhodného aminu. Názorné příklady vhodných R skupin jsou, ale bez omezení, chinolin-4-ylbutylová skupina, 4-fenylimidazol-1-ylbutylová skupina, 4-(pyridin-3-yl)imidazol-1-ylbutylová skupina, pyridin-4-ylbutylová skupina, 3H-imidazo[4,5-b]pyridin-3-ylbutylová skupina, 1H-imidazo[4,5-b]pyridin-1-ylbutylová skupina, 1H-imidazo[4,5c]pyridin-1-ylbutylová skupina, purin-7-ylbutylová skupina, purin-9-ylbutylová skupina, 1H-imidazo[4,5-b]pyridin-1-ylbut-2-enylová skupina a

4-(pyrimidin-5-yl)imidazol-1-ylbutylová skupina. Data z NMR a hmotnostní spektroskopie pro vybrané sloučeniny jsou poskytnuty v tabulce 2.

Tabulka 2

Data z ^1H NMR a hmotnostní spektroskopie pro vybrané sloučeniny (I) podle vynálezu

sl.	X	R ⁶	R ¹³	R	Spektroskopická data
A	H	OCH ₃	CH ₃		M+H ⁺ = 782
B	H	OCH ₃	CH ₃		M+H ⁺ = 810
C	H	OCH ₃	CH ₃		^1H NMR (300 MHz, CHCl ₃) δ 8,43 (d, 1H), 8,15 (s, 1H), 8,08 (d, 1H), 7,17-7,14 (m, 1H), 5,20 (m, 1H), 4,42-4,10 (m, 4H), 3,8-3,43 (m, 4H), 3,38-3,0 (m, 4H), 2,98-2,86 (m, 2H), 2,62 (s, 3H), 2,57 (s, 6H), 2,1-1,10 (m, 31H)
D	H	OCH ₃	CH ₃		M+H ⁺ = 772
E	H	OCH ₃	CH=CH ₂		M+H ⁺ = 798
F	H	OCH ₃	CH=CH ₂		^1H NMR (300 MHz, CHCl ₃) δ 8,43 (d, 1H), 8,15 (s, 1H), 8,08 (d, 1H), 7,17-7,14 (m, 1H), 6,05-5,93 (m, 1H), 5,45-5,30 (m, 2H), 5,39 (s, 1H), 5,20 (s, 1H), 4,42-4,10 (m, 4H), 3,8-3,43 (m, 4H), 3,38-3,0 (m, 4H), 2,98-2,86 (m, 2H), 2,62 (s, 3H), 2,57 (s, 6H), 2,1-1,10 (m, 26H), 0,95 (d, 3H)
G	H	OCH ₃	CH=CH ₂		^1H NMR (300 MHz, CHCl ₃) δ 8,59 (d, 1H), 8,15 (s, 1H), 7,76 (d, 1H), 7,17-7,14 (m, 1H), 6,11-5,93 (m, 1H), 5,45-5,30 (m, 2H), 5,22 (s, 1H), 5,17 (s, 1H),

					4,30-4,10 (m, 4H), 3,8-3,43 (m, 4H), 3,28-3,12 (m, 4H), 2,98-2,86 (m, 2H), 2,62 (s, 3H), 2,48-2,39 (m, 1H), 2,38 (s, 6H), 2,1-1,10 (m, 26H), 1,1 (d, 3H)
H	H	OCH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃		M+H ⁺ = 826
J	H	OCH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃		M+H ⁺ = 800
K	H	OCH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃		M+H ⁺ = 800
L	H	OCH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃		¹ H NMR (300 MHz, CHCl ₃) δ 8,59 (d, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,17-7,14 (m, 1H), 5,95-5,71 (m, 2H), 4,95 (d, 1H), 4,81 (d, 1H), 4,42-4,10 (m, 4H), 3,62-3,43 (m, 2H), 3,32-3,0 (m, 4H), 2,57 (s, 3H), 2,48-2,39 (m, 1H), 2,30 (s, 6H), 1,72-1,10 (m, 30H), 0,95 (d, 3H), 0,85 (t, 2H)
M	H	OCH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃		¹ H NMR (300 MHz, CHCl ₃) δ 9,20 (s, 1H), 8,43 (d, 1H), 8,02 (s, 1H), 7,41 (d, 1H), 5,15 (m, 1H), 4,42-4,10 (m, 4H), 3,82-3,42 (m, 5H), 3,32-3,02 (m, 4H), 2,57 (s, 3H), 2,48-2,39 (m, 1H), 2,30 (s, 6H) 2,10-0,95 (m, 39H)
N	H	OCH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃		¹ H NMR (300 MHz, CHCl ₃) δ 9,20 (s, 1H), 9,01 (s, 1H), 8,17 (s, 1H), 4,95 (d, 1H), 4,42-4,10 (m, 4H), 3,82-3,42 (m, 5H), 3,32-3,02 (m, 4H), 2,57 (s, 3H), 2,48-2,39 (m, 1H), 2,30 (s, 6H), 2,10-0,95 (m, 24H), 0,95 (d, 3H), 0,85 (t, 2H)
O	F	OCH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃		¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ 216,6, 202,7 (d, J = 28,0 Hz), 166,5 (d, J = 23,0 Hz), 157,3, 156,3, 145,0, 144,8, 126,0, 118,0, 118,0, 104,3, 97,8 (d, J = 204,9 Hz), 82,1, 80,7, 78,6, 70,4, 69,7, 65,8, 60,7, 53,5, 49,2, 45,0, 44,5, 42,4, 40,9, 40,2, 39,5, 39,2, 30,9, 28,2, 27,3, 25,2 (d, J = 22,3 Hz), 24,4, 21,2, 19,8, 19,1, 17,9, 15,0, 14,7, 13,7, 13,6. M+H ⁺ = 818
P	H	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃		¹ H NMR (300 MHz, CHCl ₃) δ 9,10 (s, 1H), 8,52 (s, 1H), 8,17 (d, 1H), 7,60 (s, 1H), 6,42 (s, 1H), 4,42-4,21 (m, 1H), 4,12-3,95 (m, 2H), 3,65-0,85 (m, 58H)
Q	H	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃		M+H ⁺ = 770

Příklad 24

Syntéza 2'-O-benzoyl-6-O-allyl-3-deskladinosyl-3-oxo-10,11-anhydro-2-fluor-15-methylerythromycinu A

K roztoku 100 mg (0,132 mmol, 1,0 ekv.) 11,12-cyklického karbamátu 2'-O-benzoyl-6-O-allyl-3-deskladinosyl-3-oxo-11-deoxy-11-amino-15-methylerythromycinu A v 0,5 ml THF byl přidán THF roztok 0,3 ml (2,3 ekv.) 1M terc-butoxidu draselného v -78 °C. Reakční směs pak byla udržována v -60 °C až -40 °C po dobu 20 minut, pak následovalo přidání 46 mg (0,146 mmol, 1,1 ekv.) N-fluorbenzensulfonimidu v 0,2 ml THF v -78 °C. Reakční směs byla udržován v -70 °C až -40 °C po dobu 1 hodiny předtím, než byla ponechána zahřát se na 0 °C z -70 °C během 1,5 hodiny. Směs pak byla naředěna EtOAc, promyta saturovaným vodným NaHCO₃, vodou a solankou. Organická fáze byla usušena nad MgSO₄, filtrována a koncentrována. Velmi rychlá chromatografie surového produktu (4:1 směs hexanu a acetonu + 1% Et₃N) poskytla 76 mg (74%) požadovaného produktu. ¹³C NMR (100,6 MHz, CDCl₃) δ 217,5, 203 (d, J = 27,6 Hz), 165,5 (d, J = 23,8 Hz), 165,2, 157,5, 135,4, 132,9, 130,4, 129,8, 128,3, 118,0, 101,7, 98 (d, J = 207 Hz), 83,5, 79,1, 78,6, 72,1, 69,4, 64,6, 63,5, 57,5, 44,2, 40,7, 40,4, 38,5, 37,3, 31,4, 31,3, 24,9 (d, J = 24,3 Hz), 21,0, 20,7, 19,4, 17,7, 15,0, 13,9, 13,7, 13,3.

Příklad 25

Syntéza 2'-O-benzoyl-6-O-propargyl-3-deskladinosyl-3-oxo-10,11-anhydro-2-fluor-15-methylerythromycinu A

Roztok 2'-O-benzoyl-6-O-propargyl-3-deskladinosyl-3-oxo-10,11-anhydro-15-methylerythromycinu A v tetrahydrofuranu v inertní atmosféře byl ochlazen na $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ a podroben působení 1,0 M terc-butoxidu draselného v tetrahydrofuranu. Směs byla míchána po dobu 5 minut a byl přidán roztok N-fluorbenzensulfonimidu v tetrahydrofuranu ve třech částech po dobu 2 hodin. Po přidání byla reakce ponechána zahřát se na teplotu místnosti a udržována dalších 5 hodin. Byl přidán vodný K_2CO_3 a směs byla extrahována CH_2Cl_2 . Organické extrakty byly spojeny, usušeny nad MgSO_4 , filtrovány a evaporovány. Chromatografie na silikagelu poskytla produkt.

Příklad 26

11,12-cyklický karbamát 15-(2-(3-chinolyl)ethyl)-3-deskladinosyl-3-oxo-6-O-methylerythromycinu A

Příprava A: 15-(2-(3-chinolyl)ethyl)erythromycin A-9-oxim

25,7 g (28,9 mmol, 1,00 ekv.) 15-(2-(3-chinolyl)ethyl)erythromycinu A bylo suspendováno ve 42 ml 2-propanolu. Bylo přidáno 22,2 ml (375 mmol, 13,0 ekv.) hydroxylaminu, 50% (hmotnostní) v H_2O . Směs byla míchána, dokud nebyla homogenní. Byla přidána ledová HOAc. Roztok byl míchán v $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 11 hodin. Byl přidán saturovaný NaHCO_3 . Směs byla koncentrována a extrahována 4x400 ml CHCl_3 , promyta NaHCO_3

a vodou. Spojené vodné vrstvy byly zpětně extrahovány 400 ml CHCl_3 . Spojené organické fáze byly promyty solankou, usušeny nad Na_2SO_4 , filtrovány a koncentrovány za zisku surové látky. S ní bylo pokračováno bez další purifikace.

Příprava B: 15-(2-(3-chinolyl)ethyl)erythromycin A-9-(isopropoxycyklohexyl)oxim

Surový 15-(2-(3-chinolyl)ethyl)erythromycin A-9-oxim uvedený výše byl rozpuštěn v 72 ml bezvodého CH_2Cl_2 a po kapkách bylo přidáváno 29,2 ml (140 mmol, 4,86 ekv.) 1,1-diisopropoxycyklohexanu. Po kapkách byl přidáván roztok 10,5 g (41,9 mmol, 1,45 ekv.) pyridinium-p-toluensulfonátu ve 36 ml CH_2Cl_2 . Po 15 hodinách bylo přidáno 200 ml dichlormethanu. Roztok byl promyt 2x100 ml NaHCO_3 a 100 ml vody. Spojené vodné fáze byly zpětně extrahovány 100 ml CH_2Cl_2 . Spojené organické vrstvy byly promyty solankou, usušeny nad MgSO_4 , filtrovány a koncentrovány. Látka byla podrobena chromatografii na silikagelu za vzniku požadovaného produktu.

Příprava C: 2',4''-bis(O-trimethylsilyl)-15-(2-(3-chinolyl)-ethyl)erythromycin A-9-(isopropoxycyklohexyl)oxim

22,2 g (21,3 mmol, 1,0 ekv.) 15-(2-(3-chinolyl)ethyl)erythromycin A-9-(isopropoxycyklohexyl)oximu bylo rozpuštěno v 54 ml bezvodého CH_2Cl_2 a ochlazeno v lázni se směsí ledu a vody. Po kapkách byla přidávána směs 4,05 ml (31,9 mmol, 1,5 ekv.) chlortrimethylsilanu, 7,81 ml (53,2 mmol, 2,5 ekv.) N-(trimethylsilyl)imidazolu a 18 ml CH_2Cl_2 . Reakce byla míchána po dobu 15 minut po ukončení přidávání a zastavena 600 ml EtOAc. Směs byla promyta 2x200 ml saturovaného NaHCO_3 , 200 ml vody a 200 ml solanky. Organická vrstva byla usušena nad MgSO_4 , filtrována a koncentrována za

zisku surového produktu, s kterým bylo pokračováno bez další purifikace.

Příprava D: 2',4"-Bis(O-trimethylsilyl)-6-O-methyl-15-(2-(3-chinolyl)ethyl)erythromycin A-9-(isopropoxycyklohexyl)oxim

Surový 2',4"-bis-(O-trimethylsilyl)-15-(2-(3-chinolyl)-ethyl)erythromycin A-9 (isopropoxycyklohexyl)oxim byl rozpuštěn v 41 ml bezvodého tetrahydrofuranu a ochlazen na 10 °C. Bylo přidáno 41,4 ml bezvodého methylsulfoxidu a 20,7 ml (41,4 mmol, 2,0 ekv.) methylbromidu, 2,0 M v etheru. 1,0 M roztok 41,4 ml (41,4 mmol, 2,0 ekv.) t-butoxidu draselného v THF byl naředěn 41,4 ml bezvodého methylsulfoxidu. Tento roztok byl přidán k reakční směsi rychlostí 0,5 ekv. za hodinu. Reakce byla monitorována TLC (5:1 směs toluenu a acetonu). Reakce byla zastavena přidáním 200 ml ethylacetátu a 70 ml saturovaného NaHCO₃. Směs byla přenesena do dělicí nálevky a naředěna 850 ml ethylacetátu. Organická fáze byla promyta po 300 ml saturovaného NaHCO₃, vody a solanky. Výsledná emulze byla filtrována přes Celit. Oddělená organická fáze pak byla usušena nad MgSO₄, filtrována a koncentrována za vzniku surového produktu, s kterým bylo pokračováno bez další purifikace.

Příprava E: 6-O-methyl-15-(2-(3-chinolyl)ethyl)erythromycin A-9-oxim

Surový 2',4"-bis(trimethylsilyl)-6-O-methyl-15-(2-(3-chinolyl)ethyl)erythromycin A-9 (isopropoxycyklohexyl)oxim uvedený výše byl rozpuštěn ve 110 ml acetonitrilu. Pomalu bylo přidáváno 67 ml ledové kyseliny octové naředěné 55 ml vody. Roztok byl míchán 8 hodin. Byl přidán toluen a 2-propanol a roztok byl koncentrován. Produkt pak byl rozpuštěn v toluenu a

dvakrát koncentrován za vzniku surového produktu, s kterým bylo pokračováno bez další purifikace.

Příprava F: 6-O-methyl-15-(2-(3-chinolyl)ethyl)erythromycin A

Surový 6-O-methyl-15-(2-(3-chinolyl)ethyl)erythromycin A-9-oxim uvedený výše a 23,1 g (113 mmol, 5,63 ekv.) hydrosulfitu sodného bylo vloženo do baňky s kulatým dnem vybavené kondenzátorem a naplněné N₂. Bylo přidáno 140 ml ethanolu a 140 ml vody. Po kapkách bylo přidáváno 3,75 ml (95,4 mmol, 4,77 ekv.) mravenčí kyseliny. Směs byla míchána v 80 °C po dobu 4,5 hodiny. Poté, co se teplota roztoku vrátila na teplotu místnosti, byl přidán saturovaný NaHCO₃. pH bylo upraveno na 9 až 10 s 6N NaOH. Směs pak byla extrahována 3x400 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly promyty po 250 ml saturovaného NaHCO₃, a pak vody. Spojené vodné fáze byly zpětně extrahovány 400 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly promyty solankou, usušeny nad MgSO₄, filtrovány a koncentrovány za vzniku surového produktu, s kterým bylo pokračováno bez další purifikace. Čistý produkt může být získán chromatografií na silikagelu.

Příprava G: 6-O-methyl-15-(2-(3-chinolyl)ethyl)-3-deskladinosylerythromycin A

Surový 6-O-methyl-15-(2-(3-chinolyl)ethyl)erythromycin A byl míchán v 280 ml 0,5 M HCl po dobu 3 hodin. pH bylo upraveno na 9 až 10 s 6N NaOH. Precipitát byl sebrán filtrací ve vakuu a promyt vodou. Matečný roztok byl extrahován 3x400 ml ethylacetátu. Spojené organické fáze byly promyty saturovaným NaHCO₃ a vodou. Spojené vodné fáze byly zpětně extrahovány ethylacetátem. Spojené organické fáze byly promyty solankou, usušeny nad MgSO₄, filtrovány a koncentrovány.

Spojený produkt byl podroben chromatografii na silikagelu za vzniku požadovaného produktu jako bílé pevné látky.

Příprava H: 2-O-acetyl-6-O-methyl-15-(2-(3-chinolyl)ethyl)-3-deskladinosylerythromycin A

11,5 g (15,5 mmol, 1,0 ekv.) 6-O-methyl-15-(2-(3-chinolyl)ethyl)-3-deskladinosylerythromycinu A bylo rozpuštěno ve 40 ml ethylacetátu. Po kapkách byl přidáván roztok 2,92 ml (31,0 mmol, 2,0 ekv.) acetanhydridu v 35 ml ethylacetátu. Reakce byla míchána po dobu 30 minut, a pak byla koncentrována. Látka byla podrobena chromatografii na silikagelu za vzniku požadovaného produktu jako bílé pevné látky.

Příprava I: 2'-O-acetyl-3-deskladinosyl-3-oxo-6-O-methyl-15-(2-(3-chinolyl)ethyl)erythromycin A

10 g (12,8 mmol, 1,0 ekv.) 2'-O-acetyl-6-O-methyl-15-(2-(3-chinolyl)ethyl)-3-deskladinosylerythromycinu A a 16,51 g (86,1 mmol, 6,7 ekv.) hydrochloridu 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylkarbodiimidu bylo smícháno v baňce s kulatým dnem a naplněno N₂. Pevné látky byly rozpuštěny v 64 ml bezvodého CH₂Cl₂ a ochlazeny v lázni se směsí ledu a vody. Bylo přidáno 15,5 ml (218 mmol, 17 ekv.) bezvodého DMSO. Po dobu 3 hodin byl přidáván roztok 12,14 g (62,9 mmol, 4,9 ekv.) pyridiniumtrifluoracetátu ve 47 ml CH₂Cl₂. Roztok byl naředěn 600 ml ethylacetátu a promyt po 200 ml saturovaného NaHCO₃, vody a solanky. Organická fáze byla usušena nad MgSO₄, filtrována a koncentrována. Chromatografie na silikagelu poskytla požadovaný produkt.

Příprava J: 2'-O-acetyl-3-oxo-3-deskladinosyl-11-methansulfonyl-6-O-methyl-15-(2-(3-chinolyl)ethyl)erythromycin A

2'-O-acetyl-3-deskladinosyl-3-oxo-6-O-methyl-15-(2-(3-chinolyl)ethyl)erythromycin A byl rozpuštěn v 35 ml čerstvě destilovaného pyridinu a ochlazen v lázni se směsí vody a ledu. Po kapkách byl přidáván methansulfonylchlorid. Reakce byla ponechána zahřát se na teplotu místnosti a míchána přes noc. Bylo přidáno 700 ml ethylacetátu a roztok byl promyt po 200 ml saturovaného NaHCO₃, vody a solanky. Organická fáze byla usušena nad MgSO₄, filtrována a koncentrována. Chromatografie na silikagelu poskytla požadovanou sloučeninu.

Příprava K: 2'-O-acetyl-10,11-anhydro-3-deskladinosyl-3-oxo-6-O-methyl-15-(2-(3-chinolyl)ethyl)erythromycin A

6 g (6,98 mmol, 1,0 ekv.) 2'-O-acetyl-3-oxo-3-deskladinosyl-11-methansulfonyl-6-O-methyl-15-(2-(3-chinolyl)ethyl)erythromycinu A bylo rozpuštěno ve 23 ml acetonu. Po kapkách bylo přidáváno 5,22 ml (34,9 mmol, 5,0 ekv.) 1,8-diazabicyklo(5.4.0)undec-7-enu. Reakce byla míchána při teplotě místnosti po dobu 4 hodin, a pak byla koncentrována. Chromatografie na silikagelu poskytla požadovanou sloučeninu.

Příprava L: 11,12-cyklický karbamát 3-deskladinosyl-3-oxo-6-O-methyl-15-(2-(3-chinolyl)ethyl)erythromycinu A

Roztok 2'-O-acetyl-10,11-anhydro-3-deskladinosyl-3-oxo-6-O-methyl-15-(2-(3-chinolyl)ethyl)erythromycinu A v suchém tetrahydrofuranu byl přidán k míchané suspenzi 3 ekv. NaH v THF chlazenému na -10 °C. K tomuto roztoku byl přidán roztok 10 ekv. karbonyldiimidazolu ve směsi THF a DMF (5:3) a směs

byla míchána po dobu 2 hodin. Reakce byla zahřáta na teplotu místnosti a naředěna koncentrovaným vodným čpavkem a míchána přes noc. Směs byla naředěna ethylacetátem a promyta vodným NaHCO_3 a solankou, usušena nad MgSO_4 a evaporována. Chromatografie na silikagelu poskytla produkt.

Příklad 27

Testování citlivosti *in vitro*

Minimální inhibiční koncentrace ("MIC") byly určeny postupem mikroředění v médiu NCCLS pro testování citlivosti bakterií, které rostou aerobně (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 4. vyd. Approved standard. NCCLS Document M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.). Zásobní roztoky byly připraveny v den testu a vhodné alikvoty byly přidány k Mueller-Hintonovu médiu s upravenými kationty (CAMHB) nebo testovacímu médiu pro *Haemophilus*. Byla připravena dvojitá sériová ředění a přidána do jamek mikrotitračních destiček. Konečné testované koncentrace se pohybovaly v rozmezí 16 až 0,015 $\mu\text{g/ml}$. Kultury bakterií v médiu inokulované z kultur rostoucích přes noc na miskách pro všechny testované bakterie kromě *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae* byly inkubovány ve 35 °C a pak upraveny na Kirby-Bauerův standard a naředěny v CAMHB tak, aby dosáhly konečné koncentrace inokula přibližně 5×10^5 CFU/ml. Inokula pro *S. pneumoniae* a *H. influenzae* byla připravena přímým suspendováním kolonií z kultury rostoucí přes noc na miskách, upravením hustoty a ředěním, jak bylo

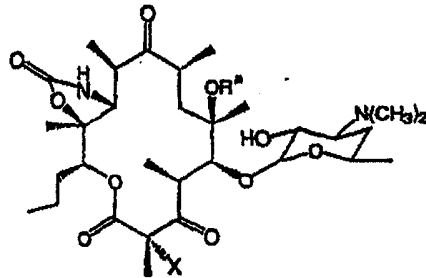
uvedeno výše. Média pro *S. pneumoniae* byla doplněna 2,5% lyzovanou koňskou krví. Všechny misky byly inkubovány v normální atmosféře ve 35 °C po dobu 20-24 hodin pro *S. pneumoniae* a *Haemophilus influenzae* a 16-20 hodin pro všechny další bakterie. Konečné hodnoty MIC byly určovány odečtem nejnižší koncentrace testované sloučeniny, která kompletně inhibovala růst testovaných bakterií. Tabulka 3 ukazuje konečné hodnoty MIC pro sloučeniny z tabulky 2 (příklad 23).

Tabulka 3

Citlivost *in vitro* (MIC v µg/ml) pro sloučeniny z tabulky 2

Sloučenina	Mikroorganismus				
	<i>E. coli</i> OC2605	<i>S. aureus</i> ATCC29213	<i>E. faecalis</i> ATCC29212	<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619	<i>H. influenzae</i> OC4883
Erythromycin	>16	0,5	1	0,06	1
A	>16	0,25	0,12	0,03	8
B	>16	0,5	0,25	0,03	16
C	>16	2	0,5	0,12	>16
D	>16	1	0,12	0,03	8
E	>16	0,5	0,12	0,03	8
F	>16	0,5	0,12	0,06	8
H	>16	1	0,25	0,06	8
J	>16	0,5	0,25	0,06	8
K	4	0,25	0,06	≤0,015	2
L	4	0,25	0,12	0,03	4
M	8	0,25	0,06	0,03	1
N	16	0,5	0,12	0,06	4
O	2	0,12	0,03	≤0,015	< 0,25
P	>16	>16	16	2	>16
Q	>16	8	1	0,25	>16

Tabulka 4 ukazuje příkladné konečné hodnoty MIC pro vybrané sloučeniny vzorce III.



kde X a R^a jsou, jak označeno.

Tabulka 4

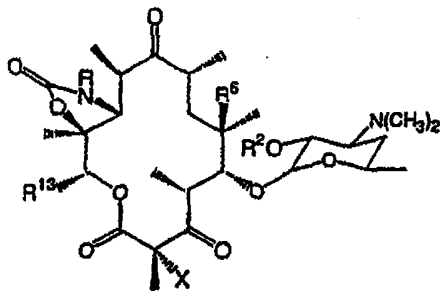
Citlivost *in vitro* (MIC v µg/ml) pro vybrané sloučeniny vzorce III

Sloučenina	Mikroorganismus				
	<i>E. coli</i> OC2605	<i>S. aureus</i> ATCC29213	<i>E. faecalis</i> ATCC29212	<i>S. pneumoniae</i> ATCC49619	<i>H. influenzae</i> OC4883
Erythromycin	>16	0,5	1	0,06	1
X = atom H a R ^a = 3-(chinol-3-yl)-allylová skupina	8	0,12	0,06	<0,015	1
X = atom H a R ^a = 3-(6-fluorchinol-3-yl)allylová skupina	16	0,12	0,06	<0,015	4
X = atom H a R ^a = 3-(6-chlorchinol-3-yl)allylová skupina	16	0,25	0,12	0,03	8
X = atom H a R ^a = 3-(6-methylchinol-3-yl)allylová skupina	8	0,25	0,12	0,03	8
X = atom H a R ^a = 3-(isochinol-4-yl)-allylová skupina	>16	0,25	0,12	0,03	8

X = atom F a R ^a = 3-(chino-3-yl)allylová skupina	8	0,12	0,06	<0,015	4
X = atom H a R ^a = 3-(pyrid-3-yl)allylová skupina	>16	0,25	0,06	<0,015	8
X = atom H a R ^a = 3-(chinol-6-yl)-allylová skupina	8	0,12	0,06	<0,015	4
X = atom H a R ^a = 3-[5(N-2-pyridylamino)fuoyl]allylová skupina	>16	0,25	0,06	0,03	16
X = atom H a R ^a = 3-(chinoxal-6-yl)-allylová skupina	8	0,06	0,03	<0,015	4
X = atom H a R ^a = 3-(chinol-6-yl)-allylová skupina	8	0,12	0,06	<0,015	4

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Sloučenina vzorce



kde:

X je atom vodíku nebo halogenid,

R^2 je atom vodíku, acylová skupina nebo skupina chránící hydroxyskupinu,

R^6 je atom vodíku, hydroxylová skupina nebo skupina $-OR^a$, kde R^a je substituovaná nebo nesubstituovaná skupina vybraná ze skupiny, kterou tvoří alkylová skupina obsahující 1 až 10 atomů uhlíku, alkenylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku, alkynylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku, arylová skupina, heterocyklová skupina, arylalkylová skupina obsahující 1 až 10 atomů uhlíku v alkylové části, arylalkenylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkenylové části, arylalkynylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkynylové části, heterocykloalkylová skupina obsahující 1 až 10 atomů uhlíku v alkylové části, heterocykloalkenylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkenylové části a heterocykloalkynylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkynylové části,

R^{13} je atom vodíku nebo substituovaná nebo nesubstituovaná skupina, kde skupina je vybraná ze skupiny, kterou tvoří methylová skupina, alkylová skupina obsahující 3 až 10 atomů

uhlíku, alkenylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku, alkynylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku, arylová skupina, heterocyklová skupina, arylalkylová skupina obsahující 1 až 10 atomů uhlíku v alkylové části, arylalkenylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkenylové části, arylalkynylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkynylové části, heterocykloalkylová skupina obsahující 1 až 10 atomů uhlíku v alkylové části, heterocykloalkenylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkenylové části a heterocykloalkynylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkynylové části, a

R je atom vodíku nebo substituovaná nebo nesubstituovaná skupina, kde skupina je vybraná ze skupiny, kterou tvoří alkylová skupina obsahující 1 až 10 atomů uhlíku, alkenylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku, alkynylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku, arylová skupina, heterocyklová skupina, arylalkylová skupina obsahující 1 až 10 atomů uhlíku v alkylové části, arylalkenylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkenylové části, arylalkynylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkynylové části, heterocykloalkylová skupina obsahující 1 až 10 atomů uhlíku v alkylové části, heterocykloalkenylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkenylové části a heterocykloalkynylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkynylové části,

a její farmaceuticky přijatelné soli, estery a předléčivové formy.

2. Sloučenina podle nároku 1, kde

X je atom vodíku nebo fluorid,

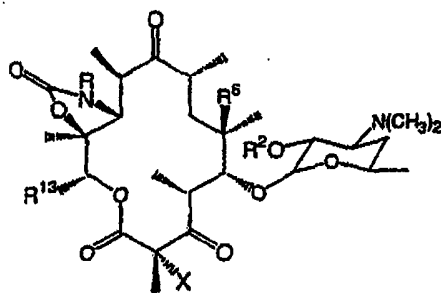
R je atom vodíku,

R^2 je atom vodíku, skupina $-\text{COCH}_3$ - nebo $-\text{CO}$ fenylová skupina,

R^{13} je methylová skupina, propylová skupina nebo vinylová skupina, a,

R^6 je vybrán ze skupiny, kterou tvoří skupina, kterou tvoří 3-(chinolin-3-yl)prop-2-enylová skupina, 3-(chinolin-3-yl)prop-2-ynylová skupina, 3-(chinolin-6-yl)prop-2-enylová skupina, 3-(chinolin-6-yl)prop-2-ynylová skupina, 3-(chinolin-7-yl)prop-2-enylová skupina, 3-fenylprop-2-enylová skupina, 3-(naft-1-yl)prop-2-enylová skupina, 3-(naft-1-yl)prop-2-ynylová skupina, 3-(naft-2-yl)prop-2-ynylová skupina, 5-fenylpent-4-en-2-ynylová skupina, 3-(fur-2-yl)prop-2-ynylová skupina, 3-(thien-2-yl)prop-2-enylová skupina, 3-(karbazol-3-yl)prop-2-enylová skupina a 3-(chinoxalin-6-yl)prop-2-enylová skupina.

3. Sloučenina vzorce



kde:

R^2 je atom vodíku, $-\text{COCH}_3$ nebo $-\text{CO}$ fenylová skupina,

R^{13} je methylová skupina, propylová skupina, vinylová skupina, butylová skupina, 3-butenylová skupina, 3-hydroxybutylová

skupina, 2-fluorethylová skupina, nebo 2-azidoethylová skupina,

R^6 je skupina $-OR^a$, kde R^a je atom vodíku, alkylová skupina obsahující 1 až 5 atomů uhlíku nebo skupina $-YZ$,

kde Y je alkylová skupina obsahující 1 až 10 atomů uhlíku, alkenylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku nebo alkynylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku a Z je substituovaná arylová skupina, nesubstituovaná arylová skupina, substituovaná heterocyklová skupina nebo nesubstituovaná heterocyklová skupina a

R je atom vodíku nebo R^a ,

a její farmaceuticky přijatelné soli, estery a předléčivové formy.

4. Sloučenina podle nároku 3, kde

X je atom vodíku nebo fluorid,

R je atom vodíku,

R^2 je atom vodíku, skupina $-COCH_3$ nebo $-CO$ fenylová skupina, a

R^{13} je methylová skupina, propylová skupina nebo vinylová skupina a

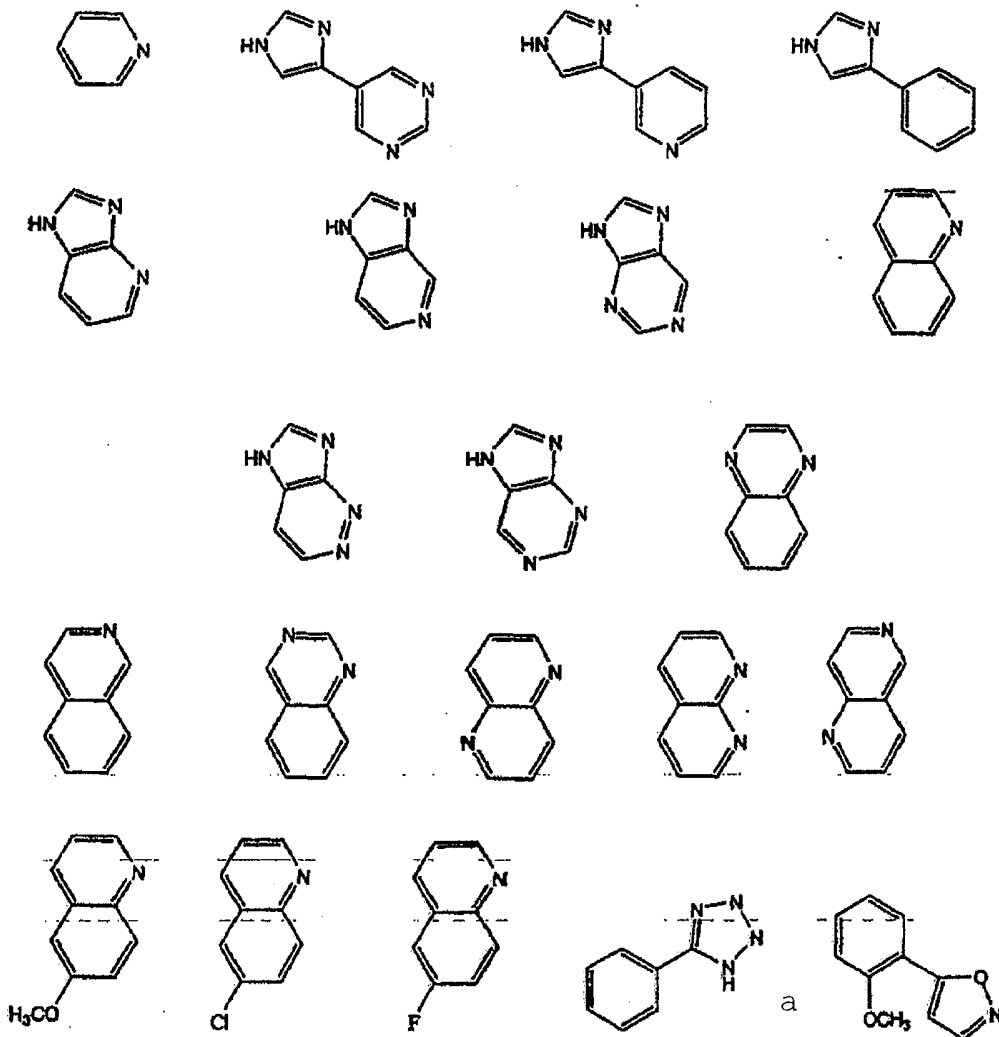
R^6 je podle nároku 3.

5. Sloučenina podle nároku 4, kde R^a je skupina $-YZ$.

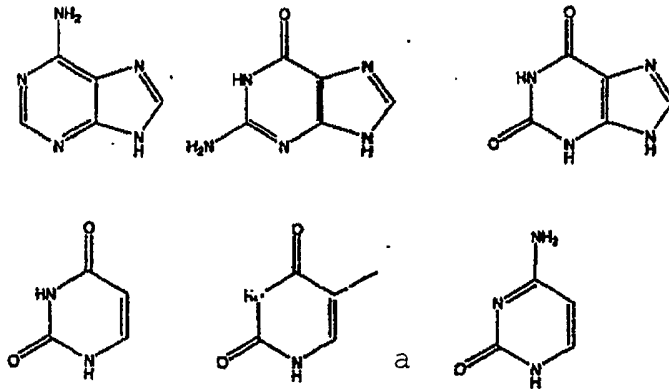
6. Sloučenina podle nároku 5, kde Y je alkylová skupina obsahující 3 až 6 atomů uhlíku, alkenylová skupina obsahující 3 až 6 atomů uhlíku nebo alkynylová skupina obsahující 3 až 6 atomů uhlíku.

7. Sloučenina podle nároku 5, kde Z je substituovaná nebo nesubstituovaná heteroarylová skupina.

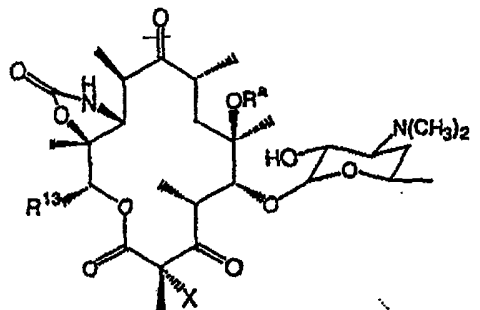
8. Sloučenina podle nároku 5, kde Z je vybrána ze skupiny, kterou tvoří



9. Sloučenina podle nároku 5, kde Z je vybrána ze skupiny, kterou tvoří



10. Sloučenina vzorce



kde

X je atom H nebo atom F,

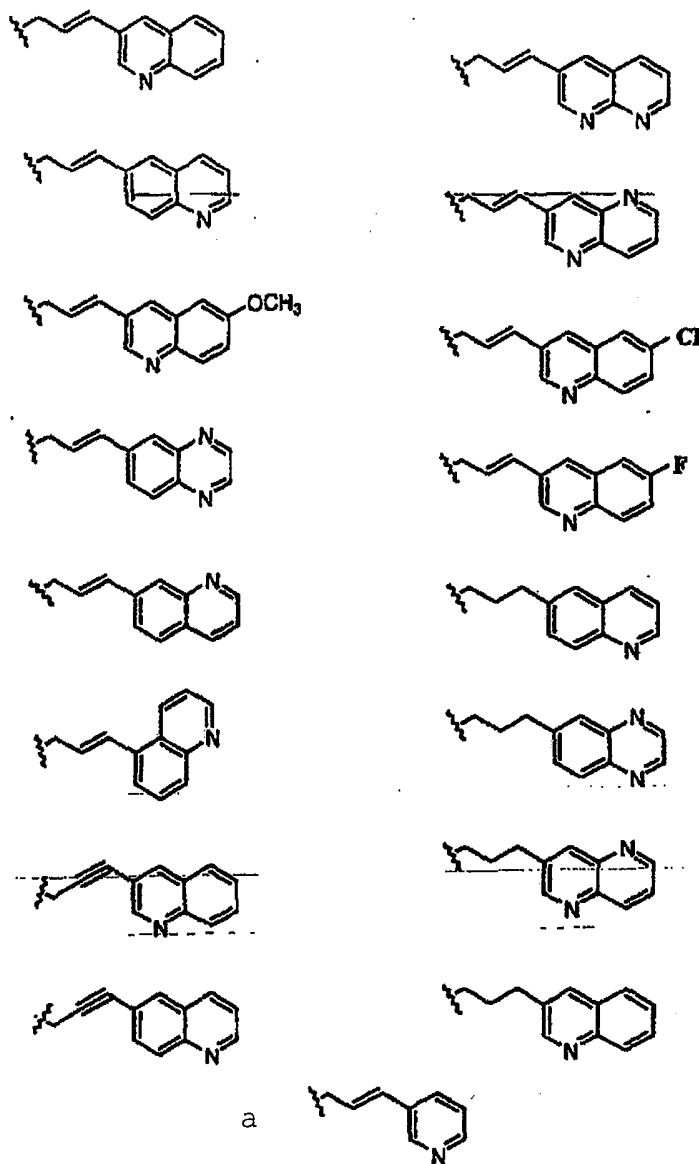
R^{13} je methylová skupina, propylová skupina nebo vinylová skupina, a

R^a je substituovaná nebo nesubstituovaná heterocykloalkylová skupina obsahující 1 až 10 atomů uhlíku v alkylové části, heterocykloalkenylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku

v alkenylové části nebo heterocykloalkynylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkynylové části, a její farmaceuticky přijatelné soli, estery a předléčivové formy.

11. Sloučenina podle nároku 10, kde R^a je substituovaná nebo nesubstituovaná heteroarylalkylová skupina obsahující 1 až 10 atomů uhlíku v alkylové části, heteroarylalkenylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkenylové části nebo heteroarylalkynylová skupina obsahující 2 až 10 atomů uhlíku v alkynylové části.

12. Sloučenina podle nároku 10, kde R^a je vybrán ze skupiny, kterou tvoří

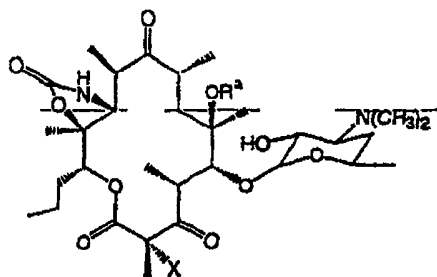


13. Sloučenina podle nároku 12, kde R^{13} je methylová skupina.

14. Sloučenina podle nároku 12, kde R^{13} je vinylová skupina.

15. Sloučenina podle nároku 12, kde R^{13} je propylová skupina.

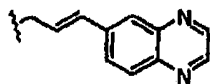
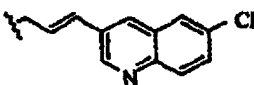
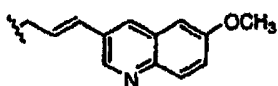
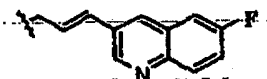
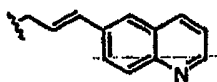
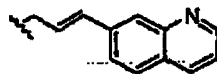
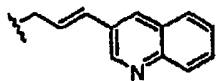
16. Sloučenina vzorce



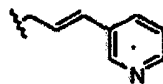
kde

X je atom vodíku nebo fluorid a

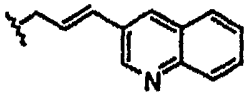
R^a je vybrán ze skupiny, kterou tvoří



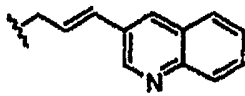
a



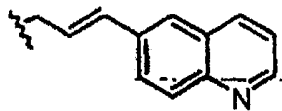
17. Sloučenina podle nároku 16, kde X je atom vodíku a R^a je



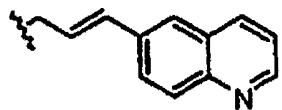
18. Sloučenina podle nároku 16, kde X je fluorid a R^a je



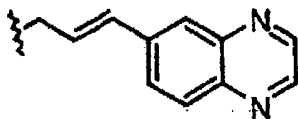
19. Sloučenina podle nároku 16, kde X je atom vodíku a R^a je



20. Sloučenina podle nároku 16, kde X je fluorid a R^a je



21. Sloučenina podle nároku 16, kde X je atom vodíku a R^a je



22. Sloučenina podle nároku 16, kde X je fluorid a R^a je

