



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **258 991 A1**

4(51) C 07 H 15/234

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 07 H / 292 400 1	(22)	11.07.86	(44)	10.08.88
(31)	22425A/85	(32)	10.10.85	(33)	IT

(71)	PIERREL S. p. A, 80100 Napoli, IT
(72)	Mangia, Alberto; Giobbio, Vincenzo; Oranto, Giorgio, IT
(74)	Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD

(54) Verfahren zur selektiven Synthese von Amikacin

(57) Es wird ein neues Verfahren zur Synthese von Amikacin beschrieben, bei dem von in 3- und in 6'-Stellung geschütztem Kanamycin A ausgegangen wird, wobei diese Verbindung in Gegenwart von Wasser als Lösungsmittel oder Verschnitt-Lösungsmittel mit einem Salz eines zweiwertigen Kations eines aus Zink, Nickel, Eisen, Cobalt, Mangan, Kupfer und Cadmium ausgewählten Metalls zur Reaktion gebracht wird, worauf der erhaltene Komplex in situ mit einem reaktionsfähigen Derivat der L-Amino-2-hydroxybuttersäure zur Reaktion gebracht wird, das Metallkation der Schutzgruppen entfernt wird und das auf diese Weise erhaltene Rohprodukt gereinigt wird. Die Acylierung ist unter diesen Bedingungen außerordentlich selektiv.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur selektiven Synthese von Amikacin, bei dem von in 3- und in 6'-Stellung geschütztem Kanamycin A ausgegangen wird, **gekennzeichnet dadurch**, daß diese Verbindung in Gegenwart von Wasser als Lösungsmittel oder Verschnitt-Lösungsmittel mit einem Salz eines zweiwertigen Kations eines aus Zink, Nickel, Eisen, Cobalt, Mangan, Kupfer und Cadmium oder ihren Mischungen ausgewählten Metalls zur Reaktion gebracht wird, der erhaltene Komplex mit einem geeigneten Derivat der L-(-)-4-Amino-2-hydroxybuttersäure, bei dem die Aminogruppe geschützt und die Carboxylgruppe aktiviert ist, zur Reaktion gebracht wird, der Komplex durch Entfernen des Metallkations zerstört wird und die Schutzgruppen entfernt werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Zwischenkomplex nicht isoliert wird.
3. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Bildung des Komplexes in Wasser oder in Mischungen von Wasser und einem organischen Lösungsmittel, bei denen ein solches Lösungsmittel aus Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid, Acetonitril, Aceton, Tetrahydrofuran und niederen aliphatischen Alkoholen ausgewählt ist, durchgeführt wird.
4. Verfahren nach Punkt 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Bildung des Komplexes in Wasser durchgeführt wird.
5. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß das zweiwertige Metallkation aus Zink, Kupfer und Nickel ausgewählt ist.
6. Verfahren nach Punkt 5, **gekennzeichnet dadurch**, daß das zweiwertige Metallkation Zink(II) ist.
7. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Anion des Salzes aus den von schwachen organischen Säuren abgeleiteten Anionen ausgewählt ist.
8. Verfahren nach Punkt 7, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Anion aus Acetat, Propionat und Benzoat ausgewählt ist.
9. Verfahren nach Punkt 6, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Salz des zweiwertigen Metalls Zinkacetat ist.
10. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Schutzgruppen der Aminofunktionen Benzyloxycarbonylgruppen sind, die gegebenenfalls substituiert sind.
11. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Carboxylgruppe der L-(-)-4-Amino-2-hydroxybuttersäure als aktiver Ester mit N-Hydroxysuccinimid, N-Hydroxyphthalimid oder N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximid oder als gemisches Anhydrid mit Phthalsäure, Benzoessäure oder Benzylcarbonsäure aktiviert ist.
12. Verfahren nach Punkt 11, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Carboxylgruppe als aktiver Ester aktiviert ist.
13. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Salz des zweiwertigen Metallkations in einem auf das Ausgangs-Kanamycinderivat bezogenen Molverhältnis zwischen 1:1 und 10:2 verwendet wird.
14. Verfahren nach Punkt 13, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Molverhältnis des Salzes des zweiwertigen Metallkations zu dem Ausgangs-Kanamycinderivat zwischen 2:1 und 6:1 liegt.
15. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Derivat der L-(-)-4-Amino-2-hydroxybuttersäure im Überschuß eingesetzt wird.
16. Verfahren nach Punkt 15, **gekennzeichnet dadurch**, daß der erwähnte Überschuß zwischen 20% und 60% liegt.
17. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß das zweiwertige Metallkation aus dem Komplex entfernt wird, indem der pH der Mischung auf einen Wert zwischen 9 und 10 gebracht wird.
18. Verfahren nach Punkt 17, **gekennzeichnet dadurch**, daß der pH durch Zugabe einer NH₄OH-Lösung auf einen Wert zwischen 9 und 10 gebracht wird.

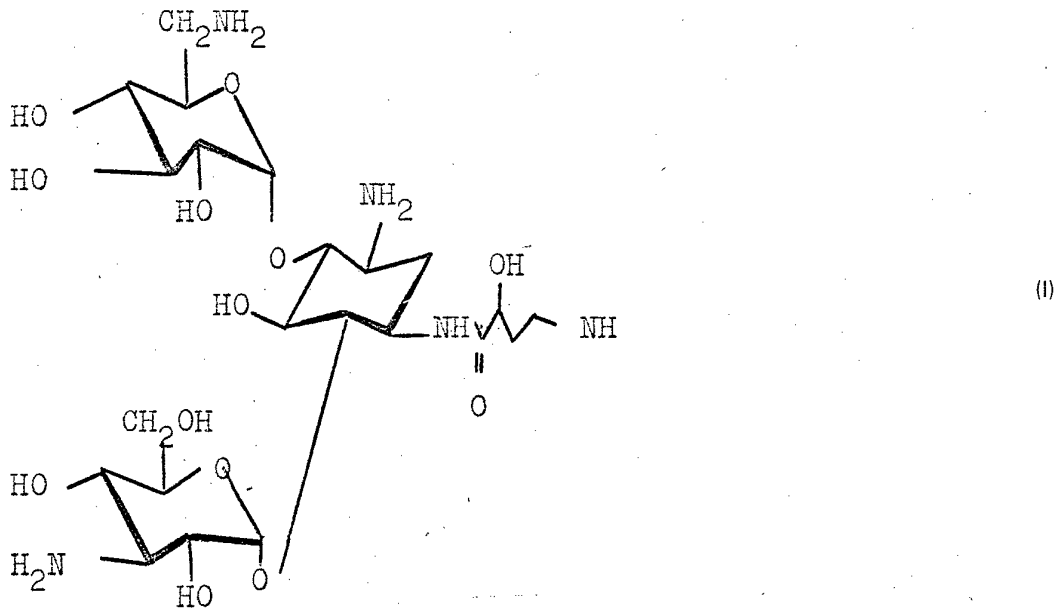
Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur selektiven Synthese von Amikacin.

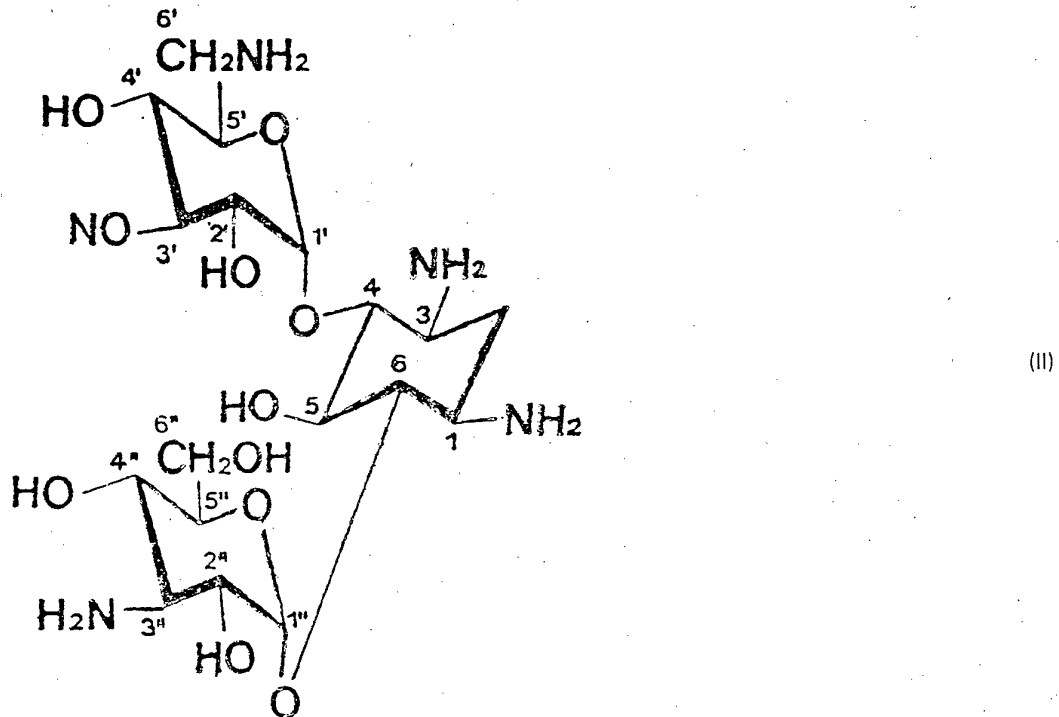
Die erfindungsgemäß hergestellte Verbindung wird angewandt als Arzneimittel, insbesondere als Antibiotikum.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

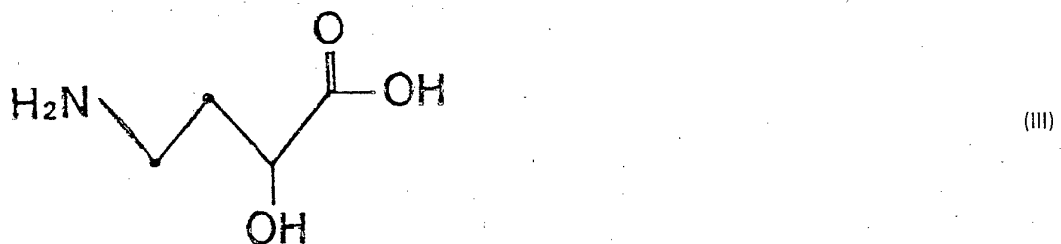
Das Amikacin, O-3-Amino-3-desoxy- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-O-(6-amino-6-desoxy- α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4))-N¹-(4-amino-2-hydroxy-1-oxobutyl)-2-desoxy-D-streptamin, mit der Formel (I):



ist ein in ausgedehntem Maße in der Therapie verwendetes, halbsynthetisches Antibiotikum, das sich formal von der Acylierung des Kanamycins A (II):



mit L-(-)-4-Amino-2-hydroxybuttersäure (III):

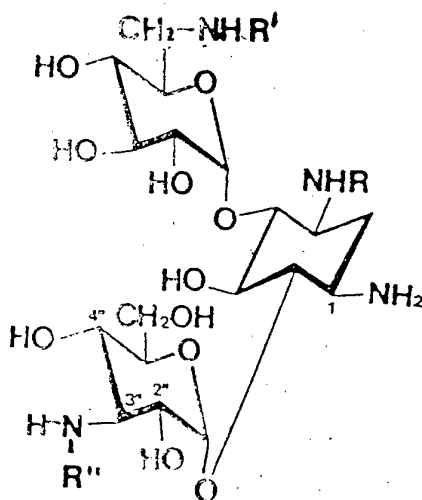


(nachstehend als L-HABA bezeichnet) herleitet.

In Druckschriften wurde Amikacin zum erstenmal von H. Kawaguchi u. a. in Journ. of Antib. XXV, (1972), S. 695, und in der Patenliteratur in der US-PS 3781268 beschrieben. In der Patenliteratur und in nicht zur Patenliteratur gehörenden Druckschriften sind jedoch mehrere Verfahren beschrieben worden, die die Herstellung von Amikacin in immer größeren Ausbeuten und mit immer höherer Reinheit bezwecken. Wie aus dem Molekül des Kanamycins (A) (II) ersichtlich ist, gibt es in Wirklichkeit vier acylierbare Aminogruppen, zwei davon, die als N-1 bzw. N-3 bezeichnet werden, an dem mittleren Ring (dem 2-Desoxystreptamin-Ring), eine, die als N-6 bezeichnet wird, am 6-Amino-6-desoxy-D-glucose-Ring und eine, die als N-3 bezeichnet wird, am 3-Amino-3-desoxy-D-glucose-Ring.

Die Schwierigkeiten bei der chemischen Synthese von Amikacin liegen in der regioselektiven Acylierung der Aminogruppe in der 1-Stellung; die anderen drei Aminogruppen führen, wenn sie acyliert werden, abgesehen von der sich daraus ergebenden Verminderung der stöchiometrischen Ausbeute des Hauptprodukts, nämlich des Amikacins, zu Stellungsisomeren mit geringerer mikrobiologischer Aktivität. Außerdem machen die Stellungsisomere, die zusammen mit Amikacin in den Produkten der Synthese vorhanden sind, eine Feinreinigung unter den verschiedenen Produkten notwendig, die nur durch Chromatographie an Ionenaustauscherharzen, die mit einer weiteren Verminderung der Ausbeute des Hauptprodukts verbunden ist, erzielt werden kann.

Außer Amikacin können tatsächlich die folgenden anderen Isomere gebildet werden, die mit derselben Gruppe der L-(-)-4-Amino-2-hydroxybuttersäure acyliert sind [T. Naito u. a., Journal of Antib. XXVI, 297, (1973)]:



$R' = -\text{CO}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$; $R = R'' = \text{H}$ (als BB-K6 bezeichnet)

$R'' = -\text{CO}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$; $R = R' = \text{H}$ (als BB-K11 bezeichnet)

$R = -\text{CO}-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$; $R' = R'' = \text{H}$ (als BB-K29 bezeichnet)

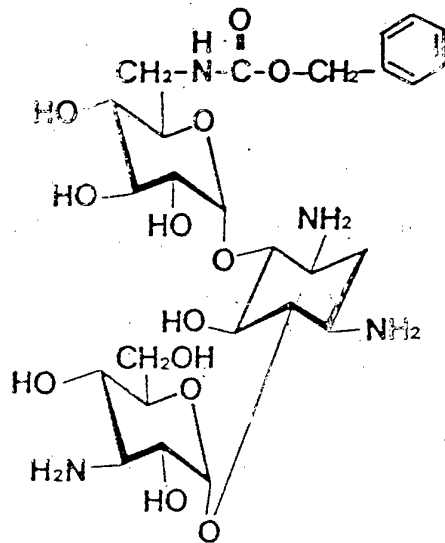
Die direkte Acylierung von Kanamycin A [beispielsweise in T. Naito u. a., Journal of Antib., XXVI, 297 (1973)] führt mit hohen Ausbeuten hauptsächlich zu dem Derivat, das an der die reaktionsfähigere Aminogruppe darstellenden Aminogruppe N-6' acyliert ist; dieser Sachverhalt verhindert, daß durch direkte Acylierung mit der L-(-)-4-Amino-2-hydroxybuttersäure Amikacin erhalten wird.

Wenn die Reaktion mit L-(-)-4-Amino-2-hydroxybuttersäure erwähnt wird, ist in Wirklichkeit die Reaktion mit einem Derivat davon gemeint, bei dem die Aminogruppe in 4-Stellung geschützt ist und die Carboxylgruppe aktiviert ist, um zu veranlassen, daß sie leicht und mit hoher Ausbeute mit der Aminogruppe des Kanamycins reagiert.

Im einzelnen können als Schutzgruppen die üblichen Schutzgruppen für die Aminofunktionen gewählt werden, die dem Fachmann bekannt sind, beispielsweise die t-Butoxycarbonylgruppe, die am Ende der Reaktion leicht durch Behandlung mit einer verdünnten Säure entfernt werden kann, oder die Benzyloxycarbonylgruppe oder die 4-Nitrobenzyloxycarbonylgruppe, die durch katalytische Hydrogenolyse an Palladium- oder Platinkatalysatoren entfernt werden können, oder andere derartige Schutzgruppen (siehe Protective Groups in Organic Synthesis, T.W. Greene; J. Wiley + Sons Inc., 1981, Seiten 218 bis 287); eine der Formen, in denen die Carboxylgruppe geeigneterweise aktiviert ist, ist jedoch diejenige als aktiver Ester mit N-Hydroxysuccinimid, N-Hydroxyphthalimid, N-Hydroxy-5-norbornen-2,3-dicarboximid usw. oder als gemischtes Anhydrid mit Pivalinsäure, Benzoesäure oder Benzylcarbonsäure.

Die Ausgangssynthese von Amikacin wurde von H. Kawaguchi u. a. (zitierte Literaturangaben) unter Beseitigung des schwerwiegenden Nachteils der höheren Reaktivität der in der 6'-Stellung des Kanamycins befindlichen Aminogruppe durchgeführt, indem diese Gruppe mit einer Schutzgruppe wie z. B. der Benzyloxycarbonylgruppe zur Reaktion gebracht wurde.

Es wird das N-6'-Benzyloxycarbonylkanamycin (IV):

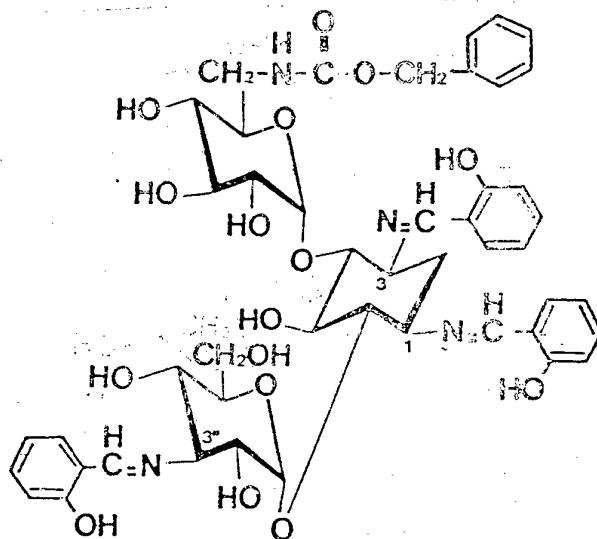


(IV)

gebildet, das seinerseits acyliert wird. Diese Acylierung ist jedoch nicht regioselektiv, wodurch nach der nachfolgend zur Beseitigung aller N-Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppen durchgeführten Hydrierung neben Amikacin auch die Stellungsisomere BB-K 11 und BB-K 29 und einige Polyacylierungsprodukte gebildet werden.

Da infolgedessen keine Selektivität vorhanden ist, wird eine Trennung der auf diese Weise gebildeten komplexen Mischung notwendig gemacht; die Trennung wird an einem Ionenaustauschchromatographie-Harz durchgeführt, wobei rohes Amikacin mit stöchiometrischen Ausbeuten von 22% erhalten wird, die durch die nachfolgend zur Erzielung von reinem Amikacin durchgeführte Reinigung weiter vermindert werden. Die sehr niedrigen Ausbeuten dieser Synthese veranlaßten, daß neue Synthesewege untersucht wurden, um die Ausbeute zu erhöhen und infolgedessen die Kosten selbst bei Anwendung einer größeren Zahl von Syntheseschritten zu vermindern.

T. Naito, S. Nakagawa und M. Oka offenbarten in der veröffentlichten Französischen Patentschrift 2272009 einen weiteren Syntheseweg, bei dem 6'-N-Benzyloxycarbonylkanamycin A (IV), dasselbe Derivat wie bei der früheren Synthese, mit gewissen aromatischen Aldehyden in einem Verhältnis von mindestens drei Mol Aldehyd pro Mol 6'-N-Benzyloxycarbonylkanamycin A zur Reaktion gebracht wird, wobei die jeweiligen Schiff'schen Basen zwischen den drei freien Aminogruppen in 1-, 3- und 3"-Stellung und den jeweiligen Aldehyden gebildet werden. Die resultierende Verbindung (V):



(V)

die drei Aldehydreste pro Mol 6'-N-Benzyloxycarbonylkanamycin enthält, wird danach mit einem geeigneten Derivat von L-HABA acyliert, wodurch nach der Hydrogenolyse der Schutzgruppen Amikacin erhalten wird.

Die Acylierung der 3 Aminogruppen (in 1-, 3- und 3"-Stellung) ist jedoch nicht selektiv, und es ist notwendig, von der chromatographischen Trennung an einem Ionenaustauscherharz Gebrauch zu machen, um Amikacin hauptsächlich von BB-K 29 und BB-K 11 abzutrennen.

Überdies betragen die stöchiometrischen Gesamtausbeuten an Amikacin nur 23% und sind folglich mit den Ausbeuten des vorher beschriebenen Verfahrens vergleichbar.

Ferner sind diese Ausbeuten unter Bezugnahme auf das Zwischenprodukt 6'-N-Benzyloxycarbonylkanamycin (IV) berechnet worden, das seinerseits mit stöchiometrischen Ausbeuten von 45 bis 56% aus Kanamycin A erhalten wird.

Mit einem Wort, diese zwei Synthesewege liefern — von Kanamycin A ausgehend — Gesamtausbeuten an Amikacin von 10 bis 13%; dieser Wert ist offensichtlich sehr niedrig.

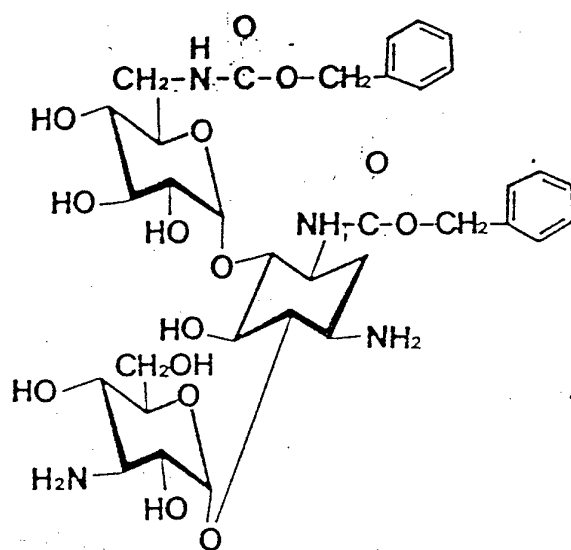
Eine wichtige Entwicklung in der selektiven Acylierung von Kanamycin A zur Herstellung von Amikacin ist bei den Untersuchungen von M. J. Cron u. a., die in Chem. Comm., 266 (1979), und in den US-Patentschriften 4347 354 und 4424 343

In diesen Patentschriften ist die Herstellung von Amikacin durch Acylierung eines polysilylierten Derivats von Kanamycin A, das gegebenenfalls in 6'-Stellung oder in 6'- und 3-Stellung mit Schutzgruppen versehen ist, die von Silylgruppen verschieden sind, offenbart. Im einzelnen wird das polysilylierte Derivat von Kanamycin oder geschütztem Kanamycin hergestellt, indem das Kanamycin-Substrat in einem geeigneten organischen Lösungsmittel, unter denen Acetonitril bevorzugt wird, mit verschiedenen Silanisierungsmitteln, unter denen Hexamethyldisilazan bevorzugt wird, zur Reaktion gebracht wird, um Derivate zu erhalten, bei denen alle Hydroxylgruppen des Kanamycins oder ein Teil davon durch die $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ -Gruppe geschützt ist. Nach der üblichen Hydrogenolyse, die in diesem Fall nur zur Entfernung der Schutzgruppe der L-HABA-Säure dient, wird neben dem Ausgangs-Kanamycin und Polyacylierungsprodukten immer noch eine Mischung von Stellungsisomeren erhalten, und infolgedessen ist immer noch eine chromatographische Trennung der Produkte erforderlich.

Dieses Verfahren bewirkt zwar eine beachtliche Erhöhung der Ausbeuten an Amikacin, jedoch zeigt es vom Standpunkt des Umweltschutzes schwerwiegende Nachteile. Im einzelnen ist Acetonitril, das bevorzugte Lösungsmittel für diese Reaktion, tatsächlich ein hochgiftiges Lösungsmittel, von dessen Verwendung im industriellen Maßstab sehr abzuraten ist; überdies bildet Hexamethyldisilazan während der Reaktion gasförmiges Ammoniak, das in geeigneter Weise entfernt werden muß, um eine Verunreinigung der Atmosphäre zu vermeiden.

Ein weiteres Verfahren zur Herstellung von Amikacin basiert auf den Forschungsarbeiten von T. Tsuchiya u. a., Tet. Lett., 4951 (1979), und Belgische Patentschrift 879925 von Zaidan Hojin Biseibutsu Kagaku Kenkyu Kai.

Der Syntheseweg basiert auf der Bildung eines Zwischenderivats (VI):



(VI)

das in N-6'- und N-3-Stellung durch die übliche N-Benzoyloxycarbonylgruppe geschützt ist.

Dieses Zwischenprodukt, das durch Bildung von Komplexverbindungen der Aminogruppen in 3"- und 1-Stellung mit Zinkacetat und den betreffenden Hydroxylgruppen, die sich in vicinaler Stellung in bezug auf die vorstehend erwähnten Aminogruppen befinden, erhalten wird, ist schon in der Abhandlung von T. L. Nagabhushan u. a., J. Amer. Chem. Soc., 100, 5254 (1978), und in der US-PS 4 136 254 beschrieben worden, wo von der Darstellung durch Komplexbildung mit verschiedenen Metallen berichtet wurde.

Während dieses „zweimal geschützte“ Zwischenprodukt in der US-PS 4 136 254 durch direkte Acylierung mit einem Acylierungsmittel von L-HABA in das aminoglykosidische Antibiotikum umgewandelt wird, was jedoch im Fall von Amikacin vollkommen unbefriedigende Ausbeuten liefert, wird dieses Zwischenprodukt jedoch in der BE-PS 879925 zunächst mit Ethyltrifluoracetat zur Reaktion gebracht, um die Aminogruppe in 3"-Stellung zu schützen, und dann mit dem Derivat von L-HABA, das in geeigneter Weise ausgewählt wird, zur Reaktion gebracht, so daß eine selektive Acylierung der einzigen freien Aminogruppe, die sich in 1-Stellung befindet, erzielt wird. Die zwei verschiedenen Schutzgruppen, nämlich die Trifluoracetyl- und die Benzoyloxycarbonylgruppe, werden dann mit Ammoniak bzw. mit Wasserstoff entfernt, wodurch die Reaktion vervollständigt wird. Auch in diesem Fall steigen die Ausbeuten an Amikacin in erheblichem Maße an, jedoch ist das Verfahren wegen der Verwendung von Ethyltrifluoracetat, das ein hochgiftiger und sehr teurer Reaktionsteilnehmer ist, für die Anwendung im industriellen Maßstab nicht geeignet.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines verbesserten Verfahrens zur Synthese von Amikacin, mit dem auf einfache, wirtschaftliche und umweltfreundliche Weise hohe Ausbeuten an dem gewünschten Produkt erzielt werden können.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, geeignete Ausgangsverbindungen und geeignete Reaktionsschritte für die Herstellung von Amikacin aufzufinden.

Es ist nun ein neues Verfahren für die Synthese von Amikacin entwickelt worden, das vom gewerbehygienischen Standpunkt aus besonders sicher ist, weil fast unschädliche Reaktionsteilnehmer und Lösungsmittel verwendet werden, das leicht durchführbar ist, weil die gebildeten Zwischenprodukte nicht abgetrennt werden müssen, und das eine zufriedenstellende Erhöhung der

Ausbeute an Amikacin bewirkt, wobei gleichzeitig Reaktionsteilnehmer verwendet werden, die viel billiger sind als die nach dem Stand der Technik verwendeten Reaktionsteilnehmer.

Im einzelnen besteht das erfindungsgemäße Verfahren, bei dem von einem in 6'- und in 3-Stellung geschützten Kanamycin A ausgegangen wird, darin, daß das geschützte Kanamycin A in Gegenwart von Wasser als Lösungsmittel oder Verschnitt-Lösungsmittel der Reaktion mit einem Salz eines zweiwertigen Kations eines aus Zink, Nickel, Eisen, Cobalt, Mangan, Kupfer und Cadmium oder ihren Mischungen ausgewählten Metalls zur Reaktion gebracht wird, worauf der erhaltene Komplex in situ mit dem in geeigneter Weise ausgewählten reaktionsfähigen Derivat von L-HABA zur Reaktion gebracht wird. Das Metallkation wird dann entfernt, indem eine basische Lösung zugegeben wird, bis der pH auf einen Wert von 9 bis 10 gebracht worden ist. Das Acylierungsprodukt wird dann durch übliche Verfahren abgetrennt; die Gruppen, die die Aminofunktionen in 6' und 3-Stellung und in der Seitenkette schützen, werden entfernt, und das auf diese Weise erhaltene Rohprodukt wird durch Chromatographie gereinigt, wobei Amikacin mit Ausbeuten in der Nähe von 50% erhalten wird.

Im einzelnen kann aus Ausgangsprodukt irgendein Derivat von Kanamycin A verwendet werden, bei dem die Aminogruppen in 6'- und in 3-Stellung durch Substitution eines Wasserstoffatoms mit einer Acylgruppe, beispielsweise mit einer Benzyloxycarbonylgruppe oder einer substituierten Benzyloxycarbonylgruppe wie z. B. einer p-Nitrobenzyloxycarbonyl- oder p-Methoxybenzyloxycarbonylgruppe, einer Alkoxycarbonylgruppe wie z. B. einer t-Butoxycarbonyl- oder t-Amyloxycarbonylgruppe, einer Phthaloylgruppe oder einer Halogenalkylcarbonylgruppe wie z. B. einer Trifluoracetyl- oder Chloracetylgruppe, oder mit anderen geeigneten Schutzgruppen geschützt sind. Die Aminogruppen in 6'- und in 3-Stellung sollen jedoch vorzugsweise mit einer Benzyloxycarbonylgruppe oder einer substituierten Benzyloxycarbonylgruppe geschützt sein, weil diese Gruppen am Ende der Reaktion durch katalytische Reduktion leicht entfernt werden können, wie bereits dargelegt wurde.

Das Ausgangsprodukt dieses Typs kann durch das in der BE-PS 855 704 beschriebene Verfahren oder durch das in der CA-PS 1 131 628 beschriebene Verfahren hergestellt werden. Im einzelnen wird der erste Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens durchgeführt, indem das Ausgangsprodukt, d. h., Kanamycin A, das in 3- und in 6'-Stellung geschützt ist, und eine mindestens äquimolare Menge des ausgewählten Salzes eines zweiwertigen Metalls in Wasser oder in einer Mischung von Wasser mit einem inerten, mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel wie z. B. Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid, niederem aliphatischem Alkohol, Tetrahydrofuran, Aceton, Acetonitril usw. gelöst werden.

Das zweiwertige Metallkation wird aus den Kationen von Zink, Nickel, Eisen, Cobalt, Mangan, Kupfer und Cadmium ausgewählt, wobei die weniger giftigen und wirtschaftlicheren Kationen selbstverständlich bevorzugt werden, während das Anion irgendein organisches oder anorganisches Kation sein kann, obwohl die von schwachen Säuren abgeleiteten Anionen und insbesondere die von schwachen organischen Säuren wie z. B. Essigsäure, Propionsäure oder Benzoesäure abgeleiteten Anionen bevorzugt werden, weil die Metallsalze dieser Säuren im allgemeinen eine höhere Komplexbildungsaktivität haben.

Das Salz wird im allgemeinen in einem auf das Ausgangssubstrat bezogenen Molverhältnis zwischen 1:1 und 10:1 und vorzugsweise zwischen 2:1 und 6:1 verwendet.

Die Reaktion wird zweckmäßigerweise bei Raumtemperatur unter Rühren durchgeführt. Sobald der Komplex gebildet ist, wird im zweiten Schritt des Verfahrens unter Rühren eine Lösung oder Suspension des vorher ausgewählten reaktionsfähigen Derivats von L-HABA in einem polaren und aprotischen organischen Lösungsmittel zugegeben. Zu den organischen Lösungsmitteln, die zweckmäßigerweise verwendet werden können, gehören Dimethylsulfoxid, Acetonitril, Tetrahydrofuran, Dimethylformamid und gemäß einem bevorzugten Merkmal der Erfindung die halogenierten aliphatischen Kohlenwasserstoffe wie z. B. Methylenchlorid, Chloroform, 1,2-Dichlorethan usw. Auch dieser zweite Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird zweckmäßigerweise bei Raumtemperatur durchgeführt.

In beiden Schritten ist jedoch ein mäßiges Erwärmen zur Beschleunigung der Reaktion möglich.

Nach einige Stunden dauerndem Rühren wird die gegebenenfalls vorhandene organische Phase entweder durch Destillation, wenn das Lösungsmittel einen niedrigen Siedepunkt hat, oder durch mechanische Abtrennung entfernt, und zu der Reaktionsmischung wird eine wäßrige basische Lösung hinzugegeben, bis der pH auf einen Wert zwischen 9 und 10 gebracht worden ist.

Als basisches Mittel kann irgendein Alkalihydroxid oder -carbonat oder gemäß einem bevorzugten Merkmal der Erfindung NH_4OH verwendet werden. Die Zugabe des basischen Mittels bewirkt, daß der Komplex unter Ablösung des Metallkations und unter Ausfällung des zweimal, d. h., in 3- und in 6'-Stellung, geschützten Acylierungsprodukts zerstört wird. Das letztere wird durch Filtrieren gewonnen, und die Schutzgruppen in 3- und in 6'-Stellung sowie die Schutzgruppe in der Seitenkette werden gemäß den üblichen Verfahren entfernt. Wenn die Schutzgruppen beispielsweise gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung Benzyloxycarbonylgruppen sind, die gegebenenfalls substituiert sind, werden sie durch übliche katalytische Hydrogenolyse mit einem Katalysator aus Platin, Palladium, Palladiumoxid oder Platinoxid entfernt, oder, wenn diese Schutzgruppen Phthaloylgruppen sind, werden sie einfach durch Hydrolyse mit Hydrazin entfernt, oder t-Butoxycarbonyl-Schutzgruppen werden zweckmäßigerweise mit Ameisensäure entfernt usw.

Das auf diese Weise erhaltene Rohprodukt wird dann durch chromatographische Verfahren, die aus der Literatur für die Reinigung von Amikacin bekannt sind, gereinigt. Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren mit dem zweimal, d. h., in 3-N- und in 6'-N-Stellung, geschützten Kanamycin A nach der Bildung des Komplexes des letzteren mit dem Metallkation durchgeführte Acylierung führt überraschenderweise zu einer sehr hohen Regioselektivität, da vorzugsweise Amikacin gebildet wird und weder BB-K 11 noch das Produkt, das durch doppelte Acylierung in N-1- und in N-3"-Stellung erhalten wird, gebildet wird.

Dieses Ergebnis wird wahrscheinlich wegen eines Unterschiedes in der Stabilität der zwei Komplexbildungsstellen ($\text{N-3''} \gg \text{N-1}$) unter den festgelegten Reaktionsbedingungen erhalten.

Dieses Ergebnis wird in der folgenden Tabelle gezeigt, in der die Werte, die bei der direkten Acylierung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonylkanamycin oder bei der Bildung eines Komplexes des letzteren mit Zinkacetat und der nachfolgenden Acylierung mit dem Ester der 4-Benzyloxycarbonylamino-2-hydroxybuttersäure mit n-Hydroxysuccinimid erhalten werden, verglichen werden:

3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-1-N-[L-(-)- γ -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxybutyryl]-kanamycin A
(% stöch.)

Direkte Acylierung 27
Acylierung des Komplexes 58

Unumgesetztes 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonylkanamycin

Direkte Acylierung 25
Acylierung des Komplexes 25

Es ist außerordentlich wichtig, die Zusammensetzung der End-Reaktionsmischung nach der Hydrogenolyse der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppen, die unter den Standardbedingungen praktisch quantitativ ist, zu beobachten, wobei die letzteren als Beispiel im experimentellen Teil gezeigt werden.

Die einzige Verunreinigung, die in großer Menge vorhanden ist, ist Kanamycin A, das nicht nur die Abtrennung der Verbindung in der Ionenaustauschchromatographiesäule nicht stört, weil seine Verweilzeit in der Säule kürzer ist als die Verweilzeit des Amikacins, sondern auch zurückgewonnen werden kann, was zu einer 80 % betragenden stöchiometrischen Ausbeute an Amikacin in bezug auf Kanamycin A, den teuersten Reaktionsteilnehmer der Synthese, führt.

Ausführungsbeispiel

Das erfindungsgemäße Verfahren wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

5,2 g 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonylkanamycin A mit einer Reinheit von 85 % (5,87 mmol) und 3,9 g wasserfreies Zinkacetat (21,3 mmol) werden in einer Mischung von Dimethylsulfoxid (25 ml) und Wasser (70 ml) gelöst. Nach zweistündigem Rühren bei Raumtemperatur wird der Ester von 4-Benzyloxycarbonylamino-2-hydroxybuttersäure mit N-Hydroxysuccinimid in Methylenchlorid gelöst (3,28 g in 140 ml) zugegeben.

Nach 5stündigem Rühren wird die Isolierung durchgeführt, indem das Methylenchlorid destilliert wird und unter 20°C eine Perkolation einer Mischung von Wasser (125 ml) und konzentriertem Ammoniak (25 ml) durchgeführt wird. Nach Filtrieren, Waschen und Trocknen in einem Trockenschrank bei 45°C werden 6,7 g 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-1-N-[L-(-)- γ -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxybutyryl]-kanamycin A mit einer Reinheit von 45 % zusammen mit 16,8 % des Ausgangsprodukts 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonylkanamycin A erhalten. Diese Ausbeute entspricht 51,4 % des stöchiometrischen Wertes.

Ein Teil des auf diese Weise erhaltenen Produkts wird mit Ameisensäure und Pd/C hydriert, wobei 164 ml einer wässrigen Lösung, die 6,61 mg/ml Amikacin, 0,4 mg/ml Kanamycin, 0,21 mg/ml BB-K 11 und 1,83 mg/ml Diacylierungsprodukt mit L-HABA in N-1- und N-3"-Stellung enthält, erhalten werden.

Die relative Reinheit des Amikacins beträgt 73 %.

Beispiel 2

5,2 g 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonylkanamycin A mit einer Reinheit von 85 % (5,87 mmol) werden in 20 ml Methanol suspendiert; Zinkacetat (3,9 g, als wasserfreies Produkt) wird in Wasser (80 ml) gelöst schnell zugegeben. Zu der erhaltenen Lösung werden nach 2stündigem Rühren bei Raumtemperatur auf einmal 3,28 g (9,35 mmol) des Esters von L-(-)-4-Benzyloxycarbonylamino-2-hydroxybuttersäure mit N-Hydroxysuccinimid in 100 ml Methylenchlorid gelöst hinzugegeben.

Nach einer Nacht bei Raumtemperatur wird die Mischung nach Verdampfen des Methylenchlorids mit Wasser und Ammoniak (5%ig, 150 ml) verdünnt.

Nach Filtrieren des Feststoffs und Trocknen werden 6,5 g eines Produkts mit einem 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-1-N-[L-(-)- γ -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxybutyryl]-kanamycin A-Gehalt von 49,8 %, was einer stöchiometrischen Ausbeute von 57 % entspricht, erhalten.

Das noch vorhandene Ausgangsprodukt entspricht 17 % des abgetrennten Produkts, was 25 % des stöchiometrischen Wertes sind.

Das bei der Acylierung erhaltene Produkt wird in 100 ml Wasser suspendiert. 3,5 g 5%iges Pd/C werden zugegeben. 7 ml Ameisensäure, gelöst in 20 ml Wasser, werden durchlaufen gelassen bzw. zur Perkolation verwendet. Nach Rühren über eine Nacht wird die Mischung filtriert, und der feste Rückstand wird mit Wasser gewaschen.

Die erhaltene Lösung (223 ml) hat die folgende Zusammensetzung:

	mg/ml	Anteil (%)
Amikacin	8,2	63,3
BB-K 29	0,3	2,3
BB-K 11	0,3	2,3
Diacyliertes Produkt*	0,69	5,3
Kanamycin A	3,46	26,7

Produkt mit dem L-HABA-Rest in N-1- und N-3"-Stellung; relative Reinheit des Amikacins in bezug auf seine homologen Verbindungen (abgesehen von Kanamycin): höher als 90 %.

Die Lösung wird als solche auf pH 7 gebracht und dann durch eine mit schwach saurem Ionenaustauscherharz in der

Ammoniakform gefüllte Säule hindurchlaufen gelassen. Sie wird mit Ammoniaklösung eluiert, und die Fraktionen, die Kanamycin A enthalten, und die Fraktionen, die Amikacin enthalten, werden getrennt. Aus den erstgenannten, die vereinigt, verdampfen gelassen und eingeeengt werden, werden nach Fällung mit Methanol aus einer Lösung mit einer Konzentration von 20% 1,1 g Kanamycinsulfat erhalten. Die amikacinhaltigen Fraktionen werden auf eine Konzentration von 20% eingeeengt und liefern nach Ansäuern mit 50%iger Schwefelsäure, Behandlung mit Kohlenstoff und Zugabe von Methanol 2,6 g Amikacinsulfat mit einem mikrobiologischen Titer von 680 µg/mg.

Beispiel 3

Dieses Vergleichsbeispiel zeigt, in welchem Maße die Selektivität (und/oder die Stabilität) der Komplexe grundsätzlich durch das Wasser beeinflusst wird, das — im Gegensatz zu der mit Kanamycin A (in wasserfreier Umgebung) durchgeführten Komplexbildung — nicht nur nicht schädlich ist, sondern im Gegenteil notwendig ist, um den Unterschied zwischen den zwei Komplexbildungsstellen zu verstärken.

Tatsächlich findet in Abwesenheit von Wasser keine Acylierung des 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonylkanamycins A (VI) in Gegenwart zweiwertiger Kationen statt, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß nicht nur an der N-3"-Stellung, sondern auch an der N-1-Stellung ein stabiler Komplex gebildet wird.

5,2 g 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonylkanamycin A mit einer Reinheit von 85% (5,87 mmol) werden in 50 ml Dimethylsulfoxid gelöst, und zu der Lösung werden 3,9 g (21,9 mmol) wasserfreies Zinkacetat hinzugegeben. Nach zweistündigem Rühren bei Raumtemperatur wird der Ester von 4-Benzyloxycarbonylamino-2-hydroxybuttersäure mit N-Hydroxysuccinimid in Methylenchlorid gelöst (3,28 g in 140 ml) zugegeben.

Nach 5stündigem Rühren wird die Isolierung durchgeführt, indem das Methylenchlorid destilliert wird und unter 20°C eine Perkolation einer Mischung von Wasser (125 ml) und konzentriertem Ammoniak (25 ml) durchgeführt wird.

Das Produkt wird filtriert, gewaschen und in einem Trockenschrank bei 45°C getrocknet. Es werden 5,7 g des Ausgangsprodukts mit einer Reinheit von 80% ohne Spuren einer Acylierung in N-1-Stellung erhalten.

Unter diesen Bedingungen werden die N-1- und die N-3"-Stellung wegen der Bildung von Komplexen, die die nachfolgende Acylierung verhindern, blockiert.
