



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

257292

(11) (B2)

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>  
C 07 H 15/234

(22) Přihlášeno 07 08 86  
(21) PV 5913-86.U  
(32) (31) (33) Právo přednosti od 10 10 85  
(22425 A/85) Itálie

(40) Zveřejněno 17 09 87

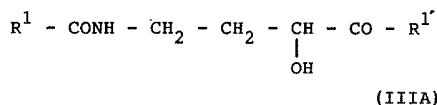
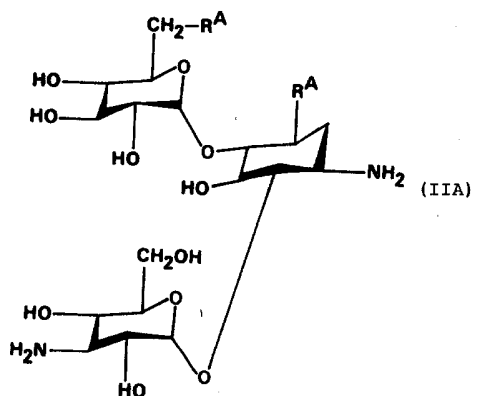
(45) Vydáno 15 03 89

(72) Autor vynálezu MANGIA ALBERTO, MILÁN, GIOBBIO VINCENZO, TURIN,  
ORNATO GIORGIO, IVREA TURIN (Itálie)

(73) Majitel patentu PIERREL S.p.A., NEAPOL (Itálie)

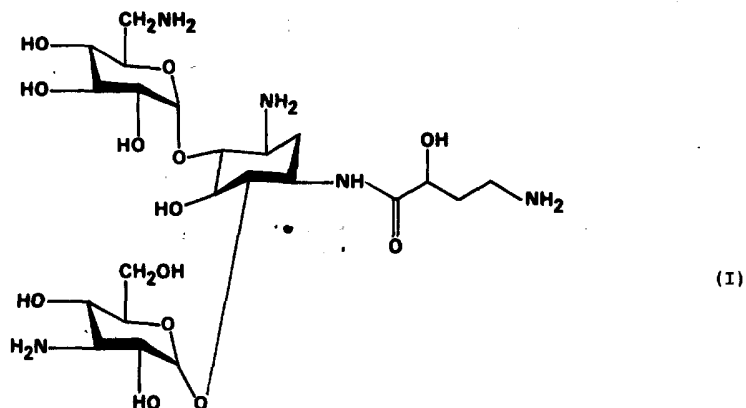
## (54) Způsob výroby amikacinu

Způsob výroby amikacinu z chráněného derivátu kanamycinu A, obecného vzorce IIA, kde  $R^A$  znamená benzyloxykarbonylamino-, p-nitrobenzyloxykarbonylamino-, p-methoxybenzyloxykarbonylamino-, terc.butoxykarbonylamino-, terc.amyloxykarbonylamino-, ftaloylamino-, trifluoracetyl-amino- nebo chloracetylaminoskupinu, který spočívá v tom, že se tato sloučenina nechá reagovat se solí dvojvazného kationtu kovu vybraného ze skupiny zahrnující zinek, nikl, železo, kobalt, mangan, měď a kadmium, v přítomnosti vody jako rozpouštědla nebo korozpouštědla, vzniklý komplex se in situ podrobí reakci s reaktivním derivátem L-4-amino-2-hydroxymásečné kyseliny obecného vzorce IIIA, kde  $R^1$  je terc.-butoxylová, benzyloxylová nebo p-nitrobenzyloxylová skupina a  $R^1$  je zbytek esteru shora uvedené kyseliny s N-hydroxysukcinimidem, N-hydroxyftalimidem či N-hydroxy-5-norbornen-2,3-dikarboximidem, nebo zbytek smíšeného anhydridu shora uvedené kyseliny s kyselinou pivalovou, benzoovou nebo fenylacetovou, z produktu se odstraní kationt kovu a chránicí skupiny, a výsledný surový produkt se vyčistí. Acylace prováděná ze těchto podmínek probíhá mimořádně selektivně.

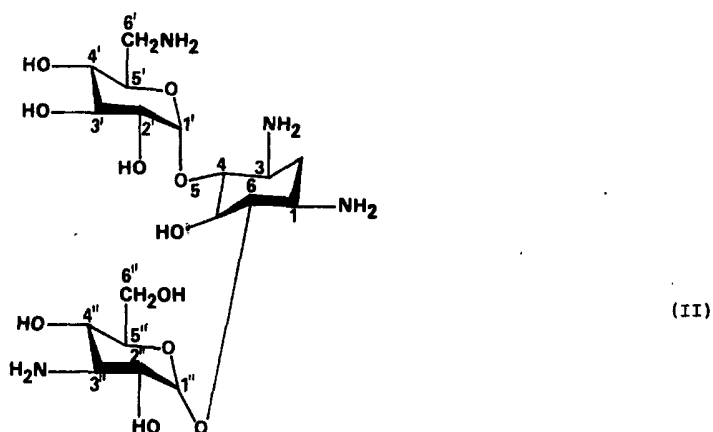


Vynález se týká nového způsobu syntézy amikacinu z kanamycinu A.

Amikacin, tj. 0,3-amino-3-deoxy-alfa-D-glukopyranoxyl-(1→6)-0-[6-amino-6-deoxy-alfa-D-glukopyranosyl-(1→4)]-N<sup>1</sup>-(4-amino-2-hydroxy-1-oxobutyl)-2-deoxy-D-streptamin, odpovídající vzorci I



je polosyntetickým antibiotikem s rozsáhlým použitím v terapii, vznikajícím při acylaci kanamycinu A, vzorce II



L-(-)-4-amino-2-hydroxymáseľnou kyselinou vzorce III



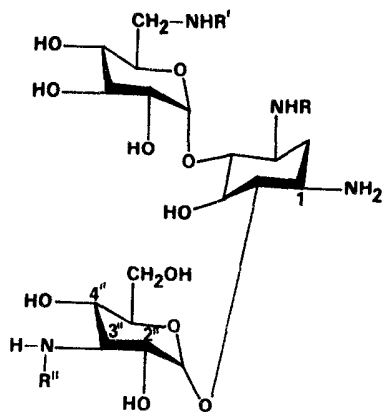
která bude pro zjednodušení označována dále zkratkou L-HABA.

Amikacin popsali prvně v literatuře H. Kawaguchi a spol., Journ. of Antib. XXV, (1972), str. 695, v patentové literatuře je pak amikacin prvně zmíněn v americkém patentovém spisu č. 3 781 268. Jak v patentové, tak nepatentové literatuře je již popsána řada postupů pro přípravu amikacinu se stále vyšším výtěžkem a ve vyšší čistotě.

V molekule kanamycinu A vzorce II se nacházejí 4 acylovatelné aminoskupiny, a to dvě na centrálním 2-deoxystreptaminovém kruhu, označované N<sup>1</sup> resp. N<sup>3</sup>, jedna na 6-amino-6-deoxy-α-D-glukosovém kruhu, označovaná N<sup>6'</sup> a jedna na 3-amino-3-deoxy-D-glukosovém kruhu, označovaná N<sup>3''</sup>.

Obtíže při chemické syntéze amikacinu spočívají v polohově selektivní acylaci aminoskupiny v poloze 1, protože případná acylace ostatních tří aminoskupin vede k vzniku polohových isomerů s nižší mikrobiologickou účinností, nehledě na příslušné snížení stechiometrického výtěžku hlavního produktu, jímž je amikacin. Navíc pak polohové isomery přítomné v reakční směsi spolu s amikacinem mají za následek nutnost důkladného čištění, které je možno provést pouze chromatografií na iontoměničích, spojenou s dalšími ztrátami výtěžku hlavního produktu.

Vedle amikacinu mohou vznikat následující další isomery acylované stejným zbytkem L-(-)-4-amino-2-hydroxymáselné kyseliny [T. Naito a spol., Journal of Antib. XXVI, 297 (1979)]



$R' = -CO-CH(OH)-CH_2CH_2NH_2$

$R'' = -CO-CH(OH)-CH_2CH_2NH_2$

$R = -CO-CH(OH)-CH_2CH_2NH_2$

$R = R'' = H$  (označení BB-K6)

$R = R' = H$  (označení BB-K11)

$R' = R'' = H$  (označení BB-K29)

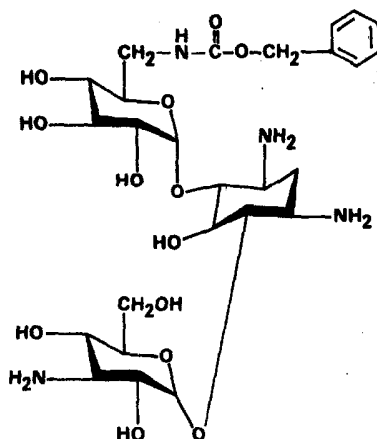
Přímá acylace kanamycinu A [viz například T. Naito a spol., Journ. of Antib. XXVI, 297 (1973)] vede ve vysokém výtěžku hlavně k  $N^{6'}$ -acylovanému derivátu, protože v této poloze se nachází nejreaktivnější aminoskupina. Tato skutečnost zabraňuje možnosti získat amikacin acylací L-(-)-4-amino-2-hydroxymáselnou kyselinou.

Pokud je popisována reakce s L-(-)-4-amino-2-hydroxymáselnou kyselinou, míní se tím v praxi reakce s derivátem této kyseliny, v němž je aminoskupina v poloze 4 chráněna a karboxylová skupina aktivovaná tak, aby reagovala snadněji a s vyšším výtěžkem s aminoskupinou kanamycinu.

Jako tyto chránicí skupiny lze volit obvykle chránicí skupiny aminových funkcí známé v daném oboru, jako například terc.butoxykarbonylovou skupinu, kterou je možno po ukončení reakce snadno odstranit působením zředěné kyseliny, nebo benzyloxykarbonylovou či 4-nitrobenzyloxykarbonylovou skupinu, které lze odštěpit katalytickou hydrogenolýzou v přítomnosti paladiového nebo platínového katalyzátoru, nebo jiné podobné chránicí skupiny (viz Protective Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene; J. Wiley et Sons. Inc., 1981, str. 218 až 287). Jednou z forem, jíž je možno vhodně aktivovat karboxylovou skupinu, je forma aktivního esteru s N-hydroxysukcinimidem, N-hydroxy-5-norbornen-2,3-dikarboximidem apod., nebo forma smíšeného anhydridu s pivalovou kyselinou, benzoovou kyselinou nebo benzyloxykarboxylovou kyselinou.

Počáteční syntézu amikacinu uskutečnili H. Kawaguchi a spol. (viz výše), kteří odstranili závažnou nevýhodu vyšší reaktivity aminoskupiny v poloze 6' kanamycinu tím, že na tuto skupinu zavedli chránicí skupinu, jako skupinu benzyloxykarbonylovou.

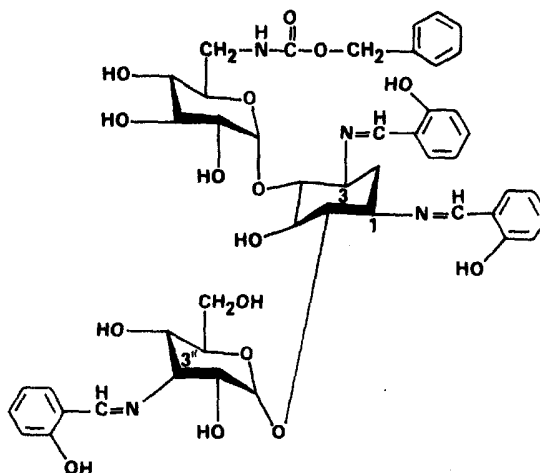
Tímto způsobem vznikne  $N^{6'}$ -benzyloxykarbonylkanamycin vzorce IV



(IV)

který se podrobí acylaci. Tato acylace však není polohově selektivní, takže po následující hydrogenaci, sloužící k eliminaci všech N-benzoyloxykarbonylových chránicích skupin, se získají kromě amikacinu rovněž polohové isomery BB-K11 a BB-K29 a určité množství polyacylovanných produktů. Vzhledem k tomu, že zmíněná acylace neprobíhá selektivně, je třeba výslednou směs dělit, což se provádí chromatografií na iontoměničích. Tímto způsobem se získá surový amikacin ve výtěžku 22 % a tento výtěžek se ještě dále sníží následujícím čištěním potřebným k získání čistého amikacinu. Velmi nízké výtěžky této syntézy vyvolaly potřebu vývoje nových postupů, jimiž by bylo možno výtěžek zvýšit a v souladu s tím snížit výrobní náklady, a to dokonce i za tu cenu, že by se jednalo o vícestupňovou syntézu.

T. Naito, S. Nakagawa a M. Oka ve francouzském patentovém spisu č. 2 272 009 popsali další syntetický postup spočívající v reakci této  $N^6$ -benzoyloxykarbonylkanamycinu A vzorce IV z předcházející syntézy s určitými aromatickými aldehydy, při níž se používají vždy nejméně 3 mol aldehydu na každý mol  $N^6$ -benzoyloxykarbonylkanamycinu A. Při této reakci vzniknou příslušné Schiffovy báze mezi třemi volnými aminoskupinami v polohách 1, 3 a 3" a odpovídajícími aldehydy. Výsledná sloučenina vzorce V



(V)

obsahující tři aldehydické zbytky na každý mol  $N^6$ -benzoyloxykarbonylkanamycinu se pak acyluje vhodným derivátem L-HABA. Po hydrogenolýze chránicích skupin se pak získá amikacin.

Acylace tří aminoskupin (v polohách 1, 2 a 3") však neprobíhá selektivně a proto je nutné chromatografické dělení reakční směsi na iontoměničích k separaci amikacinu, zejména od isomerů BB-K29 a BB-K11.

Globální stechiometrické výtěžky amikacinu se navíc pohybují pouze okolo 23 %, což jsou hodnoty srovnatelné s výtěžky dosahovanými při předcházející metodě. Mimoto se tyto výtěžky počítají na intermediární N<sup>6</sup>-benzyloxykarbonylkanamycin (IV), který se získává z kanamycinu A ve výtěžku 45 až 56 %.

Souhrnně řečeno, poskytují tyto dvě syntetické cesty amikacin ve výtěžku 10 až 13 %, počítáno na výchozí kanamycin A, což je hodnota velmi nízká.

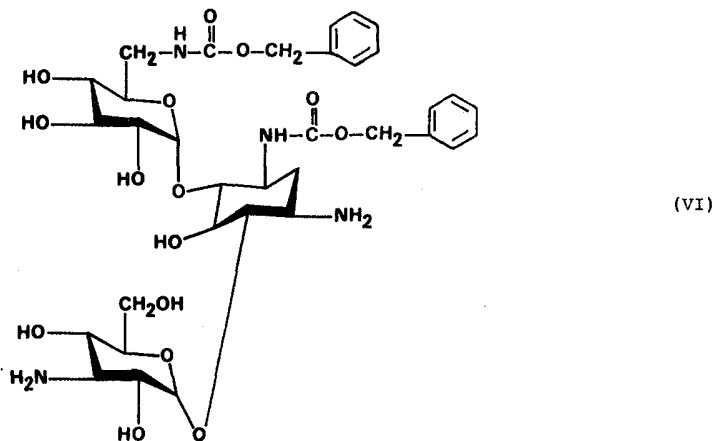
Významný pokrok pokud jde o selektivní acylaci kanamycinu A za vzniku amikacinu dosáhli M. J. Cron a spol., jak je popsáno v Chem. Comm., 266 (1979) a v amerických patentových spisech č. 4 347 354 a 4 424 343.

V těchto patentových spisech je popsána příprava amikacinu acylací polysilylovaného derivátu kanamycinu A, který může popřípadě obsahovat v poloze 6' nebo v polohách 6' a 3 jiné chránicí skupiny než skupinu silylovou. Příprava polysilylovaného derivátu kanamycinu nebo chráněného kanamycinu se konkrétně provádí reakcí výchozího kanamycinu ve vhodném organickém rozpouštědle, s výhodou v acetonitrilu, se silylačními činidly, výhodně s hexamethyldisilazanem, za vzniku příslušných derivátů, v nichž všechny hydroxylové skupiny kanamycinu nebo jejich část jsou chráněny trimethylsilylovými skupinami.

Po obvyklé hydrogenolýze, která v tomto případě slouží pouze k odstranění chránicí skupiny L-HABA, se však kromě výchozího kanamycinu a polyacylovaných produktů stále ještě získává směs odpovídajících polohových isomerů, takže je opět nutné chromatografické dělení produktu. Tento postup, i když se při něm dosahuje výrazně vyšších výtěžků amikacinu, má však vážné nevýhody z hlediska ochrany životního prostředí. Jde zejména o to, že acetonitril, který je pro shora uvedenou reakci výhodným rozpouštědlem, je vysoce toxický a jeho použití v průmyslovém měřítku je nežádoucí a navíc pak z hexamethyldisilazanu se v průběhu reakce uvolňuje plynný amoniak, který je nutno vhodně odstraňovat, aby nedošlo k znečištění atmosféry.

Další způsob výroby amikacinu je založen na výzkumné práci T. Tsuchiya a spol., Tet. Lett., 4 951 (1979) a na belgickém patentovém spisu č. 879 925 (Zaidan Hojin Biseibutsu Kagaku Kenkyu Kai).

Tento syntetický postup spočívá na přípravě intermediárního derivátu chráněného v polohách N<sup>6</sup> a N<sup>3</sup> obvyklými N-benzyloxykarbonylovými skupinami, odpovídajícího vzorci VI



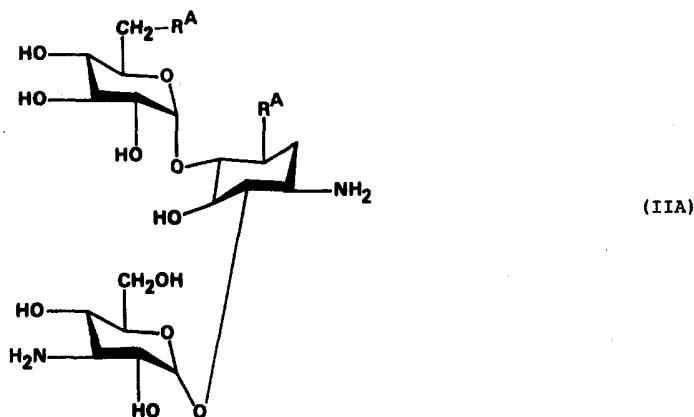
Tento meziprodukt, vznikající vytvořením komplexních sloučenin mezi aminoskupinami v polohách 3" a 1, octanem zinečnatým a sousedícími hydroxylovými skupinami ve vicinální poloze, pokud jde o shora uvedené aminoskupiny, je již popsán v práci T. L. Nagabhushana a spol., J. Amer. Chem. Soc., 100, 5 254 (1978) a v americkém patentovém spisu č. 4 136 254, kde je popsána příprava komplexů s několika kovy.

Zatímco v americkém patentovém spisu č. 4 136 254 se tento "di-chráněný" meziprodukt převádí na aminoglykosidické antibiotikum přímou acylací acylující derivátem L-HABA, což však v případě amikacinu vede k zcela nepřijatelným výtěžkům, v belgickém patentovém spisu č. 879 925 se tento meziprodukt podrobí nejprve reakci s ethyl-trifluoracetátem k chránění aminoskupiny v poloze 3" a pak s derivátem L-HABA, který je vhodně zvolen tak, aby selektivně acyloval pouze jedinou volnou aminoskupinu, tj. aminoskupinu v poloze 1. Obě přítomné odlišné chránicí skupiny, tj. trifluoracetylová a benzyloxykarbonylová skupina, se pak odštěpí působením amoniaku resp. vodíku, čímž se reakce dokončí. I v tomto případě jsou výtěžky amikacinu značně vyšší, postup sám však nelze vhodně použít v průmyslovém měřítku vzhledem k tomu, že se při něm užívá ethyl-trifluoracetát, který představuje vysoce toxickou a velmi drahou látku.

Nyní byl vyvinut nový způsob syntézy amikacinu, který je zvláště bezpečný z hygienického hlediska, protože reakční složky a rozpouštědlo jsou téměř neškodné, a který je snadno proveditelný, protože vzniklé meziprodukty není nutno dělit. Tímto novým způsobem se dosahuje vyššího výtěžku amikacinu za použití mnohem levnějších reakčních složek než při způsobech známých z dosavadního stavu techniky.

Způsob podle vynálezu, při němž se vychází z kanamycinu A chráněného v polohách 6' a 3, se vyznačuje tím, že se tento výchozí chráněný kanamycin nechá reagovat se solí dvojjadného kationtu kovu vybraného ze skupiny zahrnující zinek, nikl, železo, kobalt, mangan, měď, kadmium a jejich směsi, v přítomnosti vody jako rozpouštědla nebo korozpouštědla, a vzniklý komplex se podrobí in situ reakci s vhodným reaktivním derivátem L-HABA. Kationt kovu se pak odstraní přidáváním roztoku zásady až k dosažení pH 9 až 10, načež se běžným způsobem oddělí acylovaný produkt, chránicí skupiny aminových funkcí v polohách 6' a 3 a v postranním řetězci se odštěpí a takto získaný surový produkt se vyčistí chromatografií, čímž se získá amikacin ve výtěžku blízkém se 50 %.

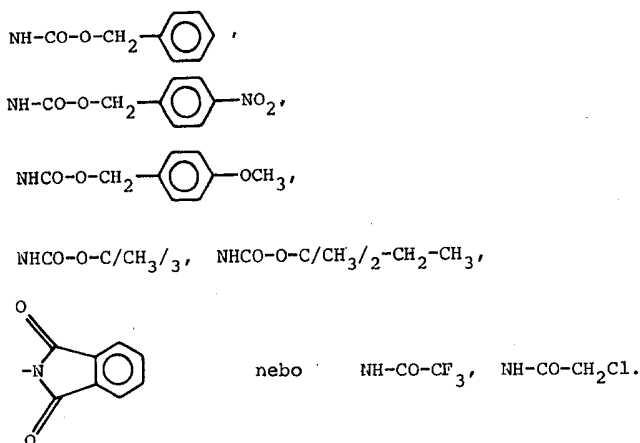
Jako výchozí materiál je obecně možno použít jakýkoli derivát kanamycinu A, v němž je aminoskupina v poloze 6' a v poloze 3 chráněna substitucí vodíkového atomu acylovou skupinou, například benzyloxykarbonylovou skupinou nebo substituovanou benzyloxykarbonylovou skupinou, jako p-nitrobenzyloxykarbonylovou nebo p-methoxybenzyloxykarbonylovou skupinou, alkoxykarbonylovou skupinou, jako terc.butoxykarbonylovou nebo terc.amyloxykarbonylovou skupinou, ftaloylovou skupinou, halogenalkylkarbonylovou skupinou, jako trifluoracetylovou nebo chloracetylovou skupinou, nebo jinou vhodnou chránicí skupinou. V souladu s vynálezem se jako výchozí derivát kanamycinu A používá sloučenina obecného vzorce IIA



ve kterém

R<sup>4</sup>

představuje zbytek vzorce



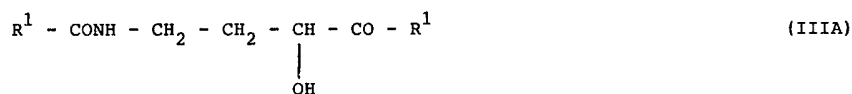
Výchozí materiál tohoto typu je možno připravit postupem popsáným v belgickém patentovém spisu č. 855 704 nebo postupem popsáným v kanadském patentovém spisu č. 1 131 628. Konkrétně se první reakční stupeň způsobu podle vynálezu uskutečňuje tak, že se výchozí materiál obecného vzorce IIA a nejméně ekvimolární množství vhodné soli dvojmocného kovu rozpustí ve vodě nebo ve směsi vody s inertním organickým rozpouštědlem mísitelným s vodou, jako je dimethylsulfoxid, dimethylformamid, nižší alifatický alkohol, tetrahydrofuran, aceton, acetonitril apod.

Dvojmocný kationt kovu se volí ze skupiny kovů zahrnující zinek, nikl, železo, kobalt, mangan, měď a kadmium, přičemž výhodné jsou pochopitelně kationty méně toxické a levnější, zatímco aniontem může být libovolný organický nebo anorganický aniont, i když výhodné jsou anionty odvozené od slabých organických kyselin, jako od kyseliny octové, kyseliny propionové a kyseliny benzoové, protože kovové soli těchto kyselin obecně ochotněji tvoří komplexy.

Sůl se obecně používá v molárním poměru vzhledem k výchozí látce pohybujícím se mezi 1:1 a 10:1, s výhodou mezi 2:1 a 6:1.

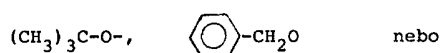
Reakce se účelně provádí za míchání při teplotě místnosti. Po vytvoření komplexu se pak provede druhý reakční stupeň spočívající v tom, že se za míchání přidá roztok nebo suspenze vhodného reaktivního derivátu L-HABA v polárním aprotickém organickém rozpouštědle. Mezi vhodná použitelná organická rozpouštědla náleží dimethylsulfoxid, acetonitril, tetrahydrofuran, dimethylformamid a s výhodou pak halogenované alifatické uhlovodíky, jako methylenchlorid, chloroform, 1,2-dichlorethan apod. Rovněž tento druhý reakční stupeň způsobu podle vynálezu se účelně provádí při teplotě místnosti. V obou reakčních stupních je však možno reakční směs k urychlení reakce mírně zahřívát.

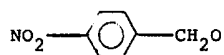
Vhodným reaktivním derivátem L-HABA je sloučenina obecného vzorce IIIA



ve kterém

$\text{R}^1$  znamená zbytek vzorce

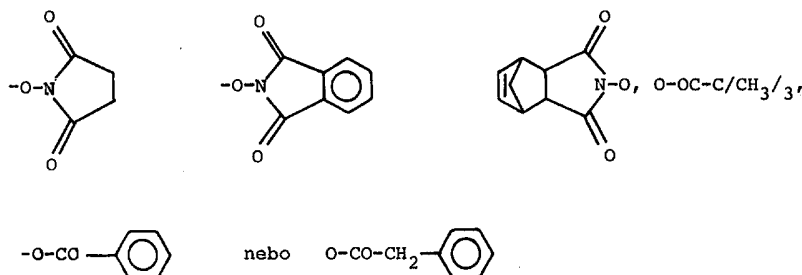




a

R<sup>1</sup>

představuje zbytek vzorce



Po několikahodinovém míchání se popřípadě přítomná organická fáze oddělí, a to buď destilací v případě, že rozpouštědlo má nízkou teplotu varu, nebo mechanickým oddělením a k zbylé reakční směsi se přidává vodný roztok zásady až k dosažení pH mezi 9 a 10.

Jako zásadu je možno použít hydroxid či uhličitán libovolného alkalického kovu nebo, v souladu s výhodným provedením způsobu podle vynálezu, hydroxid amonný. Přidání zásaditého činidla způsobí rozpad komplexu spojený s odtržením kationtu kovu a vysrážením acylovaného produktu chráněného v polohách 3 a 6". Tento produkt se odfiltruje a chránicí skupiny v polohách 3 a 6", jakož i chránicí skupina v postranním řetězci, se odštěpí běžným způsobem. Tak například, použijí-li se v souladu s výhodným provedením způsobu podle vynálezu jako chránicí skupiny benzyloxykarbonylové, jež mohou být popřípadě substituované, lze tyto skupiny odštěpit konvenční katalytickou hydrogenolýzou za použití katalyzátoru vybraného ze skupiny zahrnující platinu, paládium, oxid paladnatý a oxid platičitý nebo, pokud jsou chránicími skupinami ftaloylové skupiny, lze je jednoduše odštěpit hydrolýzou hydrazinem. Chránicí terc.butoxykarbonylové skupiny je možno účelně odštěpit působením kyseliny mravenčí apod.

Takto získaný surový produkt se pak čistí chromatografickými postupy známými z literatury pro čištění amikacinu.

Acylace, již se v souladu se způsobem podle vynálezu podrobuje kanamycin A, chráněný na dusíkových atomech v polohách 3 a 6", po převedení komplexu s kationtem kovu, vede k neočekávatelně vysoké selektivitě pokud jde o polohu, do níž acylový zbytek vstupuje, protože vzniká s výhodou amikacin a nikoli isomer BB-K11 nebo produkt dvojnásobné acylace na dusíkových atomech v polohách 1 a 3". Tento výsledek je pravděpodobně důsledkem rozdílné stability dvou míst, na nichž dochází k tvorbě komplexu ( $N^{3''} \gg N^1$ ) za shora uvedených reakčních podmínek.

Zmíněný výsledek je uveden v následujícím přehledu, kde jsou porovnány údaje zjištěné při přímé acylaci  $N^3, N^{6''}$ -di-benzyloxykarbonyl-kanamycinu A esterem 4-benzyloxykarbonylamino-2-hydroxymáslé kyseliny s N-hydroxysukcinimidem s údaji získanými při převedení shora uvedeného derivátu kanamycinu na komplex s octanem zinečnatým a následující acylací výše zmíněným esterem.



## Sloučenina/reakce

## % Stechiometrie

$N^3, N^6$ -di-benzyloxykarbonyl-  
- $N^1$ -[L-(-)-gama-benzyloxykarbo-  
nylamino-alfa-hydroxybutyryl]ka-  
namycin A

|                  |    |
|------------------|----|
| přímá acylace    | 27 |
| acylace komplexu | 58 |

nezreagovaný  $N^3, N^6$ -di-benzyl-  
oxykarbonyl-kanamycin

|                  |    |
|------------------|----|
| přímá acylace    | 25 |
| acylace komplexu | 25 |

Mimořádně důležité je složení finální reakční směsi po hydrogenolýze chránicích benzyloxykarbonylových skupin, která probíhá za standardních podmínek prakticky kvantitativně a je popsána v příkladové části přihlášky. Jedinou nečistotou vyskytující se ve větším množství je kanamycin A, který nejen že nevadí při dělení směsi na sloupci iontoměniče, protože sloupcem prochází rychleji než amikacin, ale po zahuštění eluátu jej lze regenerovat, čímž se stechiometrický výtěžek amikacinu počítáno na kanamycin A, který je nejdražší reakční složkou při shora popsané syntéze, zvýší na 80 %.

Vynález ilustrují následující příklady provedení, jimiž se však rozsah vynálezu v žádném směru neomezuje.

## P ř í k l a d 1

5,2 g  $N^3, N^6$ -di-benzyloxykarbonyl-kanamycinu A o čistotě 85 % (5,87 mmol) a 3,9 g (21,3 mmol) bezvodého octanu zinečnatého se rozpustí ve směsi 25 ml dimethylsulfoxidu a 70 ml vody. Po dvouhodinovém míchání při teplotě místnosti se přidá roztok 3,28 g esteru 4-benzyloxykarbonylamino-2-hydroxymáselné kyseliny s N-hydroxysukcinimidem ve 140 ml methylenchloridu.

Po pěti hodinovém míchání se oddestiluje methylenchlorid a zbytek se při teplotě 20 °C rozmíchá se směsí 125 ml vody a 25 ml koncentrovaného amoniaku. Po filtraci, promytí a vysušení v sušárně při teplotě 45 °C se získá 6,7 g  $N^3, N^6$ -di-benzyloxykarbonyl-1-N-[L-(-)-gama-benzyloxykarbonylamino-alfa-hydroxybutyryl] kanamycinu A o čistotě 45 %, spolu se 16,8 % výchozího  $N^3, N^6$ -di-benzyloxykarbonylkanamycinu A. Výtěžek odpovídá 51,4 % stechiometrického množství.

Část takto získaného produktu se hydrogenuje v přítomnosti kyseliny mravenčí a paladia na uhlí za vzniku 164 ml vodného roztoku obsahujícího 6,61 mg/ml amikacinu, 0,4 mg/ml kanamycinu, 0,21 mg/ml BB-K11 a 1,83 mg/ml produktu diacylovaného L-HABA na dusíkových atomech v polohách 1 a 3".

Relativní čistota amikacinu činí 73 %.

## P ř í k l a d 2

5,2 g  $N^3, N^6$ -di-benzyloxykarbonyl-kanamycinu A o čistotě 85 % (5,87 mmol) se suspenduje ve 20 ml methanolu a k suspenzi se rychle přidá roztok octanu zinečnatého (3,9 g vztaženo na bezvodý produkt) v 80 ml vody. K výslednému roztoku se po dvouhodinovém míchání při teplotě místnosti v jediné dávce přidá 3,28 g (9,35 mmol) esteru L-(-)-4-benzyloxykarbonylamino-2-hydroxymáselné kyseliny s N-hydroxysukcinimidem, rozpuštěného ve 100 ml methylenchloridu.

Reakční směs se nechá přes noc stát při teplotě místnosti, pak se methylenchlorid odpaří a zbytek se zředí 150 ml 5% vodného amoniaku.

Po odfiltrování pevného materiálu a vysušení se získá 6,5 g  $N^3, N^6$ -di-benzyloxykarbonyl-1-N-[L-(-)-gamma-benzyloxykarbonylamino-alfa-hydroxybutyryl]kanamycinu A o čistotě 49,8 %, což odpovídá výtěžku 57 %.

Množství výchozí látky přítomné v reakční směsi odpovídá 17 % odděleného produktu, což se rovná 25 % stechiometrické hodnoty.

Získaný acylovaný produkt se suspenduje ve 100 ml vody, přidá se 3,5 g 5% paladia na uhlí a 7 ml kyseliny mravenčí rozpuštěné ve 20 ml vody. Po jednohodinovém míchání se směs zfiltruje a pevný zbytek se promyje vodou.

Získá se 223 ml roztoku s následujícím složením:

| Složka                            | mg/ml | Relativní množství (%) |
|-----------------------------------|-------|------------------------|
| amikacin                          | 8,2   | 63,3                   |
| BB-K29                            | 0,3   | 2,3                    |
| BB-K11                            | 0,3   | 2,3                    |
| diacylovaný produkt <sup>x)</sup> | 0,69  | 5,3                    |
| kanamycin A                       | 3,46  | 26,7                   |

Poznámka:

<sup>x)</sup> produkt obsahující zbytek L-HABA v poloze  $N^1$  a  $N^3$  s relativní čistotou amikacinu s ohledem na jeho homology (s výjimkou kanamycinu) vyšší než 90 %

Shora uvedený roztok se bez dalších úprav nastaví na pH 7 a prolije se sloupcem slabě kyselého iontoměniče v amoniakální formě. Sloupec se vymývá roztokem amoniaku a frakce obsahující kanamycin A se oddělí od frakcí obsahujících amikacin. Frakce s obsahem kanamycinu A se spojí a odpaří se. Ze zbylého roztoku o koncentraci 20 % se methanolem vysráží 1,1 g kanamycin-sulfátu. Frakce obsahující amikacin se zahustí na koncentraci 20 % a po okyselení 50% kyselinou sírovou, odbarvení aktivním uhlím a přidání methanolu se z nich získá 2,6 g amikacin-sulfátu s mikrobiologickým titrem 680 µg/mg.

P ř í k l a d 3

Tento srovnávací příklad dokládá, do jaké míry je selektivita (nebo/a stabilita) komplexů zásadně ovlivňována přítomností vody která, na rozdíl od přípravy komplexu prováděné s kanamycinem A (za bezvodých podmínek), nejen že není na závalu, ale naopak je nutná pro zvýšení odlišnosti mezi oběma místy, na nichž probíhá tvorba komplexu.

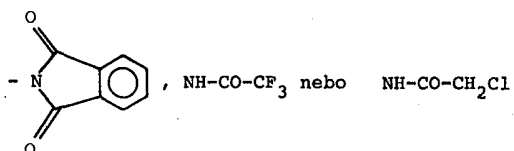
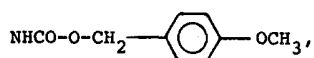
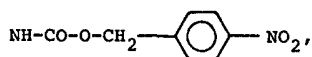
V nepřítomnosti vody neprobíhá v přítomnosti dvojvazných kationtů vůbec žádná acylace  $N^3, N^6$ -di-benzyloxykarbonyl-kanamycinu A (VI), pravděpodobně v důsledku toho, že se kromě stabilního komplexu na  $N^3$  vytvoří rovněž stabilní komplex na  $N^1$ .

5,2 g  $N^3, N^6$ -di-benzyloxykarbonyl-kanamycinu A o čistotě 85 % (5,87 mmol) se rozpustí v 50 ml dimethylsulfoxidu a k roztoku se přidá 3,9 g (21,9 mmol) bezvodého octanu zinečnatého. Po dvouhodinovém míchání při teplotě místnosti se přidá roztok 3,28 g esteru-4-benzyloxykarbonylamino-2-hydroxymásečné kyseliny s N-hydroxysukcinimidem, rozpuštěného ve 140 ml methylenchloridu. Po pěti hodinovém míchání se methylenchlorid oddestiluje a k odparku se přidá při teplotě 20 °C směs 125 ml vody a 25 ml koncentrovaného amoniaku.

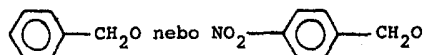
Vyloučený produkt se odfiltruje a po promytí se vysuší v sušárně při teplotě 45 °C. Získá se 5,7 g výchozí látky o čistotě 80 %, u níž ani ve stopové míře nedošlo k acylaci na dusíku v poloze 1.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

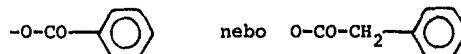
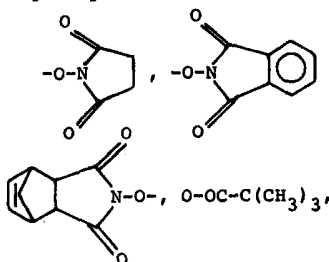
(IIA)

 $R^A$ NC(=O)OCC1=CC=CC=C1
$$\text{R}^1 - \text{CONH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \underset{\text{OH}}{\text{CH}} - \text{CO} - \text{R}^1 \quad (\text{IIIA})$$

ve kterém

$R^1$ znamená zbytek vzorce  $(CH_3)_3C-O-$ , $R^{1-}$ 

představuje zbytek vzorce



který se používá v nadbytku 10 až 100 % molárních, výsledný komplex se rozloží odstraněním kationtu kovu úpravou pH reakční směsi na hodnotu mezi 9 a 10 a z vysráženého produktu se odštěpí chránicí skupiny.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se intermediární komplex neizoluje.
3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se příprava komplexu uskutečňuje ve vodě nebo ve směsi vody a organického rozpouštědla vybraného ze skupiny zahrnující dimethylsulfoxid, dimethylformamid, acetonitril, aceton, tetrahydrofuran a nižší alifatické alkoholy.
4. Způsob podle bodu 3, vyznačující se tím, že se tvorba komplexu uskutečňuje ve vodě.
5. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se používá dvojvalentního kationtu kovu vybraného ze skupiny zahrnující zinek, měď a nikl.
6. Způsob podle bodu 5, vyznačující se tím, že se jako dvojvalentního kationtu kovu používá zinečnatého kationtu.
7. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se používá sůl, jejíž aniont je odvozen od slabé organické kyseliny.
8. Způsob podle bodu 7, vyznačující se tím, že se používá sůl, jejímž aniontem je aniont acetátový, propionátový nebo benzoátový.
9. Způsob podle bodu 6, vyznačující se tím, že se jako sůl dvojvalentního kationtu kovu používá octan zinečnatý.
10. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se sůl dvojvalentního kationtu kovu a výchozí kanamycinový derivát vzorce IIA používají v molárním poměru mezi 2:1 a 6:1.
11. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se derivát L-(-)-4-amino-2-hydroxymáselné kyseliny používá v nadbytku od 20 % do 60 % molárních.
12. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se dvojvalentní kationt kovu odstraňuje z komplexu úpravou pH reakční směsi na hodnotu směsi 9 a 10 přidáním roztoku hydroxidu amonného.