



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 22.05.75 (P. 180591)

Pierwszeństwo: 23.05.74 Stany Zjednoczone
Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 05.06.76

Opis patentowy opublikowano: 29.09.1979

Int. Cl.² C07D 309/14

Twórcy wynalazku: Masahisa Oka, Susumu Nakagawa, Takayuki
Naito

Uprawniony z patentu: Bristol-Myers Company, Nowy Jork
(Stany Zjednoczone Ameryki)

**Sposób wytwarzania 1- L-/-(-γ-amino-α-hydroksybutyrylo)
kanamycyny A**

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 1-(L-)-(-γ-amino-α-hydroksybutyrylo)kanamycyny A o wzorze 1.

Wiadomo, że kanamycyna A zawiera w cząsteczce cztery pierwszorzędowe grupy aminowe w pozycjach 1, 3, 6' i 3". Udowodniono, że podczas działania na tę cząsteczkę czynnikiem elektrofilowym najbardziej reaktywną grupą aminową jest grupa w pozycji 6' a drugą najreaktywniejszą grupą aminową jest grupa w pozycji 1. Obie grupy aminowe w pozycjach 3 i 3' są mniej reaktywne niż grupy w pozycjach 1 lub 6', ale ulegają reakcji w niewielkim stopniu, dając pewną ilość niepożądanych ubocznych produktów acylacji.

Znany jest sposób wytwarzania związku o wzorze 1 na drodze acylowania kanamycyny A przy użyciu grup blokujących, stosowanych zwykle do blokowania grup aminowych, np. grupy benzyloksykarbonylowej i następnego acylowania otrzymanego związku za pomocą środka acylującego, stanowiącego pochodną N-hydroksysukcynimidu kwasu α-hydroksy-γ-aminomasłowego. Jednak reakcja ta przebiega z niską wydajnością rzędu około 9% ze względu na małą selektywność, powodującą tworzenie się niepożądanych pochodnych acylowanych w pozycji 3 i 3".

Z lepszą selektywnością ale i to zaledwie z 10% wydajnością przebiega sposób wytwarzania związku o wzorze 1, prowadzony przy selektywnym zabezpieczeniu trzech grup aminowych aromatycz-

2

nymi aldehydami, tworzącymi z blokowanymi grupami aminowymi zasady Schiffa i następnym acylowaniu otrzymanej zasady Schiffa pochodną N-hydroksysukcynimidu kwasu α-hydroksy-γ-aminomasłowego oraz katalitycznym odszczepieniu grup zabezpieczających.

Stwierdzono, że związek o wzorze 1 można wytworzyć z o wiele większą wydajnością rzędu około 36%, jeśli obok grup blokujących tworzących z grupami aminowymi zasadę Schiffa zastosuje się nowy, selektywnie działający środek acylujący.

Sposób według wynalazku polega na tym, że reakcji poddaje się związek o wzorze 2, z aldehydem takim jak aldehyd benzoesowy, salicylowy, p-nitrobenzoesowy, p-metoksybenzoesowy i piwalowy, w proporcji molowej związku o wzorze 2 do aldehydu jak 1 do co najmniej 3, po czym otrzymany związek o wzorze ogólnym 3, w którym Z oznacza jedną z grup o wzorach 4, 5, 6, 7 lub 8 poddaje się ewentualnie in situ działaniu związku o wzorze 9 w proporcji molowej, odpowiednio, jak 1 do co najmniej 0,5, a korzystnie 1 i otrzymany produkt uwodarnia in situ do związku o wzorze 1.

Pierwszy etap przeprowadza się korzystnie w mieszącym się z wodą rozpuszczalniku takim jak rozpuszczalnik alkoholowy, na przykład absolutny etanol, metanol, n-propanol, izopropanol, n-butanol, II rząd.-butanol, rozpuszczalnik eterowy,

na przykład tetrahydrofuran, dioksan lub inne polarne, aprotyczne lub protonowe rozpuszczalniki, takie jak dwumetyloformamid i aceton lub ich mieszaniny, lub ich mieszaniny z wodą, w temperaturze od około 5°C do około temperatury wrzenia, w ciągu od około 30 minut do około 5 godzin.

Drugi etap reakcji przeprowadza się stosując związek o wzorze 3 i związek o wzorze 9, korzystnie w stosunku około 1:1, w temperaturze od około -10°C do około +35°C, ale korzystnie w zakresie od 5°C do około 25°C, w ciągu okresu co najmniej 1—3 godzin, po czym przed uwodornieniem usuwa się rozpuszczalnik organiczny.

Uwodornienie in situ przeprowadza się za pomocą wodoru w obecności katalizatora metalicznego, takiego jak pallad, platyna, nikiel Raney'a, rod, ruten i nikiel, korzystnie w obecności palladu, a zwłaszcza palladu na węglu aktywnym, w wodzie lub w mieszącym się z wodą układzie rozpuszczalników, takim jak woda z dioksanem, czterohydrofuranem, eterem dwumetylowym glikolu etylenowego, eterem dwumetylowym glikolu propylowego i tym podobne, korzystnie w wodzie, przy wartości pH 3—5, korzystnie 4.

Korzystny sposób wytwarzania związku o wzorze 1 polega na tym, że zgodnie z wynalazkiem związek o wzorze 2 poddaje się reakcji z aldehydem, takim jak aldehyd benzoowy, salicylowy, p-nitrobenzoowy i p-metoksybenzoowy, przy proporcji molowej związku o wzorze 2 do aldehydu jak 1 do co najmniej 3 w absolutnym etanolu, metanolu, n-propanolu, III rzęd.-butanolu, chlorku metylenu, czterohydrofuranie, dioksanie, dwumetyloformamidzie lub acetonie albo w mieszaninie tych rozpuszczalników z wodą.

Reakcję prowadzi się w temperaturze 5—40°C, w ciągu od około 30 minut do około 5 godzin, uzyskując związek o wzorze ogólnym 3, w którym Z oznacza grupy o wzorach 4, 5, 6 lub 7. Następnie w drugim etapie związek o wzorze ogólnym 3 po uprzednim wydzieleniu lub in situ, poddaje się reakcji ze związkiem o wzorze 9, w proporcji molowej związku o wzorze 3 do związku o wzorze 9, jak 1 do 0,5—1 w temperaturze 5—35°C, w ciągu 1—3 godzin i w rozpuszczalnikach wymienionych w etapie pierwszym. Następnie rozpuszczalnik organiczny usuwa się i pozostałość uwodarnia się in situ za pomocą wodoru w obecności katalizatora metalicznego, takiego jak pallad, platyna, nikiel Raney'a, rod, ruten i nikiel, ale korzystnie w obecności palladu, a zwłaszcza palladu na węglu aktywnym, w wodzie lub układzie rozpuszczalników mieszających się z wodą, korzystnie takich jak woda z dioksanem, czterohydrofuranem, eterem dwumetylowym glikolu etylenowego i eterem dwumetylowym glikolu propylowego, ale przede wszystkim w wodzie, przy wartości pH 3—5, a zwłaszcza 4.

Szczególnie korzystnie wytwarza się związek o wzorze 1, jeśli zgodnie z wynalazkiem związek o wzorze 2 poddaje się reakcji z aldehydem takim jak aldehyd benzoowy, salicylowy i p-nitrobenzoowy w proporcji molowej związku o wzorze 2 do aldehydu jak 1 do co najmniej 3.

Reakcję przeprowadza się w absolutnym etanolu, metanolu, n-propanolu, izopropanolu, n-butanolu, II rzęd.-butanolu, III rzęd.-butanolu, czterohydrofuranie, chlorku metylenu, dioksanie, dwumetyloformamidzie lub acetonie lub w mieszaninie tych rozpuszczalników z wodą, w temperaturze od około 5°C do około 40°C, w ciągu od około 30 minut do około 5 godzin, uzyskując związek o wzorze ogólnym 3, w którym Z oznacza grupę o wzorach 4, 5 lub 7.

W drugim etapie związek o wzorze ogólnym 3 poddaje się in situ lub po uprzednim wydzieleniu go, reakcji ze związkiem o wzorze 9, w proporcji molowej związku o wzorze 3 do związku o wzorze 9, jak i około 0,5—0,85 w temperaturze 15—30°C w ciągu 1—3 godzin.

Reakcję przeprowadza się w układach rozpuszczalników przedstawionych w etapie pierwszym. Następnie po usunięciu rozpuszczalnika organicznego pozostałość uwodarnia się in situ za pomocą wodoru w obecności katalizatora metalicznego, korzystnie takiego jak pallad, platyna, nikiel Raney'a, rod, ruten i nikiel, korzystnie pallad, ale najkorzystnie w obecności palladu na węglu aktywnym. Uwodarnianie prowadzi się w wodzie lub układach rozpuszczalników mieszających się z wodą, takich jak woda z dioksanem, czterohydrofuranem, eterem dwumetylowym glikolu etylenowego i eterem dwumetylowym glikolu propylowego, korzystnie w wodzie przy wartości pH około 4, uzyskując związek o wzorze 1.

Najkorzystniejszy sposób wytwarzania związku o wzorze 1 zgodnie z wynalazkiem polega na tym, że związek o wzorze 2 poddaje się działaniu aldehydu benzoowego w proporcji molowej związku o wzorze 2 do aldehydu benzoowego jak 1:3, w mieszaninie 1:1 wody z tetrahydrofuranem, w temperaturze od około 20°C do około 30°C przy wartości pH około 10, w ciągu 2—4 godzin, po czym otrzymany związek o wzorze 10 poddaje się in situ lub po uprzednim wydzieleniu, reakcji ze związkiem o wzorze 9, w proporcji molowej związku o wzorze 10 do związku o wzorze 9, jak 1 do 0,6—0,75, w temperaturze od około 20°C do około 30°C w ciągu 1—3 godzin w wyżej wymienionych rozpuszczalnikach takich jak mieszanina chlorku metylenu, metanolu i wody lub mieszanina dwumetyloformamidu, acetonu i wody. Następnie usuwa się rozpuszczalnik organiczny pod zmniejszonym ciśnieniem, doprowadza pH do wartości 4 za pomocą wodorotlenku amonu i otrzymany związek uwodornia in situ za pomocą wodoru pod ciśnieniem atmosferycznym w obecności palladu na węglu.

Inny korzystny sposób wytwarzania związku o wzorze 1 zgodnie z wynalazkiem polega na tym, że związek o wzorze 2 poddaje się reakcji z aldehydem salicylowym, w proporcji molowej związku o wzorze 2 do aldehydu salicylowego jak 1:3, w mieszaninie 1:1 wody z tetrahydrofuranem, w temperaturze od około 20°C do około 30°C, przy wartości pH około 8 w ciągu od około 2—4 godzin, uzyskując związek o wzorze 11, który in situ lub po uprzednim wydzieleniu poddaje się

reakcji ze związkiem o wzorze 9 w proporcji molowej związku o wzorze 11 do związku o wzorze 9 jak 1 do 0,6—0,75.

Reakcję prowadzi się w temperaturze od około 20°C do około 30°C, w ciągu 1—3 godzin, w wyżej podanych rozpuszczalnikach lub w mieszaninie dwumetyloformamidu, acetonu i wody. Następnie usuwa się rozpuszczalnik organiczny pod zmniejszonym ciśnieniem doprowadza odczyn do wartości pH, za pomocą wodorotlenku amonu i uwodornia pozostałość in situ za pomocą wodoru pod ciśnieniem atmosferycznym w obecności paladu na węglu.

Użyte w niniejszym opisie wynalazku określenie niższa grupa alkilowa oznacza grupę alkilową prostą lub rozgałęzioną o 1—6 atomach węgla. Określenie „niższy alkanol” oznacza nasycony alkohol o prostym lub rozgałęzionym łańcuchu, zawierający 1—6 atomów węgla i jedną grupę hydroksylową.

Reakcję według wynalazku korzystnie prowadzi się przy stosowaniu związków wytwarzanych in situ, ponieważ takie postępowanie znacznie zmniejsza koszt.

Na przykład związek o wzorze 9 wytwarza się in situ i poddaje reakcji ze związkiem o wzorze 10 w tym samym etapie reakcji. Związek o wzorze 1 można więc wytworzyć jak to opisano wyżej lub po wyodrębnieniu i następnym poddaniu reakcji ze związkami o wzorze 12 i o wzorze 13 po dodaniu dwucykloheksylokarboduimidu, w proporcji molowej związku o wzorze 10 do związku o wzorze 12 i dwucykloheksylokarboduimidu jak 1 : 0,5—1,0 i około 0,005 do 0,25 związku o wzorze 13. Ta reakcja prowadzona jest w temperaturze od około —10°C do około +35°C, korzystnie, od +5°C do około +25°C, przy czym w ciągu ostatnich 10 godzin reakcję prowadzi się w rozpuszczalnikach, jak uprzednio opisane, a otrzymany produkt uwodornia według wyżej opisanego sposobu, lub ewentualnie w ilości po około 0,5 do 0,8 mola związku o wzorze 12 i cykloheksylokarboduimidu na 1 mol związku o wzorze 3 oraz około 0,05 do 0,425 mola związku o wzorze 13 w temperaturze 15—30°C, w ciągu 15—25 godzin. Najkorzystniejsze warunki dla tej reakcji to użycie związku o wzorze 3 w ilości 1 mola na około 0,6—0,75 mola związków o wzorze 12 i dwucykloheksylokarboduimidu i około 0,06—0,375 mola związku o wzorze 13, w temperaturze 10—30°C, w ciągu 15—25 godzin.

Związek o wzorze 1, 1-N(L)-(—γ-amido-α-hydroksybutyrylo)kanamycyna A (BB-K8) wykazuje doskonałe działanie przeciwbakteryjne, lepsze niż sama kanamycyna A. Przedstawiono to poniżej w dwóch tabelach pokazujących najmniejsze stężenia hamujące (MIC) kanamycyny A i związku o wzorze 1 (BB-K8) przeciwko różnym Gram-dodatnim i Gram-ujemnym bakteriom, uzyskanym metodą rozcieńczeń agarowych, Steersa (tablica I) i metodą kolejnych rozcieńczeń (tablica II). Przy opracowywaniu tablicy I stosowano pożywkę Mueller-Histon Agar Medivum, a przy tablicy II Heart Infusion Broth.

Tablica I
(MIC mg/ml)

Drobnoustrój	Kanamycyna A (6-8198)	Związek o wzorze 1 (BB-K8)
1	2	3
Alk. faecalis A-9423	16	8
" " A-20648	>125	>125
Ent. cloacae A-0656	4	4
" szczep A-20364	>125	2
" hafniae 1 A-20674	1	1
E. coli A-0636	2	1
" " A-20664	16	4
" " A-20665	>125	1
" " A-20507	32	2
" " A-20520	>125	4
" " A-20365	>125	1
" " A-20684	2	2
" " A-20682	>125	2
" " A-20683	>125	8
" " A-20681	>125	2
" " A-15119	4	4
K. pneumoniae A-0967	4	4
" szczep A-20328	>125	2
" " A-20330	32	32
" " A-20634	>125	4
K. pneumoniae A-20680	>125	4
" " A-0077	1	1
Pr. mirabilis A-9900	2	2
" morgani A-15153	2	2
" vulgaris A-9555	2	1
" rettgeri A-9636	0,25	0,25
" mirabilis A-20645	4	4
Alk. Faecalis A-9423	16	8
" " A-20648	>125	>125
Ent. cloacae A-0656	4	4
" szczep A-20364	125	2
" hafniae A-20674	1	1
E. coli A-0636	2	1
" " A-20664	16	4
" " A-20665	>125	1
" " A-20507	32	2
" " A-20520	>125	4
" " A-20365	>125	1
" " A-20684	2	2
" " A-20682	>125	2
" " A-20683	>125	8
" " A-20681	>125	2
" " A-15119	4	4
K. pneumoniae A-0967	4	4
" szczep A-20328	>125	2
" " A-20330	32	32
" " A-20634	>125	4
" pneumoniae A-20680	>125	4
" " A-0077	1	1
Pr. mirabilis A-9900	2	2
Pr. morgani A-15153	2	2
" vulgaris A-9555	2	1
" Rettgeri A-9636	0,25	0,25
" mirabilis A-20645	4	4
" " A-20454	2	2

1	2	3
Prowidencja struartii A-20615	2	1
Providencia		
alkalifaciens A-20676	1	1
Ps. aeruginosa A-20229	32	2
" " A-0943A	125	16
" " A-20653	>125	32
" szczep A-20601	125,63	16
" " A-20621	>125	>125
" maltophilie A-20620	32	>125
Sal. enteritidis A-0531	1	0,5
" derby A-20087	>125	1
Ser. marcescens A-20019	2	4
" " A-9933	4	8
" " A-20460	>125	4,2
" " A-20459	4	16
Shig. flexneri A-9684	4	4
Aeromonas sp. A-20670	2	2
Arizona sp. A-20671	2	1
Citrobacter sp. A-20673	4	4
Edwardsiella sp. A-20678	4	4
Staph. aureus A-9606	1	1
" " A-4749	0,5	1
" " A-9537	2	1
" " A-20610	>125	2
" " A-20240	>125	8
" " A-15197	1	2
Pożywka Muelle- ra-Hintona + 4% krwi owczej		
Str. faecalis A-9854	63	63
" " A-9575	>125	>125
" pyogenes A-20200	32,16	32
" " A-20159	125	125
" " A-9604	125	125
" " A-15040	125	125
Str. " A-20065	125	125
D. pneumoniae A-9585	63,32	63
D. pneumoniae A-20159	125	125

Tablica II
(MIC mg/ml)

Drobnoustrój	Kana- micy- na A (6-8198)	Związek o wzor- rze 1 (BB-K8)
D. pneumoniae ± surowicy A-0585	63	63
Str. pyogenes ± 5% surowicy A-9604	125	125
Staph. aureus Smith A-9537	0,5	0,5
Staph. aureus A-9497	0,5	0,5
Staph. aureus A-20239	125	4
" " A-20240	125	4
Enter. cloacae A-0656	2	2
Enter. szczep A-20364	125	2
K. pneumoniae A-9867	2	4
E. coli K-12 ML 1410 A-20361	2	4
" " " ML 1630 A-20363	125	2
E. coli K-12 A-9632	2	1

E. coli	A-20664	32	8
" "	A-20665	125	8
Pr. mirabilis	A-9900	2	16
Pr. morgani	A-15153	4	16
Pr. vulgaris	A-9436	1	2
Ps. aeruginosa	A-20227	4	1
Ps. szczep	A-20499	63	4
Ps. aeruginosa	A-20653	125	4
Ps. szczep	A-20621	125	125
Ser. marcescens	A-20019	2	4
Ser. marcescens	A-20141	16	16

15 Podane powyżej wielkości najmniejszych stężeń hamujących wskazują, że związek o wzorze 1 (BB-K8) wykazuje lepszą aktywność niż kanamycyna A, szczególnie przeciwko drobnoustrojom opornym na kanamycynę.

20 Wielkości najmniejszych stężeń hamujących (MIC) wykazują również dobrą korelację z uzyskanymi in vivo wynikami dla wszystkich trzech drobnoustrojów, dla których przeprowadzono badania z kanamycyną A i związkiem o wzorze 1.

25 Związek o wzorze 1 i kanamycyna A były jednakowo skuteczne przeciwko zakażeniom u myszy czułym na działanie kanamycyny A szczepami E. coli A-15119 i Staph. aureus A-9537. Aczkolwiek wielkość CD_{50} (dawka lecznicza dla 50% śmiertelnie zakażonych myszy) dla Staph. aureus A-9537 wskazuje, że związek o wzorze 1 jest trochę mniej aktywny niż kanamycyna A, to ta niewielka różnica jest prawdopodobnie nieistotna ze względu na to, że wielkości dawek znacznie się różnią (pięciokrotnie rozcieńczone).

35 Jak spodziewano się, kanamycyna A nie wykazuje skuteczności in vivo przeciwko szczepom D. coli A-20520, opornemu na kanamycynę, podczas gdy związek o wzorze 1 wykazuje zaznaczające się działanie ochronne. Związek o wzorze 1 wykazuje około dziesięciokrotnie wyższą aktywność przeciwko temu szczepowi E. coli przy podawaniu go w czterech porcjach niż we dwóch.

45 Związek o wzorze 1 ma znaczenie jako środek przeciwbakteryjny, jako odżywczy dodatek do pasz zwierzęcych, jako środek terapeutyczny w leczeniu drobiu i zwierząt, w tym i ludzi i jest szczególnie cenny w zwalczaniu chorób infekcyjnych wywołanych przez bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne.

55 Przy podawaniu doustnym, związek o wzorze 1 jest użyteczny jako dodatkowy środek w przedoperacyjnej sterylizacji wnętrza. Zarówno tlenowa jak i beztlenowa flora bakteryjna wykazuje wrażliwość na ten lek i rozwój jej zostaje zahamowany w znacznym stopniu. Związek ten wraz z należyтым, mechanicznym myciem, jest użyteczny w chirurgii okrężnicy.

60 Związek o wzorze 1 jest skuteczny w leczeniu bakteryjnym zakażeń układowych u ludzi przy podawaniu pozajelitowym w dawkach od około 250 mg do około 3000 mg dziennie, przy podawaniu trzy lub cztery razy w ciągu dnia. Ogólnie,

Tablica III

Zestawienie aktywności in vitro i in vivo związku o wzorze 1 i kanamycyny A

Związek	Numer testu	Staphylococcus aureus A-9537		Escherichia coli A-15119		Escherichia coli A-20520	
		a) MIC	b) CD ₅₀	a) MIC	b) CD ₅₀	a) MIC	b) CD ₅₀
Związek o wzorze 1	1	1	2,0 × 2	2	2 × 2	2	66 × 2
	2	c	—	—	—	—	5 × 4
Kanamycyna A	1	2	0,5 × 2	4	4 × 2	125	200 × 2
	2	—	—	—	—	—	200 × 4

Objaśnienia:

- a) MIC — najmniejsze stężenie hamujące (μg/ml). Test przeprowadzono w sposób opisany przez Chisholma i współpracowników (Antimicrob. Agents and Chemotherapy — 1969, str. 244, 1970) stosując jako pożywkę testową agar Muellera-Histena.
- b) CD₅₀ — dawka lecznicza, (mg/kg wagi ciała) i krotność podania. W przypadku podawania dwukrotnego myszom podawano preparat podskórnie po 1 godzinie i po 4 godzinach po zakażeniu, natomiast w przypadku podawania czterokrotnego podawano preparat natychmiast po zakażeniu i po upływie 2, 4 i 6 godzin. Oprócz tego test był przeprowadzany w sposób opisany przez Price i współpracowników (J. of Antibiotics 22:1, 1969).
- c) — nie badano.

związek jest skuteczny przy podawaniu w ilości około 5,0—7,5 mg/kg wagi ciała w ciągu 12 godzin.

Przykład I. Wytwarzanie bezwodnika kwasu 5-norbornenoendodwukarboksyowego-2,3, stanowiącego produkt wyjściowy o wzorze 13 dla wytworzenia związku o wzorze 9.

Reakcję przeprowadza się metodą opisaną przez O. Dielsa i K. Adlera w Ann. 460, 98, (1928). Do mieszaniny zawiesiny 98,1 g (1 mol) bezwodnika maleinowego w 500 ml suchego benzenu wkrapla się przy chłodzeniu 66,1 g (1 mol) cyklopentadienu. Mieszaninę reakcyjną miesza się do wydzielenia krystalicznego osadu. Osad ten odsącza się i rekrytalizuje z mieszaniny ligroiny (w szczególności z n-heksanu) i benzenu, w stosunku 1:1, uzyskując 116 g (71%) produktu tytułowego o temperaturze topnienia 164—166°C (temperatura topnienia podana w literaturze wynosi 164—165°C).

Przykład II. Wytwarzanie N-hydroksyimidu kwasu 5-norbornenoendodwukarboksyowego-2,3 (wzór 13).

Reakcję przeprowadza się według metody opisanej przez L. Bauera i S. V. Miarka, J. Org. Chem. 24, 1293 (1959). 115 g (0,7 mola) bezwodnika norbornenowego otrzymanego jak w przykładzie I dodaje się do roztworu hydroksyalominy uzyskanego z 47,5 g (0,45 mola) węgla sodu dodanego do roztworu 60,5 g (0,87 mola) chlorowodoru hydroksyloaminy w 140 ml wody. Mieszaninę ogrzewa się w temperaturze 60—70°C w ciągu 1 godziny i pozostawia w ciągu nocy w chłodni. Wydzielone kryształy odsącza się, przemywa 120 ml zimnego 5n kwasu solnego i suszy uzyskując 84,9 g (70%) związku o wzorze 13 o temperaturze topnienia 172°C. Ługi pokrytaliczne zakwasza się do pH 2 i ekstrahuje 10 razy po 70 ml chloroformu. Po odparowaniu ekstraktów chloroformowych uzyskuje się drugą porcję (7,2 6%) związku o wzorze 13 o temperaturze topnienia 170—172°C.

Przykład III. Wytwarzanie estru N-hydro-

ksy-5-norborneno-2,3 - dwukarboksyimidowego kwasu L-γ-benzylloksykarbonyloamino-α-hydroksy-masłowego (wzór 9).

Do roztworu 2,53 g (0,01 mola) kwasu L-γ-benzylloksykarbonyloamino-α-hydroksy-masłowego i 1,79 g (0,01 mola) związku o wzorze 13 w 50 ml czterohydrofuranu dodaje się przy mieszaniu w temperaturze 10°C 2,06 g (0,01 mola) dwucykloheksylokarbodiimidu. Mieszaninę reakcyjną miesza się w ciągu nocy w temperaturze pokojowej. Wydzielony w postaci osadu dwucykloheksylo-mocznik odsącza się i przemywa czterowodorofuranem. Przesącza i roztwór z przemycia łączy się i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem. Oleistą pozostałość (4,5 g) przepuszcza się przez kolumnę wypełnioną żelazem krzemionkowym, stosując jako eluent octan etylu. Uzyskuje się 4,0 g (96%) aktywnego estru o wzorze 9 w postaci bezbarwnego oleju.

Widmo w podczerwieni (film): 3300, 1820, 1780, 1735, 1720 i 1695 cm⁻¹.

Widmo magnetyczne rezonansu protonowego (CDCl₃+1 kropla D₂O): δ w ppm = 1,63 (2H, q J = 9 Hz), 2,15 (2H, m), 3,40 (6H, m), 4,60 (1H, d-d, J = 7 i 5 Hz), 5,13 (2H, s), 6,20 (2H, szeroki), 7,40 (5H, s) ppm.

Przykład IV. Wytwarzanie N-benzylloksykarbonyloksy-5-norborneno-2,3 - dwukarboksyimidu.

Do mieszanego roztworu 2,64 g (0,066 mola) wodorotlenku sodu w 50 ml wody dodaje się 3,58 g (0,02 mola) N-hydroksy-5-norborneno-2,3-dwukarboksyimidu (o wzorze 13) w temperaturze 10°C. Do tego roztworu wkrapla się w ciągu 40 minut w temperaturze 0—5°C 6,83 g (0,04 mola) chlorku benzylloksykarbonylu i mieszaninę reakcyjną miesza się w ciągu 4 godzin w temperaturze pokojowej. Do mieszaniny reakcyjnej dodaje się 20 ml n-heksanu uzyskując biały osad, który odsącza się i suszy na powietrzu. Surowy produkt krystalizuje się w mieszaninie benzenu i heksanu, uzyskując 5,1 g (81%) bezbarwnych kryształów N-benzyllo-

ksykarbonyloksy - 5 - norborneno - 2,3 - dwukarboksylimidu o temperaturze topnienia 121–122°C.

Widmo w podczerwieni (KBr): 1810, 1780, 1740, 1630 cm^{-1} .

Widmo magnetycznego rezonansu protonowego (aceton- d_6): = 1,66 (2H, szeroki s), 3,45 (4H, m), 5,37 (2H, s), 6,12 (2H, t, $J = 1,5$ Hz), 7,48 (5H, s) ppm.

Analiza elementarna:

obliczono dla $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_5$: C = 65,17%, H = 4,84%, N = 4,47%

oznaczono: C = 65,50%, H = 4,73%, N = 4,44%.

Przykład V. Wytwarzanie 6'-N-benzylksykarbonylokanamycyny A (wzór 2) (6'-Cbz-kanamycyna A).

Do mieszanego roztworu 4,84 kg (0,01 mola) wodnej zasady kanamycyny A w 50 ml 50% wodnego roztworu czterohydrofuranu dodaje się 3,14 g (0,01 mola) N-benzylksykarbonyloksy-5-norborneno-2,3-dwukarboksylimidu w kilku porcjach w ciągu godziny w temperaturze 7°C. Mieszaninę reakcyjną miesza się w ciągu następnych 4 godzin i odparowuje rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskany wodny roztwór rozcieńcza się 150 ml wody i ekstrahuje dwiema porcjami po 100 ml butanolu nasyconego wodą. Warstwę butanową przemywa się 100 ml wody i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem uzyskując 1,78 g poli-Cbz-kanamycyny A. Fazę wodną i roztwór z przemycia łączy się i zateża pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości około 50 ml. Wodny roztwór przepuszcza się przez kolumnę wypełnioną żywicą jonowymienną CC-50 (NH_4^+ , 140 ml) przemytą kolejno 200 ml wody, 1,9 l, 0,05 n NH_4OH , 1,9 l 0,1 n NH_4OH , 1,0 l 0,3 n NH_4OH . Eluaty zbiera się w porcjach po 20 ml i na podstawie chromatografii cienkowarstwowej biorąc pod uwagę wielkości R_F dzieli się je na dwie frakcje (6'-Cbz-kanamycyna A — $R_F = 0,23$, kanamycyna A — $R_F = 0,07$). Każdą z frakcji opracowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostałość suszy się pod zmniejszonym ciśnieniem nad pięciotlenkiem fosforu.

Tablica IV

Frakcja	Nr próbek	Eluacja za pomocą	Ilość	Identyfikacja
1	106—144	0,1 n NH_4OH	3,44 g (56%)	6'-Cbz-kanamycyna (II)
2	203—212	0,3 n NH_4OH	0,54 g (11%)	odzyskana kanamycyna

*Uzyskana w taki sposób 6'-Cbz-kanamycyna (wzór 2) jest bardzo czysta i wykazuje jednorodność w analizie metodą chromatografii cienkowarstwowej na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym. Temperatura topnienia produktu wynosi 217–219°C. Własności fizykochemiczne są zgodne z próbką wzorcową.

Przykład VI. Wytwarzanie 1-N(L)-(- γ -amino- α -hydroksybutyrylo)-kanamycyna A (BB-K8, wzór 1) poprzez zasadę Schifffa z benzaldehydem.

Do roztworu 6,19 (0,01 mola) 6'-Cbz-kanamycyny (wzór 2) w 50 ml czterohydrofuranu dodaje się przy mieszaniu 3 ml (0,03 mola) aldehydu benzoowego. Mieszaninę reakcyjną miesza się w ciągu 3 godzin w temperaturze pokojowej, ochładza do temperatury 5°C i poddaje reakcji z roztworem 4 g związku o wzorze 9 (0,01 mola) w 50 ml czterohydrofuranu. Mieszaninę reakcyjną miesza się w ciągu 1 godziny w temperaturze 5°C, doprowadza pH do 2 za pomocą 6n kwasu solnego, miesza w ciągu następnej godziny w temperaturze pokojowej i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem w celu usunięcia rozpuszczalnika organicznego. Uzyskany roztwór wodny przemywa się 20 ml chlorku metylenu, doprowadza do pH 4 za pomocą 10% NH_4OH i uwodarnia w ciągu nocy z dodatkiem palladu na węglu, pod ciśnieniem atmosferycznym w temperaturze pokojowej. Katalizator odsącza się i przemywa 20 ml wody. Przesącza i roztwór z przemycia łączy się, doprowadza do pH 8 za pomocą 10% NH_4OH i przepuszcza przez kolumnę wypełnioną żywicą CG-50 (NH_4^+ , 200 ml) którą przemywa się kolejno 0,4 l wody, 1,2 l 0,1 n NH_4OH , 2,06 l 0,3 n NH_4OH , 0,92 l 0,5 n NH_4OH i w końcu 1,2 l 1,0 n NH_4OH . Eluaty zbiera się w porcjach po 20 ml i dzieli się te frakcje na podstawie wielkości R_F oznaczonych metodą chromatografii cienkowarstwowej na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym (8—110, ninhydryna) i na podstawie metody płytkowej przy użyciu B. subtilis PCI 219 i P. aeruginosa A 9843. Każdą z frakcji odparowaną pod zmniejszonym ciśnieniem i liofilizowano.

Wydajność i oznaczenie każdej frakcji podano w tablicy V.

Frakcję 4 (1,877 g) rozpuszcza się w 10 ml odjonizowanej wody. Roztwór doprowadza się do pH 6 za pomocą 10% kwasu solnego i adsorbuje na żywicy CG-50 (NH_4^+ , 15 ml), którą następnie eluuje się za pomocą 100 ml 0,3 n NH_4OH i 200 ml 0,5 n NH_4OH . Eluaty zbiera się w porcjach po 20 ml. Probówki 6 i 8—17 dają dodatni wynik w próbie z ninhydryną. Probówki 8—17 łączy się i zateża pod zmniejszonym ciśnieniem do około 1 ml. Stężony roztwór poddaje się działaniu 3 ml metanolu i sączy. Sączek przemywa się 0,5 ml 75% wodnego roztworu metanolu. Przesącza i roztwór z przemycia łączy się, rozcieńcza dodatkowo 10 ml metanolu i pozostawia w ciągu nocy w temperaturze pokojowej. Powstały bezpostaciowy osad przesącza się i przesącza zaszczenia się uzyskując bezbarwne kryształy związku o wzorze 1, identycznego z próbką wzorcową. Przesącza odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem i liofilizuje.

Wydajność i oznaczenia każdej frakcji podano w tablicy VI.

BB-K 11 oznacza 3"-N(L)-(- γ -amino- α -hydroksybutyrylo)kanamycynę A.

BB-K 29 oznacza 3-N(L)-(- γ -amino- α -hydroksybutyrylo)kanamycynę A.

Przykład VII. Wytwarzanie 1-N(L)-(- γ -amino- α -hydroksybutyrylo)kanamycyny A (wzór 1).

5,0 g (4,91 milimola) 6'-karbobenzylksy-1,3,3"-trój-p-nitrobenzalkanamycyny A rozpuszcza się

Tablica V

Frakcja	Próbka nr	Roztwór wodny NH ₄ OH eluujący	Wydajność wagowa	Wydajność biologiczna	
1	90—99	0,3 N	1603 mg (33%)	1490 mg (30%) ^{M1}	odzyskana
2	152—161	0,3 N	483 mg (8%)	⊕	kanamycyna
3	162—169	0,3 N	376 mg (6%)	196 mg (3%) ^{M2}	BB-K 29
4	170—197	0,3 N—0,5 N	1877 mg (30%)	1350 mg (23%) ^{M2}	BB-K 29+
5	198—203	0,5 N	100 mg (2%)	⊕	BB-K 8
6	238—257	1,0 N	146 mg (2%)	⊕	BB-K 8+
					BB-K 11
					po pochodna
					dwuacylowa

Objaśnienia:

M₁ — oznaczono wobec szczepu B. subtilis PCI 219

M₂ — oznaczono wobec szczepu K. pneumoniae A 20680, który jest wrażliwy na związek BB-K 8 i wysoce oporny na kanamycynę, BB-K 11 i BB-K 29.

⊕ — oznacza, że dana frakcja nie zawierała związku o wzorze 1.

Tablica VI

Związek o wzorze 1	Ilość	Oznaczenie		Wydajność	
		B. subtilis	K. pneumoniae	B. subtilis	K. pneumoniae
Bezpostaciowy proszek	70 mg	737 u/mg	927 u/mg	0,9%	1,1%
Kryształy	1098 mg	1163 u/mg	1087 u/mg	19%	19%
Liofilizowany proszek	180 mg	608 u/mg	504 u/mg	1,9%	1,6%

w 50 ml dwumetyloformamidu w temperaturze 24°C. 2,064 g (5,895 milimoli) estru N-hydroksysukcynimidowego kwasu L-(-)-γ-benzylloksykarbonyloamino-α-hydromasłowego rozpuszcza się w 20 ml dwumetyloformamidu w temperaturze 24°C i roztwór ten dodaje się przy intensywnym mieszaniu do roztworu zasady Schiffa w ciągu 75 minut. Roztwór miesza się w ciągu nocy. Stosując zmniejszone ciśnienie uzyskanie za pomocą parowej pompy ssącej z roztworu usuwa się rozpuszczalnik w temperaturze około 40°C. Zadając pozostałość 100 ml metanolu i ponownie go usuwając uzyskuje się lepki olej. Olej ten rozpuszcza się w 100 ml metanolu i ponownie go usuwając uzyskuje się lepki olej. Olej ten rozpuszcza się w 100 ml mieszaniny diksanu i wody w stosunku 1:1 i dodaje się 10 ml lodowatego kwasu octowego. Roztwór umieszcza się w reaktorze Parra o pojemności 500 ml i uwodornia się pod ciśnieniem 3,15 atmosfery z dodatkiem 2,5 g 5% palladu na węglu (Engelhard) w temperaturze 24°C. Całkowity spadek ciśnienia w ciągu czterogodzinnego uwodorniania wynosi 6,04 atmosfery (zamknięty reaktor) w tym licząc okresowe uzupełnienie ciśnienia. Mieszaninę sączy się przez warstwę ziemi okrzemkowej. Warstwę ziemi okrzemkowej przemywa się następnie 3×50 ml 50% roztworem wodnym dioksanu. Połączone przesącze suszy się i poddaje destylacji azeotropowej ze 100 ml n-butanolu i w końcu suszy się z metanolem uzyskując lepki olej. Olej ten rozpuszcza się w 30 ml metanolu i powoli wlewa przy intensywnym mieszaniu do 1000 ml ochłodzonego do temperatury 5—10°C eteru dwuetylowego. Po mieszanii na łaźni lodowej w ciągu 1/2 godziny wydzielony osad odsącza się i suszy

nad P₂O₅ w eksykatorze próżniowym. Uzyskuje się mieszaninę produktów w ilości 4,9620 g, w której stwierdzono na podstawie chromatografii cienkowarstwowej, że głównym produktem jest związek o wzorze 1, kanamycyna A i pewne ilości śladowe dwu- i trójpodstawionej kanamycyny A, w tym kwas 4-amino-2-hydroksymasłowy.

Stosując szklaną kolumnę o wymiarach 40×100 mm wypełnioną Amberlitem IRC-50 (w postaci NH₄⁺, typu I, 100 (200 mesh) o wysokości złoża 980 mm uzyskuje się rozdział tych różnych frakcji. Przez kolumnę przepuszcza się 4,600 g surowej mieszaniny rozpuszczonej w 1 ml wody. Kolumnę eluuje się wodnym roztworem amoniaku w gradiencie stężenia amoniaku od 0 do 2 n roztworu NH₄OH. Eluaty zbiera się w porcjach po 15 ml. Po zebraniu 295 frakcji kolumnę przemywa się 1,5 l 3 m NH₄OH. Poszczególne frakcje łączy się na podstawie pomiaru skręcalności optycznej i poddaje się liofilizacji, uzyskując stałe produkty.

W tym doświadczeniu stosunek BB-K 8 (kanamycyna A) wynosi 0,45. Uzyskany w wyniku tego doświadczenia produkt jest identyczny z produktem uzyskanym zgodnie z metodą opisaną w opisie zgłoszenia patentowego w Stanach Zjednoczonych Ameryki nr 221 378 o temperaturze topnienia 194°C z rozkładem i (α)_D²⁵+85°)c = 2 w wodzie. Aktywność rzeczywista przeciwko B. subtilis (płytki agarowa) = 960 mcg/mg standard: wolna zasada kanamycyny A.

Analiza elementarna:

obliczono dla C₂₂H₄₂N₅O₁₃, 2H₂CO₃: C = 40,62%, H = 6,66%, N = 9,87%.

oznaczono: C = 40,21%, 39,79%, H = 6,96%, 6,87%, N = 9,37%, 9,49%.

Nr frakcji	Preparat	Waga gramy	Skorygowana waga w stosunku do całkowitej wagi surowego produktu gramy	Oznaczenia biologiczne	Wydajność %
120—150	kanal A	1,1654	1,257	809	42,6
201—224	BB-K 29	0,40	0,43	—	—
228—241	BB-K 8	0,6523	0,7036	786 ±101 *	19,2 **

* — średnia z 4 płytek, ± odczylenia standardu

** — o ile można oprzeć się na ilości odzyskanej kanamycyny A, wydajność BB-K 8 (wzór 1) wynosi 33,5%.

Przykład VIII. Wytwarzanie soli jednosiarczanowej I-N-(L)-(-γ-amino-α-hydroksybutyrylo)-kanamycyny A.

1 mol I-N-(L)-(-γ-amino-α-hydroksybutyrylo) kanamycyny A rozpuszcza się 1—3 litrów wody. Roztwór przesącza się w celu usunięcia nierozpuszczalnych substancji stałych. Do tego roztworu dodaje się przy chłodzeniu i mieszaniu roztwór 1 mola kwasu siarkowego w 500 ml wody. Mieszaninę reakcyjną miesza się w ciągu 30 minut, a następnie dodaje się ochłodzony etanol w celu wydzielania osadu. Osad odsącza się uzyskując pożądaną sól jednosiarczanową.

Przykład IX. Wytwarzanie soli dwusiarczanowej I-N-(L)-(-γ-amino-α-hydroksybutyrylo) kanamycyny A (BE-K 8, 2H₂SO₄), 35 g I-N-(L)-(-γ-amino-α-hydroksybutyrylo)-kanamycyny A w postaci jednowodoroweglanu trójhdratu rozpuszcza się w 125 ml odjonizowanej wody. Wartość pH roztworu wynosi około 9. Za pomocą 50% objętość (objętość kwasu siarkowego obniża się pH roztworu do 7—7,5).

Do mieszaniny dodaje się 8,5 g aktywnego węgla Darco G-60 i mieszaninę miesza się w temperaturze pokojowej w ciągu pół godziny. Węgiel usuwa się na drodze odsączenia i przemywa 40 ml wody. Wodę pochodzącą z przemycia dodaje się do przesącza.

Za pomocą 50% objętość/objętość kwasu siarkowego doprowadza się pH powyższego roztworu do wartości 2—2,6. W tym czasie wydzieli się duża ilość dwutlenku węgla. Roztwór umieszcza się w komorze próżniowej i miesza w ciągu 20 minut w celu usunięcia pozostałej ilości dwutlenku węgla.

8,5 g węgla Darco G-60 dodaje się do odgazowanego roztworu i mieszaninę reakcyjną miesza się w ciągu pół godziny w temperaturze pokojowej. Węgiel odsącza się, przemywa 35 ml odjonizowanej wody, którą dołącza się następnie do przesącza. W połączonych roztworach doprowadza się za pomocą 50% objętość/objętość kwasu siarkowego pH do wartości 1—1,3. Roztwór ten dodaje się przy intensywnym mieszaniu w ciągu 10 minut do 600—800 ml metanolu (3—4 objętości metanolu). Mieszaninę tę miesza się w ciągu 5 minut w pH 1—1,2, przepuszcza się przez sito o rozmiarze 100 mesh i pozostawia w ciągu 5 minut do wytrącenia osadu. Większość roztworu

znad osadu dekantuje się, a pozostałą zawieszinę odsącza się, przemywa 200 ml metanolu i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 50°C w ciągu 24 godzin uzyskując 32—34 g bezpostaciowego związku BB-K 8 (dwuwodorosiarczany), o temperaturze rozkładu 220—223°C i ()²²D H₂O = +74,75.

Analiza elementarna (w przeliczeniu na suchą zasadę)*:

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

* — oznaczenie wody metodą Karla Fischera: 2,33, 1,79, 2,87% (zawartość wody dla monohydratu wynosi teoretycznie 2,25%).

Uzyskana sól jest higroskopijna, jednak nie wykazuje zjawiska rozpylania się. Po pozostawieniu tego osadu na powietrzu w temperaturze pokojowej w ciągu 18 godzin zawartość wody wzrasta do 9,55, 9,89% (teoretycznie zawartość wody dla pięciohydratu wynosi 10,33%).

Przykład X. Wytwarzanie 6'-karbobenzoksy-1,3,3"-trójsalicylalokanamycyny A.

Do zawiesiny 9,0 g (14,5 milimola) 6'-karbobenzoksykanamycyny A w 500 ml absolutnego etanolu dodaje się w temperaturze 24°C 58,2 milimola aldehydu salicylowego. Mieszaninę ogrzewa się w temperaturze wrzenia i w ciągu tego czasu mieszanina przekształca się w klarowny, żółty roztwór, z którego w ciągu ogrzewania wytrąca się szybko biały osad. Mieszaninę ogrzewa się we wrzeniu w ciągu 3 godzin, ochładza i odsącza wydzielony produkt. Produkt przemywa się niewielką ilością absolutnego etanolu, uzyskując po rekryształizacji z mieszaniny czterohydrofuranu, metanolu i heptanu w stosunku 4:1:5 i po wysuszeniu produkt o temperaturze topnienia 196—193°C.

Analiza elementarna:

obliczono dla C₄₇H₅₄N₄O₁₆: C = 60,62%, H = 5,88%, N = 6,02%.

oznaczono: C = 58,67%, H = 5,73%, N = 5,98%.

Oznaczenie wody metodą Karla Fischera — 2,45%.

Analiza elementarna po uwzględnieniu zawartości wody:

oznaczono: C = 60,14%, H = 5,60%, N = 6,13%.

Przykład XI. Wytwarzanie I-N-(L)-(-γ-

-amino- α -hydroksybutyrylo)kanamycyny A metodą in situ.

Do umieszczonej w odpowiedniej aparaturze zawiesiny 1000 g (1,074 mola) 6'-karbobenzoksy-1,3,3"-trójsalicylalokanamycyny A w 11400 ml czterohydrofuranu dodaje się przy mieszaniu w temperaturze 22–25°C 600 ml wody. Rozpuszczanie zachodzi w ciągu około 10 minut. Do roztworu dodaje się 181,5 g (0,716 mola) kwasu 4-benzyl-oksycarbonyloamino - 2 - hydroksymasłowego i 0,12 mola N-hydroksyimidu kwasu 5-norbornenodwukarboksylowego-2,3. Po zakończeniu dodawania pH roztworu ustala się w granicach 5,5–6,0. Utrzymując temperaturę roztworu w zakresie 22–25°C dodaje się 162,3 g (0,787 mola) dwucykloheksylokarbonyloamidu rozpuszczonego w 3000 ml czterohydrofuranu. Zawiesinę miesza się w ciągu 24 godzin w temperaturze 22–25°C, a następnie chłodzi się roztwór w temperaturze 0–5°C w ciągu 2 godzin w celu wydzielenia krystalicznego osadu dwucykloheksyloamocznika.

Mocznik odsąca się i osad przemywa się 800 ml mieszaniny czterohydrofuranu i wody w stosunku 95:5. Przesącz i roztwór z przemycia łączy się i usuwa się rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 3000 ml. Do pozostałości dodaje się 4000 ml metanolu i ponownie zateża się roztwór pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 3000 ml.

Do tak otrzymanego roztworu dodaje się w temperaturze 40°C 2000 ml absolutnego metanolu. Roztwór zaszczebia się następnie 6'-karbobenzoksy-1,3,3"-trójsalicylalokanamycyną A i pozostawia do ochłodzenia i krystalizacji w ciągu 0,5–1 godziny. Następnie przy intensywnym mieszaniu dodaje się w ciągu 0,5 godziny w temperaturze 22–25°C 2000 ml wody i miesza w ciągu 2 godzin, po czym obniża się temperaturę do 0–5°C w ciągu 1 godziny.

Wydzielony osad odsąca się, przemywa za pomocą 900 ml mieszaniny metanolu i wody w stosunku 2:1 oraz 800 ml metanolu. Przesącz i roztwory z przemycania zachowuje się. Odsączony osad stanowi zasadniczo 6'-karbobenzoksy-1,3,3"-trójsalicylalokanamycyna A.

Powyższe przesącze rozcieńcza się dodatkiem 1000 ml chlorku metylenu. W temperaturze 25°C obniża się za pomocą 6 n kwasu solnego pH roztworu do 1,8–2,0 i pozostawia się roztwór w tym pH w ciągu 0,5 godziny. Po rozdzieleniu faz, fazę wodną przemywa się 2000 ml chlorku metylenu. Połączone fazy organiczne zachowuje się ze względu na możliwość odzyskania aldehydu salicylowego.

Za pomocą stężonego roztworu wodorotlenku amonu doprowadza się pH fazy wodnej do 3,5–4,0. Roztwór ten poddaje się wodorolizie w temperaturze pokojowej pod ciśnieniem 3,5 atmosfery w obecności 5% palladu na węglu. Wydajność biologiczna pożądanego produktu w roztworze wynosi 30–45% wydajności teoretycznej.

Przykład XII. Wytwarzanie związku o wzorze 1 stosując różnoprocentową zawartość molarową N-hydroksyimidu kwasu 5-norbornenodwukarboksylowego-2,3 przy zachowaniu stałych procen-

towych zawartości molowych innych substratów.

Postępując jak w przykładzie XI i stosując zamiast 0,12 mola N-hydroksyimidu kwasu 5-norbornenodwukarboksylowego-2,3 różne procentowe zawartości molowe przedstawione poniżej uzyskuje się następujące wydajności procentowe związku o wzorze 1:

Tablica VIII

Doświad-czenie	% molarowy N-hydroksy-imidu kwasu 5-norbornenodwukarboksylowego-2,3	% wydajności związku o wzorze 1
1	0	9,33
2	2	20,07
3	10	31,72
4	50	36,52
5	100	36,01

Z podanych rezultatów wynika, że reakcja tworzenia się związku o wzorze 1 zachodzi w nieobecności N-hydroksyimidu kwasu 5-norbornenodwukarboksylowego-2,3. Jednakże wynika również, że najlepszą wydajność związku o wzorze 1 uzyskuje się wtedy, gdy procentowa zawartość molarowa N-hydroksyimidu kwasu 5-norbornenodwukarboksylowego-2,3 wynosi od 10 do 50% zawartości molarowej kwasu 4-benzyl-oksycarbonyloamino-2-hydroksymasłowego użytego w reakcji acylowania. Dokładny mechanizm według którego zachodzi proces acylowania zablokowanej kanamycyny A nie jest znany. Jednakże widoczne jest, że w obecności N-hydroksyimidu kwasu 5-norbornenodwukarboksylowego-2,3, uzyskuje się w niewyjaśniony sposób lepsze wydajności niż uzyskiwane uprzednio.

Przykład XIII. Wytwarzanie 1-N-(L-)-(-)-amino- α -hydroksybutyrylo)kanamycyny A (wzór 1).

18,6 g (20 milimoli) 6'-karbobenzoksy-1,3,3"-trójsalicylalokanamycyny A uzyskanej jak w przykładzie XI rozpuszcza się w 55 ml dwumetyloformamidu w temperaturze 45°C. Do powyższego roztworu dodaje się 7,3 ml wody i 102 ml acetonu. Roztwór pozostawia się do ochłodzenia do temperatury około 25°C i dodaje się jednorazowo 50 ml roztworu 9,9 milimola estru N-hydroksysukcynimidowego kwasu L-(-)-benzyl-oksycarbonylo-hydroksymasłowego. Mieszaninę reakcyjną miesza się w temperaturze około 25°C w ciągu 40 godzin. Następnie dodaje się 150 ml wody i kilka kryształów 6'-karbobenzoksy-1,3,3"-trójsalicylalokanamycyny A i mieszaninę reakcyjną miesza się w temperaturze około 25°C w ciągu 1 godziny, a później w ciągu 3 godzin w temperaturze 0–5°C. Nadmiar i nieprzereagowaną zasadę Schiffa z aldehydem salicylowym odsąca się. Osad przemywa się 60 ml 50%-owego wodnego roztworu acetonu i suszy, uzyskując 9,4 g odzyskanej zasady Schiffa o temperaturze topnienia 170–185°C (surowy związek).

Uzyskany powyżej przesącz poddaje się działaniu 40 ml chlorku metylenu i obniża się pH

mieszaniny z 6,2 do 2,0 w celu usunięcia dalszych substratów. Po rozdzielaniu faz, fazę wodną ekstrahuje się 2×40 ml chlorku metylenu i pH fazy wodnej doprowadza się do 3,7. Niewielkie ilości chlorku metylenu i acetonu usuwa się pod zmniejszonym ciśnieniem. Fazę wodną poddaje się wodorolizie w temperaturze 24°C z dodatkiem 3,0 g 5% palladu na węglu jako katalizatora, pod ciśnieniem 3,15 atmosfery. Mieszaninę uwodornia się w ciągu 15 godzin, sączy przez ziemię okrzemkową w celu usunięcia katalizatora. Objętość przesącza doprowadza się do około 100 ml. Jeden mililitr roztworu pobiera się na oznaczenie płytkowe i krążkowe. Oznaczenie płytkowe wykazuje zawartość 1936 mcg/ml związku o wzorze 1, a oznaczenie krążkowe 1325 mcg/ml, co odpowiada 33,4% wydajności końcowego produktu.

Pozostałe 99 ml roztworu zateża się do objętości około 30 ml i przepuszcza przez kolumnę chromatograficzną w sposób opisany w przykładzie VII. Połączone frakcje o objętości 500 ml zawierające związek o wzorze 1 zateża się do objętości około 20 ml, po czym dodaje się 45 ml metanolu, a następnie wkrapla się około 25 ml izopropanolu w celu wydzielenia produktu. Krystaliczny produkt odsącza się, przemywa mieszaniną metanolu i izopropanolu w stosunku 50:50 i suszy, uzyskując 2,31 g związku BB-K 8 o wzorze 1. Oznaczenie osadu metodą płytkową wykazuje aktywność 836 mcg/mg, co odpowiada czystości 83,6% i stanowi 33,3% wydajności związku o wzorze 1 w przeliczeniu na 9,9 milimola substancji wyjściowej.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania 1-(L)-(-γ-amino-α-hydroksybutyrylo)kanamycyny A o wzorze 1 przez poddanie reakcji związku o wzorze 2 z aldehydem, zacylowaniu wytworzonej zasady Schiffa i katalitycznym uwodornieniu i odszczepieniu grup blokujących, znamieny tym, że związek o wzorze 2 poddaje się reakcji aldehydem takim jak aldehyd benzoowy lub p-nitrobenzoowy, lub salicylowy lub p-metoksybenzoowy lub piwalowy w proporcji molowej związku o wzorze 2 do aldehydu, jak 1 do co najmniej 3, przy czym reakcję prowadzi się w rozpuszczalniku takim jak absolutny etanol, metanol, n-propanol, chlorek metylenu, izopropanol, n-butanol, II rzęd. butanol, III rzęd. butanol, tetrahydrofuran, dioksan, dwumetyloformamid lub aceton albo w ich mieszaninie, lub w mieszaninie tych rozpuszczalników z wodą, w temperaturze od 5°C do temperatury wrzenia pod chłodnicą zwrotną w ciągu od 30 minut do 5 godzin, po czym wytworzony związek o ogólnym wzorze 3, w którym Z oznacza grupę o wzorze 4 lub 5, lub 6, lub 7, lub 8 poddaje się in situ reakcji ze związkiem o wzorze 9, w proporcji molowej związku o wzorze 3 do związku o wzorze 9, jak 1 do co najmniej 0,5, a korzystnie 1, przy czym reakcję prowadzi się w temperaturze od -10°C do +35°C w ciągu co najmniej jednej godziny, a następnie usuwa rozpuszczalnik i pozostałość uwodornia in situ wodorem w

obecności katalizatora metalicznego takiego jak pallad, platyna, nikiel Reney'a, rod, ruten lub nikiel, w wodzie lub w mieszaninie wody z mieszającym się z wodą układem rozpuszczalnikowym, takiej jak woda i dioksan, tetrahydrofuran, eter dwumetylowy glikolu etylenowego lub eter dwumetylowy glikolu propylenowego, przy pH 3-5.

2. Sposób wytwarzania 1-(L)-(-γ-amino-α-hydroksybutyrylo)kanamycyny A o wzorze 1, przez poddanie reakcji związku o wzorze 2, z aldehydem, zacylowaniu wytworzonej zasady Schiffa i katalitycznym uwodornieniu i odszczepieniu grup blokujących, znamieny tym, że związek o wzorze 2 poddaje się reakcji aldehydem, takim jak aldehyd benzoowy lub p-nitrobenzoowy lub salicylowy lub p-metoksybenzoowy lub piwalowy w proporcji molowej związku o wzorze 2 do aldehydu, jak 1 do co najmniej 3, przy czym reakcję prowadzi się w rozpuszczalniku takim jak absolutny etanol, metanol, n-propanol, chlorek metylenu, izopropanol, n-butanol, III rzęd. butanol, II rzęd. butanol, tetrahydrofuran, dioksan, dwumetyloformamid lub aceton, w ich mieszaninie lub w mieszaninie tych rozpuszczalników z wodą w temperaturze od 5°C do temperatury wrzenia pod chłodnicą zwrotną, w ciągu od 30 minut do 5 godzin, po czym wytworzony związek o ogólnym wzorze 3, w którym Z oznacza grupę o wzorze 4 lub 5 lub 6 lub 7 lub 8 wyodrębnia się z mieszaniny poreakcyjnej i poddaje reakcji ze związkiem o wzorze 9 w proporcji molowej związku o wzorze 3 do związku o wzorze 9, jak 1 do co najmniej 0,5, przy czym reakcję prowadzi się w temperaturze od -10°C do +35°C w ciągu co najmniej jednej godziny, a następnie usuwa rozpuszczalnik z mieszaniny poreakcyjnej i pozostałość uwodornia in situ wodorem w obecności katalizatora metalicznego, takiego jak pallad, platyna, nikiel Reney'a, rod, ruten lub nikiel, w wodzie lub w mieszaninie wody z mieszającymi się z wodą układem rozpuszczalnikowym; takiej jak woda i dioksan, tetrahydrofuran, eter dwumetylowy glikolu etylenowego lub eter dwumetylowy glikolu propylenowego, przy pH 3-5.

3. Sposób wytwarzania 1-(L)-(-γ-amino-α-hydroksybutyrylo)kanamycyny A o wzorze 1, przez poddanie reakcji związku o wzorze 2, z aldehydem, zacylowaniu wytworzonej zasady Schiffa i katalitycznym uwodornieniu i odszczepieniu grup blokujących, znamieny tym, że związek o wzorze 2 poddaje się reakcji z aldehydem, takim jak aldehyd benzoowy lub p-nitrobenzoowy, lub salicylowy, lub p-metoksybenzoowy, lub piwalowy, w proporcji molowej związku o wzorze 2 do aldehydu jak 1 do co najmniej 3, przy czym reakcję prowadzi się w rozpuszczalniku takim jak absolutny etanol, metanol, n-propanol, chlorek metylenu, izopropanol, n-butanol, II rzęd. butanol, III rzęd. butanol, tetrahydrofuran, dioksan, dwumetyloformamid lub aceton, w ich mieszaninie lub w mieszaninie tych rozpuszczalników z wodą, w temperaturze od 5°C do temperatury wrzenia pod chłodnicą zwrotną, w ciągu od 30 minut do 5

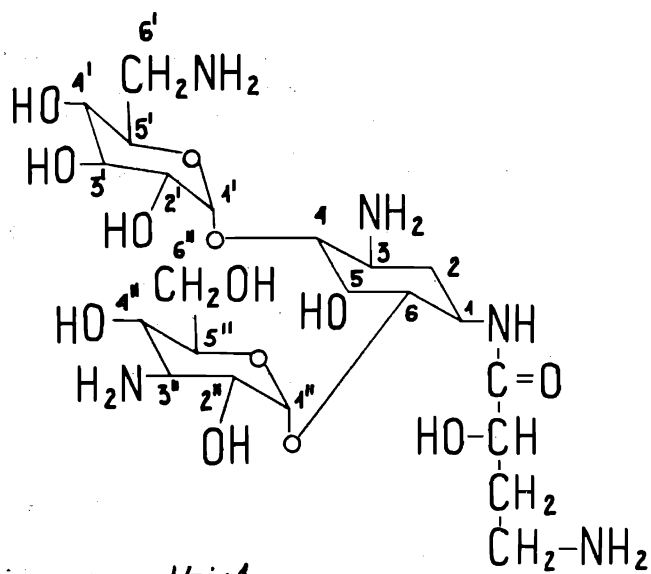
21

godzin, po czym wytworzony związek o ogólnym wzorze 3, w którym Z oznacza grupę o wzorze 4 lub 5 lub 6 lub 7 lub 8 poddaje się in situ reakcji ze związkiem o wzorze 12 i 13 z dodatkiem dwucykloheksylokarbodwuimidu w proporcji molowej związku o wzorze 3 do związku o wzorze 12 i dwucykloheksylokarbodwuimidu jak 1 do 0,5—1,0 i 0,005—0,25 związku o wzorze 13, przy czym reakcję prowadzi się w temperaturze od -10°C do $+35^{\circ}\text{C}$ w ciągu co najmniej 10 godzin, a następnie usuwa się rozpuszczalnik z mieszaniny reakcyjnej i pozostałość uwodornia się, in situ, wodorem w obecności katalizatora metalicznego takiego jak pallad, platyna, nikiel Reney'a, rod, ruten lub nikiel w wodzie lub w mieszaninie wody z mieszącym się z wodą układem rozpuszczalnikowym takiej jak woda i dioksan, czterohydrofuran, eter dwumetylowy glikolu etylenowego lub eter dwumetylowy glikolu propylenowego, przy pH 3—5.

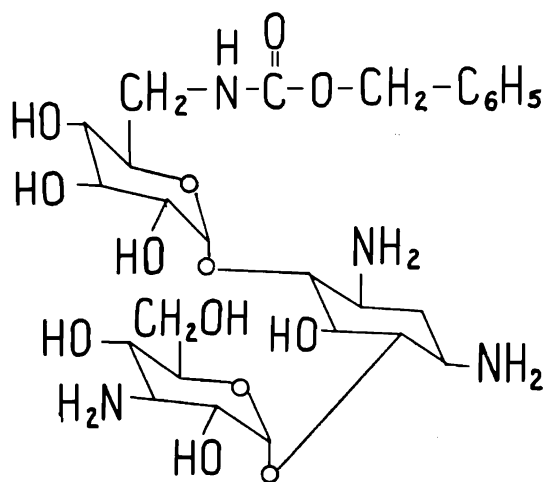
4. Sposób wytwarzania 1-(L-)-(- γ -amino- α -hydroksybutyrylo)kanamycyny A o wzorze 1, przez poddanie reakcji związku o wzorze 2, z aldehydem, zacyłowaniu wytworzonej zasady Schiffa i katalitycznym uwodornieniu i odszczepieniu grup blokujących, **znamienny tym**, że związek o wzorze 2 poddaje się reakcji z aldehydem takim jak aldehyd benzoesowy, lub p-nitrobenzoesowy, lub salicylowy, lub p-metoksybenzoesowy lub piwalowy, w proporcji molowej związku o wzorze 2,

22

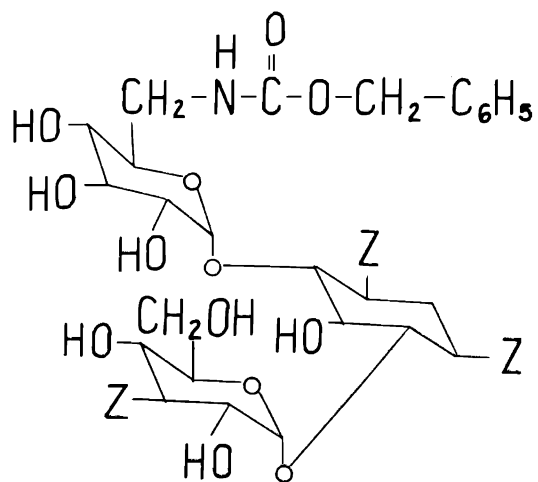
do aldehydu jak 1 do co najmniej 3, przy czym reakcję prowadzi się w rozpuszczalniku, takim jak absolutny etanol, metanol, n-propanol, chlorek metylenu, izopropanol, n-butanol, II rzęd.-butanol, III rzęd.-butanol, tetrahydrofuran, dioksan, dwumetyloformamid lub aceton, w ich mieszaninie lub w mieszaninie tych rozpuszczalników z wodą, w temperaturze od 5°C do temperatury wrzenia pod chłodnicą zwrotną, w ciągu od 30 minut do 5 godzin, po czym wytworzony związek o wzorze ogólnym 3, w którym Z oznacza grupę o wzorze 4 lub 5 lub 6 lub 7 lub 8, wyodrębnia się i poddaje reakcji ze związkami o wzorze 12 i 13 z dodatkiem dwucykloheksylokarbodwuimidu w proporcji molowej związku o wzorze 3 do związku o wzorze 12 i dwucykloheksylokarbodwuimidu jak 1 do 0,5—1,0 i 0,005—0,25 związku o wzorze 13, przy czym reakcję prowadzi się w temperaturze od -10°C do $+35^{\circ}\text{C}$ w ciągu co najmniej 10 godzin, usuwa rozpuszczalnik i pozostałość uwodornia in situ wodorem w obecności katalizatora metalicznego takiego jak pallad, platyna, nikiel Reney'a, rod, ruten lub nikiel, w wodzie lub w mieszaninie wody z mieszącym się z wodą układem rozpuszczalnikowym, takiej jak woda i dioksan, tetrahydrofuran, eter dwumetylowy glikolu etylenowego lub eter dwumetylowy glikolu propylenowego, przy pH 3—5.



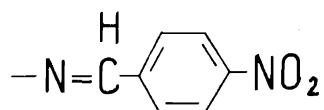
Wzór 1



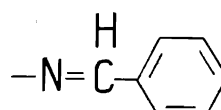
Wzór 2



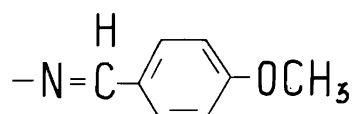
Wzór 3



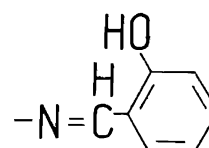
Wzór 4



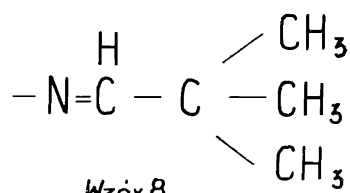
Wzór 5



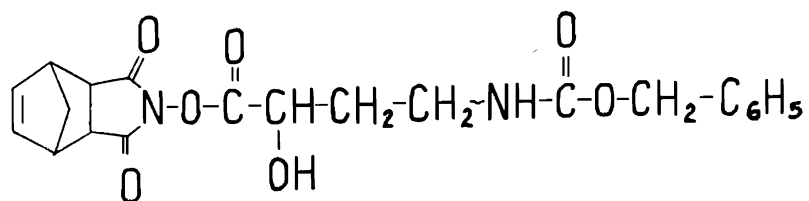
Wzór 6



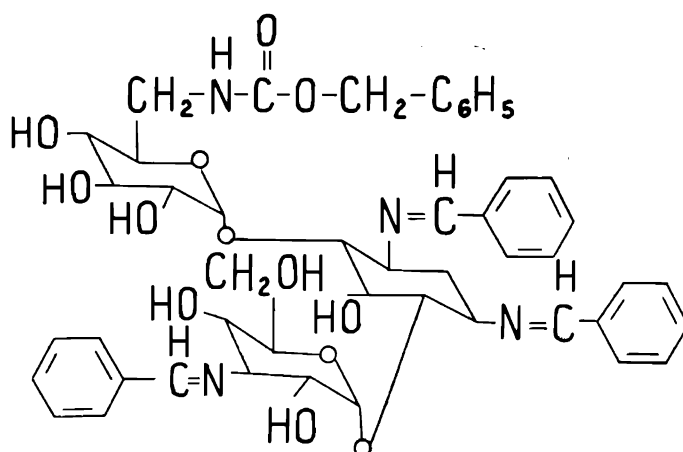
Wzór 7



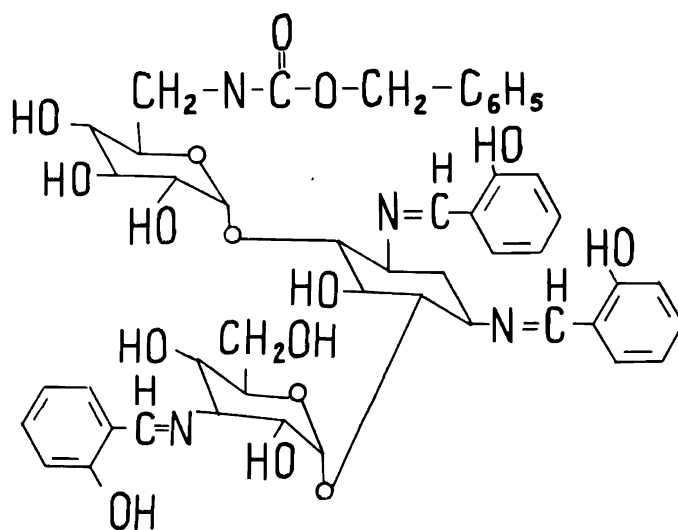
Wzór 8



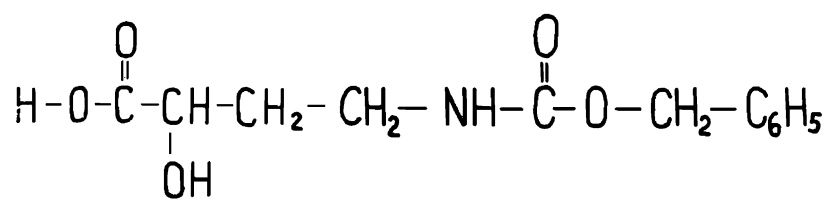
Wzór 9



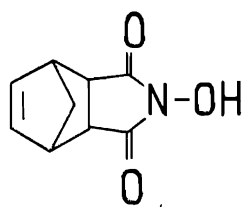
Wzór 10



Wzór 11



Wzór 12



Wzór 13