

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

195712
(11) (B2)



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

(22) Přihlášeno 23 10 75
(21) {PV 7161-75}

(32) (31) (33) Právo přednosti od 26 10 74
{46412/74} Velká Británie

(40) Zveřejněno 31 05 79

(45) Vydáno 15 05 83

(51) Int. Cl.³
C 07 H 5/04

(72)

Autor vynálezu MOORE JAMES WILLIAM, SANDWICH {Velká Británie}

(73)

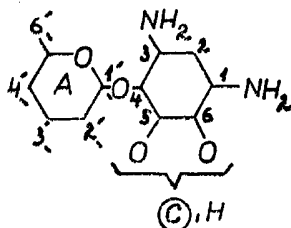
Majitel patentu PFIZER CORPORATION, COLON {Panama} S OBCHODNÍM SÍDLEM
V BRUSELU {Belgie}

(54) Způsob výroby nových aminoglykosidů 2-deoxystreptaminu

1

Vynález se týká antibakteriálních činidel a zejména pak skupiny nových aminoglykosidů 2-deoxystreptaminu, které jsou antibakteriálně účinné, dále také způsobu výroby těchto látek.

Četné aminoglykosidy 2-deoxystreptaminu vyskytující se v přírodě mají obecně tri-cyklickou strukturu, kterou lze popsat následujícím obecným vzorcem



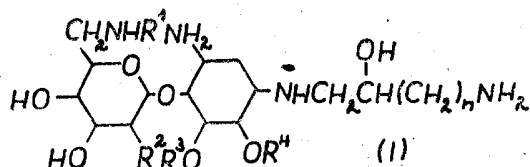
kde kruhem A je hexopyranosový skelet obsahující aminoskupinu v poloze 2' a/nebo 6', kruhem B je 2-deoxystreptaminová skupina a kruh C představuje glykosylovou skupinu napojenou glykosidickou vazbou buď na polohu 5, nebo 6 streptaminového kruhu, přičemž druhá z těchto poloh nese hydroxylovou skupinu.

Nová antibakteriální činidla podle vynálezu představují skupinu aminoglykosidů 2-

2

-deoxystreptaminu nesoucích β -hydroxy- ω -aminoalkylový substituent na aminoskupině v poloze 1 a glykosylovou skupinu napojenou v poloze 5 nebo 6 streptaminového kruhu B. Tyto sloučeniny jsou účinné při léčbě řady infekcí způsobených grampozitivními a gramnegativními bakteriemi, včetně infekcí močových cest, u zvířat i lidí, a mají jisté přednosti oproti použití aminoglykosidů 2-deoxystreptaminu s nesubstituovanou aminoskupinou v poloze 1 2-deoxystreptaminového kruhu B, jako přírodního kanamycinu A a B, neomycinu a ribostamycinu.

V souhlase s tím popisuje vynález nové sloučeniny obecného vzorce I

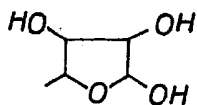


ve kterém

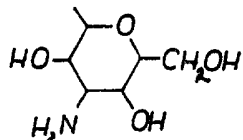
R¹ znamená atom vodíku nebo alkylovou skupinu, s 1 až 3 atomy uhlíku,

R² představuje aminoskupinu nebo hydroxylovou skupinu,

jeden ze symbolů R^3 a R^4 znamená atom vodíku a druhý z těchto symbolů představuje glykosylovou skupinu, přičemž v případě, znamená-li R^3 glykosylovou skupinu, odpovídá tato skupina vzorci



a představuje-li R^4 glykosylovou skupinu, odpovídá tato skupina vzorci



a n má hodnotu 1, 2 nebo 3, a jejich farmaceuticky upotřebitelné adiční soli s kyselinami.

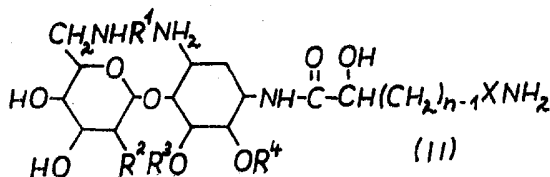
Zvláštní podskupinu sloučenin podle vynálezu tvoří látky shora uvedeného obecného vzorce I, v němž R^1 znamená atom vodíku a n má hodnotu 1 nebo 2.

Výhodnou skupinu sloučenin podle vynálezu tvoří látky shora uvedeného obecného vzorce I, ve kterém R^3 znamená atom vodíku a R^4 představuje 3-amino-3-deoxy- α -D-glukopyranosylovou skupinu, to je deriváty kanamycinu A a B. Výhodné jsou rovněž sloučeniny, v nichž β -hydroxy- ω -aminoalkylová skupina na dusíku N^1 má konfiguraci (S) a n má hodnotu 2 nebo 3. R^1 představuje s výhodou atom vodíku nebo methylovou skupinu.

Zvlášť výhodnými individuálními sloučeninami podle vynálezu jsou 1-N-[(S)-4-amino-2-hydroxybutyl]kanamycin A a 1-N-[(S)-5-amino-2-hydroxypentyl]kanamycin A.

Farmaceuticky upotřebitelnými adičními solemi sloučenin podle vynálezu s kyselinami jsou soli tvořené s kyselinami vedoucími k netoxickým adičním solím s kyselinami obsahujícím farmaceuticky upotřebitelné anionty, jako hydrochloridy, hydrobromidy, hydrojodidy, sulfáty nebo bisulfáty, fosfáty nebo kyselá fosfáty, acetáty, maleáty, fumaráty, oxaláty, laktáty, tartráty, citráty, glukonáty, sacharáty, p-toluensulfonáty a soli s kyselinou uhličitou.

Nové sloučeniny obecného vzorce I se podle vynálezu připravují tak, že se sloučeniny obecného vzorce II



ve kterém

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 a n mají shora uvedený význam, a

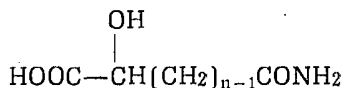
X představuje skupinu CH_2 nebo CO , nechají ve vhodném rozpouštědle reagovat s redukčním činidlem k redukci amidické vazby na dusíku N^1 a popřípadě přítomné karbonylové skupiny ve významu symbolu X.

Tento způsob je popřípadě možno doplnit případnou předcházející tvorbou vhodné adiční soli s kyselinou, aby se dosáhlo rozpustnosti sloučenin obecného vzorce II v organických rozpouštědlech. Tuto reakci je možno uskutečnit například tak, že se sloučenina obecného vzorce II rozpustí při teplotě pohybující se obecně mezi teplotou místnosti a $0^\circ C$ v nadbytku bezvodé kyseliny trifluoroctové. Nadbytek kyseliny se odstraní odpařením reakční směsi ve vakuu k suchu, sůl se rozpustí v bezvodém organickém rozpouštědle inertním za reakčních podmínek, například v tetrahydrofuranu nebo dimetoxyethanu, a k roztoku se přidá redukční činidlo, například diboran, který se účelně přidává ve formě roztoku v tetrahydrofuranu. Redukční činidlo se obecně používá v nadbytku a pracuje se obvykle při teplotě pohybující se mezi teplotou místnosti a teplotou varu reakční směsi, v závislosti na povaze jednotlivých reakčních složek a na použitém rozpouštědle. V případě, že symbol X znamená skupinu CO , používá se přirozeně dostatek redukčního činidla potřebný k zajištění redukce obou amidických karbonylových skupin. Provádí-li se reakce v tetrahydrofuranu při teplotě $50^\circ C$ za použití diboranu, je v podstatě ukončena během 24 hodin. Produkt se pak účelně izoluje tak, že se k reakční směsi přidá voda k rozložení nezreagovaného diboranu a organické rozpouštědlo se odpaří ve vakuu. Hodnota pH zbylého vodného roztoku se upraví na 5 a surový produkt lze pak oddělit od nezreagovaného výchozího materiálu a vedlejších produktů běžnou chromatografickou technikou.

Četné ze sloučenin obecného vzorce II, kde X znamená skupinu CH_2 , jsou známými, již dříve popsány antibiotiky. Tak například N-1-(4-amino-2-hydroxybutyryl)kanamycin A, který se rovněž označuje zkratkou BB-K8, je popsán v americkém patentním spisu č. 3 781 268. Další příklady sloučenin jsou popsány v amerických patentních spisech č. 3 781 268, 3 541 078 a 3 860 574, a v publikované západoněmecké přihlášce vynálezu č. 2 350 203 a 2 322 576. 1-N-(5-amino-2-hydroxyvaleryl)- a 1-N-(3-amino-2-hydroxypropionyl)deriváty kanamycinu A a B jsou popsány ve zveřejněné západoněmecké přihlášce vynálezu č. 2 408 666 a v J. Antibiotics 1974, 27, 851. 6'-N-alkylderiváty jsou popsány ve zveřejněné západoněmecké přihlášce vynálezu č. 2 350 169 a v J. Antibiotics, 1975, 28, 483.

Sloučeniny shora uvedeného obecného vzorce II, ve kterém X znamená skupinu CO ,

je možno připravit acylací 1-aminoskupiny aminoglykosidů 2-deoxystreptaminu obdobnými metodami, jaké se používají pro přípravu sloučenin obecného vzorce II, kde X znamená skupinu CH_2 , s tím, že se jako acylační činidlo použije reaktivní derivát kyseliny vzorce



Nové sloučeniny obecného vzorce I podle vynálezu mohou existovat v různých konformačních formách a vynález není omezen pouze na některou z těchto forem. Obecně jsou oba kruhy A a B v „židlíčkové“ formě a všechny zbytky R^2 , OR^3 , OR^4 , aminoskupiny a hydroxylové skupiny mají ekvatoriální polohu vzhledem ke kruhům A a B. Dále pak glykosidická vazba mezi hexopyranosylovým kruhem A a 2-deoxystreptaminovým kruhem B je nejobvyklejší α -vazbou vzhledem k prvnímu z jmenovaných kruhů, zejména pak v případech, kdy se sloučeniny obecného vzorce II odvozuji od přírodních aminoglykosidů 2-deoxystreptaminu. β -hydroxy- ω -aminoalkylová skupina na dusíku N^1 může dále existovat v S nebo R konfiguraci nebo jako směs obou optických isomerů.

Hodnocení antibakteriální účinnosti sloučenin podle vynálezu in vitro se provádí tak, že se zjišťuje minimální inhibiční koncentrace testované sloučeniny ve vhodném prostředí, při níž nedochází k růstu pokusného mikroorganismu. V praxi se postupuje tak, že se agarové plotny s přidavkem testované sloučeniny v příslušné koncentraci inokulují standardním počtem buněk testovaného mikroorganismu a každá z ploten se pak 24 hodiny inkubuje při teplotě 37 °C. Pak se zjistí, zda na pokusných plotnách došlo nebo nedošlo k růstu bakterií a stanoví se příslušné hodnoty minimálních inhibičních koncentrací. Mikroorganismy používané při těchto testech zahrnují kmeny *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus faecalis*.

Účinnější sloučeniny se rovněž hodnotí v testech in vivo, při nichž se testované sloučeniny podávají subkutánně myším vystaveným infekci kmenem *Escherichia coli*. Každá z testovaných sloučenin se podává v řadě různých dávek skupinám myší a její účinnost se vyjadřuje jako dávka poskytující 50% ochranu proti letálnímu účinku organismu *Escherichia coli* během 72 hodin.

K použití v humánní medicíně je možno antibakteriálně účinné sloučeniny podle vynálezu podávat samotné, obecně se však aplikují ve směsi s farmaceuticky upotřebitelným nosičem vybíraným s ohledem na zamýšlený způsob podání a na standardní farmaceutickou praxi. Tak například je mož-

no popisované sloučeniny podávat orálně ve formě tablet obsahujících jako nosnou látku například škrob nebo laktózu, nebo ve formě kapslí, které obsahují buď samotné účinné látky nebo jejich směsi s nosnými a pomocnými látkami nebo ve formě elixírů nebo suspenzí obsahujících chuťové přísady nebo barviva. Účinné látky je možno podávat rovněž v parenterálních, například intravenózních, intramuskulárních nebo subkutánních injekcích. K parenterálnímu podání se účinné látky podle vynálezu nejvhodněji používají ve formě sterilních vodných roztoků, které mohou obsahovat další rozpustné látky, například vhodné množství solí nebo glukózy, k isotonizaci roztoku.

Očekává se, že při aplikaci v humánní medicíně se budou antibakteriálně účinné sloučeniny podle vynálezu podávat v denních dávkách srovnatelných s aminoglykosidickými antibakteriálními činidly používanými v současné praxi, například v dávkách od 0,1 do 50 mg/kg (v dílčích dávkách) při aplikaci parenterální nebo v dávkách od 10 do 100 mg/kg (v dílčích dávkách) při aplikaci orální. Tak je možno očekávat, že tablety nebo kapsle určené k orálnímu podání až čtyřikrát denně budou obsahovat od 0,1 do 1 g účinné látky, zatímco jednotkové dávky k parenterální aplikaci budou obsahovat od 10 do 500 mg účinné látky. Bude větší lékaře stanovit příslušnou dávku, která bude nejvhodnější pro toho kterého pacienta, a která se bude měnit v závislosti na stáří pacienta, na jeho váze a odezvě na aplikovaný preparát. Shora uvedené dávky jsou příklady dávek pro průměrného pacienta. Mohou pochopitelně existovat individuální případy, kdy bude zapotřebí použít vyššího nebo nižšího dávkování, kteréžto případy rovněž spadají do rozsahu vynálezu. Vynález ilustrují následující příklady provedení, jimiž se však rozsah vynálezu nijak neomezuje. Teploty jsou v těchto příkladech udávány ve stupních Celsia.

Příklad 1

150 mg 1-N-[(S)-4-amino-2-hydroxybutyryl]kanamycinu A, připraveného postupem popsaným v americkém patentním spisem č. 3 781 268, se při teplotě 0 °C rozpustí v 10 ml bezvodé trifluoroctové kyseliny. Roztok se odpaří ve vakuu k suchu a odparek se 15 minut suší ve vysokém vakuu při teplotě 20 °C. Získaný sklovitý zbytek se vyjme 5 ml tetrahydrofuranu a v dusíkové atmosféře se k němu po částech přidá 20 ml 1 M roztoku diboranu v tetrahydrofuranu. Výsledný čirý roztok se 3 hodiny zahřívá na 50 °C, pak se nechá 16 hodin stát při teplotě místnosti, načež se další 3 hodiny zahřívá na teplotu 50 °C. Nadbytek diboranu se rozloží opatrným přidavkem několika kapek vody a organické rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku. Zbytek se vyjme 10 ml vody a zalikalizuje se N/10 vodným hydroxidem sod-

ným. pH vodného roztoku se přidáním 2 N kyseliny chlorovodíkové nastaví na hodnotu 5 a výsledný roztok se chromatografuje na sloupci 50 ml iontoměniče Amberlite CG 50 v amoniovém cyklu. Sloupec se promyje destilovanou vodou k odstranění anorganických pevných podílů a pak se vymývá vodným roztokem hydroxidu amonného o průběžně stoupající koncentraci od 0,1 do 1,0 N. Frakce, které podle chromatografie na tenké vrstvě obsahují žádaný produkt, se spojí a odpaří se ve vakuu. Získá se 75 mg (výtěžek 50 %) 1-N-[(S)-4-amino-2-hydroxybutyl]kanamycinu A.

Elektroforéza v tenké vrstvě

Produkt má R_f 0,6. Jako elektrolyt se používá směs stejných dílů kyseliny octové a kyseliny mravenčí o pH 2 a rozdíl napětí 900 V se aplikuje na protilehlé konce desek pokrytých silikagelem (délka 20 cm) po dobu 45 minut. Detekce se provádí tak, že se deska vysuší, postříká se cyklohexanovým roztokem chlornanu terc.butylnatého, pak se vysuší a po ochlazení se vyvíjí roztokem škrobu a jodidu draselného. Za těchto podmínek má referenční standardní vzorek 1-N-[(S)-4-amino-2-hydroxybutyl]kanamycinu A R_f 1,0 a kanamycin A R_f 0,9.

Infračervené spektrum

Svědčí o vymizení pásu amidického karbonylu, který ve spektru 1-N-[(S)-4-amino-2-hydroxybutyl]kanamycinu A se nachází při 1635 cm^{-1} .

Optická rotace

$$[\alpha]_D^{25} = +73^\circ \quad (c = 1,0 \text{ ve vodě}).$$

Hmotová spektrometrie (ionizace polem)

Spektrum obsahuje silný M + 1 signál při m/e 572.

Vzorek produktu se převede na těžavý penta-N-acetyl-okta-O-trimethylsilylderivát dvacetičtyřhodinovou reakcí s acethydridem v methanolu při teplotě místnosti a následující dvacetičtyřhodinovou reakcí se směsí hexamethyldisilazanu a trimethylchlorsilanu při teplotě místnosti.

Pro $C_{56}H_{119}N_5O_{17}Si_8$

vypočteno: M^+ 1357,
nalezeno: M^+ 1357.

Pro $C_{22}H_{45}N_5O_{12} \cdot 2\frac{1}{2} H_2CO_3$

vypočteno:
40,5 % C, 6,9 % H, 9,6 % N,
nalezeno:
40,1 % C, 6,7 % H, 9,6 % N.

Příklad 2

100 mg butirosinu {1-N-[(S)-4-amino-2-hydroxybutyl]ribostamycinu} ve formě volné báze se při teplotě místnosti rozpustí v 5 ml bezvodé kyseliny trifluoroctové. Odpařením nadbytku kyseliny ve vakuu k suchu se získá sůl s kyselinou trifluoroctovou ve formě sklovitého zbytku. Zbytek se vyjme 10 ml suchého dimethyletheru diethylen glykolu a přidá se 10 ml 1 M roztoku diboranu v tetrahydrofuranu, čímž se získá čirý roztok, který se nechá 18 hodin stát při teplotě místnosti, pak se k němu přidá dalších 5 ml roztoku diboranu a výsledný roztok se nechá další 24 hodiny stát při teplotě místnosti. Nadbytek diboranu se rozloží opatrným přidáním několika kapek vody a organická rozpouštědla se odpaří ve vakuu při teplotě 50°C . Odparek se zalkalizuje několika kapkami 2 N roztoku hydroxidu sodného a pak se přidáním 2 N kyseliny chlorovodíkové upraví pH na hodnotu 5. Produkt se izoluje chromatografií na sloupci iontoměniče Amberlite CG 50 postupem popsaným v předchozím příkladu. Odpařením frakcí, obsahujících produkt v čisté formě, ve vakuu se získá 1-N-[(S)-4-amino-2-hydroxybutyl]ribostamycin.

Elektroforéza v tenké vrstvě

Produkt má R_f 0,5. Pracuje se za podmínek popsaných v předchozím příkladu. Jako referenční standardní látka se používá butirosin, který má R_f 1,0.

Příklad 3

Postupem popsaným v příkladu 1 se 0,35 g 1-N-[(S)-5-amino-2-hydroxyvaleryl]kanamycinu A převede na sůl s kyselinou trifluoroctovou, redukuje a chromatografuje. Získá se 0,12 g (35 %) 1-N-[(S)-5-amino-2-hydroxypentyl]kanamycinu A.

Elektroforéza v tenké vrstvě

Produkt má R_f 0,7. Pracuje se za podmínek popsaných v příkladu 1. Výchozí materiál, používaný jako referenční standardní látka, má R_f 1,0.

Příklad 4

Postupem popsaným v příkladu 1 se redukcí 0,15 g 1-N-(3-amino-2-hydroxypropionyl)kanamycinu A získá 0,04 g (27 %) 1-N-(3-amino-2-hydroxypropyl)kanamycinu A.

Elektroforéza v tenké vrstvě

Produkt má R_f 0,6. Pracuje se za podmínek popsaných v příkladu 1. Výchozí materiál, používaný jako referenční standardní látka, má R_f 1,0.

Příklad 5

Postupem popsaným v příkladu 1 se obdobně redukuje 1-N-[(S)-4-amino-2-hydroxybutyryl]kanamycin B za vzniku 1-N-[(S)-4-amino-2-hydroxybutyl]kanamycinu B.

Příklad 6

6'-N-methyl-1-N-[(S)-4-amino-2-hydroxybutyryl]kanamycin A (připravený postupem, který popsali H. Umezawa a spol. v J. Antibiotics, 1975, 28, 483) poskytne reduk-

cí popsanou v příkladu 1 6'-N-methyl-1-N-[(S)-4-amino-2-hydroxybutyl]kanamycin A.

Elektroforéza v tenké vrstvě

Produkt má R_f 0,7. Pracuje se za podmínek popsaných v příkladu 1. Výchozí materiál, používaný jako referenční standardní látka, má R_f 1,0 a kanamycin A má R_f 1,03.

Výsledky testů antibakteriální aktivity sloučenin z předchozích příkladů in vitro, za použití shora popsaných metod, jsou uvedeny v následující tabulce:

TABULKA

Účinnost in vitro

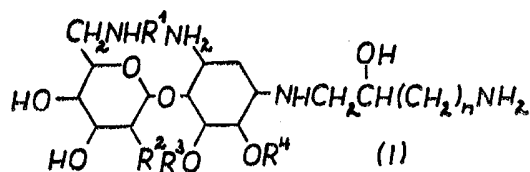
příklad č.	Escherichia coli	minimální inhibiční koncentrace v $\mu\text{g/ml}$ Klebsiella pneumoniae	Proteus mirabilis	Pseudomonas aeruginosa	Staphylococcus aureus
1	6,2	3,1	3,1	1,6	1,6
2	6,2	6,2	25	12,5	12,5
3	6,2	3,1	12,5	3,1	1,6
4	12,5	6,2	12,5	3,1	3,1

Za použití výše popsaného postupu byla mimoto testována účinnost sloučeniny z příkladu 1 in vivo. Tato sloučenina vykazuje

u myši hodnotu PD_{50} proti Escherichia coli 3,8 mg/kg.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby nových aminoglykosidů 2-deoxystreptaminu, obecného vzorce I

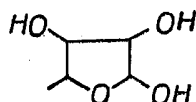


ve kterém

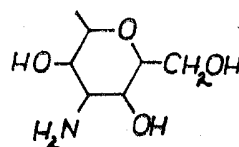
R^1 znamená atom vodíku nebo alkylovou skupinu s 1 až 3 atomy uhlíku,

R^2 představuje aminoskupinu nebo hydroxylovou skupinu,

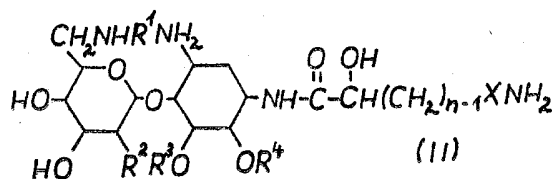
jeden ze symbolů R^3 a R^4 znamená atom vodíku a druhý z těchto symbolů představuje glykosylovou skupinu, přičemž v případě, znamená-li R^3 glykosylovou skupinu, odpovídá tato skupina vzorci



a představuje-li R^4 glykosylovou skupinu, odpovídá tato skupina vzorci



a n má hodnotu 1, 2 nebo 3, a jejich farmaceuticky upotřebitelných adičních solí s kyselinami, vyznačující se tím, že se sloučeniny obecného vzorce II



ve kterém

R^1 , R^2 , R^3 , R^4 a n mají shora uvedený význam a

X představuje skupinu CH_2 nebo CO , redukuje reakcí s diboranem v prostředí bezvodého organického rozpouštědla, potom se k reakční směsi přidá voda.