



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

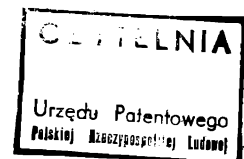
Zgłoszono: 15. 06. 77 (P. 198872)

Pierwszeństwo: 16. 06. 76 dla zastrz. 1—9
28. 09. 76 dla zastrz. 10—18
08. 12. 76 dla zastrz. 19—27
Wielka Brytania

Zgłoszenie ogłoszono: 13. 03. 78

Opis patentowy opublikowano: 15. 12. 1982

Int. Cl² C07H 15/22
C07C 103/19



Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Pfizer Corporation, Colon (Republika Panama)

Sposób wytwarzania nowych aminoglikozydów 2-dezoksystreptaminowych

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowych aminoglikozydów 2-dezoksystreptaminowych, będących środkami przeciwbakteryjnymi.

Aminoglikozydy 2-dezoksystreptaminowe są dobrze znanymi środkami przeciwbakteryjnymi, otrzymywanymi na drodze fermentacji lub metodą półsyntetyczną. Do środków tych należą wartościowe preparaty chemoterapeutyczne, takie jak kanamycyna, gentamycyna, tobramycyna, rybostamycyna i neomycyna.

Nowe środki przeciwbakteryjne wytwarzane sposobem według wynalazku stanowią serię aminoglikozydów 2-dezoksystreptaminowych, w których we wzorze, w położeniu 1 grupa aminowa podstawiona jest grupą alkilową, która z kolei przy atomie węgla innym niż związany z grupą aminową podstawiona jest jedną lub większą liczbą grup hydroksylowych. Związki te charakteryzują się aktywnością przeciwko zakażeniom wywołanym przez różne drobnoustroje Gram-dodatnie i Gram-ujemne, w tym również przeciw zakażeniom dróg moczowych u ludzi i zwierząt.

Związki wytwarzane sposobem według wynalazku wykazują korzystniejsze cechy w porównaniu z aminoglikozydami 2-dezoksystreptaminowymi zawierającymi niepodstawioną grupę aminową w położeniu 1 pierścienia 2-dezoksystreptaminowego. Stwierdzono, że korzystniejszym cechem towarzyszy jednocześnie zmniejszona toksyczność nowych

2

pochodnych w porównaniu z toksycznością wielu znanych aminoglikozydów.

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowych aminoglikozydów 2-dezoksystreptaminowych o wzorze ogólnym 1, w którym R¹ oznacza pierwszorzędową grupę alkilową o 3—7 atomach węgla, z których przynajmniej dwa inne niż atom węgla połączony z grupą aminową podstawione są grupą hydroksylową lub R¹ oznacza drugorzędową grupę alkilową o 3—7 atomach węgla, z których przynajmniej jeden inny niż atom węgla połączony z grupą aminową, podstawiony jest grupą hydroksylową, R² oznacza grupę aminową lub hydroksylową, każdy z podstawników R³ oznacza grupę hydroksylową, R⁴ i R⁵ oznaczają atomy wodoru, a R⁶ oznacza grupę 3-amino-3-dezoksy- α -D-glikopiranozyłową, a R⁷ oznacza atom wodoru lub niższą grupę alkilową, zawierającą do 4 atomów węgla oraz dopuszczalnych do stosowania w farmacji addycyjnych soli tych związków z kwasami.

Określenie „pierwszorzędowa grupa alkilowa” oznacza grupę alkilową przyłączoną niepodstawioną grupą metylenową do grupy aminowej, która jeżeli składa się z więcej niż 3 atomów węgla to może być grupą alkilową o łańcuchu prostym lub rozgałęzionym, określenie „drugorzędowa grupa alkilowa” oznacza grupę alkilową, w której atom węgla przyłączony do grupy aminowej, łączy się jednocześnie z dwoma atomami węgla lub z dwoma łańcuchami alkilowymi.

3

Korzystną grupę związków wytwarzanych sposobem według wynalazku stanowią związki, w których we wzorze 1, R¹ oznaczają atomy wodoru, a każdy z podstawników, R¹ oznacza grupę alkilową o 3—5 atomach węgla, korzystnie podstawioną grupą hydroksylową, a zwłaszcza grupę propylową. Szczególnie korzystnym podstawnikiem grupy 1-aminowej jest grupa dwuhydroksypropylowa, na przykład, grupa 2,3-dwuhydroksypropylową, lub 1,3-dwuhydroksypropylową-2.

Szczególnie korzystnymi związkami, które wytwarza się sposobem według wynalazku są 1-N-(2,3-dwuhydroksypropylo -kanamycyna A i B oraz 1-N-(1,3-dwuhydroksypropylo-2-) kanamycyna A i B.

Sole addycyjne z kwasami związków wytwarzanych sposobem według wynalazku, dopuszczone do stosowania w farmacji, otrzymuje się przy użyciu kwasów, które dają takie sole addycyjne, zawierające anion dopuszczony do stosowania w farmacji. Przykłady takich soli to chlorowoderek, bromowoderek, siarczan, kwaśny siarczan, fosforan, kwaśny fosforan, octan, maleinian, funaron, bursztynian, mleczan, winian, cytrynian, glikonian, cukrzan, p-toluenosulfonian oraz węglany.

Nowe związki o wzorze ogólnym 1, wytwarza się sposobem według wynalazku przez alkilowanie związku o wzorze ogólnym 2, w którym R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ i R⁷ mają wyżej podane znaczenie, oraz w którym jedna lub większa liczba wolnych grup aminowych, innych niż grupa aminowa w położeniu 1, może być ewentualnie ochroniona. Po przeprowadzeniu alkilowania usuwa się ewentualne grupy ochraniające i izoluje się związek o wzorze ogólnym 1.

Ewentualne grupy ochraniające wolne grupy aminowe w związku o wzorze ogólnym 2 można wprowadzić za pomocą reakcji selektywnie działającego w odniesieniu do wolnych grup aminowych reagenta, i następnie łatwo dających się usunąć za pomocą zwykle stosowanych sposobów, na przykład za pomocą hydrolizy i wodorolizy. Przykłady odpowiednich grup ochraniających są grupa formylowa, acetylowa, trójfluoroacetylowa, metoksykarbonylowa, III-rzęd- butyloksykarbonylowa i benzyloksykarbonylowa.

Alkilowanie można przeprowadzić zwykle stosowanymi sposobami, na przykład na drodze redukującego alkilowania przy użyciu odpowiedniego hydroksypodstawionego aldehydu lub ketonu lub, jeśli we wzorze ogólnym 1 podstawnik R¹ oznacza pierwszorzędową grupę alkilową, przy użyciu odpowiedniego hydroksypodstawionego kwasu przeprowadza się acylowanie, a następnie uzyskaną pochodną acylowaną poddaje się redukcji (na przykład przy użyciu boroetanu).

Oczywiście, w przypadku występowania w związku o wzorze ogólnym 2 innych wolnych grup aminowych poza grupą aminową w położeniu 1, reakcja zachodzi również z tymi pozostałymi grupami aminowymi i niezbędne staje się oddzielenie pożądanej 1-N-podstawionej pochodnej z mieszaniny produktów. Zabieg ten można przeprowadzić znanymi sposobami, na przykład za pomocą chromatografii jonowymiennej. Jednak korzystnie sto-

4

suje się ochronę pewnych lub najkorzystniej wszystkich grup aminowych, innych niż grupa w położeniu 1, w czasie przeprowadzania reakcji alkilowania, w celu uproszczenia procesu końcowej izolacji produktu. W takim przypadku niezbędne jest wprowadzenie dodatkowego etapu usuwania grup ochraniających.

Tak więc, jednym ze sposobów wytwarzania związków o wzorze ogólnym 1, jest poddanie selektywnie ochraniającej pochodnej aminoglikozydowej o wzorze ogólnym 2, posiadającej wolną grupę aminową w położeniu 1, reakcji z aldehydem lub ketonem korzystnie z ketonem użytym w nadmiarze. Powstającą w początkowym etapie zasadę Schiffa, jednocześnie lub w następnym etapie, poddaje się reakcji i otrzymuje produkt 1-N-podstawiony.

Reakcję można przeprowadzać przy użyciu borowodoru sodowego lub cyjanoborowodoru sodowego jako czynnika redukującego. Czynniki redukujący dodaje się do mieszaniny reakcyjnej zwykle przy wartości pH pomiędzy 4 i 7 i tym samym umożliwia się przeprowadzenie reakcji w jednym etapie. Sposobem alternatywnym mieszaninę aminoglikozydu o wzorze ogólnym 2 i aldehydu lub ketonu poddaje się reakcji katalitycznego wodorowania przeprowadzanej zwykle stosowanymi metodami.

Reakcję przeprowadza się zwykle przy użyciu odczynników rozpuszczonych w rozpuszczalniku obojętnym w warunkach reakcji, na przykład, w wodzie, uwodnionym dioksanie lub uwodnionym metanolu, w temperaturze pomiędzy 0°C i w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika. Okres czasu konieczny do zakończenia reakcji zależy od właściwości odczynników, rozpuszczalnika i stosowanej temperatury. Stwierdzono jednak, że reakcja pomiędzy aminoglikozydem o wzorze ogólnym 2 i hydroksypodstawionym aldehydem lub ketonem (na przykład, glicerynoaldehydem lub dwuhydroksyacetonem), w obecności nadmiaru cyjanoborowodoru sodowego, przy wartości pH pomiędzy 4 i 7, zwykle zachodzi całkowicie w ciągu 2 dni, jeśli przeprowadza się ją w uwodnionym acetonie w temperaturze 60°C.

W drugim etapie usuwa się ewentualnie grupy ochraniające grupę aminową, jeśli występują one w cząsteczce aminoglikozydu. Dobór warunków zapewniających całkowite usunięcie grup ochraniających grupy aminowe zależy od właściwości grupy ochraniającej oraz od otoczonej ochraniającej grupy aminowej. Reakcję usuwania grup ochraniających przeprowadza się w różnych środowiskach zarówno bezwodnych jak i uwodnionych, oraz w szczególności w przypadkach w środowiskach kwaśnych lub zasadowych o różnych stężeniach.

Szczególnie korzystną grupą ochraniającą dla związków o wzorze ogólnym 2 jest grupa formylowa. Grupę tę łatwo usuwa się za pomocą łagodnej hydrolizy zasadowej, na przykład, za pomocą działania rozcieńczonym roztworem wodorotlenku sodowego, w temperaturze pokojowej w ciągu kilku godzin lub przez ogrzewanie z octanem hydrazyny albo w warunkach łagodnej hydrolizy kwaśnej na

przykład, przy użyciu 5 n roztworu kwasu solnego w temperaturze pokojowej w ciągu kilku godzin.

Odpowiednią grupą jest również grupa III rzędu -butyloksykarbonylowa, którą usuwa się w warunkach kwasowych, na przykład za pomocą działania kwasem trójtłorooctowym, w warunkach bezwodnych, w temperaturze pokojowej w czasie krótszym niż 45 minut, jak również grupa benzyloksykarbonylowa, którą usuwa się za pomocą katalitycznej wodorolizy, na przykład za pomocą wodorolizy w wodnym roztworze kwasu octowego, w obecności palladu osadzonego na węglu jako katalizatora, w temperaturze 30°C, pod ciśnieniem 3,4 atmosfery w ciągu kilku godzin, oraz grupa acetylowa, którą usuwa się przez ogrzewanie z 3 n roztworem wodorotlenku sodowego w temperaturze 80–90°C w ciągu kilku godzin. Po usunięciu grup ochraniających produkt wydzielają się zwykle stosowanymi sposobami, na przykład przez odsączenie lub oddestylowanie rozpuszczalnika, po czym surowy produkt oczyszcza się na drodze krystalizacji lub za pomocą chromatografii.

Szczególnie korzystną ochronioną aminoglikozydylową pochodną o wzorze ogólnym 2, stosowaną w sposobie według wynalazku do wytwarzania pochodnych kanamycyny A o wzorze ogólnym 1, w którym R⁷ oznacza atom wodoru, a R² oznacza grupę hydroksylową jest 3, 3'', 6' -trój-N-formylokanamycyna A.

Odpowiednią pochodną 2, 3, 3'' 6'-cztero-N-formylokanamycyna B korzystnie stosuje się do wytwarzania 1-N-podstawionych pochodnych kanamycyny B o wzorze ogólnym 1, w którym R² oznacza grupę aminową, a R³, R⁴, R⁵, R⁶ i R⁷ mają wyżej podane znaczenie. Do tych celów odpowiednie są znane również selektywnie ochronione pochodne kanamycyny A i B na przykład 3'', 6'-N-acetylokanamycyna A, 2', 3'', 6'-trój-N-fluoroacetylokanamycyna B i 3'', 6-dwu-N-trójtłorooacetylokanamycyna A.

Aminoglikozydy i ochronione pochodne aminoglikozydów o wzorze ogólnym 2 są związkami znanymi i uprzednio opisanymi w literaturze. Na przykład, różne N-formylowane na wszystkich grupach aminowych aminoglikozydy, w tym 3, 3'', 6' -trój-N-formylokanamycynę A i 2', 3'', 6' -cztero-N-formylokanamycynę B, opisano w belgijskim opisie patentowym nr 817546.

Podobne pochodne innych aminoglikozydów można wytwarzać sposobem analogicznym. Pochodne, w których ochroniona jest grupa 6'-aminowa są dobrze znane i sposoby ich wytwarzania przedstawiono w brytyjskim opisie patentowym nr 1401220 i opisach patentowych RFN nr 2311524, 2350169 i 2512587.

Hydroksypodstawione aldehydy i ketony odpowiednie do stosowania w sposobie według wynalazku do wytwarzania związków o wzorze ogólnym 1, są związkami łatwo dostępnymi. Na przykład, jeśli stosuje się D-glicerynoaldehyd, to otrzymuje się produkt o wzorze ogólnym 1, w którym R¹ oznacza grupę (S) 2,3-dwuhydroksypropylową. W reakcji można stosować również inne łatwo dostępne aldozy i dezoksyaldzozy, na przykład, D-erytrozę, D-rybozę i 2-dezoksy-D-rybozę.

Podobnie można stosować dwuhydroksyaceton w celu wytwarzania pochodnej 1-N- 1,3-dwuhydroksypropylowej-2) oraz hydroksyaceton (acetol) do wytwarzania odpowiedniej pochodnej 1-hydroksypropylowej-2.

Związki o wzorze ogólnym 1, jak również związki o wzorze ogólnym 2, mogą występować w różnych postaciach konformacyjnych i zakres sposobu według wynalazku nie ogranicza się do którejkolwiek z tych postaci. Ogólnie, każdy z pierścieni występuje w postaci krzesłkowej i każdy z podstawników przyjmuje położenie ekwatorialne w odniesieniu do pierścienia. Ponadto, łańcuch glikozydowy pomiędzy pierścieniem heksopiranozylowym i pierścieniem 2-dezoksystreptaminowym zwykle przyłączony jest w położeniu α w odniesieniu do grupy wzorcowej. Ponadto podstawnik hydroksyalkilowy grupy 1-aminowej posiada jeden lub większą liczbę asymetrycznych atomów węgla, przy czym każdy z nich może wystąpić w konfiguracji R lub S albo w postaci mieszaniny izomerów optycznych.

Badania in vitro przeciwbakteryjnej aktywności związków otrzymywanych sposobem według wynalazku przeprowadza się przez określenie najmniejszego stężenia badanego związku hamującego wzrost drobnoustrojów. Badanie to przeprowadza się w odpowiednim środowisku, w którym wzrastają poszczególne drobnoustroje. W praktyce stosuje się płytki agarowe, z których każda zawiera badany związek w danym stężeniu. Płytki te szczepi się standardową ilością komórek testowanego drobnoustroju, po czym płytki inkubuje się w ciągu 24 godzin w temperaturze 37°C. Następnie płytki ocenia się, obserwując obecność lub brak wzrostu drobnoustroju i oznaczając odpowiednią wartość najmniejszego stężenia hamującego (M.I.C.). Jako testowe drobnoustroje stosuje się następujące szczepy: *Escherichia coli*, *Klasiella pneumoniae*, *Prateus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aurea* i *Streptococcus faecalis*.

Badanie in vivo przeprowadza się podając podskórnie badane związki myszom zakażonym szczepem *Escherichia coli*.

Każdy związek podaje się w seriach dawek grupom myszy i jego aktywność określa się jako dawkę, przy której chroni się przed chorobą 50% myszy zakażonych szczepem *Escherichia coli* w ciągu 72 godzin.

Dane porównawcze związków otrzymanych sposobem według wynalazku ze związkami znanymi o podobnej budowie przedstawiają wyniki trzech oddzielnych badań.

W badaniu A in vitro aktywność przeciwbakteryjną dwóch związków otrzymanych sposobem według wynalazku, porównano z aktywnością kanamycyny A i B przeciwko pięciu opornym szczepom *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa* jest głównym patogenem, przeciwko któremu, w leczeniu chorób ludzi stosuje się zwykle antybiotyki aminoglikozydowe, przy czym coraz poważniejszym problemem jest pojawienie się wśród nich szczepów opornych na stosowanie aminoglikozydów.

Jednak główna zaleta związków otrzymanych sposobem według wynalazku polega na ich mniejszej toksyczności, w porównaniu z dotychczas stosowanymi aminoglikozydami. Objawami toksycznego działania aminoglikozydów, które najczęściej zaobserwowano, są utrata słuchu lub uszkodzenia nerek.

W badaniu B przedstawiono wyniki testu określającego stopień działania związku na tkankę nerkową. Wyniki odnoszą się do jedenastu badanych związków i do sześciu związków otrzymanych sposobem według wynalazku. Należy zaznaczyć, że netylmycyna czyli 1-N-etylosomycyna uważana jest za najlepszy spośród związków ujawnionych.

Amikacyna jest związkiem znanym z opisu patentowego St. Zjedn. Ameryki nr 3 781 268, zaś wszystkie pozostałe związki można uważać za „antybiotyki macierzyste”.

W badaniu C związek z przykładu XIX był badany bezpośrednio w porównaniu z amikacyną, kanamycyną i kanamycyną B. Możliwość uszkodzenia słuchu przy stosowaniu związku z przykładu XIX jest wyraźnie mniejsza w porównaniu z innymi związkami użytymi w badaniach.

A. Najmniejsze stężenie związków hamujące oporne szczepy *Pseudomonas aeruginosa*.

Tablica 1

Numer szczepu	Najmniejsze stężenie związków hamujące wzrost drobnoustrojów mcg/ml			
	Związek z przykładu XVIII	Kanamycyna A	Związek z przykładu XIX	Kanamycyna
48	3,1	50	1,56	12,5
52	3,1	50	1,56	12,5
53	3,1	100	3,1	25
54	6,25	100	3,1	25
56	6,25	50	1,56	12,5

B. Osłona wiążąca tkanką nerkową.

Sposób postępowania jest zasadniczo taki sam jak opisany przez Kunin'a w *Journal of Infections Diseases*, 121, 55 (1970). Nerkę królika homogenizuje się w stężeniu 12,5% w buforowym roztworze fosforanu o wartości pH=8. Roztwór badanego związku o stężeniu 20 mcg/ml przygotowuje się w homogenacie tkanki i jego działanie przeciwbakteryjne w stosunku do *Bacillus subtilis*, mierzy się stosując standardową technikę płytkową i określa aktywność przeciwbakteryjną na podstawie rozmiarów obszaru hamowania. Następnie mierzy się aktywność przeciwbakteryjną badanego związku, w tych samych warunkach, lecz w nieobecności tkanki nerkowej.

Na podstawie otrzymanych dwóch cyfr, można obliczyć procent hamowania aktywności przeciwbakteryjnej, spowodowanego tkanką nerkową. Stwierdzono, że im bardziej toksyczny jest antybiotyk aminoglikozydowy, tym silniej wiąże się on z tkanką nerkową i wskutek tego zwiększa się procent hamowania aktywności przeciwbakteryjnej.

Tablica 2

Badany związek	Procent hamowania działania przeciwbakteryjnego
ribostamycyna	55
streptomycyna	57
kanamycyna A	58
butyrosyna	58
amikacyna	61
kanamycyna B	69
tobramycyna	73
netylmycyna	76
3', 4'-dwudezoksykana-mycyna B	77
gentamycyna	81
neomycyna	81
związek z przykładu I	38
związek z przykładu II	33
związek z przykładu III	32
związek z przykładu IV	34
związek z przykładu V	37
związek z przykładu XI	48
związek z przykładu XVII	52
związek z przykładu XVIII	42
związek z przykładu XIX	46

C. Osłona przeciw uszkodzeniu słuchu u świnek morskich.

Wybiera się grupę składającą się z 4—7 białych świnek morskich w 48 godzin po urodzeniu. W każdym z eksperymentów jedna grupa jest grupą kontrolną, zaś zwierzętom z innych grup wstrzykuje się podskórnie badany związek. Każdego dnia podczas eksperymentu i tuż przed zastrzykiem każde zwierzę jest wystawione na impulsy dźwiękowe o częstotliwości 12 kHz. Odnotowuje się najmniejsze natężenie dźwięków mierzone w decybelach odległości 30,5 cm, przy którym zwierzę wykazuje odruch Preyera (drganie uszu). Bardziej toksyczne związki powodują utratę słuchu, która prowadzi do odpowiedniego zwiększenia dawki aż do progu natężenia odruchu Preyera. Na ogół wynik jest widoczny w ciągu 20 dni. Amikacyna zwiększa znacznie utratę słuchu po 15—17 dniach, w dawkach 150 mg/kg dziennie, podczas gdy związek z przykładu XIX stosowany w takiej samej dawce nie wskazuje na utratę słuchu. Kanamycyna A stosowana w dawce 200 mg/kg dziennie powodowała całkowitą głuchotę, po 14—16 dniach, zaś kanamycyna B stosowana w dawce 100 mg/kg dziennie powodowała całkowitą głuchotę po 14—15 dniach.

Wykres na rysunku przedstawia bezpośrednie porównanie amikacyny ze związkiem z przykładu XIX. Związek z przykładu XIX jest oznaczony numerem kodowym UK-31 214.

W celu stosowania u ludzi, przeciwbakteryjne związki otrzymane sposobem według wynalazku można podawać w postaci czystej lub w miesza-

nie z farmaceutycznymi nośnikami dobranymi w zależności od drogi podawania i zwykle stosowanej praktyki farmaceutycznej. Na przykład, związki te można podawać doustnie w postaci tabletek zawierających takie dodatki jak skrobia i laktoza w postaci kapsułek zawierających czysty związek albo związek w mieszaninie z dodatkami w postaci płynów albo zawieszin zawierających poza tym czynniki smakowe i barwiące. Związki te można również stosować w postaci iniekcji pozajelitowych, na przykład dożylnie, domięśniowo lub podskórnie.

W celu podawania pozajelitowego związku otrzymane sposobem według wynalazku, najlepiej stosuje się w postaci jałowego roztworu wodnego, który ponadto może zawierać inne rozpuszczone składniki, na przykład sole lub glikozę, które powodują, że roztwór jest izotoniczny.

Przy podawaniu ludziom należy uwzględnić to, aby wielkość dziennej dawki przeciwbakteryjnego związku otrzymanego sposobem wynalazku była porównywalna z dawkami aminoglikozydowych czynników przeciwbakteryjnych stosowanych obecnie na przykład 0,1-50 mg/kg (w dawkach podzielonych) przy podawaniu pozajelitowym lub 10-100 mg/kg (w dawkach podzielonych) przy podawaniu doustnym. Tak więc tabletki lub kapsułki, które powinny zawierać 0,1-1 g związku aktywnego podaje się doustnie cztery razy dziennie, podczas gdy pozajelitowo podaje się dziennie 10-500 mg związku aktywnego. Wielkość dawki najbardziej odpowiedniej dla danego pacjenta określa się biorąc pod uwagę wiek, wagę i wrażliwość pacjenta. Podane powyżej dawki stanowią przykłady średnich wielkości. Oczywiście, jeśli zachodzi potrzeba, to w indywidualnych przypadkach stosuje wyższe lub niższe dawki.

Następujące przykłady przedstawiają sposoby wytwarzania związków sposobem według wynalazku. Wartości temperatury podane w stopniach Celsjusza. Nazwy „Amberlite” i „Sephadex” oznaczają zarejestrowane nazwy handlowe. Chromatografię cienkowarstwową przeprowadza się na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym i podanej mieszaniny rozpuszczalników. Plamy poddaje się oględzinom po wysuszeniu płytek spryskanych 5% roztworem podchlorynu III rzędu w cykloheksanie, wysuszeniu w temperaturze 100°C w ciągu 10 minut w przedmuchiwanej piecu, oziębieniu i spryskaniu roztworem skrobi i roztworem jodku potasowego.

Przykład I. Wytwarzanie 1-N-[(S)-2,5-dwuhydroksypropylo]-kanamycyny A.

100 mg (0,18 milimola) 3,3',6'-trój-N-formylokanamycyny A, 31,6 mg (0,35 milimola) D-glicerynoaldehydu i 33 mg (0,52 milimola) cyjanoborowodoru sodowego rozpuszcza się w mieszaninie 10 ml metanolu i 2 ml wody, po czym wartość pH roztworu doprowadza się do 6,05 n roztworem kwasu solnego. Roztwór utrzymuje się w temperaturze pokojowej w ciągu 40 godzin. Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem oddestylowuje się rozpuszczalnik, pozostałość poddaje działaniu 1 n roztworu wodorotlenku sodowego i pozostawia w temperaturze pokojowej w ciągu dalszych 20 godzin. Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem od-

destylowuje się rozpuszczalnik i pozostałość chromatografuje na kolumnie wypełnionej żywicą jonowymienną Amberlite CG-50 (postać NH_4^+), eluując roztworem amoniaku o wzrastającym stężeniu od 0 do 0,1 n i otrzymuje 66 mg (67%) 1-N-[(S)-2,3-dwuhydroksypropylo] kanamycyny A. Wartość R_f otrzymanego związku w 1 m wodnym roztworze chlorku sodowego wynosi 0,27 (w tych warunkach wartość R_f kanamycyny A wynosi 0,21). Wartość R_f w mieszaninie metanolu i 0,880 roztworu amoniaku w stosunku 1:2 wynosi 0,70 dla kanamycyny A wynosi 0,70.

Analiza elementarna: dla wzoru $\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_{13} \cdot 2\text{H}_2\text{CO}_3$ obliczono: C=40,5%, H=6,8%, N=8,2% znaleziono: C=40,1%, H=7,0%, N=8,3%.

Próbkę otrzymanego produktu przekształca się w lońną pochodną cztero-N-acetylo-dziewięcio-O-trójmetylosililową przez działanie bezwodnikiem octowym w metanolu, w temperaturze pokojowej w ciągu 24 godzin, po czym poddaje się reakcji z mieszaniną sześciometylodwusilazenu i trójmetylochlorosilanu w stosunku 2:1 w temperaturze pokojowej w ciągu 24 godzin. Stwierdzono, że wartość m/e wynosi 1285. Obliczono, że dla wzoru $\text{C}_{56}\text{H}_{122}\text{N}_4\text{O}_{17}\text{Si}_6$ pomniejszonego o jedną grupę $\text{C}_3\text{H}_9\text{OSi}$ uzyskuje się ciężar cząsteczkowy 1285.

Przykład II. Wytwarzanie 1-N-[(S)-2,3,4-trójhdroksybutylo] kanamycyny A.

Roztwór 100 mg (0,18 milimola) 3,3',6'-trój-N-formylokanamycyny A, 107 mg (0,90 milimola) D-erytrozy i 66 mg (1,04 milimola) cyjanoborowodoru sodowego w mieszaninie 10 ml metanolu i 2 ml wody przy wartości pH=6,0 ogrzewa się w ciągu 50 godzin w temperaturze 60°C. Następnie rozpuszczalnik oddestylowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostałość rozpuszcza w 12 ml 10% wodzianu hydrozyny, pH mieszaniny doprowadza do wartości 6,0 lodowatym kwasem octowym i otrzymany roztwór ogrzewa się w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną w ciągu 6 godzin. Rozpuszczalnik oddestylowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostałość chromatografuje na żywicy jonowymiennej Amberlite CG-50 sposobem podanym w przykładzie I. Następnie największą frakcję zawierającą produkt chromatografuje się na Sephadex CM25 (postać NH_4^+) eluując kolumnę roztworem amoniaku o zmiennym stężeniu jak podano powyżej i otrzymuje się 37 mg (36%) 1-N-[(S)-2,3,4-trójhdroksybutylo] kanamycyny A. Związek ten w mieszaninie metanolu i 0,880 roztworu amoniaku w stosunku 2:1 wykazuje wartość $R_f=0,29$ (dla kanamycyny A wartość $R_f=0,32$).

Analiza elementarna: dla wzoru $\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_{14} \cdot 2\text{H}_2\text{CO}_3$ obliczono: C=40,5%, H=6,8%, N=7,9% znaleziono: C=41,6%, H=6,6%, N=7,9%.

Przykład III. Wytwarzanie 1-N-[(S) (S) (R)-2,3,4,5-czterohydroksypentylo] kanamycyny A

Związek tytułowy wytwarza się sposobem opisanym w przykładzie II, stosując jako substrat D-rybozę. Otrzymuje się produkt, który w mieszaninie metanolu i 0,880 roztworu amoniaku w stosunku 1:2 wykazuje wartość $R_f=0,68$ (kanamycyna A wykazuje wartość $R_f=0,70$).

11

Przykład IV. Wytwarzanie 1-N-[(S) (R)-3, 4, 5-trójhdroksypentylol] kanamycyna A.

Związek tytułowy wytwarza się sposobem opisanym w przykładzie II stosując jako substrat 2-dezoksy-D-rybozę. Otrzymuje się produkt, który w mieszaninie metanolu i 0,880 roztworu amoniaku w stosunku 1 : 2 wykazuje wartość $R_f=0,68$ (wartość R_f dla kanamycyny A wynosi 0,70).

Przykład V. Wytwarzanie 1-N-[(S) (R) (R)-2, 3, 4, 5, 6-pięciohydroksyheksylol] kanamycyny A.

Związek tytułowy wytwarza się sposobem opisanym w przykładzie II stosując jako substrat D-glikozę. Otrzymany związek w mieszaninie metanolu i 0,880 roztworu amoniaku w stosunku 1 : 2 wykazuje wartość $R_f=0,55$ (wartość R_f dla kanamycyny A wynosi 0,71).

Przykład VI. Wytwarzanie 1-N-[(R) (S) (R)-2, 3, 4, 5-czterohydroksypentylol] kanamycyny A.

Związek tytułowy wytwarza się sposobem opisanym w przykładzie II stosując jako substrat D-arabinozę. Otrzymany związek w mieszaninie metanolu i 0,880 roztworu amoniaku w stosunku 1 : 1 wykazuje wartość $R_f=0,34$ (dla kanamycyny A wartość R_f wynosi 0,49).

Przykład VII. Wytwarzanie 1-N-[(S) (R) (R)-2, 3, 4, 5-cztero-hydroksypentylol] kanamycyny A.

Roztwór 100 mg (0,18 milimola) 3, 3'', 6'-trój-N-formylokanamycyny A, 79 mg (0,53 milimola) D-ksylozy i 44 mg (0,68 milimola) cyjanoborowodoru sodowego w 10 ml wody przy wartości $pH=4,6$ ogrzewa się w temperaturze $90^{\circ}C$ w ciągu 3,5 godziny. Z roztworu pod zmniejszonym ciśnieniem oddestylowuje się rozpuszczalnik i pozostałość rozpuszcza się w 10 ml 5 n roztworu kwasu solnego i roztwór miesza się w temperaturze $35^{\circ}C$ w ciągu 16 godzin. Następnie rozpuszczalnik oddestylowuje się i pozostałość chromatografuje się na kolumnie wypełnionej żywicą jonowymienną Amberlite CG-50 (postać NH_4^+) i eluuje roztworem amoniaku o stężeniu wzrastającym od 0 do 0,2 n. Otrzymuje się 56 mg (51%) 1-N-[(S) (R) (R)-2, 3, 4, 5-czterohydroksypentylol] kanamycyny A. Związek ten w mieszaninie metanolu i 0,880 roztworu amoniaku w stosunku 1 : 2 wykazuje wartość $R_f=0,58$ (kanamycyna A wykazuje wartość $R_f=0,66$).

Przykład VIII. Wytwarzanie 1-N-[(R) (S) (S)-2, 3, 4, 5-czterohydroksypentylol] kanamycyny A.

Związek tytułowy wytwarza się sposobem opisanym w przykładzie VII stosując jako substrat L-ksylozę. Produkt w mieszaninie metanolu i 0,880 roztworu amoniaku w stosunku 1 : 2 wykazuje wartość $R_f=0,34$ (kanamycyna A wykazuje wartość $R_f=0,50$).

Przykład IX. Wytwarzanie 1-N-[(R) (R) (R)-2, 3, 4, 5-czterohydroksypentylol] kanamycyny A.

Związek tytułowy wytwarza się sposobem opisanym w przykładzie VII stosując jako substrat L-rybozę. Produkt w mieszaninie metanolu i 0,880 roztworu amoniaku w stosunku 1 : 1 wykazuje wartość $R_f=0,38$ (dla kanamycyny A wartość R_f wynosi 0,51). Wartość m/e dla $N+1$ wynosi 619.

Przykład X. Wytwarzanie 1-N-[(R) (R) (R)-2, 3, 4, 5-czterohydroksypentylol] kanamycyny A.

12

Związek tytułowy wytwarza się sposobem opisanym w przykładzie VII stosując jako substrat D-ksylozę. Produkt w mieszaninie metanolu i 0,880 roztworu amoniaku w stosunku 1 : 1 wykazuje wartość $R_f=0,37$ (dla kanamycyny A wartość R_f wynosi 0,48).

Przykład XI. Wytwarzanie 1-N-[(S)-2,3-dwuhydroksypropylol]-kanamycyny B.

Roztwór 45 mg (0,5 milimola) D-glicerynaldehydu w 1 ml metanolu dodaje się do roztworu 100 mg (0,17 milimola) 2', 3, 3'', 6'-cztero-N-formylokanamycyny B w 5 ml metanolu i 1 ml wody. Następnie w czasie mieszania dodaje się 20 mg (0,3 milimola) cyjanoborowodoru sodowego i wartość pH mieszaniny doprowadza do 6,0 5n roztworem kwasu solnego. Całość miesza się w temperaturze pokojowej w ciągu nocy. Następnie z roztworu całkowicie oddestylowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem rozpuszczalnik, zaś pozostałość poddaje działaniu 5n roztworu kwasu solnego i roztwór pozostawia w ciągu nocy. Następnie wartość pH roztworu doprowadza się do 6,0 roztworem wodorotlenku sodowego i roztwór ten chromatografuje na kolumnie wypełnionej żywicą Amberlite CG-50, sposobem opisanym w przykładzie I. Odpowiednie frakcje zbiera się i poddaje liofilizacji otrzymując 53 mg (56%) 1-N-[(S)-2,3-dwuhydroksypropylol] kanamycyny B. Wartość R_f w 3 m wodnym roztworze chlorku sodowego wynosi 0,51 (dla kanamycyny B wartość $R_f=0,42$), w mieszaninie metanolu i 0,880 roztworu amoniaku w stosunku 1 : 1 wartość $R_f=0,54$ (dla kanamycyny B wartość $R_f=0,58$). W widmie spektroskopii masowej obserwuje się silny pik $M+1$ przy m/e wynoszącym 558. Dla wzoru $C_{21}H_{43}N_5O_{12}$, $M+1=558$.

Przykład XII. Wytwarzanie 1-N-[(S) (R)-2, 3, 4-trójhdroksybutylol] kanamycyny B.

Związek tytułowy wytwarza się sposobem opisanym w przykładzie XI, stosując jako substrat D-erytrozę. Produkt w 3 m roztworze chlorku sodowego wykazuje wartość $R_f=0,60$ (dla kanamycyny B wartość $R_f=0,45$).

Przykład XIII. Wytwarzanie 1-N-[(S) (S) (R)-2, 3, 4, 5-czterohydroksypentylol] kanamycyny B.

Związek tytułowy wytwarza się sposobem opisanym w przykładzie XI, stosując jako substrat D-rybozę. Produkt w 2 m roztworze chlorku sodowego wykazuje wartość $R_f=0,3$ (dla kanamycyny B wartość $R_f=0,2$).

Przykład XIV. Wytwarzanie 1-N-[(S) (R)-3, 4, 5-trójhdroksypentylol] kanamycyny B.

Związek tytułowy wytwarza się sposobem opisanym w przykładzie XI, stosując jako substrat 2-dezoksy-D-rybozę. Produkt w 2 m roztworze chlorku sodowego wykazuje wartość $R_f=0,3$ (dla kanamycyny B wartość R_f wynosi 0,2).

Przykład XV. Wytwarzanie 1-N-[(S) (R) (R)-2, 3, 4, 5-pięciohydroksyheksylol] kanamycyny B.

Związek tytułowy wytwarza się sposobem opisanym w przykładzie XI stosując jako substrat D-glikozę. Produkt w mieszaninie metanolu i 0,880 roztworu amoniaku w stosunku 1 : 1 wykazuje wartość $R_f=0,25$ (dla kanamycyny B wartość $R_f=0,42$).

Przykład XVI. Wytwarzanie 1-N-(2,5-dwu-hydroksy-2-hydroksymetylopropylo) kanamycyny B.

Związek tytułowy wytwarza się sposobem opisanym w przykładzie XI stosując jako substrat DL-2-hydroksymetylo-2,3-O-izopropylidenoglicerynoaldehyd. Otrzymuje się produkt, którego R_f w 3 m roztworze chlorku sodowego wynosi 0,55 (dla kanamycyny B wartość $R_f=0,42$). Stwierdzono, że wartość m/e dla $M+1$ wynosi 588. Dla wzoru $C_{22}H_{45}N_5O_{13}$ wartość $M+1$ wynosi 588.

Przykład XVII. Wytwarzanie 1-N-[(R)-2,3-dwuhydroksypropylo] kanamycyny B.

Związek tytułowy wytwarza się sposobem opisanym w przykładzie XI stosując jako substrat glicerynoaldehyd. Otrzymuje się produkt, który za pomocą chromatografii cienkowarstwowej identyfikuje się jako produkt uzyskany sposobem opisanym w przykładzie XI.

Przykład XVIII. Wytwarzanie 1-N-(1,3-dwuhydroksypropylo) kanamycyny A.

200 mg (0,36 milimola) 3,3'', 6'-trój-N-formylokanamycyny A, 95 mg (1,05 milimola) dwuhydroksyacetonu i 88 mg (1,40 milimola) cyjanoborowodoru sodowego rozpuszcza się w mieszaninie 20 ml metanolu i 4 ml wody, po czym roztwór doprowadza się do wartości pH = 6,6 5n roztworem kwasu solnego. Otrzymany roztwór ogrzewa się w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną w ciągu 22 godzin. Z kolei dodaje się następną porcję 95 mg dwuhydroksyacetonu i 88 mg cyjanoborowodoru sodowego i wartość pH doprowadza do 5,5. Ogrzewanie w temperaturze wrzenia kontynuuje się w ciągu dalszych 24 godzin, po czym rozpuszczalnik oddestylowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem, zaś pozostałość poddaje działaniu 20 ml mieszaniny 10% hydrozyny i kwasu octowego o wartości pH=6,8 i ogrzewa w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną w ciągu 6 godzin. Z roztworu pod zmniejszonym ciśnieniem oddestylowuje się rozpuszczalnik i pozostałość chromatografuje na kolumnie wypełnionej żywicą jonowymienną Amberlite CG-50 (postać NH_4^+) eluując roztworem amoniaku w wzrastającym stężeniu od 0 do 0,1 n. Frakcje zawierające produkt (co stwierdza się za pomocą chromatografii cienkowarstwowej) łączy się, oddestylowuje się z nich rozpuszczalnik, po czym pozostałość ponownie poddaje się chromatografii kolumnowej na Sephadex CM-25 (postać NH_4^+) eluując sposobem opisanym poprzednio i otrzymuje się 0,11 g (57%) 1-N-(1,3-dwuhydroksy-2-propylo) kanamycyny A. Produkt ten w mieszaninie metanolu i 0,880 roztworu amoniaku w stosunku 2 : 1 wykazuje wartość $R_f = 0,40$ (dla kanamycyny wartość R_f wynosi 0,30).

Analiza elementarna: dla wzoru $C_{21}H_{42}N_4O_{13} \cdot 2 H_2CO_3$:
obliczono: C = 40,5%, H = 6,8%, N = 8,2%,
znaleziono: C = 40,6%, H = 6,5%, N = 8,4%.

Przykład XIX. Wytwarzanie 1-N-(1,3-dwuhydroksy-2-propylo) kanamycyny B.

88 mg (1,40 milimoli) cyjanoborowodoru sodowego dodaje się do roztworu 200 mg (0,33 milimola) 2',3,3'',6'-cztero-N-formylokanamycyny B i 95 mg (1,05 milimola) dwuhydroksyacetonu w 12 ml me-

tanolu i 3 ml wody. Wartość pH roztworu doprowadza się do 4,5 2n roztworem kwasu solnego i całość ogrzewa w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną w ciągu 20 godzin. Następnie pod zmniejszonym ciśnieniem oddestylowuje się rozpuszczalnik i pozostałość rozpuszcza w 10 ml wody. Do roztworu dodaje się 2 ml 60% hydratu hydrazyny i pH roztworu doprowadza do wartości 6 2 ml lodowatego kwasu solnego, po czym całość ogrzewa w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną w ciągu 6 godzin. Z mieszaniny oddestylowuje się rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem i otrzymuje produkt w postaci gumy. Produkt ten rozpuszcza się w 8 ml wody i pH roztworu doprowadza do wartości 5,5 0,2 m roztworem kwasu solnego, po czym chromatografuje na kolumnie wypełnionej żywicą jonowymienną Amberlite CG-50 (postać NH_4^+) eluując na początku wodą, zaś następnie roztworem amoniaku o wzrastającym stężeniu do 0,25 m. Frakcje zawierające produkt (co stwierdza się za pomocą chromatografii cienkowarstwowej) łączy się i oddestylowuje z nich rozpuszczalnik, po czym pozostałość ponownie poddaje chromatografii na kolumnie wypełnionej Sephadex CM-25 (postać NH_4^+) eluując sposobem opisanym powyżej. Otrzymuje się 59 mg (32%) 1-N-(1,3-dwuhydroksy-2-propylo) kanamycyny B. Związek ten w mieszaninie metanolu i 0,880 roztworu amoniaku w stosunku 1 : 1 wykazuje wartość $R_f = 0,55$ (dla kanamycyny B wartość $R_f = 0,47$), oraz w 2 m roztworze chlorku sodowego wartość $R_f = 0,37$ (dla kanamycyny B wartość $R_f = 0,26$).

Analiza elementarna: dla wzoru $C_{21}H_{43}N_5O_{12} \cdot 3 H_2CO_3 \cdot H_2O$
obliczono: C = 37,8%, H = 6,8%, N = 9,2%,
znaleziono: C = 37,6%, H = 6,3%, N = 9,2%.

Przykład XX. Wytwarzanie 1-N-(1-hydroksy-2-propylo) kanamycyny B.

200 mg (0,36 milimola) 2',3,3'',6'-cztero-N-formylokanamycyny B, 78 mg (1,05 milimola) hydroksyacetonu i 88 mg (1,40 milimola) cyjanoborowodoru sodowego rozpuszcza się w mieszaninie 20 ml metanolu i 4 ml wody, po czym pH roztworu doprowadza do wartości 6,0 5n roztworem kwasu solnego. Otrzymany roztwór ogrzewa się w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną w ciągu 22 godzin. Następnie dodaje się 23 mg hydroksyacetonu i 30 mg cyjanoborowodoru sodowego, po czym ogrzewanie w temperaturze wrzenia kontynuuje się w ciągu 24 godzin. Z kolei oddestylowuje się rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostałość poddaje działaniu 10% wodnego roztworu wodzianu hydrolizy i pH roztworu doprowadza do wartości 6 20 ml lodowatego kwasu octowego i całość ogrzewa w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną w ciągu 6 godzin. Z mieszaniny reakcyjnej oddestylowuje się rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostałość chromatografuje na kolumnie wypełnionej żywicą jonowymienną Amberlite CG-50 (postać NH_4^+), eluując roztworem amoniaku o stężeniu wzrastającym od 0 do 0,1 n. Frakcje zawierające produkt (co stwierdza się za pomocą chromatografii cienkowarstwowej) łączy się, oddestylowuje z nich rozpuszczalnik i otrzymuje 0,11 g (50%) 1-N-(1-hydro-

ksy-2-propylo) ksanamycyny B. Związek ten w 3 m roztworze chlorku sodowego wykazuje wartość $R_f = 0,55$ (kanamycyna B wykazuje wartość $R_f = 0,47$).

Analiza elementarna: dla wzoru $C_{21}H_{43}N_5O_{11} \cdot 2\frac{1}{2}H_2CO_3$.

Obliczono: C = 40,5%, H = 6,9%, N = 10,0%.

Znaleziono: C = 39,6%, H = 6,8%, N = 10,5%.

Wartość m/e ($M+1$) wynosi 542. Dla wzoru $C_{21}H_{43}N_5O_{11}$ obliczono $M+1=542$.

Przykład XXI. Wytwarzanie 1-N-(1-hydroksy-2-propylo) kanamycyny A.

Związek tytułowy wytwarza się sposobem opisanym w przykładzie XX, stosując 3,3",6'-trój-N-formylokanamycynę A. Otrzymany związek wykazuje wartość $R_f = 0,30$ w mieszaninie metanolu, chloroformu i 8% roztworu wodorotlenku amonowego w stosunku 4:1:2 (wartość R_f dla kanamycyny wynosi 0,20).

Przykład XXII. Wytwarzanie 1-N-(1-hydroksy-2-propylo) tobramycyny.

2,0 g (3,5 milimola) 6'-N-IIIrz.-butyloksykarbonylotobramycyny, 0,78 g (10,6 milimola) hydroksyacetonu i 0,89 g (14,0 milimola) cyjanoborowodoru sodowego rozpuszcza się w mieszaninie 150 ml metanolu i 30 ml wody, po czym pH roztworu doprowadza do wartości 6,0 5n roztworu kwasu solnego. Całość ogrzewa się w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną w ciągu 72 godzin. Rozpuszczalnik oddestylowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostałość poddaje działaniu 20 ml kwasu trójfluorooctowego mieszając w ciągu 45 minut w temperaturze pokojowej. Następnie rozpuszczalnik ponownie oddestylowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszcza w niewielkiej ilości wody, pH roztworu doprowadza do wartości 6,0 3n roztworem wodorotlenku amonowego i roztwór chromatografuje na kolumnie wypełnionej żywicą jonowymienną Amberlite CG-50 (postać NH_4^+) eluując roztworem amoniaku o wzrastającym stężeniu. Frakcje zawierające produkt łączy się, oddestylowuje rozpuszczalnik i pozostałość chromatografuje na Sephadex CM-25 (postać NH_4^+) eluując sposobem opisanym poprzednio i otrzymuje 8 mg (0,4%/ 1,N,) 1-hydroksy-2-propylo (toqramycyny). Wartość R_f otrzy-

manego związku w 3 m roztworze chlorku sodowego wynosi 0,68 (dla kanamycyny wartość $R_f = 0,60$). Wartość m/e dla $M+1$ wynosi 526. Dla wzoru $C_{21}H_{43}N_5O_{10}$ $M+1 = 526$.

5 Przykład XXIII. Wytwarzanie 1-N-[(S)-2,3-dwuhydroksypropylo] tobramycyny.

Związek tytułowy wytwarza się sposobem opisanym w przykładzie XXII przy użyciu D-glicerynoaldehydu zamiast hydroksyacetonu. Związek otrzymany w 3 m roztworze chlorku sodowego wykazuje wartość $R_f = 0,55$ (dla tobramycyny wartość $R_f = 0,45$), zaś w mieszaninie metanolu i 0,880 roztworu wodorotlenku amonowego w stosunku 2:1 wynosi 0,37 (dla tobramycyny wartość $R_f = 0,35$).

15 Przykład XXIV. Wytwarzanie 1-N-(1,3-dwuhydroksy-2-propylo) kanamycyny A.

500 mg (0,80 milimola) 6',3"-dnu-N-acetylokanamycyny A, 237 mg (2,64 milimola) 1,3-dwuhydroksyacetonu i 181 mg (2,64 milimola) cyjanoborowodoru sodowego rozpuszcza się w 45 ml metanolu i 5 ml wody, po czym wartość pH doprowadza do 6,0 2n roztworem kwasu solnego. Następnie roztwór pozostawia się w ciągu 3 dni w temperaturze pokojowej. Metodą chromatografii cienkowarstwowej stosując mieszaninę metanolu, chloroformu i n roztworu wodorotlenku amonowego w stosunku 4:2:1 stwierdza się obecność dwóch plam o wartościach R_f wynoszących 0,17 i 0,22. Z roztworu oddestylowuje się rozpuszczalnik i produkty rozdziela za pomocą chromatografii kolumnowej na Sephadex CM-25 (postać NH_4^+) eluując roztworem amoniaku o wzrastającym stężeniu. Składnik o wartości $R_f = 0,17$, który eluuje się jako drugi, ogrzewa się w 3n roztworem wodorotlenku sodowego w temperaturze 89–90°C w ciągu 4 godzin. Po reakcji roztwór zubożnia się i oczyszcza za pomocą chromatografii kolumnowej na żywicy jonowymiennej Amberlite CG-50 (postać NH_4^+) eluując sposobem opisanym poprzednio i otrzymuje 1-N-(1,3-dwuhydroksy-2-propylo)kanamycynę A, identyczną z produktem otrzymanym sposobem w przykładzie XVIII.

45 Wyniki badania in vitro aktywności przeciwbakteryjnej związków, które otrzymuje się sposobami opisanymi w przykładach, przeprowadzonego sposobami poprzednio opisanymi, zamieszczone są w tablicy 3.

Tablica 3

Przeciwbakteryjna aktywność związków w badaniach in vitro.

Przykład nr	Najmniejsze stężenie związków hamujących wzrost drobnoustrojów $\mu\text{g/ml}$				
	E. Coli	Klebsiella pneumoniae	Proteus mirabilis	Pseudomonas aeruginosa	Staphylococcus aureus
1	2	3	4	5	6
I	6,2	6,2	25	6,2	6,2
II	12,5	6,2	12,5	6,2	6,2
III	12,5	12,5	12,5	6,2	6,2
IV	12,5	12,5	25	12,5	12,5
V	12,5	12,5	25	12,5	12,5
VI	25	25	50	25	25

1	2	3	4	5	6
VII	12,5	12,5	25	12,5	6,2
VIII	50	25	100	25	25
IX	25	12,5	25	12,5	25
X	25	25	100	25	25
XI	6,2	3,1	6,2	3,1	1,6
XII	3,1	3,1	6,2	1,6	1,6
XIII	3,1	3,1	12,5	3,1	1,6
XIV	3,1	3,1	6,2	3,1	1,6
XV	6,2	6,2	100	6,2	6,2
XVI	6,2	3,1	12,5	3,1	3,1
XVII	6,2	6,2	12,5	6,2	3,1
XVIII	6,2	6,2	25	3,1	6,2
XIX	3,1	1,6	6,2	1,6	1,6
XX	3,1	3,1	25	3,1	1,6
XXI	3,1	3,1	12,5	6,2	3,1
XXII	3,1	6,5	12,5	3,1	0,8
XXIII	6,2	3,1	6,2	3,1	1,6

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania aminoglikozydów 2-dezoksystreptaminowych o wzorze ogólnym 1, w którym R¹ oznacza pierwszorzędową grupę alkilową o 3—7 atomach węgla, z których przynajmniej dwa, inne niż atom węgla połączony z grupą aminową podstawione są grupą hydroksylową, R² oznacza grupę aminową lub hydroksylową, każdy z podstawników R³ oznacza grupę hydroksylową, R⁴ i R⁵ oznaczają atomy wodoru, R⁶ oznacza grupę 3-amino-3-dezoksy- α -D-glikopiranozyłową, a R⁷ oznacza atom wodoru lub niższą grupę alkilową zawierającą do 4 atomów węgla oraz dopuszczalnych do stosowania w farmacji addycyjnych soli tych związków z kwasami, **znamienny tym**, że związek o wzorze ogólnym 2, w którym R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ i R⁷ mają wyżej podane znaczenie, oraz w którym jedna lub większa liczba wolnych grup aminowych, innych niż grupa aminowa w położeniu 1, może być ewentualnie ochroniona, poddaje się redukcyjnemu alkilowaniu, usuwa się ewentualnie występujące grupy ochraniające, po czym izoluje związek o wzorze ogólnym 1 i w razie potrzeby, przeprowadza się otrzymany związek w dopuszczalną do stosowania w farmacji addycyjną sól z kwasem.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się związek o wzorze ogólnym 2, w którym jedna lub większa liczba wolnych grup aminowych innych niż grupa aminowa w położeniu 1, występuje w postaci ochronionej grupą formylową.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się związek o wzorze ogólnym 2, w którym jedna lub większa liczba wolnych grup aminowych innych niż grupa aminowa w położeniu 1, występuje w postaci ochronionej grupą acetylową.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się związek o wzorze ogólnym 2, w którym jedna lub większa liczba wolnych grup aminowych innych niż grupa aminowa w położeniu 1, występuje w postaci ochronionej grupą trójfluoroacetylową.

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się związek o wzorze ogólnym 2, w którym jedna lub większa liczba wolnych grup aminowych innych niż grupa aminowa w położeniu 1, występuje w postaci ochronionej grupą III-rzęd.-butyloksykarbonylową.

6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że redukcyjne alkilowanie przeprowadza się przy użyciu aldehydu.

7. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że redukcję prowadzi się przy użyciu borowodoru sodowego lub cyjanoborowodoru sodowego.

8. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że redukcję prowadzi się na drodze katalitycznego wodorowania.

9. Sposób według zastrz. 6 albo 7, **znamienny tym**, że redukcyjne alkilowanie przeprowadza się przy użyciu D-glicerynoaldehydu.

10. Sposób wytwarzania aminoglikozydów 2-dezoksystreptaminowych o wzorze ogólnym 1, w którym R¹ oznacza drugorzędową grupę alkilową o 3—7 atomach węgla, z których przynajmniej dwa inne niż atom węgla połączony z grupą aminową podstawione są grupą hydroksylową, R² oznacza grupę aminową lub hydroksylową, R³ oznacza grupę hydroksylową R⁴ i R⁵ oznaczają atomy wodoru, a R⁶ oznacza grupę 3-amino-3-dezoksy-L-D-glikopiranozyłową, a R⁷ oznacza atom wodoru lub niższą grupę alkilową zawierającą do 4 atomów węgla oraz dopuszczalnych do stosowania w farmacji addycyjnych soli tych związków z kwasami, **znamienny tym**, że związek o wzorze ogólnym 2, w którym R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ i R⁷ mają wyżej podane znaczenie, oraz w którym jedna lub większa liczba wolnych grup ami-

nowych, innych niż grupa aminowa w położeniu 1, może być ewentualnie ochroniona, poddaje się redukcijnemu alkiłowaniu, usuwa się ewentualnie występujące grupy ochraniające, po czym izoluje związek o wzorze ogólnym 1 i w razie potrzeby, przeprowadza się otrzymany związek w dopuszczalną do stosowania w farmacji addycyjną sól z kwasem.

11. Sposób według zastrz. 10, **znamienny tym**, że stosuje się związek o wzorze ogólnym 2, w którym jedna lub większa liczba wolnych grup aminowych innych niż grupa aminowa w położeniu 1, występuje w postaci ochronionej grupą formylową.

12. Sposób według zastrz. 10, **znamienny tym**, że stosuje się związek o wzorze ogólnym 2, w którym jedna lub większa liczba wolnych grup aminowych innych niż grupa aminowa w położeniu 1 występuje w postaci ochronionej grupą acetylową.

13. Sposób według zastrz. 10, **znamienny tym**, że stosuje się związek o wzorze ogólnym 2, w którym jedna lub większa liczba wolnych grup aminowych innych niż grupa aminowa w położeniu 1, występuje w postaci ochronionej grupą trójfluoroacetylową.

14. Sposób według zastrz. 10, **znamienny tym**, że stosuje się związek o wzorze ogólnym 2, w którym jedna lub większa liczba wolnych grup aminowych innych niż grupa aminowa w położeniu 1, występuje w postaci ochronionej grupą III rzęd.-butyloksykarbonylową.

15. Sposób według zastrz. 10, **znamienny tym**, że redukcyjne alkiłowanie przeprowadza się przy użyciu ketonu podstawionego grupą hydroksylową.

16. Sposób według zastrz. 15, **znamienny tym**, że redukcję prowadzi się przy użyciu borowodoru sodowego lub cyjanoborowodoru sodowego.

17. Sposób według zastrz. 15, **znamienny tym**, że redukcję prowadzi się na drodze katalitycznego wodorowania.

18. Sposób według zastrz. 15, **znamienny tym**, że redukcyjne alkiłowanie prowadzi się przy użyciu dwuhydroksyacetonu.

19. Sposób wytwarzania aminoglikozydów 2-dezoksystreptaminowych o wzorze ogólnym 1, w którym R^1 oznacza drugorzędową grupę alkiłową o 3—7 atomach węgla, z których jeden atom inny niż atom połączony z grupą aminową podstawiony jest grupą hydroksylową, R^2 oznacza grupę aminową lub hydroksylową, R^3 oznacza grupę hydroksylową, R^4 i R^5 oznaczają atomy wodoru, R^6 oznacza grupę 3-amino-3-dezoksy-L-D-glikopiranozylową, a R^7 oznacza atom wodoru lub inną grupę alkiłową zawierającą do 4 atomów węgla oraz dopuszczalnych do stosowania w farmacji addycyjnych soli tych związków z kwasami, **znamienny tym**, że związek o wzorze ogólnym 2, w którym R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 i R^7 mają wyżej podane znaczenie, oraz w którym jedna lub większa liczba wolnych grup aminowych, innych niż grupa aminowa w położeniu 1, może być ewentualnie ochroniona, podaje się redukcijnemu alkiłowaniu, usuwa się ewentualnie występujące grupy ochraniające, po czym izoluje związek o wzo-

rze ogólnym 1, i w razie potrzeby, przeprowadza się otrzymany związek w dopuszczalną do stosowania w farmacji addycyjną sól z kwasem.

20. Sposób według zastrz. 14, **znamienny tym**, że stosuje się związek o wzorze ogólnym 2, w którym jedna lub większa liczba wolnych grup aminowych innych niż grupa aminowa w położeniu 1, występują w postaci ochronionej grupą formylową.

21. Sposób według zastrz. 19, **znamienny tym**, że stosuje się związek o wzorze ogólnym 2, w którym jedna lub większa liczba wolnych grup aminowych innych niż grupa aminowa w położeniu 1, występują w postaci ochronionej grupą acetylową.

22. Sposób według zastrz. 19, **znamienny tym**, że stosuje się związek o wzorze ogólnym 2, w którym jedna lub większa liczba wolnych grup aminowych innych niż grupa aminowa w położeniu 1, występują w postaci ochronionej grupą trójfluoroacetylową.

23. Sposób według zastrz. 19, **znamienny tym**, że stosuje się związek o wzorze ogólnym 2, w którym jedna lub większa liczba wolnych grup aminowych innych niż grupa aminowa w położeniu 1, występuje w postaci ochronionej grupą III rzęd.-butyloksykarbonylową.

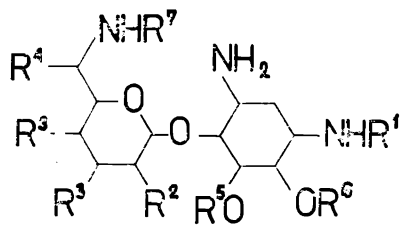
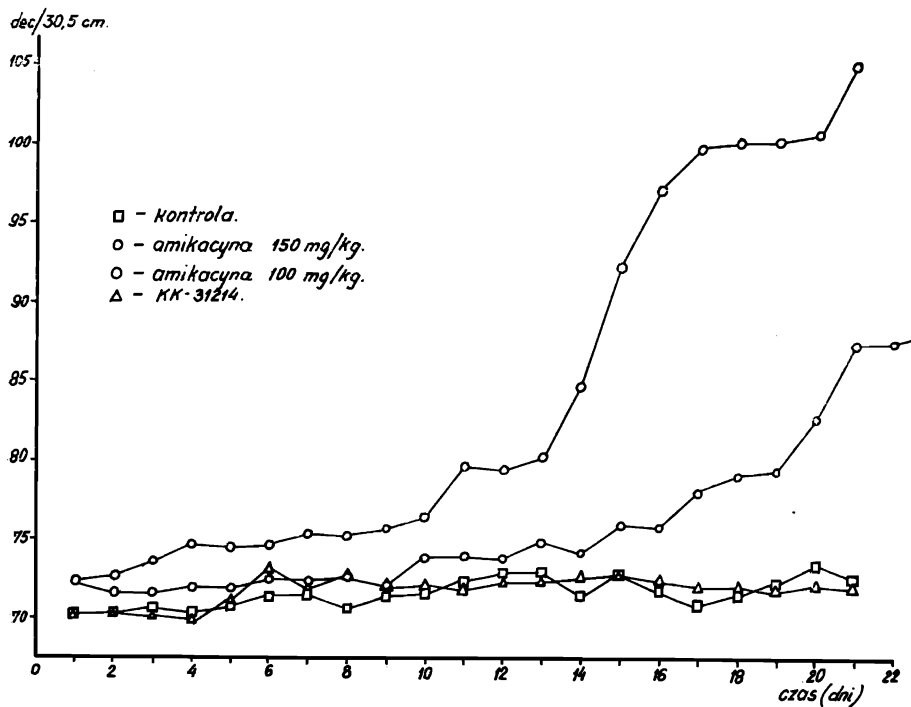
24. Sposób według zastrz. 23, **znamienny tym**, że jako związek o wzorze ogólnym 2 stosuje się 6-N-III rzęd.-butyloksykarbonylotobramycynę.

25. Sposób według zastrz. 20 albo 24, **znamienny tym**, że redukcyjne alkiłowanie przeprowadza się przy użyciu ketonu.

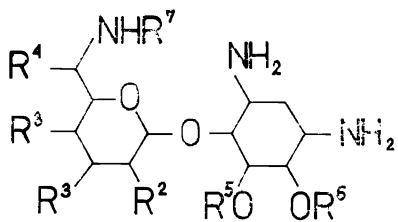
26. Sposób według zastrz. 25, **znamienny tym**, że redukcję prowadzi się przy użyciu borowodoru sodowego lub cyjanoborowodoru sodowego.

27. Sposób według zastrz. 25, **znamienny tym**, że redukcję prowadzi się na drodze katalitycznego wodorowania.

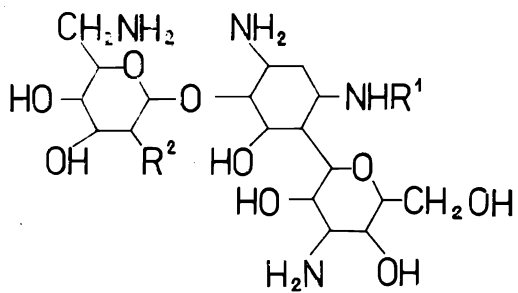
28. Sposób wytwarzania aminoglikozydów 2-dezoksystreptaminowych o wzorze ogólnym 3, w którym R^1 oznacza pierwszorzędową grupę alkiłową o 3—7 atomach węgla, z których przynajmniej dwa, inne niż atom węgla połączony z grupą aminową podstawione są grupą hydroksylową lub R^1 oznacza drugorzędową grupę alkiłową o 3—7 atomach węgla, z których przynajmniej jeden atom inny niż atom połączony z grupą aminową podstawiony jest grupą hydroksylową, a R^2 oznacza grupę aminową lub hydroksylową oraz dopuszczalnych do stosowania w farmacji addycyjnych soli tych związków z kwasami, **znamienny tym**, że 2', 3'', 6-trój-N-trójfluoroacetylokanamycynę B, 3'', 6-dwu-N-trójfluoroacetylokanamycynę A lub 3'', 6'-dwu-N-acetylokanamycynę A poddaje się redukcijnemu alkiłowaniu, usuwa się grupy acetylowe lub fluoroacetylowe, po czym izoluje się związek o wzorze 3, i w razie potrzeby przeprowadza się otrzymany związek w dopuszczalną do stosowania w farmacji addycyjną sól z kwasem.



WZÓR 1



WZOT 2



WZÓR 3