



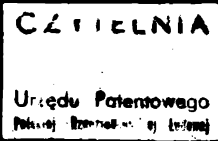
Patent dodatkowy  
do patentu nr \_\_\_\_\_

Zgłoszono: 84 10 29 (P. 250241)

Pierwszeństwo \_\_\_\_\_

Zgłoszenie ogłoszono: 86 05 06

Opis patentowy opublikowano: 88 03 31



Int. Cl.<sup>4</sup> C07H 17/04

Twórcy wynalazku: Jolanta Grzybowska, Andrzej Czerwiński, Edward Borowski

Uprawniony z patentu: Politechnika Gdańska, Gdańsk (Polska)

**Sposób otrzymywania nowych pochodnych  
N-/N,N-dimetyloamino/-acylowych estrów metylowych  
i 3-/N,N-dimetyloamino/-propyloamidów  
makrolidów polienowych**

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania nowych pochodnych N-/N,N-dimetyloamino/-acylowych estrów metylowych i 3-/N,N-dimetyloamino-propyloamidów makrolidów polienowych o wzorze ogólnym, przedstawionym na rysunku, gdzie R oznacza resztę, związanego amidowo z grupą aminową aminocukru makrolidu polienowego, aminokwasu o łańcuchu prostym lub rozgałęzionym, w którym atomy wodoru grupy względnie grup aminowych w pozycji  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i dalszych w stosunku do grupy karboksylowej aminokwasu podstawione są grupami metylowymi, o dowolnej konfiguracji. M oznacza resztę makrolidu polienowego, zaś X oznacza grupę metoksylovą w estrze makrolidu polienowego lub resztę 3-/N,N-dimetyloamino/-propyloaminy, której I-rzędowa grupa aminowa związana jest amidowo z grupą karboksylową makrolidu polienowego.

Dotychczas znane są N-acylowe pochodne estru metylowego amfoterycyny B—J. Antibiotics 25 (4), 256—258 (1972), W. Mechliński, C. P. Schaffner. Pochodne te otrzymuje się w reakcji amfoterycyny B z bezwodnikami odpowiednich kwasów, a następnie uzyskaną N-acylową pochodną amfoterycyny B przeprowadza się w ester metylowy przy użyciu dwuazometanu. Posiadają one znacznie mniejszą aktywność przeciwrzybową w porównaniu z wyjściowymi antybiotykami i nie są rozpuszczalne, jak również nie tworzą rozpuszczalnych w wodzie soli. Znane pochodne N-aminoacylowe,

2

w których grupa  $\text{NH}_2$  aminokwasów jest niepodstawiona, — J. Antibiotics 35 (7), 911—914 (1982), J. J. Wright, J. A. Albarella, L. R. Krepski, D. Loebenberg, charakteryzują się aktywnością przeciwrzybową porównywalną z aktywnością wyjściowych antybiotyków i zdolnością tworzenia rozpuszczalnych w wodzie soli.

Pochodne te otrzymuje się w reakcji acylowania N-chronionych aminokwasów z makrolidami polienowymi, a następnie przeprowadzeniu uzyskanej pochodnej w ester. Tok syntezy jest wieloetapowy i wymaga usuwania osłon grupy aminowej w aminokwasie acylującym makrolid polienowy po zakończeniu reakcji acylowania. Z opisu patentowego Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 4.365.058 znane są estry benzylove N-acetylopi-marycyny, N-acetyloamfoterycyny  $\beta$  oraz N-acetylonystatyny.

Sposób otrzymywania tych estrów polega na reakcji N-acylowej pochodnej makrolidu polienowego z dicykloheksylokarbodiimidem i alkoholem benzylovym. Estry te posiadają znacznie mniejszą aktywność przeciwrzybową w porównaniu z wyjściowymi antybiotykami i nie są rozpuszczalne w wodzie, jak również nie tworzą rozpuszczalnych w wodzie soli.

Sposób otrzymywania nowych pochodnych N-/N,N-dimetyloamino/-acylowych estrów metylowych i 3-/N,N-dimetyloamino/-propyloamidów makrolidów polienowych o wzorze ogólnym, przedstawionym

na rysunku, gdzie R oznacza resztę, związanego amidowo z grupą aminową aminocukru makrolidu polienowego, aminokwasu o łańcuchu prostym lub rozgałęzionym, w którym atomy wodoru grupy względnie grup aminowych w pozycji  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i dalszych w stosunku do grupy karboksylowej aminokwasu podstawione są grupami metylowymi, o dowolnej konfiguracyj, M oznacza resztę makrolidu polienowego, zaś X oznacza grupę metoksyłową w estrze makrolidu polienowego lub resztę 3-/N,N-dimetyloamino-propyloaminy, której I rzędowa grupa aminowa związana jest amidowo z grupą karboksylową makrolidu polienowego, według wynalazku polega na tym, że na ester metylowy względnie 3-/N,N-dimetyloamino-propyloamid makrolidu polienowego, w środowisku rozpuszczalnika organicznego lub ich mieszaniny II w obecności substancji wiążącej kwas działa się niewielkim nadmiarem N,N-dimetyloamino-kwasu z grupą karboksylową, aktywowaną azydem diestru fenylowego kwasu o-fosforowego lub N-hydroksysulfocynioimidem w obecności dicykloheksylokarbodiimidu, całość pozostawia do przereagowania, a następnie z mieszaniny poreakcyjnej wytrąca estrem etylowym surowy produkt końcowy, oczyszcza się go i ewentualnie przeprowadza w sól.

Stosuje się ester metylowy lub 3-/N,N-dimetyloamino/-propyloamid korzystnie następujących makrolidów polienowych: amfoterycyny  $\beta$ , kandydyny, mykoheptyny, nystatyny, polifunginy, aureofacyny i kandydydyny.

Korzystnie stosuje się N,N-dimetylowe pochodne następujących aminokwasów: glicyny,  $\beta$ -alaniny, D-alaniny, L-alaniny, L-fenylalaniny, L-lizyny, L-waliny oraz kwasu L-2,4-diaminomaskowego. Jako rozpuszczalniki organiczne stosuje się korzystnie N,N-dimetyloformamid, N,N-dimetyloacetamid, N,N-dimetylosulfotlenek lub ich mieszaninę.

Jako substancję wiążącą kwas stosuje się korzystnie trietyloaminę. Sposób otrzymywania N-/N,N-dimetyloamino/-acylowych pochodnych estrów metylowych i 3-/N,N-dimetyloamino/-propyloamidów makrolidów polienowych prowadzi jednoznacznie do otrzymaniażądanego produktu bez zmian w strukturze pozostałej części cząsteczki antybiotyku. Pełen dowód struktury opisuje przykład potwierdzenia budowy chemicznej estru metylowego N-/N,N-dimetyloglicylo/-amfoterycyny  $\beta$ .

Identyczność elektronowego widma absorpcyjnego estru metylowego N-/N,N-dimetyloglicylo/amfoterycyny  $\beta$  z widmem wyjściowego antybiotyku dowodzi, że opracowany sposób nie prowadzi do degradacji chromoforu polienowego, a wysoka wartość ekstynkcji  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1400$  przy 382 nm świadczy o wysokim stopniu czystości otrzymanego produktu.

W widmie absorpcyjnym w podczerwieni estru metylowego N-/N,N-dimetyloglicylo/-amfoterycyny  $\beta$  obserwuje się pasmo odpowiadające drganiom walencyjnym grupy karbonylowej estru metylowego  $\nu = 1730\text{ cm}^{-1}$ , co świadczy o tym, że ugrupowanie estrowe pozostało niezmiennione podczas

reakcji. Natomiast w widmie estru metylowego N-/N,N-dimetyloglicylo/-amfoterycyny  $\beta$  obserwuje się pojawienie pasma o liczbie falowej  $1640\text{ cm}^{-1}$ , odpowiadającego drganiom walencyjnym grupy karbonylowej w amidzie drugorzędowym, co jest bezpośrednim dowodem na obecność wiązania amidowego w otrzymanym produkcie.

Masę cząsteczkową estru metylowego N-/N,N-dimetyloglicylo/-amfoterycyny  $\beta$  potwierdzono w oparciu o widmo masowe tego związku wykonane techniką desorpcji polem na podstawie zaobserwowanego jonu molekularnego zgodnie z oczekiwanym ( $M^+ = M = 1022$ ). Przeprowadzono także hydrolizę kwasową estru metylowego N-/N,N-dimetyloglicylo/-amfoterycyny  $\beta$  w 6N kwasie solnym przez 12 godzin i w hydrolizie potwierdzono obecność N,N-dimetyloglicyny metodą chromatografii cienkowarstwowej wobec wzorca N,N-dimetyloglicyny. Natomiast w wyniku hydrolizy kwasowej estru metylowego N-/N,N-dimetyloglicylo/-amfoterycyny  $\beta$ , przeprowadzonej w łagodnych warunkach przy pomocy 3% wodnoalkoholowego roztworu chlorowodoru przez 15 minut, otrzymano po zobojętnieniu N-/N,N-dimetyloglicylo/-mykozaminę, której budowę chemiczną potwierdzono metodą spektroskopii NMR i spektrometrii masowej. Stawowi to bezpośredni dowód świadczący o tym, że reszta N,N-dimetyloglicyny tworzy wiązania amidowe z grupą aminową aminocukru, to jest mykozaminę obecnej w cząsteczce amfoterycyny  $\beta$ .

Pozostałe pochodne N-/N,N-dimetyloamino/-acylowe estrów metylowych i 3-/N,N-dimetyloamino/-propyloamidów makrolidów polienowych charakteryzowano w podobny do opisanego wyżej sposób. Przedstawione fakty dowodzą, że proponowany sposób otrzymywania N-/N,N-dimetyloamino/-acylowych pochodnych estrów metylowych i 3-/N,N-dimetyloamino/-propyloamidów makrolidów polienowych prowadzi do otrzymaniażądaných pochodnych bez naruszania pozostałych ugrupowań, obecnych w cząsteczce tych antybiotyków.

Dla otrzymanych związków oznaczono aktywność przeciwgrzybową oraz toksyczność in vitro. Aktywność przeciwgrzybową oznaczono wobec *Saccharomyces cerevisiae* oraz *Candida albicans*, a za jej miarę przyjęto stężenie badanego preparatu hamujące w 50% wzrost drożdżostroju oznaczony spektrofotometrycznie przy 660 nm, po 24 godzinnej inkubacji w temperaturze 27°C ( $JC_{50}$ ). Za miarę toksyczności in vitro przyjęto stężenie badanego preparatu powodujące w standardowych warunkach 50% hemolizę erytrocytów ludzkich ( $EH_{50}$ ).

Analogicznym sposobem do opisanego można otrzymać N-/N,N-dimetyloamino/-acylowe pochodne różnych estrów oraz różnych prostych i podstawionych amidów makrolidów polienowych. Przykładowo, otrzymać można pochodne N-/N,N-dimetyloamino/-acylowe takich estrów makrolidów polienowych, jak ester metylowy, etylowy, butylowy, benzylowy, fenylowy, p-nitrofenylowy, anyżkowy oraz takich amidów, jak amid izopropylowy, n-butylowy, izobutylowy, heksylowy, 2-hydroksyetylowy, 3-hydroksypropylowy, benzylowy, morfolinowy, cykloheksylowy, n-decylowy, n-dodecylowy, n-okta-

decylowy, n-oktylowy, 3-/N,N-dimetyloamino/-propylowy, 3-/N,N-izopropylamino/-propylowy, 1-/N,N-dimetyloamino/-izopropylowy, piperydylowy. Wszystkie te pochodne wykazują aktywność przeciwwgrzybową porównywalną z macierzystymi antybiotykami oraz tworzą z kwasami rozpuszczalne w wodzie sole, niemniej jednak optymalne właściwości biologiczne, wykazują pochodne N-/N,N-dimetyloamino/-acylowe estrów metylowych i 3-/N,N-dimetyloamino/-propyloamidów makrolidów polienowych.

Przedmiotowe pochodne w odróżnieniu od estrów oraz prostych amidów, nie zawierających podstawników o charakterze zasadowym, makrolidów polienowych dają ze słabymi kwasami dobrze rozpuszczalne w wodzie sole, które w porównaniu z wyjściowymi estrami i amidami makrolidów polienowych zachowują pełną aktywność przeciwwgrzybową.

Pochodne N-/N,N-dimetyloamino/-acylowe zasadowych amidów makrolidów polienowych w porównaniu z wyjściowymi amidami tworzą ze słabymi kwasami sole o szczególnie dobrej rozpuszczalności w wodzie. Nieoczekiwanie okazało się, a czego nie można było przewidzieć z góry, że sole przedmiotowych pochodnych ze słabymi kwasami bardzo dobrze rozpuszczają się w wodzie mimo, że w wyniku podstawienia estru metylowego lub 3-/N,N-dimetyloamino/-propyloamidu resztę N,N-dimetyloaminokwasu nie następuje ani zwiększenie w cząsteczce soli ilości elektrycznych ładunków jednoimiennych, ani też wprowadzenie silnie hydrofilnych podstawników.

Przedmiotowe pochodne, charakteryzując się wysoką aktywnością przeciwwgrzybową, obniżoną toksycznością *in vitro* w porównaniu z macierzystymi antybiotykami oraz zdolnością tworzenia z kwasami soli bardzo dobrze rozpuszczalnych w wodzie rokurają duże nadzieje na zastosowanie ich do leczenia grzybic układowych. Bardzo dobra rozpuszczalność w wodzie soli uzyskanych pochodnych jest szczególnie cenna dla medycyny z uwagi na to, że jedyny, stosowany dotychczas w leczeniu grzybic układowych, lek zwany fungizolem tworzy w wodzie wyłącznie roztwory koloidalne. Ponadto, sposób otrzymywania pochodnych N-/N,N-dimetyloamino/-acylowych estrów i amidów makrolidów polienowych jest prosty i prowadzi do uzyskania produktów z dobrą wydajnością, a przez zastosowanie N,N-dimetylowej pochodnej aminokwasu eliminuje konieczność wprowadzania ochron grup aminowych, które musiałyby być usuwane po reakcji acylowania.

Sposób otrzymywania nowych pochodnych N-/N,N-dimetyloamino/-acylowych estrów metylowych i 3-/N,N-dimetyloamino/-propyloamidów makrolidów polienowych ilustrują podane niżej przykłady.

Przykład I. 240 mg estru metylowego amfoterycyny B o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1560$  przy 382 nm rozpuszcza się w 8 ml N,N-dimetyloformamidu i schładza w łaźni z lodem. Do roztworu mieszając dodaje się 73 mg chlorowodoru N,N-dimetyloglicyny, 0,22 ml trietyloaminy oraz 0,14 ml azydku

diestru fenylowego kwasu o-fosforowego i poztawia na 12 godzin. Po przereagowaniu do roztworu dodaje się eter etylowy aż do wytrącenia osadu, który po odwirowaniu, przemyciu eterem etylowym i wysuszeniu rozpuszcza się w n-butanolu, a warstwę n-butanolową przemywa kilkakrotnie wodą do pH 7. Roztwór n-butanolowy zagęszcza się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze nie wyższej niż 40°C i wytrąca zeń osad przy pomocy nadmiaru eteru etylowego. Osad odwirowuje się, przemywa eterem etylowym, n-heksanem i suszy w eksykatorze próżniowym. Otrzymuje się 250 mg surowego produktu o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1280$  przy 382 nm.

Produkt oczyszcza się na drodze chromatografii jonowymiennej z użyciem karboksymetylocelulozy. Osad rozpuszcza się w kilku mililitrach mieszaniny metanolu i wody w stosunku objętościowym 2:1, nanosi na kolumnę napełnioną 2,5 g karboksymetylocelulozy CM 52 firmy WHATMAN zawieszzonej w mieszaninie metanolu i wody (2:1/v/v) i kolumnę przemywa się tą mieszaniną. Następnie produkt eluuje się z kolumny za pomocą 5% roztworu chlorku sodu w mieszaninie metanol-woda (2:1/v/v). Z zebranych frakcji odparowuje się metanol pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozcieńcza się wodą, dodaje trietyloaminy do pH 8 i poddaje się w rozdzielniku ekstrakcji za pomocą n-butanolu. Warstwę n-butanolu przemywa się wodą aż do zamknięcia jonów chlorkowych, wykrywanych przy pomocy testu z azotanem srebra, zagęszcza pod zmniejszonym ciśnieniem do małej objętości i wytrąca osad przy pomocy nadmiaru eteru etylowego. Osad odwirowuje się, przemywa kilkakrotnie eterem etylowym, n-heksanem i suszy w eksykatorze próżniowym. Otrzymuje się 190 mg estru metylowego N-/N,N-dimetyloglicylo/-amfoterycyny  $\beta$  o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1400$  przy 382 nm w postaci wolnej zasady, co stanowi 72% wydajności teoretycznej.  $IC_{50} = 0,12 \mu\text{g/ml}$  (*Saccharomyces cerevisiae*);  $IC_{50} = 0,1 \mu\text{g/ml}$  (*Candida albicans* 1440);  $EH_{50} = 30 \mu\text{g/ml}$ . W celu otrzymania rozpuszczalnej w wodzie soli estru metylowego N-/N,N-dimetyloglicylo/-amfoterycyny  $\beta$  zawieszają się 200 mg tego estru w 5 ml wody i dodaje się kroplami roztwór 27 mg kwasu L-asparaginowego w 2 ml wody, obserwując postępujące rozpuszczanie się estru, a następnie przy pomocy nadmiaru acetonu i niewielkiego dodatku eteru etylowego wytrąca osad. Osad odwirowuje się, przemywa acetonem z niewielkim dodatkiem eteru etylowego, eterem etylowym i suszy w eksykatorze próżniowym. Otrzymuje się 210 mg doskonale rozpuszczalnego w wodzie L-asparaginanu estru metylowego N-/N,N-dimetyloglicylo/-amfoterycyny  $\beta$  o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1250$  przy 382 nm, co stanowi 90% wydajności teoretycznej w stosunku do wolnej zasady.  $IC_{50} = 0,15 \mu\text{g/ml}$  (*Saccharomyces cerevisiae*);  $IC_{50} = 0,15 \mu\text{g/ml}$  (*Candida albicans* 1440);  $EH_{50} = 35 \mu\text{g/ml}$ .

Przykład II. 200 mg 3-/N,N-dimetyloamino/-propyloamidu amfoterycyny  $\beta$  o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1400$  przy 382 nm rozpuszcza się w 6 ml N,N-dimetyloformamidu i po schłodzeniu w łaźni z lodem do-

daje się 60 mg chlorowodoru N,N-dimetyloglicyny, 0,19 ml trietyloaminy oraz 0,13 ml azydku diestru fenyloвого kwasu o-fosforowego i pozostawia na 12 godzin do przereagowania mieszając. Dalszy tok postępowania jak w przykładzie I. Otrzymuje się 175 mg 3-/N,N-dimetyloamino/-propyloamidu N-/N,N-dimetyloglicylo/-amfoterycyny  $\beta$  o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1300$  przy 382 nm w postaci wolnej zasady, co stanowi 80% wydajności teoretycznej.  $IC_{50} = 0,12 \mu\text{g/ml}$  (*Saccharomyces cerevisiae*);  $IC_{50} = 0,1 \mu\text{g/ml}$  (*Candida albicans* 1440);  $EH_{50} = 20 \mu\text{g/ml}$ .

W celu otrzymania rozpuszczalnej w wodzie soli zawieszają się 170 mg 3-/N,N-dimetyloamino/-propyloamidu N-/N,N-dimetyloglicylo/-amfoterycyny  $\beta$  w 4 ml wody i dodaje kroplami roztwór 43 mg kwasu L-asparaginowego w 3 ml wody obserwując postępujące rozpuszczanie się amidu, a następnie wytrąca osad przy pomocy nadmiaru acetonu. Osad odwirowuje się, przemywa acetonem, eterem etylowym i suszy w eksykatorze próżniowym. Otrzymuje się 196 mg L-asparaginy 3-/N,N-dimetyloamino/-propyloamidu N-/N,N-dimetyloglicylo/-amfoterycyny  $\beta$  o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1060$  przy 382 nm, co stanowi 92% wydajności teoretycznej w stosunku do wolnej zasady.  $IC_{50} = 0,15 \mu\text{g/ml}$  (*Saccharomyces cerevisiae*);  $IC_{50} = 0,14 \mu\text{g/ml}$  (*Candida albicans*);  $EH_{50} = 25 \mu\text{g/ml}$ .

Przykład III. 200 mg estru metylowego amfoterycyny  $\beta$  o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1560$  przy 382 nm rozpuszcza się w 10 ml N,N-dimetyloformamidu i schładza w łaźni z lodem. Do roztworu dodaje się mieszając 93 mg chlorowodoru N,N-dimetylo- $\beta$ -alaniny, 0,25 ml trietyloaminy oraz 0,16 ml azydku diestru fenyloвого kwasu o-fosforowego i pozostawia na 12 godzin do przereagowania. Dalszy tok postępowania jak w przykładzie I. Otrzymuje się 257 mg estru metylowego N-/N,N-dimetylo- $\beta$ -alanylo/-amfoterycyny  $\beta$  o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1370$  przy 382 nm, co stanowi 83% wydajności teoretycznej.  $IC_{50} = 0,1 \mu\text{g/ml}$  (*Saccharomyces cerevisiae*);  $IC_{50} = 0,12 \mu\text{g/ml}$  (*Candida albicans*);  $EH_{50} = 20 \mu\text{g/ml}$ .

W celu otrzymania rozpuszczalnej w wodzie soli z kwasem L-askorbinowym zawieszają się 207 mg estru metylowego N-/N,N-dimetylo- $\beta$ -alanylo/-amfoterycyny  $\beta$  w 5 ml wody, dodaje kroplami roztwór 35 mg kwasu L-askorbinowego w 4 ml wody i po całkowitym rozpuszczeniu zawieszono osadu przy pomocy nadmiaru acetonu wytrąca się osad, który odwirowuje się, przemywa acetonem, eterem etylowym i suszy w eksykatorze próżniowym. Otrzymuje się 223 mg L-askorbinianu estru metylowego N-/N,N-dimetylo- $\beta$ -alanylo/-amfoterycyny  $\beta$  o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1180$  przy 382 nm, co stanowi 93% wydajności teoretycznej w stosunku do wolnej zasady.  $IC_{50} = 0,14 \mu\text{g/ml}$  (*Saccharomyces cerevisiae*);  $IC_{50} = 0,17 \mu\text{g/ml}$  (*Candida albicans*);  $EH_{50} = 30 \mu\text{g/ml}$ .

Przykład IV. Do roztworu 280 mg estru metylowego amfoterycyny  $\beta$  o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1560$  przy 382 nm w 10 ml N,N-dimetyloformamidu schłodzonego w łaźni z lodem dodaje się mieszając

165 mg dichlorowodoru N<sup>2</sup>,N<sup>2</sup>,N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-tetrametylo-L-lizyny, 0,34 ml trietyloaminy oraz 0,17 ml azydku diestru fenyloвого kwasu o-fosforowego i pozostawia do przereagowania na 12 godzin. Dalszy tok postępowania jak w przykładzie I. Otrzymuje się 228 mg estru metylowego N-/N<sup>2</sup>,N<sup>2</sup>,N<sup>4</sup>,N<sup>4</sup>-tetrametylo-L-lizylo/-amfoterycyny  $\beta$  o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1240$  przy 382 nm, co stanowi 68% wydajności teoretycznej.  $IC_{50} = 0,2 \mu\text{g/ml}$  (*Saccharomyces cerevisiae*);  $IC_{50} = 0,17 \mu\text{g/ml}$  (*Candida albicans* 1440);  $EH_{50} = 35 \mu\text{g/ml}$ .

W celu otrzymania rozpuszczalnego w wodzie L-asparaginy estru metylowego N-/N<sup>2</sup>,N<sup>2</sup>,N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-tetrametylo-L-lizylo/-amfoterycyny  $\beta$  postępuje się analogicznie, jak w przykładzie I, stosując proporcje substratów: 2 mole kwasu L-asparaginowego na 1 mol estru.

Przykład V. 470 mg estru metylowego nystatyny o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 860$  przy 304 nm rozpuszcza się w 10 ml N,N-dimetyloformamidu i schładza w łaźni z lodem. Do roztworu dodaje się mieszając 140 mg chlorowodoru N,N-dimetyloglicyny, 0,42 ml trietyloaminy oraz 0,26 ml azydku diestru fenyloвого kwasu o-fosforowego i pozostawia na 12 godzin do przereagowania. Dalszy tok postępowania jak w przykładzie I. Otrzymuje się 333 mg estru metylowego N-/N,N-dimetyloglicylo/-nystatyny o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 810$  przy 304 nm, co stanowi 65% wydajności teoretycznej.  $IC_{50} = 0,4 \mu\text{g/ml}$  (*Saccharomyces cerevisiae*);  $IC_{50} = 0,35 \mu\text{g/ml}$  (*Candida albicans* 1440);  $EH_{50} = 150 \mu\text{g/ml}$ .

Przykład VI. 1,2 g 3-/N,N-dimetyloamino/-propyloamidu aureofacyny o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 700$  przy 379 nm rozpuszcza się w 20 ml N,N-dimetyloformamidu i schładza w łaźni z lodem. Do roztworu dodaje się 0,28 chlorowodoru N,N-dimetyloglicyny, 0,84 ml trietyloaminy oraz 0,46 ml azydku diestru fenyloвого kwasu o-fosforowego. Mieszaninę reakcyjną pozostawia do przereagowania przy ciągłym mieszaniu. Następnie dodaje się 50 ml acetonu i wytrąca osad przy pomocy nadmiaru eteru etylowego. Osad odwirowuje się, przemywa eterem etylowym i suszy w eksykatorze próżniowym, a następnie rozpuszcza w n-butanolu, a warstwę n-butanolową przemywa kilkakrotnie wodą.

Roztwór n-butanolowy zagęszcza się do małej objętości pod zmniejszonym ciśnieniem i przy pomocy eteru etylowego wytrąca osad, który odwirowuje się, przemywa eterem etylowym i suszy w eksykatorze próżniowym. Otrzymuje się 1,03 g surowego produktu. Produkt oczyszcza się na drodze ekstrakcji przeciwprądowej w aparacie Craiga stosując mieszaninę rozpuszczalników: chloroform, metanol i 0,5% roztwór wodny chlorku sodu w stosunku objętościowym 2:2:1. Frakcje zawierające produkt końcowy łączy się, odparowuje z niego chloroform i metanol pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozcieńcza wodą i poddaje ekstrakcji n-butanołem. Warstwę n-butanolową przemywa się wodą aż do zaniku jonów chlorkowych (test z azotanem srebra), a następnie zagęszcza do małej objętości pod zmniejszonym ciśnieniem i wytrąca osad nadmiaru eteru etylowego. Osad odwirowuje się, przemywa kilkakrotnie eterem etylowym i su-

szy w ekzykatorze próżniowym. Otrzymuje się 0,66 g 3-/N,N-dimetyloamino/-propyloamidu N-/N,N-dimetyloglicylo/-aureofacyny o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 780$  przy 379 nm, co stanowi 51% wydajności teoretycznej.  $IC_{50} = 0,0002 \mu\text{g/ml}$  (*Saccharomyces cerevisiae*);  $IC_{50} = 0,0003 \mu\text{g/ml}$  (*Candida albicans* 1440);  $EH_{50} = 31 \mu\text{g/ml}$ .

W celu otrzymania rozpuszczalnej w wodzie soli 3-/N,N-dimetyloamino/-propaloamidu N-/N,N-dimetyloglicylo/-aureofacyny zawieszają się 257 mg tego związku w 5 ml wody, dodaje kroplami roztwór 54 mg kwasu L-asparaginowego w 4 ml wody i pozostawia na kilka minut mieszając. Następnie dodaje się acetonu do całkowitego rozpuszczenia soli. Produkt wytrąca się nadmiarem mieszaniny acetonu i eteru etylowego w stosunku 1:3, odwirowuje się, przemywa mieszaniną acetonu i eteru etylowego w stosunku 1:3, eterem etylowym i suszy w ekzykatorze próżniowym. Otrzymuje się 280 mg L-asparaginianu 3-/N,N-dimetyloamino/-propyloamidu N-/N,N-dimetyloglicylo/-aureofacyny o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 650$  przy 379 nm, co stanowi 90% wydajności teoretycznej w stosunku do wolnej zasady.  $IC_{50} = 0,002 \mu\text{g/ml}$  (*Saccharomyces cerevisiae*);  $IC_{50} = 0,003 \mu\text{g/ml}$  (*Candida albicans* 1440);  $EH_{50} = 50 \mu\text{g/ml}$ .

Przykład VII. 1,2 g 3-/N,N-dimetyloamino/-propyloamidu aureofacyny o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 700$  przy 379 rozpuszcza się w 20 ml N,N-dimetyloformamidu i po schłodzeniu w łaźni z lodem dodaje mieszając 0,31 g chlorowodoru N,N-dimetylo- $\beta$ -alaniny, 0,84 ml trietyloaminy oraz 0,46 ml azydku diestru fenyloвого kwasu o-fosforowego i pozostawia do przereagowania. Dalszy tok postępowania jak w przykładzie VI. Otrzymuje się 0,72 g 3-/N,N-dimetyloamino/-propyloamidu N-/N,N-dimetylo- $\beta$ -alanylo/-aureofacyny o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 770$  przy 379 nm, co stanowi 55% wydajności teoretycznej.  $IC_{50} = 0,0005 \mu\text{g/ml}$  (*Saccharomyces cerevisiae*);  $IC_{50} = 0,0004 \mu\text{g/ml}$  (*Candida albicans* 1440);  $EH_{50} = 13 \mu\text{g/ml}$ .

Przykład VIII. 368 mg estru metylowego aureofacyny o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1080$  przy 379 nm rozpuszcza się w 5 ml N,N-dimetyloformamidu i po schłodzeniu w łaźni z lodem dodaje mieszając 115 mg chlorowodoru N,N-dimetylo- $\beta$ -alaniny, 0,28 ml trietyloaminy oraz 0,18 ml azydku diestru fenylowego kwasu o-fosforowego i pozostawia do przereagowania. Do roztworu dodaje się 15 ml acetonu i wytrąca osad nadmiarem eteru etylowego. Osad odwirowuje się, przemywa kilkakrotnie eterem etylowym, suszy w ekzykatorze próżniowym i rozpuszcza w niewielkiej ilości mieszaniny metanolu i N,N-dimetyloformamidu w stosunku 3:1 oraz nanosi na kolumnę wypełnioną żelalem Sephadex LH-20, zawieszonym w metanolu (110 cm  $\times$   $\times$  3,6 cm). Produkt eluuje się z kolumny metanolem. Frakcje zawierające produkt łączy się, zagęszcza do małej objętości pod zmniejszonym ciśnieniem i dodaje eteru etylowego aż do wytrącenia osadu. Osad odwirowuje się, przemywa eterem etylowym i suszy w ekzykatorze próżniowym. Otrzymuje się 327 mg estru metylowego N-/N,N-di-

metylo- $\beta$ -alanylo/-aureofacyny o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1025$  przy 379 nm, co stanowi 81% wydajności teoretycznej.  $IC_{50} = 0,0003 \mu\text{g/ml}$  (*Saccharomyces cerevisiae*);  $IC_{50} = 0,0003 \mu\text{g/ml}$  (*Candida albicans* 1440);  $EH_{50} = 7 \mu\text{g/ml}$ .

Przykład IX. 356 mg perimycyny o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 805$  przy 379 nm rozpuszcza się w 5 ml N,N-dimetyloformamidu i schładza w łaźni z lodem. Do roztworu dodaje się mieszając 115 mg chlorowodoru N,N-dimetylo- $\beta$ -alaniny, 0,28 ml trietyloaminy oraz 0,18 ml azydku diestru fenylowego kwasu o-fosforowego i pozostawia do przereagowania. Dalszy tok postępowania jak w przykładzie VIII. Otrzymuje się 306 mg N-/N,N-dimetylo- $\beta$ -alanylo/-perimycyny o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 715$  przy 379 nm, co stanowi 78% wydajności teoretycznej.  $IC_{50} = 0,0003 \mu\text{g/ml}$  (*Saccharomyces cerevisiae*);  $IC_{50} = 0,0003 \mu\text{g/ml}$  (*Candida albicans* 1440);  $EH_{50} = 3 \mu\text{g/ml}$ .

Przykład X. 105 mg chlorowodoru N,N-dimetyloglicyny rozpuszcza się w 6 ml N,N-dimetyloformamidu, dodaje 159 mg dicykloheksylokarbodiimidu oraz 87 mg N-hydroksysukcynimidu i pozostawia na 12 godzin do przereagowania. Powstały osad odsącza się, przemywa N,N-dimetyloformamidem i przesącz dodaje do roztworu 350 mg estru metylowego amfoterycyny  $\beta$  o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1560$  przy 382 nm w 5 ml N,N-dimetyloformamidu z dodatkiem 0,11 ml trietyloaminy. Całość miesza się 12 godzin w temperaturze pokojowej. Po przereagowaniu do mieszaniny dodaje się eter etylowy aż do wytrącenia osadu, który odwirowuje się, przemywa eterem etylowym i suszy w ekzykatorze próżniowym. Osad rozpuszcza się w n-butanolu przenosi do rozdzielacza i przemywa wodą do pH 7. Warstwę n-butanolową zagęszcza pod zmniejszonym ciśnieniem do małej objętości w temperaturze poniżej 40°C i eterem etylowym wytrąca surowy produkt, który odwirowuje się, przemywa eterem etylowym i suszy w ekzykatorze próżniowym. Produkt oczyszcza się metodą rozdziału przeciwwądowego w aparacie Craiga w mieszaninie rozpuszczalników chloroform:metanol:woda 2:2:1. Otrzymuje się 265 mg estru metylowego N-/N,N-dimetyloglicylo/-amfoterycyny  $\beta$  o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1350$  przy 382 nm, co stanowi 70% wydajności teoretycznej.  $IC_{50} = 0,12 \mu\text{g/ml}$  (*Saccharomyces cerevisiae*);  $IC_{50} = 0,11 \mu\text{g/ml}$  (*Candida albicans* 1440);  $EH_{50} = 30 \mu\text{g/ml}$ .

Przykład XI. 115,2 mg chlorowodoru N,N-dimetylo- $\beta$ -alaniny rozpuszcza się w 5 ml N,N-dimetyloacetamidu, dodaje 159 mg dicykloheksylokarbodiimidu oraz 87 mg N-hydroksysukcynimidu i pozostawia do przereagowania na 12 godzin. Powstały osad odsącza się, przemywa niewielką ilością N,N-dimetyloacetamidu, a przesącz dodaje do roztworu 377 mg 3-/N,N-dimetyloamino/-propyloamidu kandydyny o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1450$  przy 382 nm w 8 ml N,N-dimetyloacetamidu z dodatkiem 0,11 ml trietyloaminy. Całość miesza się przez 12 godzin w temperaturze pokojowej. Dalszy tok postępowania jak w przykładzie X. Otrzymuje się 298 mg 3-/N,N-dimetyloamino/-propyloamidu N-/N,N-

-dimetylo- $\beta$ -alanylo/-kandydyny o  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 1300$  przy 382 nm, co stanowi 72% wydajności teoretycznej.  $IC_{50} = 0,19 \mu\text{g/ml}$  (*Saccharomyces cerevisiae*);  $IC_{50} = 0,17 \mu\text{g/ml}$  (*Candida albicans* 1440);  $EH_{50} = 22 \mu\text{g/ml}$ .

## Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania nowych pochodnych N-/N,N-dimetyloamino/-acylowych estrów metylowych

Nr przykł.	Nazwa produktu końcowego	$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$	$IC_{50}[\mu\text{g/ml}]$		$EH_{50}[\mu\text{g/ml}]$	Nr przykł. otrzym.
			Saccharom. cerevisiae	Candida albic. 1440		
1	2	3	4	5	6	7
XIII	ester metylowy N-/N,N-dimetylo-D-alanylo/-kandydyny*	1400 (382nm)	0,17	0,17	15	I
XIII	ester metylowy N-/N,N-dimetylo-L-feniloalanylo/-amfoterycyny $\beta$	1290 (382nm)	0,16	0,15	26	I
XIV	ester metylowy N-/N,N-dimetylo-L-walilo/-polifunginy	790 (304nm)	0,35	0,56	85	I
XV	ester metylowy N-/N,N-dimetylo-L-alanylo/kandydyny**	980 (379nm)	0,0004	0,0004	7	VIII
XVI	ester metylowy N-/N <sup>2</sup> ,N <sup>2</sup> ,N <sup>4</sup> ,N <sup>4</sup> -tetrametylo-L-2,4-diaminobutyrylo/-aureofacyny***	980 (379nm)	0,0002	0,0002	3	VIII
XVII	ester metylowy N-/N,N-dimetylo-alanylo/-nystatyny	800 (304nm)	0,38	0,45	97	X
XVIII	ester metylowy N-/N,N-dimetyloglicylo/-kandydyny	950 (379nm)	0,0003	0,0005	8	X
XIX	3-/N,N-dimetyloamino/propyloamid N-/N,N-dimetylo-D-alanylo/-kandydyny	1300 (382nm)	0,20	0,22	25	II
XIX	3-/N,N-dimetyloamino/-propyloamid N-/N,N-dimetylo-L-feniloalanylo/-amfoterycyny $\beta$	1210 (382nm)	0,18	0,16	35	II
XXI	3-/N,N-dimetyloamino/-propyloamid N-/N,N-dimetylo-L-walilo/-amfoterycyny $\beta$	1310 (382nm)	0,14	0,14	22	II
XXII	3-/N,N-dimetyloamino/propyloamid N-/N <sup>2</sup> ,N <sup>2</sup> ,N <sup>4</sup> ,N <sup>4</sup> -tetrametylo-L-2,4-diaminobutyrylo/-aureofacyny	900 (379nm)	0,0005	0,0004	15	VI
XXIII	3-/N,N-dimetyloamino/propyloamid N-/N <sup>2</sup> ,N <sup>2</sup> ,N <sup>6</sup> ,N <sup>6</sup> -tetrametylo-L-lizylo/-kandydyny	820 (379nm)	0,0008	0,0005	12	VI
XXIV	3-/N,N-dimetyloamino/propyloamid N-/N,N-dimetylo- $\beta$ -alanylo/-nystatyny	730 (304nm)	0,4	0,4	100	XI

\* — kandydyna jest trójskładnikową mieszaniną, w skład której wchodzi kandydyna, kandydynina i kandydynina.

\*\* — kandydycyna jest synonimem leworyny

\*\*\* — aureofacyna jest synonimem patrycyny

Przykład XII—XXIV. Analogicznie jak w przykładach I—XI otrzymano następujące pochodne N-/N,N-dimetyloamino/-propyloamidów makrolidów polienowych, przedstawione w tabeli:

i 3-/N,N-dimetyloamino/-propyloamidów makrolidów polienowych o wzorze ogólnym przedstawionym na rysunku, gdzie R oznacza resztę związanego amidowo z grupą aminową aminocukru ma-

