(19) DANMARK

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **147942 B**

(21) Patentansøgning nr.: **2655/77**

(51) Int.Cl.[4]: **C 07 H 15/234**

(22) Indleveringsdag: **15 jun 1977**

(41) Alm. tilgængelig: **17 dec 1977**

(44) Fremlagt: **14 jan 1985**

(86) International ansøgning nr.: –

(30) Prioritet: **16 jun 1976 GB 24989/76** **28 sep 1976 GB 40145/76** **08 dec 1976 GB 51294/76**

(71) Ansøger: ***PFIZER CORPORATION; Colon, PA.**

(72) Opfinder: **Rhona Margaret *Plews; GB, Kenneth *Richardson; GB, James Robert *Wright; GB.**

(74) Fuldmægtig: **Internationalt Patent-Bureau**

(54) **Analogifremgangsmåde til fremstilling af kanamycin A- eller kanamycin B-derivater eller syreadditionssalte deraf**

DK 147942 B

Opfindelsen angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte kanamycin A- eller kanamycin B-derivater med formlen I (se kravet), hvori R^1 betegner en primær eller sekundær alkylgruppe med 3-7 carbonatomer, af hvilke i det mindste to, der er forskellige fra det carbonatom, som er knyttet til aminogruppen, bærer hydroxylgrupper, R^2 betegner en amino- eller hydroxylgruppe, R^6 betegner en 3-amino-3-deoxy-α-D-glucopyranosylgruppe og R^7 betegner et hydrogenatom eller en C_1-C_4-alkylgruppe, eller farmaceutisk acceptable syreadditionssalte deraf.

Disse forbindelser har antibakterielle egenskaber.

Det er kendt at beslægtede forbindelser, hvori den til R^1 svarende gruppe betegner en alkansyrerest eller alkylgruppe substitueret med en aminogruppe og med en enkelt hydroxylgruppe har antimicrobielle egenskaber, se f. eks. dansk patentansøgning nr. 4811/75 og J. Antibiotics, 1974, 27, p. 851-858.

I forhold til disse kendte forbindelser udmærker forbindelserne med formlen I sig imidlertid ved at have særlig lav toxicitet og samtidig besidde en meget bredspektret aktivitet mod bakterier, som ellers udviser resistens mod antibiotica af den pågældende type.

Den væsentligste ulempe, der knytter sig til aminoglycosidterapi er generelt risikoen for beskadigelse af høreevnen samt beskadigelse af nyrerne, hvis stoffernes koncentration i blodet øges væsentligt over den terapeutiske dosis. Derfor er en formindskelse af et aminoglycosids potentielle toxicitet af stor betydning. Den pågældende toxicitet kan vurderes efter en prøve i det væsentlige som beskrevet af Kunin i Journal of Infectious Diseases 121, p 55 (1970). Denne prøve er baseret på bestemmelse af den procentvise hæmning af den antibakterielle virkning, som forårsages ved tilstedeværelse af nyrevæv. Det har vist sig, at jo mere toxisk et aminoglycosidantibiotikum er, jo kraftigere bindes det til nyrevæv og jo større er derfor den procentvise hæmning af antibakteriel virkning. Ved denne prøve er en række forbindelser, der fremstilles efter fremgangsmåden ifølge opfindelsen, blevet sammenlignet med kendte aminoglycosidantibiotika, hvorved blev opnået følgende resultater:

Resultater:

Prøveforbindelser	Procentvis hæmning af antibakteriel virkning
ribostamycin	55
streptomycin	57
kanamycin A	58
butirosin	58
amikacin	61
butakacin	67
kanamycin B	69
tobramycin	73
netilmycin	76
3',4'-dideoxykanamycin B	77
gentamicin	81
neomycin	83
Forbindelse ifl. eks.1	38
" " " 2	33
" " " 3	32
" " " 4	34
" " " 5	37
" " " 11	48
" " " 17	52
" " " 18	42
" " " 19	46

Amikacin: 1-N-[(S)-4-amino-2-hydroxybutyryl]kanamycin A

Butakacin: 1-N-[(S)S-4-amino-2-hydroxybutyl]kanamycin A

Netilmycin: 1-N-ethyl-sisomycin

Som det vil ses udviser de afprøvede forbindelser, fremstillet efter fremgangsmåden ifølge opfindelsen, en væsentlig mindre procentvis hæmning af antibakteriel virkning.Det bemærkes i denne forbindelse, at de for de kendte forbindelser bestemte procentvise hæmninger viser god overensstemmelse med den relative toxicitet af disse forbindelser, som den er erfaret ved klinisk brug.

Det vil ses, at forbindelserne fremstillet efter fremgangsmåden ifølge opfindelsen viser lavere hæmningsværdier end butakacin, der er den bedste af forbindelserne der kendes fra ovennævnte danske patentansøgning 4811/75, og de er også overlegne i forhold til amikacin, som kendes fra ovennævnte artikel i Journal of Antibiotics.

Endvidere foretages in vitro vurdering af forbindelsernes antibakterielle virkning ved at bestemme den minimale hæmningskoncentration (M.I.C.) for forbindelserne i et egnet medium, ved hvilken væksten af den specielle mikroorganisme ikke finder sted. I praksis inoculeres agarplader i hver af hvilke der er inkorporeret en prøveforbindelse i en bestemt koncentration, med et standard antal celler af mikroorganismen, og hver plade inkuberes derpå i 24 timer ved 37°C.

Pladerne iagttages derpå for tilstedeværelse eller fravær af bakterievækst, og den tilsvarende M.I.C.-værdi konstateres. Mikroorganismerne, som er anvendt ved sådanne forsøg, har omfattet stammer af Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus og Streptococcus faecalis.

Resultaterne fremgår af nedenstående tabel:

TABEL

In vitro aktivitet

Eksempel nr.	M.I.C. µg/ml				
	E. Coli	Klebsiella pneumoniae	Proteus mirabilis	Pseudomonas aeruginosa	Staphylo-coccus aureus
1	6,2	6,2	25	6,2	6,2
2	12,5	6,2	12,5	6,2	6,2
3	12,5	12,5	12,5	6,2	6,2
4	12,5	12,5	25	12,5	12,5
5	12,5	12,5	25	12,5	12,5
6	25	25	50	25	25
7	12,5	12,5	25	12,5	6,2
8	50	25	100	25	25
9	25	12,5	25	12,5	25
10	25	25	100	25	25
11	6,2	3,1	6,2	3,1	1,6
12	3,1	3,1	6,2	1,6	1,6
13	3,1	3,1	12,5	3,1	1,6
14	3,1	3,1	6,2	3,1	1,6
15	6,2	6,2	100	6,2	6,2
16	6,2	3,1	12,5	3,1	3,1
17	6,2	6,2	12,5	6,2	3,1
18	6,2	6,2	25	3,1	6,2
19	3,1	1,6	6,2	1,6	1,6

In vivo vurdering er udført ved administrering af forbindelserne subcutant til mus, som udsættes for en stamme af Escherichia coli.

Hver forbindelse administreres i en serie med forskellige dosisniveauer til grupper af mus, og forbindelsens aktivitet bestemmes som det niveau, ved hvilket der opnås 50%'s beskyttelse mod den letale virkning af Escherichia coli organismen over et tidsrum på 72 timer.

Farmaceutisk acceptable syreadditionssalte af de pågældende forbindelser er sådanne, som dannes ud fra syrer som danner ikke toxiske syreadditionssalte indeholdende farmaceutisk acceptable anioner, såsom hydrochlorid, hydrobromid, sulfat eller bisulfat, phosphat eller surt phosphat, acetat, maleat, fumarat, succinat, lactat, tartrat, citrat, gluconat, saccharat, p-toluensulfonat og carbonat.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at en forbindelse med formlen II (se kravet), hvori R^2, R^6 og R^7 har den ovenfor anførte betydning, og hvori en eller flere af de fri aminogrupper, bortset fra 1-aminogruppen, eventuelt kan være beskyttet. alkyleres ved reduktiv alkylering med et tilsvarende hydroxy-substitueret aldehyd eller en tilsvarende hydroxy-substitueret keton, og de aminobeskyttende grupper fjernes, såfremt de har været til stede, og forbindelsen med formlen I isoleres, om ønsket i form af et farmaceutisk acceptabelt syreadditionssalt.

Den eventuelle beskyttelse af frie aminogrupper i forbindelsen med formlen II kan opnås ved omsætning med et reagens som er selektivt med hensyn til frie aminogrupper og som let senere kan fjernes derfra ved sædvanlig teknik, f.eks. ved hydrolyse eller hydrogenolyse. Eksempler på egnede beskyttende grupper er formyl-, acetyl-, trifluoracetyl-, methoxycarbonyl-, t.butyloxycarbonyl- og benzyloxycarbonylgruppen.

I tilfælde af at der er frie aminogrupper til stede foruden 1-amino-gruppen, vil der selvsagt også finde reaktion sted ved disse, og det vil derfor være nødvendigt at adskille det ønskede 1-N-substituerede derivat fra blandingen af produktet, som opnås.

Dette kan ske ved sædvanlig teknik, f.eks. ved ionbytningschromatografi. Det er imidlertid ønskeligt at beskytte nogle eller fortrinsvis alle aminogrupperne bortset fra 1-aminogruppen under alkyleringsreaktionen for at forenkle den afsluttende isolering af det ønskede produkt. I dette tilfælde vil det være nødvendigt at fjerne de beskyttende grupper som et ekstra trin ved fremgangsmåden.

Ved en udførelsesform for fremgangsmåden til fremstilling af forbindelser med formlen I omsættes således et selektivt beskyttet aminoglycosidderivat med formlen II, hvilket derivat har en fri 1-aminogruppe, med aldehydet eller ketonen, hvilken sidstnævnte fortrinsvis anvendes i overskud, og den Schiff-base, som først dannes ved reaktionen reduceres samtidigt eller på trinvis måde til opnåelse af det 1-N-substituerede produkt. Reduktionen kan passende foretages under anvendelse af natriumborhydrid eller natriumcyanoborhydrid som reduktionsmiddel, og udføres bekvemt ved tilsætning af sidstnævnte til reaktionsblandingen ved en pH-værdi sædvanligvis mellem 4 og 7, hvilket muliggør, at reaktionen kan udføres effektivt i et enkelt trin. Alternativt kan blandingen af aminoglycosidet (II) og aldehydet eller ketonen underkastes en konventionel katalytisk hydrogenering.

Reaktionen kan passende udføres med reaktanterne opløst i et for reaktionen indifferent opløsningsmiddel, f.eks. vand eller vandig dioxan eller vandig methanol ved en temperatur mellem 0°C og opløsningsmidlets tilbagesvalingstemperatur. Den tid der kræves til praktisk taget afslutning af reaktionen afhænger selvsagt af reaktanternes natur, af opløsningsmidlet og af den anvendte temperatur, men det har vist sig, at reaktionen mellem aminoglycosidet med formlen II og hydroxysubstitueret aldehyd eller keton (f.eks. glyceraldehyd eller dihydroxyacetone) under tilstedeværelse af et overskud af natriumcyanoborhydrid ved en pH-værdi mellem 4 og 7 sædvanligvis er helt afsluttet inden to døgn, når den udføres i vandig methanol ved en temperatur på 60°C.

Som et andet trin ved fremstillingen er det nødvendigt at fjerne eventuelt tilstedeværende beskyttende grupper for aminogrupperne i aminoglycosidmolekylet. Der er forskellige betingelser som kræves til fuldstændig fjernelse af de aminobeskyttende grupper, afhængigt af naturen af den beskyttende gruppe som er anvendt og af den beskyttede amins omgivelser. Det anvendte medium kan være vandfrit eller vandigt,og i specielle tilfælde kan det være surt eller

basisk i varierende udstrækning. En særligt foretrukket beskyttende gruppe for forbindelserne med formlen II er formylgruppen. Denne kan let fjernes ved mild basisk hydrolyse, f.eks. ved behandling med fortyndet natriumhydroxid ved stuetemperatur i adskilllige timer eller ved opvarmning med hydrazinacetat eller ved mild sur hydrolyse, f.eks. med 5 N saltsyre ved stuetemperatur i adskillige timer. Også egnet er t-butyloxycarbonylgruppen som kan fjernes under sure betingelser, f.eks. ved behandling med vandfri trifluoreddikesyre ved stuetemperatur i op til 45 minutter, benzyloxycarbonylgruppen som kan fjernes ved katalytisk hydrogenolyse, f.eks. ved hydrogenering i vandig eddikesyreopløsning under tilstedeværelse af en palladium-på-trækul-katalysator ved 30°C og et tryk på 50 psi i adskillige timer, og acetylgruppen som fjernes ved opvarmning med 3 N natriumhydroxid til 80-90°C i adskillige timer. Efter fjernelse af de beskyttende grupper oparbejdes produktet på sædvanlig måde, f.eks. ved filtrering og afdampning af opløsningsmidlet, og det rå produkt kan derpå renses ved krystallisation eller ved chromatografi.

Et særligt foretrukket beskyttet aminoglycosidderivat med formlen II til anvendelse ved fremstilling af kanamycin A derivater (med formlen I, hvori R^7 betegner hydrogen, R^2 betegner hydroxyl) er 3,3",6'-tri-N-formyl-kanamycin A. Det tilsvarende 2',3,3",6'-tetra-N-formyl-kanamycin B derivat foretrækkes til fremstilling af 1-N-substituerede kanamycin B derivater (med formlen I, hvori R^2 betegner amino). Ligeledes egnede er de selektivt beskyttede kanamycin A og B derivater, som er beskrevet i britisk patentskrift nr. 1530201, f.eks. 3",6'-di-N-acetyl-kanamycin A og 2',3",6'-tri-N-trifluoracetyl-kanamycin B.

Aminoglycosiderne eller de beskyttede aminoglycosidderivater med formlen II er kendte forbindelser som tidligere er beskrevet i litteraturen. F.eks. er aminoglycosider, som er N-formylerede ved alle aminogrupper bortset fra 1-aminogruppen, hvilke forbindelser omfatter 3,3",6'-tri-N-formyl-kanamycin A og 2',3,3"-6'-tetra-N-formyl-kanamycin B,beskrevet i belgisk patentbeskrivelse nr. 817546. Lignende derivater af andre aminoglycosider kan fremstilles på analog måde. Derivater i hvilke 6'-aminogruppen er beskyttet er velkendte og deres fremstilling er f.eks. beskrevet i britisk patentskrift nr. 1.401.220 og i tysk patentskrift nr. 2.311.524, 2.350.169 og 2.512.587.

Hydroxysubstituerede aldehyder og ketoner som er egnet til anvendelse ved fremgangsmåden til fremstilling af forbindelserne med formlen I er let tilgængelige.

F.eks. giver D-glyceraldehyd, når det anvendes ved fremgangsmåden, et produkt,i hvilket R^1 betegner (S)2,3-dihydroxypropyl. Andre let tilgængelige aldoser og deoxyaldoser kan også anvendes til reaktionen f.eks. D-erythrose, D-ribose og 2-deoxy-D-ribose. Tilsvarende kan dihydroxyacetone anvendes til opnåelse af 1-N-(1,3-dihydroxy-2-propyl)-derivatet.

Til human anvendelse kan de antibakterielle forbindelser administreres alene, men de vil sædvanligvis administreres opblandet med en farmaceutisk bærer udvalgt under hensyntagen til den påtænkte administreringsvej og sædvanlig farmaceutisk praksis.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen illustreres nærmere ved hjælp af nedenstående eksempler. Temperaturen er anført i °C. "Amberlite" og "Sephadex" er registrerede varemærker. Tyndtlagschromatografi blev udført på silicaplader under anvendelse af det angivne opløsningsmiddelsystem. Pletterne blev gjort synlige efter tørring af pladerne ved påsprøjtning af en 5%'s opløsning af t-butylhypochlorit i cyclohexan, tørring af pladerne ved 100°C i 10 minutter i ventileret ovn og afkøling og sprøjtning med stivelse-kaliumiodid-opløsning.

Eksempel 1

1-N-[(S)-2,3-Dihydroxypropyl]kanamycin A.

100 mg, 0,18 mmol 3,3",6'-tri-N-formyl-kanamycin A, 31,6 mg 0,35 mmol, D-glyceraldehyd og 33 mg, 0,652 mmol, natriumcyanoborhydrid blev opløst i vandig methanol (10 ml methanol, 2 ml vand) og opløsningens pH-værdi indstillet til 6,0 med 5 N saltsyre. Opløsningen blev holdt ved stuetemperatur i 40 timer. Opløsningsmidlet blev derpå afdampet under reduceret tryk, og remansen behandlet med 1 N natriumhydroxid og henstillet ved stuetemperatur i yderligere 20 timer. Efter koncentrering under reduceret tryk blev remanensen chromatograferet på en søjle af "Amberlite" CG-50 ionbytterharpiks i NH_4^+ form. Elueringen blev foretaget med en ammoniumhydroxidgradient med koncentration stigende fra 0 til 0,1 N, til opnåelse af 66 mg, 67%, 1-N- [(S)-2,3-dihydroxypropyl]kanamycin A. Rf 0,27 i 1 M vandig natriumchlorid (kanamycin A gav en Rf-værdi

på 0,21), Rf 0,70 i methanol, 0,880 ammoniumhydroxid 1:2 (kanamycin A, 0,70).

Analyse:

Fundet: C 40,1; H 7,0; N 8,3;

$C_{21}H_{42}N_4O_{13}, 2H_2CO_3$ svarer til C 40,5; H 6,08 og N 8,2%.

En prøve blev omdannet til det flygtige tetra-N-acetyl-nona-O-trimethylsilylderivat ved behandling med eddikesyreanhydrid i methanol ved stuetemperatur i 24 timer efterfulgt af omsætning med en 2:1 blanding af hexamethyldisilazan og trimethylchlorsilan ved stuetemperatur i 24 timer. m/e fundet 1285. $C_{56}H_{122}N_4O_{17}Si_9$ minus en C_3H_9OSi-gruppe svarer til m/e 1285.

Eksempel 2

1-N-[(S)(R)2,3,4-Trihydroxybutyl]kanamycin A.

En opløsning af 100 mg, 0,18 mmol, 3,3",6'-tri-N-formyl-kanamycin A, 107 mg, 0,90 mmol, D-erythrose og 66 mg, 1,04 mmol, natriumcyanoborhydrid i en blanding af 10 ml methanol og 2 ml vand ved pH 6,0 blev opvarmet til 60° i 50 timer. Opløsningen blev koncentreret under reduceret tryk. Remanensen blev opløst i 12 ml 10% hydrazinhydrat, opløsningens pH-værdi indstillet til 6,0 med iseddikesyre og opløsningen derpå opvarmet under tilbagesvaling i 6 timer. Opløsningsmidlet blev afdampet under reduceret tryk, og remanensen chromatograferet på "Amberlite" CG-50 som beskrevet i eksempel 1, efterfulgt af chromatografi af hovedfraktionen indeholdende produktet på "Sephadex" CM 25 (NH_4^+ form), eluering med en gradient af ammoniumhydroxid som før til opnåelse af 1-N-[(S)(R)-2,3,4-trihydroxybutyl]kanamycin A (37 mg, 36%). Rf 0,29 i methanol, 0,880 ammoniumhydroxid 2:1 (kanamycin A: 0,32).

Analyse:

Fundet: C 41,6; H 6,6; N 7,9

$C_{22}H_{44}N_4O_{14}, 2H_2CO_3$ svarer til C 40,5; H 6,8; N 7,9%.

Eksempel 3

1-N-[(S)(S)(R)2,3,4,5-Tetrahydroxypentyl]kanamycin blev fremstillet under anvendelse af den i eksempel 2 anførte fremgangsmåde, men med 2-ribose som udgangsmateriale. Rf 0,68 i methanol, 0,880 ammoniumhydroxid 1:2 (kanamycin A: 0,70).

Eksempel 4

1-N-[(S)(R)3,4,5-Trihydroxypentyl]kanamycin A blev fremstillet under anvendelse af den i eksempel 2 anførte fremgangsmåde, men med 2-deoxy-D-ribose. Rf 0,68 i methanol, 0,880 ammoniumhydroxid 1:2 (kanamycin A: 0,70).

Eksempel 5

1-N-[(S)(R)(R)(R)2,3,4,5-Pentahydroxyhexyl]kanamycin A blev fremstillet under anvendelse af den i eksempel 2 anførte fremgangsmåde, men med D-glucose. Rf 0,55 i methanol, 0,880 ammoniumhydroxid 1:2 (kanamycin A: 0,71).

Eksempel 6

1-N-[(R)(S)(R)2,3,4,5-Tetrahydroxypentyl]kanamycin A blev fremstillet under anvendelse af den i eksempel 2 anførte fremgangsmåde, men med D-arabinose. RF 0,34 i methanol, 0,880 ammoniumhydroxid 1:1 (kanamycin A: 0,49).

Eksempel 7

1-N-[(S)(R)(R)2,3,4,5-Tetrahydroxypentyl]kanamycin A.

En opløsning af 100 mg, 0,18 mmol,3,3",6'-tri-N-formyl-kanamycin A, 79 mg, 0,53 mmol, D-xylose og 44 mg, 0,68 mmol natrium-cyanoborhydrid i 10 ml vand ved pH 4,6 blev opvarmet til 90° i 3 1/2 time. Opløsningsmidlet blev afdampet under reduceret tryk og remansen opløst i 10 ml 5 N saltsyre og omrørt ved 30° i 16 timer. Opløsningsmidlet blev afdampet og remansen chromatograferet på en søjle af "Amberlite" CG-50 ionbytterharpiks (NH_4^+-form) under eluering med en gradient af ammoniumhydroxid med stigende koncentration fra 0 til 0,2 N til opnåelse af 1-N-[(S)(R)(R)2,3,4,5-tetrahydroxypentyl]kanamycin A (56 mg, 51%). Rf 0,58 i methanol, 0,880 ammoniumhydroxid 1:2 (kanamycin A gav en Rf-værdi på 0,66).

Eksempel 8

1-N-[(R)(S)(S)2,3,4,5-Tetrahydroxypentyl]kanamycin A blev fremstillet under anvendelse af fremgangsmåden ifølge eksempel 7 men med L-xylose som udgangsmateriale. Rf 0,34 i methanol, 0,88 ammoniumhydroxid 1:1 (kanamycin A: 0,50).

Eksempel 9

1-N-[(R)(R)(S)2,3,4,5-Tetrahydroxypentyl]kanamycin A blev fremstillet under anvendelse af fremgangsmåden ifølge eksempel 7 men med anvendelse af L-ribose som udgangsmateriale. Rf 0,38 i methanol, 0,88 ammoniumhydroxid 1:1 (kanamycin A: 0,51). m/e (feltdesorption) M + 1:619.

Eksempel 10

1-N-[(R)(R)(R)2,3,4,5-Tetrahydroxypentyl)kanamycin A blev fremstillet under anvendelse af fremgangsmåden ifølge eksempel 7 men med anvendelse af D-xylose som udgangsmateriale. Rf 0,37 i methanol, 0,880 ammoniumhydroxid 1:1 (kanamycin A: 0,48).

Eksempel 11

1-N-[(S)2,3-Dihydroxypropyl]kanamycin B.

En opløsning af 45 mg, 0,5 mmol, D-glyceraldehyd i 1 ml methanol blev sat til en opløsning af 100 mg, 0,17 mmol, 2',3,3",6'-tetra-N-formyl-kanamycin B i 5 ml methanol og 1 ml vand.

20 mg, 0,3 mmol natriumcyanoborhydrid blev sat til den omrørte opløsning, pH-værdien indstillet til 6,0 med 5 N saltsyre, og opløsningen omrørt ved stuetemperatur natten over. Opløsningen blev inddampet til tørhed under reduceret tryk, og remanensen optaget i 5 N saltsyre, hvorpå opløsningen blev henstillet natten over ved stuetemperatur. Opløsningens pH-værdi blev indstillet til 6,0 med natriumhydroxidopløsning, og opløsningen chromatograferet på "Amberlite" CG-50 som beskrevet i eksempel 1. Frysetørring af de relevante fraktioner gav 53 mg, 56%, 1-N-[(S)2,3-dihydroxypropyl]-kanamycin B. Rf 0,51 i 3 M vandig natriumchloridopløsning (kanamycin B: 0,42), Rf 0,54 i methanol, 0,880 ammoniumhydroxid 1:1 (kanamycin B: 0,58). Feltdesorptionsmassespektrometri udviste en kraftig M + 1 spids ved m/e 558. $C_{21}H_{43}N_5O_{12}$ svarer til M + 1 = 558.

Eksempel 12

1-N-[(S)(R)2,3,4-Trihydroxybutyl]kanamycin B blev fremstillet under anvendelse af fremgangsmåden ifølge eksempel 11,men med D-erythrose som udgangsmateriale. Rf 0,60 i 3 M natriumchloridopløsning (kanamycin B: 0,45).

Eksempel 13

1-N-[(S)(S)(R)2,3,4,5-Tetrahydroxypentyl]kanamycin B blev fremstillet under anvendelse af fremgangsmåden ifølge eksempel 11, men med D-ribose. Rf 0,3 i 2 M natriumchloridopløsning (kanamycin B: 0,2).

Eksempel 14

1-N-[(S)(R)3,4,5-Trihydroxypentyl]kanamycin B blev fremstilet under anvendelse af fremgangsmåden ifølge eksempel 11, men med 2-deoxy-D-ribose. Rf 0,3 i 2 M natriumchloridopløsning (kanamycin B: 0,2).

Eksempel 15

1-N-[(S)(R)(R)(R)2,3,4,5-Pentahydroxyhexyl]kanamycin B blev fremstillet under anvendelse af fremgangsmåden ifølge eksempel 11, men med D-glucose. Rf 0,25 i methanol, 0,880 ammoniumhydroxid 1:1 (kanamycin B: 0,42).

Eksempel 16

1-N-(2,3-Dihydroxy-2-hydroxymethylpropyl)kanamycin B blev fremstillet under anvendelse af fremgangsmåden ifølge eksempel 11, men med DL-2-hydroxymethyl-2,3-O-isopropyliden-glyceraldehyd. Rf 0,55 i 3 M natriumchloridopløsning (kanamycin B: 0,42). m/e (feltdesorption) M + 1 fundet 588. $C_{22}H_{45}N_5O_{13}$ svarer til M + 1 = 588.

Eksempel 17

1-N-[(R)2,3-Dihydroxypropyl]kanamycin B blev fremstillet under anvendelse af fremgangsmåden ifølge eksempel 11, men med L-glyceraldehyd som udgangsmateriale. Tyndtlagschromatografi viste identitet med produktet fra eksempel 11.

Eksempel 18

1-N-[1,3-Dihydroxy-2-propyl]kanamycin A.

200 mg, 0,36 mmol, 3,3",6'-tri-N-formyl-kanamycin A, 95 mg, 1,05 mmol, dihydroxyacetone og 88 mg, 1,40 mmol, natriumcyanoborhydrid blev opløst i 20 ml methanol og 4 ml vand, og pH-værdien af opløsningen blev indstillet til 6,6 med 5 N saltsyre. Opløsningen blev opvarmet under tilbagesvaling i 22 timer. Yderligere 95 mg dihydroxyacetone og 88 mg natriumcyanoborhydrid blev tilsat, og pH-

værdien indstillet til 5,5. Tilbagesvalingen blev fortsat i yderligere 24 timer, og opløsningsmidlet derpå afdampet under reduceret tryk, hvorefter remanensen blev behandlet med 10% hydrazinhydrat/eddikesyre ved pH 6,0 (20 ml) og opvarmet under tilbagesvaling i 6 timer. Efter koncentration under reduceret tryk blev remanensen chromatograferet på en søjle af "Amberlite" CG-50 ionbytterharpiks (NH_4^+-form) under eluering med en gradient af ammoniumhydroxid med øgende koncentration fra 0 til 0,1 N. Fraktioner indeholdende produktet (bestemt ved tyndtlagschromatografi) blev forenet og inddampet, og produktet genchromatograferet på "Sephadex" CM25 (ammoniumionform), idet der blev elueret som før til opnåelse af 0,11 g, 57%, 1-N-[1,3-dihydroxy-2-propyl]kanamycin A. Rf 0,40 i methanol, 0,880 ammoniumhydroxid 2:1 (kanamycin A: 0,30).

Analyse:

Fundet: C 40,6; H 6,5; N 8,4

$C_{21}H_{42}N_4O_{13}, 2H_2CO_3$ svarer til C 40,5; H 6,8; N 8,2%.

Eksempel 19

1-N-[1,3-Dihydroxy-2-propyl]kanamycin B.

88 mg, 1,40 mmol, natriumcyanoborhydrid blev sat til en opløsning af 200 mg, 0,33 mmol, 2',3,3",6'-tetra-N-formyl-kanamycin B og 95 mg, 1,05 mmol dihydroxyacetone i 12 ml methanol og 3 ml vand. Opløsningens pH-værdi blev indstillet til 4,5 med 2 N saltsyre,og opløsningen blev opvarmet under tilbagesvaling i 20 timer. Opløsningsmidlet blev afdampet under reduceret tryk, og remanensen optaget i 10 ml vand. 2 ml 60%'s hydrazinhydrat blev tilsat, pH-værdien indstillet til 6 med 2 ml iseddikesyre, og opløsningen opvarmet under tilbagesvaling til 6 timer og derpå inddampet under reduceret tryk til en gummiagtig masse. Produktet blev opløst i 8 ml vand, pH-værdien indstillet til 5,5 med 0,2 N saltsyre, og opløsningen chromatograferet på en kolonne af "Amberlite" CG-50 ionbytterharpiks i ammoniumionform, idet der først blev elueret med vand og derpå med en gradient af ammoniumhydroxid med øgende koncentration til 0,25 N. Fraktioner indeholdende produktet (bestemt ved tyndtlagschromatografi) blev forenet og inddampet, og produktet genchromatograferet på en kolonne af "Sephadex" CM25 (ammoniumform),idet der blev elueret som før til opnåelse af 59 mg, 32%, 1-N-[1,3-dihydroxy-2-propyl]kanamycin B. Rf 0,55 i methanol, 0,880 ammoniumhydroxid (1:1) (kanamycin B: 0,47), Rf 0,37 i 2 M natriumchlorid (kanamycin B: 0,26).

Analyse:

Fundet:	C 37,6;	H 6,3;	N 9,2
$C_{21}H_{43}N_5O_{12},3H_2CO_3,H_2O$ svarer til	C 37,8;	H 6,8;	N 9,2%.

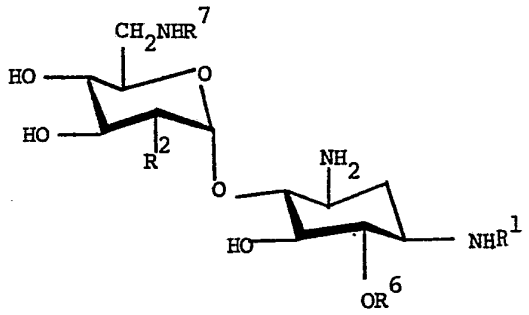
Eksempel 20

1-N-(1,3-Dihydroxy-2-propyl)kanamycin A.

500 mg, 0,88 mmol, 6',3"-di-N-acetyl-kanamycin A, 237 mg, 2,64 mmol, 1,3-dihydroxyacetone og 181 mg, 2,64 mmol, natriumcyanoborhydrid blev opløst i 45 ml methanol og 5 ml vand, og pH-værdien af opløsningen indstillet til 6,0 med 2 N saltsyre. Opløsningen blev henstillet i stuetemperatur i 3 døgn. Tyndtlagschromatografi (methanol, chloroform, 1-N-ammoniumhydroxid 4:2:1) viste to hovedkomponenter med Rf-værdi henholdsvis 0,17 og 0,22. Opløsningen blev inddampet og produkterne adskilt ved ionbytningschromatografi på "Sephadex" CM25 i ammoniumionform, idet elueringen skete med en gradient af ammoniumhydroxid med øgende koncentration. Den langsommere løbende komponent (Rf 0,17),som var den anden komponent som blev elueret fra kolonnen blev befriet for beskyttelsesgrupper ved opvarmning i 3 N natriumhydroxidopløsning til 80-90°C i 4 timer. Neutralisation og rensning ved ionbytningschromatografi på "Amberlite" CG-50 (ammoniumionform) med eluering som før gav 1-N-(1,3-dihydroxy-2-propyl)kanamycin A identisk med produktet fra eksempel 18.

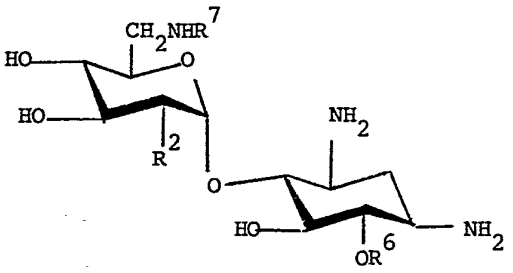
P A T E N T K R A V

Analogifremgangsmåde til fremstilling af kanamycin A eller kanamycin B-derivater med formlen I



I

hvori R^1 betegner en primær eller sekundær alkylgruppe med 3 - 7 carbonatomer, af hvilke i det mindste to, der er forskellige fra det carbonatom, som er knyttet til aminogruppen, bærer hydroxylgrupper, R^2 betegner en amino- eller hydroxylgruppe, R^6 betegner en 3-amino-3-deoxy-α-D-glucopyranosylgruppe og R^7 betegner et hydrogenatom eller en C_1-C_4-alkylgruppe, eller farmaceutisk acceptable syreadditionssalte deraf, k e n d e t e g n e t ved, at en forbindelse med formlen II



II

hvori R^2, R^6 og R^7 har den ovenfor anførte betydning, og hvori en eller flere af de fri aminogrupper, bortset fra 1-aminogruppen, eventuelt kan være beskyttet, alkyleres ved reduktiv alkylering med et tilsvarende hydroxy-substitueret aldehyd eller en tilsvarende hydroxy-substitueret keton, og de aminobeskyttende grupper fjernes, såfremt de har været til stede, og forbindelsen med formlen I isoleres, om ønsket i form af et farmaceutisk acceptabelt syreadditionssalt.

Fremdragne publikationer:

DK ans.nr. 3461/72 (pat.136251), 986/74 (pat.140259) 4811/75 (p.147075)
DE B2 2437160
The Journal of Antibiotics, 1974, bind XXVII, nr. 11, side 851-858.