

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

147 396

Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 86 07 14 (P. 260 615)

Pierwszeństwo: 85 10 10 Włochy

Zgłoszenie ogłoszono: 87 06 15

Opis patentowy opublikowano: 89 08 31

CZYTELNIĄ

Urzędu Patentowego
M. 4 B. 1 (10000)

Int. Cl.⁴ C07H 15/234

Twórcy wynalazku: Alberto Mangia, Vincenzo Giobbio, Giorgio Ornato

Uprawniony z patentu: Pierrel S.p.A., Neapol (Włochy)

SPOSÓB WYTWARZANIA AMIKACYNY

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania amikacyny, to jest 0-3-amino-3-dezoksy- α -D-glukopiranozylo-/1 $\rightarrow$ 6/-O-[6-amino-6-dezoksy- α -D-glukopiranozylo-/1 $\rightarrow$ 4/]-N¹-
-/4-amino-2-hydroksy-1-ketobutylo-2-dezoksy-D-streptaminy o wzorze 1.

Amikacyna jest półsyntetycznym antybiotykiem, szeroko stosowanym w medycynie, zwykle otrzymywanym przez acylowanie kanamycyny A o wzorze 2 kwasem L-/-/4-amino-2-hydroksymasłowym o wzorze 3, zwanym dalej L-HABA.

Po raz pierwszy opisano amikacynę w publikacji H. Kawaguchi i in. w Journ. of Antib. XXV, 1972, str. 695 i w opisie patentowym St. Zjed. Am. nr 3 781 268. Zarówno w literaturze patentowej jak i nie patentowej podano wiele sposobów, mających na celu wytwarzanie amikacyny z coraz to większą wydajnością i czystością.

Jak widać z wzoru 2, cząsteczka kanamycyny A ma 4 grupy aminowe, które mogą być acylowane. Dwie z nich znajdują się w środkowym pierścieniu 2-dezoksystreptaminy i są nazwane odpowiednio N-1 i N-3, trzecia grupa, zwana N-6', jest w pierścieniu 6-amino-6-dezoksy-D-glukozy, a czwarta, zwana N-3", jest w pierścieniu 3-amino-3-dezoksy-D-glukozy.

W chemicznej syntezie amikacyny trudności sprawiało regioselektywne acylowanie grupy aminowej w pozycji 1, powstałe trzy grupy aminowe poddawane acylowaniu prowadzą bowiem do wytwarzania izomerów położenia o mniejszej aktywności mikrobiologicznej oraz powodują zmniejszenie wydajności stechiometrycznej produktu głównego - amikacyny. Poza tym, ze względu na powstawanie podczas syntezy amikacyny szeregu izomerów położenia, konieczne jest oczyszczanie, możliwe tylko na drodze chromatografii i wymiany jonowej na żywicy jonowymiennej, co powoduje dalsze zmniejszenie wydajności głównego produktu.

Faktycznie, jak podano w publikacji T. Naito i in., Journal of Antib. XXVI, 297, (1973), przy acylowaniu kwasem L-/-/4-amino-2-hydroksymasłowym powstają oprócz amikacyny izomery o wzorze 4, w którym: R' oznacza grupę -CO-CH(OH)-CH₂CH₂NH₂, a R i R" oznaczają atomy wodoru (izomer oznaczony symbolem BB-K6). R" oznacza grupę -CO-CH(OH)-CH₂CH₂NH₂, a R i R' oznaczają

atomy wodoru (izomer oznaczony symbolem BB-K11), albo R oznacza grupę $-\text{CO}-\text{CH}/\text{OH}/-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, a R' i R'' oznaczają atomy wodoru (izomer oznaczony symbolem BB-K29).

Według podanej wyżej publikacji T. Naito i in., jak również według innych publikacji, bezpośrednie acylowanie kanamycyny A prowadzi głównie do wytwarzania pochodnej acylowanej N-6', to jest w grupie aminowej najbardziej podatnej do reakcji. Z tego też powodu, nie można wytwarzać amikacyny przez bezpośrednie acylowanie kwasem L-/-/-4-amino-2-hydroksymasłowym.

W praktyce, gdy mówi się o reakcji z kwasem L-/-/-4-amino-2-hydroksymasłowym, to faktycznie chodzi o reakcję z jego pochodną, w której grupa aminowa w pozycji 4 jest zabezpieczona, a grupa karboksylowa jest zaktywowana, aby mogła reagować łatwo i z dużą wydajnością z grupą aminową kanamycyny.

W szczególności, grupami zabezpieczającymi mogą być znane grupy, stosowane do zabezpieczania funkcji aminowych, np. grupa III-rzęd. butoksykarbonylowa, którą po zakończeniu reakcji można łatwo usuwać przez działanie rozcieńczonym kwasem, albo grupa benzyloksykarbonylowa lub 4-nitrobenzyloksykarbonylowa, które mogą być usuwane przez katalityczną hydrogenolizę na palladzie lub platynie. Można też stosować inne, podobne grupy zabezpieczające, podane w publikacji *Protective Groups in Organic Synthesis*, T.W. Greene, J. Wiley and Sons, Inc., 1981, strony 218-287. Jednakże, jedną z postaci związku stosowanego do acylowania stanowi związek, w którym grupa karboksylowa jest odpowiednio uaktywniona przez wytworzenie aktywnego estru z N-hydroksymidem kwasu bursztynowego, N-hydroksymidem kwasu ftalowego lub N-hydroksymidem kwasu norborn-5-enodwukarboksylowego-2,3 albo przez wytworzenie mieszanego bezwodnika z kwasem piwalinowym, benzoesowym lub benzylokarboksylowym.

Pierwszą syntezę amikacyny przeprowadził H. Kawaguchi i in. (cytowane wyżej publikacje), pokonując przeszkodę w postaci większej zdolności do reakcji grupy aminowej w pozycji 6' kanamycyny, poddając tę grupę reakcji z grupą zabezpieczającą, taką jak grupa benzyloksykarbonylowa. Otrzymaną N-6'-benzyloksykarbonylokanamycynę o wzorze 5 następnie acylowano. Acylowanie to nie przebiega jednak regioselektywnie i po prowadzonym następnie uwodornianiu w celu usunięcia wszystkich zabezpieczających grup N-benzyloksykarbonylowych, oprócz amikacyny otrzymuje się również pewną ilość powstałych w procesie izomerów położenia BB-K11 i BB-K29 i produktów poliacylowania.

Otrzymana w ten sposób kompleksowa mieszanina wymaga selektywnego rozdzielenia na żywicy jonowymiennej. Dzięki chromatografii uzyskuje się surową amikacynę z wydajnością stechiometryczną wynoszącą 22%, która następnie maleje w wyniku kolejnych procesów oczyszczania dla otrzymania czystej amikacyny. Bardzo niski poziom wydajności powyższego procesu syntezy wymaga zastosowania nowej, wydajniejszej i mniej kosztownej metody, nawet jeśli obejmowałaby ona więcej etapów pośrednich. T. Naito, S. Nakagawa i M. Oka we francuskim opisie patentowym nr 2 273 009 poddają 6'-N-benzyloksykarbonylową pochodną kanamycyny A o wzorze 5 reakcji z niektórymi aldehydami aromatycznymi w proporcji przynajmniej 3 moli aldehydu na 1 mol 6'-N-benzyloksykarbonylokanamycyny A, powodując utworzenie pomiędzy wolnymi grupami aminowymi w pozycji 1, 3 i 3' i odpowiednimi aldehydami zasad Schiffa. Otrzymany związek o wzorze 6, zawierający 3 reszty aldehydowe na 1 mol 6'-benzyloksykarbonylokanamycyny, jest acylowany następnie odpowiednią pochodną kwasu L-HABA i po odłączeniu drogą hydrogenolizy grup zabezpieczających otrzymuje się amikacynę. Acylowanie wspomnianych trzech grup aminowych w pozycji 1, 3 i 3' nie przebiega jednak selektywnie i konieczne jest oczyszczanie produktu głównie od izomerów BB-K29 i BB-K11 amikacyny na drodze chromatografii na jonowymiennej żywicy. Wydajność stechiometryczna przytoczonego procesu otrzymywania amikacyny wynosi jedynie 23% i praktycznie nie różni się od wydajności procesu uprzednio omówionego. Poza tym, wydajności te obliczono w oparciu o produkt pośredni - 6'-benzyloksykarbonylokanamycynę o wzorze 5, który z kolei jest otrzymywany z kanamycyny A z wydajnością stechiometryczną wynoszącą 45 - 56%.

Reasumując, przytoczone dwa sposoby syntezy amikacyny z kanamycyny A jako produktu wyjściowego przebiegają z bardzo niską całkowitą wydajnością wynoszącą 10 - 13% wydajności teoretycznej.

Postęp w selektywnym acylowaniu kanamycyny A w celu wytworzenia amikacyny przyniosły badania M.J. Cron i innych, opisane w Chem. Comm., 266 (1979) i w opisach patentowych St. Zjed. Am. nr 4 347 354 i 4 424 343. W tych opisach patentowych ujawniono wytwarzanie amikacyny przez acylowanie polisililowanej pochodnej kanamycyny A, która może mieć w pozycji 6' lub w pozycjach 6' i 3 grupy zabezpieczające inne niż grupa sililowa. W szczególności, wytwarzanie polisililowanej pochodnej kanamycyny lub zabezpieczonej kanamycyny prowadzi się poddając substrat kanamycynowy w odpowiednim rozpuszczalniku organicznym, korzystnie w acetonitrylu, reakcji z kilkoma środkami silanizującymi, a zwłaszcza z sześciometyldwusilazanem. W wyniku tej reakcji otrzymuje się pochodne, w których wszystkie grupy hydroksylowe w kanamycynie, lub ich część, są zabezpieczone grupą $-Si/CH_3/3$. Po przeprowadzeniu zwykłej hydrogenolizy, w tym przypadku tylko dla usunięcia zabezpieczającej grupy kwasu L-HABA, nadal jednak otrzymuje się mieszaninę izomerów położenia oraz wyjściowej kanamycyny i produktów poliacylowania, toteż konieczne jest chromatograficzne rozdzielanie produktów. Proces ten, aczkolwiek umożliwia wytwarzanie amikacyny ze znacznie zwiększoną wydajnością, to jednak wykazuje poważne wady z punktu widzenia ochrony środowiska naturalnego. Mianowicie, acetonitryl będący w tej reakcji korzystnym rozpuszczalnikiem, jest silnie toksyczny i jego stosowanie na skalę przemysłową jest wysoce nie wskazane. Poza tym, sześciometyldwusilazan wytwarza podczas reakcji gazowy amoniak, który należy usuwać w odpowiedni sposób, aby nie zanieczyszczać atmosfery.

Inna metoda wytwarzania amikacyny jest oparta na badaniach T. Tsuchiya i innych, Tet. Lett., 4951 (1979) i belgijski opis patentowy nr 879 925. Synteza ta polega na wytwarzaniu jako produktu pośredniego pochodnej o wzorze 7, zabezpieczonej w pozycjach N-6' oraz N-3 zwykłą grupą N-benzylloksykarbonylową. Ten produkt pośredni, otrzymany przez wytwarzanie związków kompleksowych pomiędzy grupą aminową w pozycji 3" i w pozycji 1 z octanem cynku i odpowiednimi grupami hydroksylowymi w pozycjach sąsiadujących z wspomnianymi wyżej grupami aminowymi, był już opisany w publikacji T.L. Nagabhushan i innych w J. Amer. Chem. Soc., 100, 5254 (1978) i w opisie patentowym St. Zjed. Am. nr 4 136 254, według którego proces wytwarzania polegał na kompleksowaniu z kilkoma metalami.

Według opisu patentowego St. Zjed. Am. nr 4 136 254 ten "dwu-zabezpieczony" produkt pośredni przeprowadza się w antybiotyku aminoglikozydowy przez bezpośrednie acylowanie acylującą pochodną kwasu L-HABA, co jednak w przypadku amikacyny zachodzi z niezadowalającą wydajnością całkowitą.

W odróżnieniu od tego, według belgijskiego opisu patentowego nr 879 925 ten produkt pośredni poddaje się najpierw reakcji z trójfluorooctanem etylu, aby zabezpieczyć grupę aminową w pozycji 3", a następnie z pochodną L-HABA dobraną tak, aby spowodować selektywne acylowanie tylko jednej wolnej grupy aminowej, to jest w pozycji 1. Dwie różne grupy zabezpieczające, to jest grupę trójfluoroacetylową i benzylloksykarbonylową, usuwa się następnie odpowiednio za pomocą amoniaku i wodoru, kończąc w ten sposób proces. W tym przypadku również wydajność amikacyny jest wyraźnie większa, ale proces ten nie jest dogodny do stosowania w skali przemysłowej, a to z uwagi na stosowanie trójfluorooctanu etylu, który jest wysoce toksyczny i bardzo kosztowny.

Proces według wynalazku polega na tym, że kanamycynę A zabezpieczoną w pozycjach 6' oraz 3 poddaje się reakcji z solą dwuwartościowego kationu metalu, takiego jak cynk, nikiel, żelazo, kobalt, mangan, miedź i kadm lub ich mieszaniny, po czym otrzymany kompleks poddaje się reakcji z odpowiednio wybraną, zdolną do reakcji pochodną kwasu L-HABA. Następnie usuwa się kation metalu przez dodawanie zasadowego roztworu aż do uzyskania wartości pH 9 - 10, po czym produkt acylowania oddziela się znanymi metodami, usuwa grupy zabezpieczające grupy aminowe w pozycjach 6' i 3 oraz w łańcuchu bocznym i otrzymany surowy produkt oczyszcza się chromatograficznie, otrzymując amikacynę z wydajnością zbliżoną do 50% wydajności teoretycznej.

Cechą procesu według wynalazku jest to, że pierwszy etap procesu, to jest reakcję kanamycyny A, zabezpieczonej w pozycjach 3 i 6', z solą dwuwartościowego kationu metalu prowadzi się w obecności wody jako rozpuszczalnika lub współrozpuszczalnika. Nieoczekiwanie stwierdzono bowiem, że jeżeli proces wytwarzania kompleksu prowadzi się w rozpuszczalniku

bezwodnym, wówczas w następnym etapie reakcja acylowania nie zachodzi wcale (0% acylowania). Natomiast, jeżeli reakcję tę prowadzi się w środowisku wodnym lub w mieszaninie wody z obojętnym rozpuszczalnikiem organicznym mieszającym się z wodą, wówczas następnie proces acylowania przebiega bardzo korzystnie, mianowicie reakcja acylowania w pozycji 1 przebiega w 95%, a w pozycji 3 w 5%. Zaletą tak prowadzonego procesu jest również to, że wytworzonego kompleksu nie trzeba wyosobniać i dalszy etap procesu prowadzi się w tym samym środowisku.

Niezależnie od tego, jaką pochodną kanamycyny A stosuje się jako produkt wyjściowy, grupy aminowe w pozycjach 6' i 3 tego związku są zabezpieczone przez zastąpienie atomu wodoru grupą acylową, taką jak na przykład grupa benzyloksykarbonylowa lub podstawiona grupa benzyloksykarbonylowa, taka jak grupa p-nitrobenzyloksykarbonylowa lub p-metoksybenzyloksykarbonylowa, grupa alkoksykarbonylowa, taka jak III-rzęd.butoksykarbonylowa lub III-rzęd. amyloksykarbonylowa, grupa ftaloilowa, grupa ochlorowcoalkilokarbonylowa, taka jak trójfluoroacetylowa lub ochloroacetylowa, lub inne odpowiednie grupy zabezpieczające.

Korzystnie jednak, grupy aminowe w pozycji 6' i 3 powinny być zabezpieczone grupą benzyloksykarbonylową lub podstawioną grupą benzyloksykarbonylową gdyż, jak podano wyżej, te grupy mogą być po zakończeniu reakcji łatwo usunięte przez katalityczną redukcję. Produkt wyjściowy tego typu może być wytwarzany według metody podanej w belgijskim opisie patentowym nr 855 704 lub według metody podanej w kanadyjskim opisie patentowym nr 1 131 628. W pierwszym etapie procesu zgodnie z wynalazkiem produkt wyjściowy czyli kanamycynę A zabezpieczoną w pozycji 3 i 6' i przynajmniej równomolową ilość wybranej soli dwuwartościowego metalu rozpuszcza się w wodzie lub w mieszaninie wody z obojętnym mieszającym się z wodą organicznym rozpuszczalnikiem, takim jak np. sulfotlenek dwumetylu, dwumetyloformamid, niższy alkohol alifatyczny, tetrahydrofuran, aceton i acetonitryl.

Dwuwartościowym kationem może być kation metalu takiego jak cynk, nikiel, żelazo, kobalt, mangan, miedź i kadm, a zwłaszcza metalu mniej toksycznego i tańszego, natomiast anionem może być jakikolwiek organiczny bądź nieorganiczny anion, chociaż bardziej korzystnymi są aniony pochodzące ze słabych kwasów organicznych, zwłaszcza z takich jak kwas octowy, propionowy i benzoesowy, których sole ze wspomnianymi metalami wykazują na ogół większą aktywność w tworzeniu kompleksów. Wspomnianą sól stosuje się w ilości w stosunku molowym do produktu wyjściowego od 1 : 1 do 10 : 1, korzystnie od 2 : 1 do 6 : 1. Reakcję prowadzi się w temperaturze pokojowej, mieszając. Kiedy kompleks zostanie utworzony, przeprowadza się drugi etap procesu, polegający na tym, że nie przerywając mieszania dodaje się roztwór lub zawiesinę wcześniej dobranej reaktywnej pochodnej kwasu L-HABA w polarnym i aprotycznym rozpuszczalniku organicznym, którym może być sulfotlenek dwumetylu, acetonitryl, tetrahydrofuran, dwumetyloformamid, a korzystnie chlorowcowane węglowodory alifatyczne, takie jak chlorek metylenu, chloroform, 1,2-dwuchloroetan itp.

Również ten etap reakcji prowadzi się korzystnie w temperaturze pokojowej, chociaż w obydwu etapach dopuszcza się umiarkowane ogrzewanie w celu przyspieszenia reakcji, korzystnie z nadmiarem pochodnej kwasu L-HABA ewentualnie wynoszącym 20 - 60%. Po kilku godzinach mieszania, ewentualnie obecną fazę organiczną usuwa się na drodze destylacji jeśli rozpuszczalnik jest niskowrzący lub oddziela mechanicznie i do mieszaniny reakcyjnej dodaje się wodny roztwór zasadowy aż wartość pH mieszaniny wynosić będzie 9 - 10. Jako czynnik alkalicujący stosuje się alkaliczne wodorotlenki lub węglany albo korzystnie NH_4OH . Dodanie ocyznika alkalicznego powoduje rozpad kompleksu z odłączeniem się kationu metalu i wytrącenie się 3,6'-dwuzabezpieczonego produktu acylowania, który oddziela się przez odsączenie. Grupy zabezpieczające w pozycji 3 i 6', a także z łańcuchów bocznych usuwa się znanymi metodami. Na przykład, kiedy zgodnie z korzystnym wariantem sposobu według wynalazku grupami zabezpieczającymi są grupy benzyloksykarbonylowe, ewentualnie podstawione, to usuwa się je na drodze zwykłej katalitycznej hydrogenolizy z katalizatorem, którym może być platyna, pallad, tlenek palladu lub tlenek platyny. Jeżeli grupami zabezpieczającymi są grupy ftaloilowe, są one łatwo usuwane przez hydrolizę za pomocą hydrazyny natomiast zabezpieczające grupy III-rzęd. butoksykarbonylowe są łatwo usuwane kwasem mrówkowym itp. Otrzymany w ten sposób surowy produkt oczyszcza się techniką chromatografii znaną z literatury dla oczyszczania amikacyny.

Zgodnie z procesem według wynalazku, acylowanie 3,6'-dwu-N-zabezpieczonej kanamycyny A przebiega po utworzeniu jej kompleksu z kationem metalu i zachodzi ono z nieoczekiwaną wysoką regio-selektywnością, ponieważ powstaje jedynie amikacyna, a nie BB-K11 lub pochodna podwójnie acylowana w pozycji 1 i 3". Tak dobry rezultat powoduje prawdopodobnie różnica w stabilności kompleksów powstałych w pozycjach N-3" i N-1 (N-3" >> N-1) w warunkach reakcji.

Poniżej zestawiono wydajności procesów wytwarzania kanamycyny przy stosowaniu jako produktów wyjściowych 3,6'-dwu-N-benzylksykarbonylo-kanamycyny A, w której grupy aminowe nie były zabezpieczone oraz 3,6'-dwu-N-benzylksykarbonylo-1-N-[L-/-/-T-benzylksykarbonylo-amino- α -hydroksybutyrylo]-kanamycyny A. Pierwszy z tych produktów oznaczono w zestawieniu numerem I, a drugi numerem II. Oba te produkty poddawano bezpośrednio acylowaniu, albo najpierw wytwarzano kompleks, który następnie acylowano. Wydajność reakcji podano w procentach wydajności teoretycznej.

Produkt wyjściowy I

Acylowanie bezpośrednie	- wydajność 25%
Acylowanie po utworzeniu kompleksu	- wydajność 25%

Produkt wyjściowy II

Acylowanie bezpośrednie	- wydajność 27%
Acylowanie po utworzeniu kompleksu	- wydajność 58%.

Jest rzeczą bardzo ważną, aby kontrolować skład końcowej mieszaniny reakcyjnej po hydrogenolizie zabezpieczających grup benzylksykarbonylowych. Hydrogenoliza ta, prowadzona w zwykłych warunkach, zachodzi praktycznie ilościowo, jak to wykazano niżej w przykładach.

Jedynym zanieczyszczeniem, występującym w większej ilości, jest kanamycyna A, ale związek ten nie tylko nie zakłóca procesu rozdzielania na jonowymiennej kolumnie chromatograficznej, gdyż jej czas przebywania w kolumnie jest krótszy niż amikacyny, lecz również może być, po zatężeniu, odzyskana, co ma duże znaczenie, gdyż stanowi ona najkosztowniejszy związek stosowany w procesie. Po uwzględnieniu odzyskanej kanamycyny A, wydajność procesu według wynalazku wynosi 80% wydajności teoretycznej.

Przytoczone niżej przykłady ilustrują szczegółowo proces według wynalazku, nie ograniczając jednak jego zakresu.

P r z y k ł a d I. 5,2 g 3,6'-dwu-N-benzylksykarbonylokanamycyny A o czystości 85% (5,87 mmola) i 3,9 g (21,3 mmola) bezwodnego octanu cynku rozpuszcza się w mieszaninie 25 ml sulfotlenku dwumetylu i 70 ml wody i miesza w pokojowej temperaturze w ciągu 2 godzin. Następnie dodaje się roztwór 3,28 g estru kwasu 4-benzylksykarbonyloamino-2-hydroksymasłowego z N-hydroksyimidem kwasu bursztynowego w 140 ml chlorku metylenu i miesza w ciągu 5 godzin. Wytworzony produkt wyosobnia się przez oddestylowanie chlorku metylenu i przemycie pozostałości w temperaturze 20°C 125 ml wody i 25 ml stężonego wodorotlenku amonowego, a następnie odsączenie, przemycie i wysuszenie w suszarce w temperaturze 45°C. Otrzymuje się 6,7 g 3,6'-dwu-N-benzylksykarbonylo-1-N-[L-/-/-T-benzylksykarbonyloamino- α -hydroksybutyrylo]-kanamycyny A o czystości 45% i odzyskuje się 16,8% wyjściowej 3,6'-dwu-N-benzylksykarbonylokanamycyny A. Wydajność procesu wynosi 51,4% wydajności teoretycznej.

Część otrzymanego produktu poddaje się hydrogenolizie w obecności kwasu mrówkowego i palladu na węglu, otrzymując 164 ml wodnego roztworu, który w 1 ml zawiera 6,61 mg amikacyny, 0,4 mg kanamycyny, 0,21 mg BB-K11 i 1,83 mg produktu podwójnego acylowania kwasem L-HABA w pozycjach N-1 i N-3". Względna czystość otrzymanej amikacyny wynosi 73%.

P r z y k ł a d II. Z 5,2 g 3,6'-dwu-N-benzylksykanamycyny A o czystości 85% (5,87 mmola) wytwarza się zawiesinę w 20 ml metanolu i dodaje szybko roztwór 3,9 g bezwodnego octanu cynku w 80 ml wody. Otrzymany roztwór miesza się w ciągu 2 godzin w temperaturze pokojowej, po czym dodaje się od razu roztwór 3,28 g (9,35 mmola) estru kwasu L-/-/-4-karbo-benzylksy-amino-2-hydroksymasłowego z N-hydroksyimidem kwasu bursztynowego w 100 ml chlorku metylenu. Mieszaninę pozostawia się na noc w temperaturze pokojowej, po czym odparowuje chlorek metylenu i pozostałość rozcieńcza 150 ml 5% roztworu wodnego amoniaku. Stały osad odsącza się i suszy, otrzymując 3,6'-N-dwu-benzylksykarbonylo-1-N-[L-/-/-X-benzylksy-

karbonyloamino- α -hydroksybutyrylo]-kanamycynę A o czystości 49,8%, co odpowiada 57% wydajności teoretycznej. Produkt zawiera jeszcze 17% związku wyjściowego, co odpowiada 25% w stosunku stechiometrycznym.

Otrzymany produkt acylowania miesza się z 100 ml wody i do otrzymanej zawiesiny dodaje się 3,5 g 5% palladu na węglu i perkoluje roztworem 7 ml kwasu mrówkowego w 20 ml wody. Miesza się w ciągu noocy, odsącza osad i przemywa go wodą. Otrzymuje się 223 ml roztworu o następującym składzie:

	mg/ml	zawartość %
amikacyna	8,2	63,3
BB-K29	0,3	2,3
BB-K11	0,3	2,3
produkt podwójnie acylowany ¹⁾	0,69	5,3
kanamycyna A	3,46	26,7.

¹⁾ Produkt zawierający reszty L-HABA w pozycjach N-1 i N-3".

Czystość otrzymanej amikacyny przy uwzględnieniu zawartości jej homologów, lecz z pominięciem kanamycyny, jest wyższa niż 90%. Otrzymany roztwór zobojętnia się do wartości pH 7 i perkoluje przez kolumnę wypełnioną słabo kwaśną żywiołą jonowymienną w postaci amonowej. Eluuje się roztworem wodnym amoniaku i rozdziela frakcje zawierające kanamycynę A i amikacynę. Frakcje zawierające kanamycynę A łączy się, odparowuje do stężenia wynoszącego 20% i przez dodanie metanolu wytrąca się siarozan kanamycyny. Frakcje zawierające amikacynę zatęża się do stężenia 20%, zakwasza 50% kwasem siarkowym, dodaje węgla aktywowanego i metanolu, otrzymując 2,6 g siarczuanu amikacyny o czystości mikrobiologicznej 680 μ g/mg.

P r z y k ł a d III. Przykład ten, będący przykładem porównawczym, wykazuje jak zasadniczo wpływ na selektywność i/albo trwałość kompleksów ma woda. Stwierdzono, że w odróżnieniu od kompleksowania kanamycyny w środowisku bezwodnym, woda nie tylko nie przeszkadza w procesie, lecz przeciwnie, jest konieczna dla zwiększenia różnicy pomiędzy dwoma miejscami kompleksowania. Faktycznie, w nieobecności wody acylowanie 3,6'-dwu-N-benzylloksykarbonylo-kanamycyny A wobec dwuwartościowych kationów nie zachodzi wcale, prawdopodobnie z powodu powstawania trwałego kompleksu również przy N-1, oprócz kompleksu przy N-3".

Do roztworu 5,2 g 3,6'-dwu-N-benzylloksykarbonylo-kanamycyny A o czystości 85% (5,87 mmola) w 50 ml sulfotlenku dwumetylu dodaje się 3,9 g (21,9 mmola) bezwodnego octanu cynku i miesza w pokojowej temperaturze w ciągu 2 godzin, po czym dodaje się roztwór 3,28 g estru kwasu 4-benzylloksykarbonyloamino z N-hydroksymidem kwasu bursztynowego w 140 ml chlorku metylenu. Miesza się w ciągu 5 godzin, oddestylowuje chlorek metylenu i pozostałość perkoluje w temperaturze 20°C z mieszaniną 125 ml wody i 25 ml stężonego wodorotlenku amonowego. Otrzymany produkt odsącza się, przemywa wodą i suszy w suszarce w temperaturze 45°C, uzyskując 5,7 g produktu wyjściowego, mającego czystość 80% i nie wykazującego śladów acylowania w pozycji N-1.

W opisanych wyżej warunkach, pozycje N-1 i N-3" są zablokowane przez wytworzenie kompleksów, które hamują dalsze acylowanie.

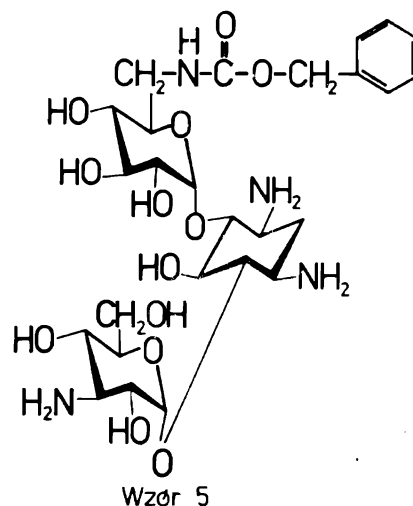
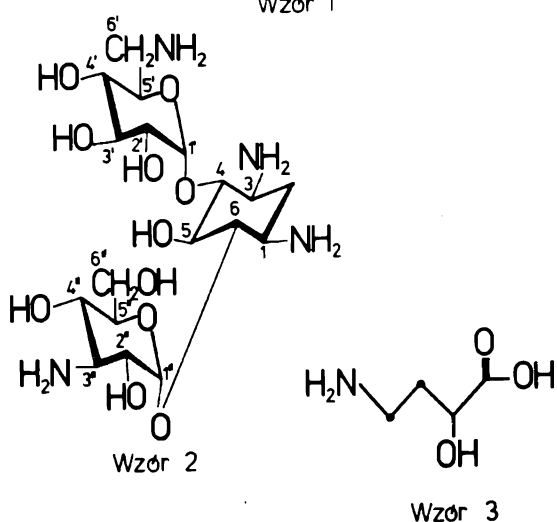
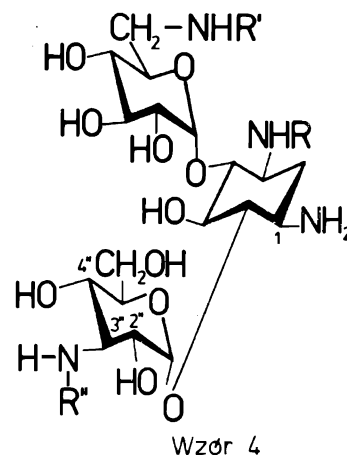
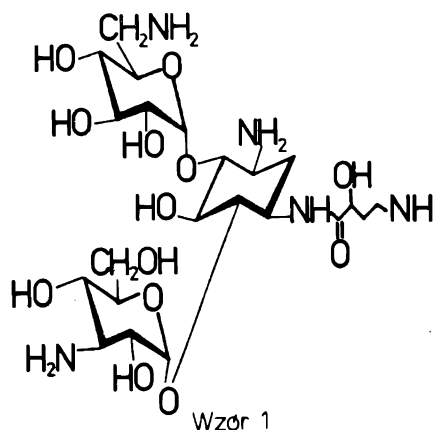
Z a s t r z e ż e n i e p a t e n t o w e

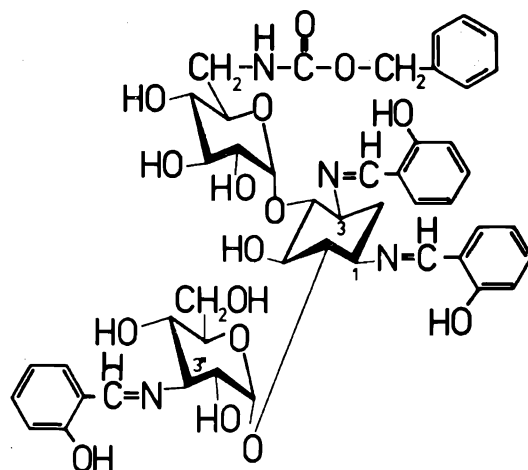
1. Sposób wytwarzania amikacyny z kanamycyny A zabezpieczonej w pozycjach 3 i 6' na drodze reakcji tak zabezpieczonej kanamycyny A z solą dwuwartościowego kationu metalu, takiego jak cynk, nikiel, żelazo, kobalt, mangan, miedź i kadm lub ich mieszaniny i następnie reakcji otrzymanego kompleksu z odpowiednią pochodną kwasu L-/-/4-amino-2-hydroksymasłowego, w której grupa aminowa jest zabezpieczona, a grupa karboksylowa uaktywniona, po czym otrzymany związek kompleksowy rozkłada się przez usunięcie metalicznego kationu i odszczepienie grup zabezpieczających, z n a m i e n n y t y m, że reakcję kanamycyny A zabezpieczonej w pozycjach 3 i 6' z solą dwuwartościowego kationu metalu prowadzi się w obecności wody jako rozpuszczalnika lub współrozpuszczalnika.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że reakcję kanamycyny A z so-
lą dwuwartościowego kationu metalu prowadzi się bez wyosobniania wytworzonego kompleksu.

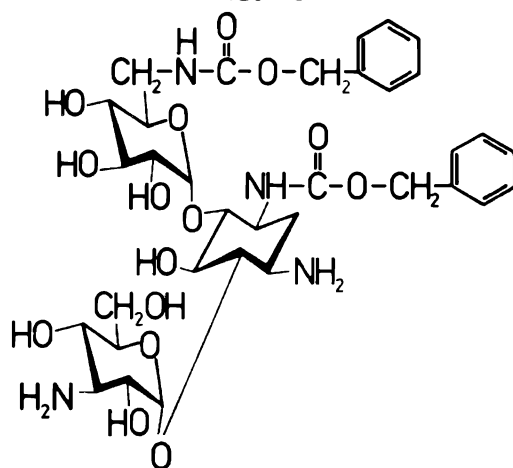
3. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że reakcję kanamycyny A z so-
lą dwuwartościowego kationu metalu prowadzi się w środowisku wodnym lub w mieszaninie wody
z rozpuszczalnikiem organicznym, takim jak sulfotlenek dwumetylu, dwumetyloformamid, ace-
tonitryl, aceton, tetrahydrofuran i niższe alkohole alifatyczne.

4. Sposób według zastrz. 3, z n a m i e n n y t y m, że reakcję prowadzi się w śro-
dowisku wodnym.





Wzór 6



Wzór 7