



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

202571
(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
C 07 D 493/02
C 07 H 17/04
A 61 K 31/35

(22) Přihlášeno 14 04 77
(21) (PV 731-78)
(32) (31) (33) Právo přednosti od 14 04 76
(15421/76) Velká Británie

(40) Zveřejněno 30 04 80

(45) Vydáno 15 10 83

(72)
Autor vynálezu

MILLION WILLIAM ALEXANDER, RAMSGATE,
PLEWS RHONA MARGARET a
RICHARDSON KENNETH dr., CANTERBURY (Velká Británie)

(73)
Majitel patentu

PFIZER CORPORATION, COLON (Panama)
s obchodním sídlem Brusel (Belgie)

(54) Způsob výroby selektivně chráněného derivátu kanamycinu A nebo kanamycinu B

1

Vynález se týká způsobu výroby selektivně chráněného derivátu kanamycinu A nebo kanamycinu B.

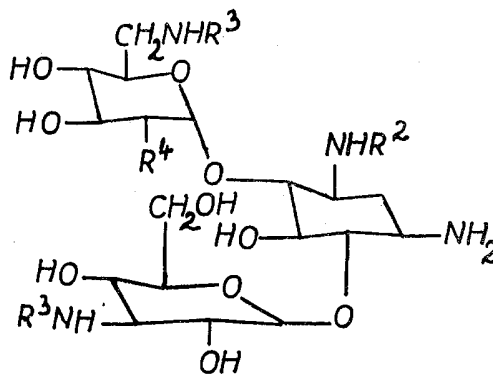
Vynález se zvláště týká způsobu výroby N-chráněných derivátů uvedeného typu.

Příklady 1-N-substituovaných kanamycinových derivátů jsou uvedeny v čs. patentu č. 195 713, další deriváty jsou známe látky, například 1-N-(4-amino-2-hydroxybutyryl)kanamycin A (BB-K8), popsáný v britském patentu č. 1 401 221. Při výrobě těchto

2

látek z kanamycinu, který je běžně dostupný, je žádoucí chránit některé aminoskupiny v poloze odlišné než poloha 1 nebo všechny tyto aminoskupiny. Pak je možno provést substituci téměř výlučně na aminoskupině v poloze 1. Tím se také usnadní izolace výsledného 1-N-substituovaného produktu.

Předmětem vynálezu je tedy způsob výroby selektivně chráněného derivátu kanamycinu A nebo kanamycinu B obecného vzorce II



(II)

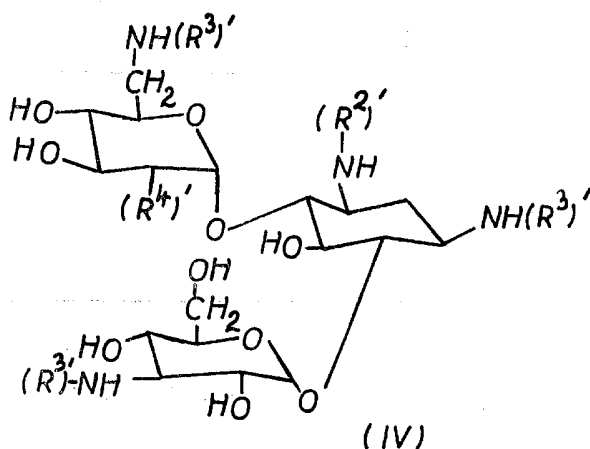
kde

R^2 znamená atom vodíku nebo benzyl,
 R^3 je acetylová nebo trifluoracetylová skupina,

R^4 znamená hydroxylovou skupinu nebo skupinu NHR^3 ,

kde

R^3 má svrchu uvedený význam, vyznačující se tím, že se uvede v reakci trifluoracetát kanamycinu A, kanamycinu B nebo 3-N-benzylkanamycinu A, 1,3,6',3''-tetra-N-benzylloxykarbonylkanamycin A, 1,3,2',6',3''-penta-N-benzylloxykarbonylkanamycin B nebo 3-N-benzyl-1,6',3''-tri-N-benzylloxykarbonalkanamycin A obecného vzorce IV



kde

$(R^2)'$ znamená atom vodíku, benzyl nebo benzyloxykarbonyl,

$(R^3)'$ znamená atom vodíku nebo benzyloxykarbonyl a

$(R^4)'$ znamená hydroxyskupinu nebo skupinu $NH(R^3)'$

za předpokladu, že každá ze skupin $(R^3)'$ má vždy též význam, s acetylačním nebo trifluoroacetylačním činidlem, katalytickou hydrogenací se odstraní případně přítomné benzyloxykarbonylové skupiny, získaný O-acetylový derivát se neutralizuje zásadou při teplotě místnosti, načež se hydrolýzou odstraní zbývající O-acylové skupiny a izoluje se selektivně N-chráněný derivát vzorce II.

Tento způsob je zvláště účinný pro výrobu těch látek, v nichž R^4 znamená hydroxylovou skupinu a R^3 znamená trifluoracetylovou skupinu. V tomto případě se kanamycin A nebo 3-N-benzylkanamycin A rozpustí v kyselině trifluoroctové a při teplotě 0 °C se uvede v reakci s anhydridem kyseliny trifluoroctové. Reakce je ukončena po několika hodinách při teplotě 0 °C a pak je možno izolovat výsledný per-O-trifluoracetylalkanamycinový derivát a jeho sůl s trifluoracetátem odpařením rozpouštědla ve vakuu. Produkt se rozpustí v inertním organickém rozpouštědle, s výhodou tetrahydrofuranu a neutra-

lizuje zásadou, například uhličitánem sodným nebo draselným. Bylo zjištěno, že za těchto podmínek je možno provést přesun $O \rightarrow N$ acylové skupiny velmi rychle, reakce je ukončena za 20 minut při teplotě místnosti. Zbývající O-trifluoracetylové skupiny se odstraní běžným způsobem, například methanolýzou s výsledným 3',6'-di-N-trifluoracetylový derivát je možno izolovat odpařením rozpouštědla a čistit běžnou sloupcovou chromatografií.

Je také možno postupovat tak, že se kanamycin A nebo 3-N-benzylkanamycin A nejprve uvede v reakci s činidlem, jímž je možno zavést odstranitelnou ochrannou skupinu na aminoskupině. Vhodnými skupinami jsou například t-butaloxykarbonylová skupina nebo benzyloxykarbonylová skupina. Takto chráněný produkt se pak podrobí O-acylaci známým způsobem, například působením anhydridu nebo chloridu kyseliny, jako anhydridu kyseliny octové v pyridinu nebo působením alkylchlormravenčanu, načež se tyto blokující skupiny opět odstraní, například tak, že t-butyloxykarbonylová skupina se odstraní působením kyseliny trifluoroctové a benzyloxykarbonylová skupina katalytickou hydrogenolýzou. Přesun $O \rightarrow N$ acylových skupin se pak provádí stejně jako svrchu a zbyvající O-acylové skupiny se odstraní a produkt se izoluje uvedeným způsobem.

Způsob podle vynálezu je možno provádět také při použití kanamycinu B, acylová skupina se v tomto případě přemístí z 3'-hydroxylové skupiny na sousední 2'-aminoskupinu za vzniku tri-N-acylovaného meziproduktu.

Sloučeniny vzorce II mohou existovat v několika formách. Substituenty obvykle mohou být ekvatoriální vzhledem ke kruhu. Mimo to glykosidická vazba mezi hexopyranosylovým kruhem a 2-desoxystreptoaminovým kruhem je obvykle v poloze X.

V následujících příkladech je v příkladu 1 popsána výroba 3-N-benzylkanamycinu A. Příklady 2 až 5 popisují výrobu nových látek vzorce II.

Chromatografie byla prováděna na tenké vrstvě kysličníku křemičitého při použití uvedeného systému rozpouštědel. Skvrny byly vyvolány po usušení desek postříkem 5% t-butylhypochloritem v cyklohexanu, usušením desek při 100 °C na 10 minut ve větrané sušárně, zchlazením a následným postříkem roztokem jodidu draselného a škrobu.

Teploty jsou uvedeny ve stupních Celsia, „Amberlit“ je chráněná slovní známka označující ionexovou pryskyřici z polystyrenového základu zesítěného 3 až 5 % divinylbenzenem a obsahující zbytky sulfonové kyseliny zavedené sulfonací.

Příklad 1

24,3 g (0,03 molu) kanamycinu A ve formě síranu se rozpustí ve 150 ml vody a pH se upraví na hodnotu 6 tak, že se po kap-

kách přidává 5-N-kyselina chlorovodíková. Přidá se 1,95 g (0,03 molu) kyanborohydridu sodného a směs se zchladí na 0 °C smíchá, přičemž se v průběhu 2,5 hodiny pomalu přidává roztok 3,61 g (0,33 molu) benzaldehydu v 15 ml methanolu. Směs se nechá ohřát na teplotu místnosti. Po 16 hodinách se pH roztoku upraví na 5,5 přidáním 1 N kyseliny chlorovodíkové a roztok se zfiltruje a nanese na sloupec iontoměničové pryskyřice (Amberlitt CG-50) v NH_4^+ -formě. Sloupec se vymývá vodou a pak se postupně zvyšujícím množstvím amoniaku ve vodě, koncentrace amoniaku vzrůstá v rozmezí 0 až 0,7 N, čímž se získá jako hlavní produkt 3-N-benzylkanamycin A spolu s malým množstvím 1-N-benzylvého derivátu, množství produktu je 5,0 g, výtěžek 28 %, R_f 0,44 ve směsi methanolu, chloroformu a 17 % hydroxidu amonného v poměru 4:1:2. Čistý kanamycin A má hodnotu R_f 0,15.

Vzorek produktu je možno převést na těkavý tetra-N-acetylhepta-O-trimethylsilylderivát působením anhydridu kyseliny octové v methanolu při teplotě místnosti 24 hodin s následnou reakcí se směsí hexamethyldisilazanu a trimethylchlorsilanu v poměru 2:1 při teplotě místnosti 24 hodin. m/e pro $\text{C}_{54}\text{H}_{106}\text{N}_4\text{O}_{15}\text{Si}_7$: vypočteno 1246 a nalezeno 1246.

Poloha substituentu byla potvrzena následujícím sledem reakcí:

a) působením t-butyloxykarbonylazidu se získá sloučenina obsahující 3-t-butyloxykarbonylové skupiny a současně benzylovou skupinu, jak bylo potvrzeno NMR-spektrém,

b) hydrogenací je možno odstranit benzylovou skupinu,

c) acylací je možno provést pomocí N-[(S)-4-benzyloxykarbonylamino-2-hydroxybutyryloxy]sukcinimidu a

d) N-ochrannou skupinu je možno odstranit hydrogenací s následným působením kyseliny trifluoroctové, čímž se získá jako hlavní produkt 3-N-(S)-4-amino-2-hydroxybutyryl]kanamycin A (BB-K29) identický se vzorkem, získaným způsobem podle publikace Naito a další (J. Antibiotics, 1973, 26, 297).

Příklad 2

5,0 ml anhydridu kyseliny trifluoroctové se pomalu přidá za stálého míchání k roztoku 1,0 g kanamycinu A ve 40 ml kyseliny trifluoroctové při 0 °C. Roztok se nechá stát při teplotě 0 až 4 °C 20 hodin. Rozpouštědlo se pak odpaří ve vakuu a odparek se smísí s 10 ml toluenu a odpaří do sucha. Trifluoracetátová sůl se smísí s bezvodým tetrahydrofuranem a pomalu neutralizuje tak, že se za stálého míchání přidává přebytek suspenze bezvodého uhličitánu draselného v tetrahydrofuranu. Směs se míchá při teplotě místnosti 20 minut a suspenze se pak zfiltruje a filtrát se odpaří do sucha. Produkt se smísí s 20 ml methanolu a nechá

stát 30 minut při teplotě místnosti. Rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku a odparek se chromatografuje na kysličníku křemičitém, sloupec se vymývá při proměnné koncentraci nejprve směsí chloroformu a methanolu v poměru 3:1, směsí chloroformu, methanolu a 17% hydroxidu amonného v poměru 8:4:1, čímž se získá 0,52 g hydrátu 3'',6'-di-N-trifluoracetylkanamycinu A jako bílá hygroskopická látka. R_f = 0,7 při použití směsi methanolu, chloroformu a 17% hydroxidu amonného v poměru 4:1:1, kanamycin A má R_f 0,05. $\nu_{\text{C=O}}$ 1665 cm^{-1} .

Vzorek produktu se převede na těkavý di-N-acetylhepta-O-trimethylsilylový derivát podle příkladu 1. m/e pro $\text{C}_{47}\text{H}_{94}\text{N}_4\text{O}_{15}\text{F}_6\text{Si}_7$: vypočteno 1264, nalezeno 1264.

Příklad 3

0,7 ml (5 mmolů) anhydridu kyseliny trifluoroctové se přidá pomalu k roztoku 0,23 g (0,4 mmolu) 3-N-benzylkanamycinu A v 15 ml kyseliny trifluoroctové při 0 °C. Roztok se udržuje 20 hodin na teplotě -4 °C. Pak se rozpouštědlo odpaří a odparek se smísí s 10 ml toluenu a odpaří do sucha. Produkt se rozpustí ve 20 ml tetrahydrofuranu a pomalu se přidá za stálého míchání k suspenzi přebytku uhličitánu draselného v tetrahydrofuranu. Suspenze se míchá při teplotě místnosti 30 minut, zfiltruje se a filtrát se odpaří do sucha za sníženého tlaku. Odparek se smísí s 20 ml methanolu a nechá stát 30 minut při teplotě místnosti. Pak se rozpouštědlo odpaří ve vakuu, čímž se získá 3-N-benzyl-3'',6'-di-N-trifluoracetylkanamycin A o R_f 0,5 při použití methanolu, chloroformu a 8% hydroxidu amonného v poměru 4:1:0,1; 3-N-benzylkanamycin A má R_f 0,01.

Příklad 4

A. Roztok 189,4 g 1,3,3'',6'-tetra-N-benzyl-oxykarbonylkanamycinu A (Bull. Chem. Soc. Japan, 1965, 38, 1181) v 568 ml pyridinu a 189 ml anhydridu kyseliny octové se míchá přes noc při teplotě místnosti a pak se vlije do 1,9 litru vody. Vodný roztok se extrahuje chloroformem (1 × 1,8 litru a 1 × 1,0 litru) a organický extrakt se odpaří do sucha za sníženého tlaku. Smísením odpareku s etherem se získá 224,8 g penta-O-acetyl-1,3,3'',6'-tetra-N-benzyloxykarbonylkanamycin A, který se odfiltruje a suší ve vakuu. Teplota tání produktu je 223 až 229 °C, R_f = 0,55 v chloroformu, δ = 1,8 až 2,05 (15 protonových multipletů, 5 acetylových skupin) a 7,4 (20 protonových singletů, 4 fenylové skupiny).

B. Roztok 53 g penta-O-acetyl-1,3,3'',6'-tetra-N-benzyloxykarbonylkanamycinu A ve 260 ml ethylacetátu s obsahem 260 ml ledové kyseliny octové se hydrogenuje při použití 5 % paládia na aktivním uhlí v celkovém množství 15 g při teplotě 60 °C a tlaku 446

kPa 7 hodin. Roztok se zfiltruje a filtrát se odpaří do sucha za sníženého tlaku. Odparek se smísí s etherem a výsledný penta-O-acetylkanamycin v množství 32,9 g se usuší ve vakuu. Produkt má teplotu tání 97 až 105 °C, R_f 0,0 ve směsi chloroformu a ethylalkoholu denaturovaného methanolem v poměru 12 : 1 ve srovnání s R_f 0,55 výchozí látky. Při protonové magnetické rezonanci byla prokázána úplná nepřítomnost aromatických protonů.

C. Roztok 139,2 g penta-O-acetylkanamycinu A v 1,4 litrech methanolu, nasyceného amoniakem se nechá stát přes noc při teplotě místnosti a pak se odpaří do sucha za sníženého tlaku. Odparek se rozpustí ve 140 ml methanolu a surový produkt se vysráží 2,5 litry chloroformu, zfiltruje a odpaří ve vakuu. Surový produkt se uvede v suspenzi ve 400 ml technického ethylalkoholu denaturovaného methanolem a 91,9 g výsledného 3'',6'-di-N-acetylkanamycinu A se oddělí filtrací, promyje etherem a suší ve vakuu. Produkt má teplotu tání 150 až 180 °C, R_f 0,77 v methanolu, a 0,880 hydroxidu amonného v poměru 1 : 1. NMR-spektrum a protonové spektrum bylo v plném souladu s předpokládanou strukturou.

Příklad 5

3,6 ml anhydridu kyseliny trifluoroctové se pomalu přidá za stálého míchání k roztoku 960 mg (2 mmoly) kanamycinu B v 50 ml kyseliny trifluoroctové při teplotě 0 °C. Roztok se nechá stát při teplotě 0 až 4 °C 20 hodin. Pak se rozpouštědlo odpaří za sníženého tlaku a odparek se smísí s 10 ml toluenu, načež se odpaří do sucha. Trifluoroacetátová sůl se rozpustí ve 30 ml tetrahydrofuranu a roztok se pomalu přidá za stálého míchání k přebytku triethylaminu v tetrahydrofuranu. Roztok se nechá stát

40 minut při teplotě místnosti, načež se rozpouštědlo odpaří za sníženého tlaku. Odparek se rozpustí v methanolu, čímž se hydrolyzuje zbývající O-trifluoracetylová skupina a po dalších 30 minutách při teplotě místnosti se rozpouštědlo odpaří za sníženého tlaku a produkt se chromatografuje na kysličníku křemičitém, přičemž se k vymývání sloupce užije směs chloroformu a methanonného v poměru 20 : 10 : 1, čímž se získá hydroxidu amonného až do výsledné směsi chloroformu, methanolu a 17% hydroxidu nolu v poměru 3 : 1 se stoupajícím podílem 452 mg (29 %) 2',3'',6'-tri-N-trifluoracetylkanamycinu B ve formě sklovité hmoty. Produkt má R_f 0,70 ve směsi methanolu, chloroformu a 8% hydroxidu amonného v poměru 4 : 1 : 0,1, kanamycin B má R_f 0,0.

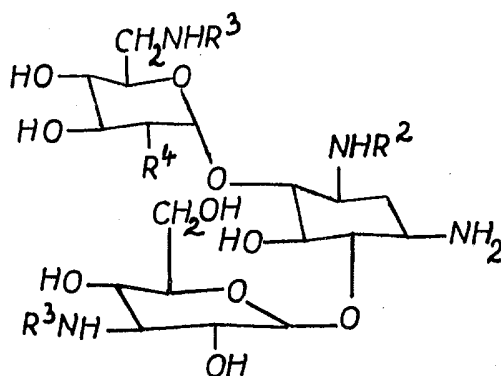
Struktura produktu byla potvrzena následujícím sledem reakcí:

a) byla provedena acetylace působením anhydridu kyseliny octové v methanolu 20 hodin při teplotě místnosti s následným působením 1 N hydroxidu amonného 18 hodin k odstranění trifluoracetylové skupiny, čímž byl získán produkt s obsahem dvou acetylových skupin. m/e pro $C_{22}H_{41}N_5O_{12}$: vypočteno 568, nalezeno 568;

b) působením anhydridu kyseliny octové s obsahem deuteria v methanolu při teplotě místnosti 24 hodin s následnou reakcí se směsí hexamethyldisilazanu a trimethylchlorsilanu v poměru 2 : 1 při teplotě místnosti 24 hodin byl získán těžký tri-N-deuteroacetyl-di-N-acetylhexa-O-trimethylsilylový derivát. m/e pro $C_{46}H_{86}N_5O_{15}D_9Si_6$: vypočteno 1134, nalezeno 1134. Došlo k diacetylaci na 2-desoxystreptaminovém kruhu, čímž je možno prokázat, že trifluoracetylace byla původně provedena v polohách 2',3'' a 6' kanamycinu B.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby selektivně chráněného derivátu kanamycinu A nebo kanamycinu B obecného vzorce II



(II)

kde

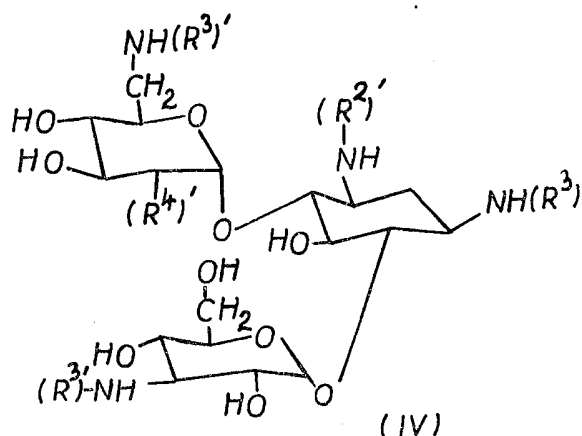
R^2 znamená atom vodíku nebo benzyl,

R^3 je acetylová nebo trifluoracetylová skupina,

R^4 znamená hydroxylovou skupinu nebo skupinu NHR^3 ,

kde

R^3 má svrchu uvedený význam, vyznačující se tím, že se uvede v reakci trifluoroacetát kanamycinu A, kanamycinu B nebo 3-N-benzylkanamycinu A, 1,3,6',3''-tetra-N-benzylloxykarbonylkanamycin A, 1,3,2',6',3''-penta-N-benzylloxykarbonylkanamycin B nebo 3-N-benzyl-1,6',3''-tri-N-benzylloxykarbonylkanamycin A obecného vzorce IV



kde

$(R^2)'$ znamená atom vodíku, benzyl nebo benzyloxykarbonyl,

$(R^3)'$ znamená atom vodíku nebo benzyloxykarbonyl a

$(R^4)'$ znamená hydroxyskupinu nebo skupinu $NH(R^3)'$

za předpokladu, že každá ze skupin $(R^3)'$ má vždy též význam, s acetylačním nebo trifluoroacetylačním činidlem, katalytickou hydrogenací se odstraní případně přítomné benzyloxykarbonylové skupiny, získaný O-acetylovaný derivát se neutralizuje zásadou při teplotě místnosti, načež se hydrolyzou odstraní zbývající O-acylové skupiny a izoluje se selektivně N-chráněný derivát vzorce II.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačující se tím, že se acyluje sůl kyseliny trifluoroctové s kanamycinem A, kanamycinem B nebo 3-N-benzylkanamycinem A pomocí anhydridu kyseliny trifluoroctové.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako acetylačního činidla použije anhydridu kyseliny octové.