



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

MKP C07d 7/46  
C07d 21/00

Zgłoszono: 11.07.72 (P. 156 653)

Pierwszeństwo: 27.01.72 Stany Zjednoczone  
Ameryki

Int. Cl.<sup>2</sup> C07D 309/12  
C07D 407/02

Zgłoszenie ogłoszono: 30.05.73

Opis patentowy opublikowano: 31.12.1977

CZYTELNIA

Urząd Patentowy  
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórca wynalazku: \_\_\_\_\_

Uprawniony z patentu: Bristol Myers Company, Nowy Jork (Stany Zjednoczone Ameryki)

### Sposób wytwarzania półsyntetycznych kanamycyn

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania półsyntetycznych kanamycyn A i B, podstawionych w pozycji 1 rodnikiem L-/-/-γ-amino-α-hydroksybutyrylowym o ogólnym wzorze 1, w którym R<sup>3</sup> oznacza grupę wodorotlenową lub aminową ewentualnie w postaci nietoksycznych, nadających się do zastosowań farmaceutycznych, soli addycyjnych z kwasami.

Kanamycyny są znanymi antybiotykami, opisanymi między innymi w ósmym wydaniu Merck Index, strony 597—598. Kanamycyna A jest związkiem o wzorze 2, kanamycyna B związkiem o wzorze 3.

Przez nietoksyczne, nadające się do zastosowań farmaceutycznych sole addycyjne związków o wzorze 1 z kwasami rozumie się związki otrzymane w wyniku przyłączenia do jednej cząsteczki związku o wzorze 1 jednej, dwóch, trzech lub czterech cząsteczek nietoksycznego, nadającego się do zastosowań farmaceutycznych kwasu. Takim kwasem jest między innymi kwas octowy, solny, siarkowy, migdałowy, małeinowy, fosforowy, azotowy, bromowodorowy, askrobinowy, jabłkowy i cytrynowy oraz te spośród innych kwasów, które zwykle stosuje się do otrzymywania soli z preparatami farmaceutycznymi, zawierającymi grupę aminową.

Sposobem według wynalazku kanamycyny o wzorze 1 otrzymuje się według schematu przedstawionego na rysunku.

Podczas wytwarzania związków o wzorze 1 otrzy-

2

muje się produkt przejściowy, związek o wzorze 4, w którym R<sup>1</sup> oznacza atom wodoru lub rodnik o wzorze C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>-CH<sub>2</sub>-O/CO-, R<sup>2</sup> oznacza atom wodoru lub rodnik L-/-/-γ-amino-α-hydroksybutyrylowy, a R<sup>3</sup> oznacza grupę -OH lub -NH<sub>2</sub> ewentualnie w postaci nadających się zastosowań farmaceutycznych soli addycyjnych tych związków z kwasami.

Sposób wytwarzania związków o wzorze 1 polega na acylowaniu kanamycyny A lub kanamycyny B z czynnikiem acylującym, wybranym spośród związków o wzorach 5—13, i karbodwuimidów związków o wzorach 12 i 13, w których to wzorach R<sup>4</sup> i R<sup>5</sup> są jednakowe lub różne i oznaczają atomy wodoru, fluoru, chloru lub bromu, grupy -NO<sub>2</sub>, -OH, niższe grupy alkilowe lub niższe grupy alkoksylowe a X oznacza atom chloru, bromu lub jodu, lub funkcjonalnymi równoważnikami powyższych czynników acylujących stosowanymi w ilości co najmniej 1 mol na 1 mol kanamycyny A lub B w rozpuszczalniku takim, jak dwumetyloacetamid, czterowodorofuran, dioksan, 1,2-dwumetoksyetan, metanol, etanol, woda, aceton, pirydyna, N-alkilopiperidyny lub mieszaniny wymienionych związków, a korzystnie poniżej 50°C, a korzystnie poniżej 25°C, przy czym otrzymuje się związek o wzorze 14, w którym R<sup>3</sup> ma znaczenie wyżej podane, a Y oznacza rodnik o wzorze 15, 16, 17, 18, 19 lub 20, a R<sup>4</sup> i R<sup>5</sup> we wzorze 15 mają znaczenie wyżej po-

dane. Następnie acyluje się związek o wzorze 14, pochodną L-/- $\gamma$ -amino- $\alpha$ -hydroksymasłowego o wzorze 21, w którym W oznacza rodnik o wzorze 15, 16, 17, 18, 19 lub 20, korzystnie rodnik o wzorze 15, a R<sup>4</sup> i R<sup>5</sup> we wzorze 15 mają znaczenie wyżej podane, M oznacza rodnik o wzorze 22, 23, 24, 25 lub 26, korzystnie rodnik o wzorze 26, a R<sup>4</sup> i R<sup>5</sup> mają znaczenie wyżej podane, lub funkcjonalnym równoważnikiem wymienionego czynnika acylującego, użytym w ilości co najmniej 0,5 mola, korzystnie 0,5—1,4 mola, a najlepiej 0,8—1,1 mola na 1 mol związku o wzorze 14, w rozpuszczalniku, korzystnie w mieszaninie wody z eterem dwumetylowym etylenoglikolu, dioksanem, dwumetyloacetamidem, dwumetyloformamidem, czterowodorofuranem, eterem dwumetylowym propylenoglikolu lub związkami podobnego typu, a zwłaszcza w mieszaninie wody z eterem dwumetylowym etylenoglikolu w stosunku 1:1, po czym w otrzymanym związku o wzorze 27, w którym R<sup>3</sup>, Y i W mają znaczenie podane wyżej i usuwa się znanymi sposobami blokujące grupy W i Y, a jeżeli W i Y oznaczają rodniki o wzorze 15, korzystnie na drodze wodorolizy gazowym wodorem w obecności metalicznego katalizatora, takiego jak pallad, platyna, nikiel Raneya, rod, ruten czy nikiel, korzystnie w obecności palladu, a zwłaszcza palladu osadzonego na węglu aktywnym, w mieszaninie wody z rozpuszczalnym w wodzie rozpuszczalnikiem, takim jak dioksan, czterowodorofuran, eter dwumetyloetylenoglikolowy, eter dwumetylopropylenoglikolowy itp., korzystnie w mieszaninie wody z dioksanem w stosunku 1:1 z dodatkiem katalitycznych ilości kwasu octowego. W wyniku reakcji otrzymuje się związek o wzorze 1, który ewentualnie przeprowadza się w nietoksyczną, nadającą się do zastosowań farmaceutycznych sól addycyjną z kwasem.

Jest oczywiste, że acylowanie grup aminowych substratów i związków przejściowych można przeprowadzać również za pomocą innych czynników acylujących. Jako grupy blokujące można stosować zwykle używane w syntezie peptydów, łatwe do usunięcia znanymi sposobami. Przykłady takich grup i sposoby ich usuwania omawia A. Kapoor w przeglądzie zamieszczonym w J. Pharm. Sciences 59, 1—27 (1970).

Funkcjonalnie równoważnymi czynnikami acylującymi aminy pierwszorzędowe są odpowiednie chlorki, bromki i bezwodniki kwasowe, w tym również bezwodniki mieszanane, a zwłaszcza mieszanane bezwodniki mocniejszych kwasów, takich jak alifatyczne monoestry kwasu węglowego, kwasów alkilo- lub arylosulfonowych i kwasów z przeszkodą sferyczną, takich jak kwas dwufenylooctowy. Poza tym można stosować takie pochodne kwasów, jak azydki i aktywne estry tioestrów, na przykład z p-nitrofenolem, tiofenolem, 2,4-dwunitrofenolem lub z kwasem tiooctowym albo wolne kwasy, podając je przed sprzęgnięciem z pochodną kanamycyny o wzorze 14 reakcji z chlorkiem N,N'-dwumetylochloroformoniowym według brytyjskiego opisu patentowego nr 1 008 170 oraz Novak, Weichert, Experientia XXI/6, 360 (1965) z enzymami lub z N,N'-karbonyldwuimidazolami lub z N,N'-karbo-

nylodwuimidazolami (Sheehan, Hess; J. Am. Chem. Soc., 77, 1067 /1964/), z odczynnikami alkinyloaminowym (R. Buijile, W. G. Viehe; Angew. Chemie, International Edition, 3, 562 /1964/), z odczynnikami keteniminowym (C. L. Stevens, M. E. Monk; J. Am. Chem. Soc. 80, 4065 /1958/) lub z solą izoksazoloiową (R. B. Woodward, R. A. Olofson, H. Mayer; J. Am. Chem. Soc. 83, 1010 /1961/).

Innym równoważnikiem chlorku kwasowego jest odpowiedni azolid, to jest amid kwasu, w którym azot amidowy jest członem pięcioczłonowego pierścienia o charakterze aromatycznym, zawierającego co najmniej dwa atomy azotu, na przykład imidazolu, pirazolu, triazolu, benzimidazolu, benzotriazolu i ich podstawionych pochodnych. Przykładem sposobu otrzymywania azolidu jest działanie na N,N'-karbonyldwuimidazol równomolarną ilością kwasu karboksylowego, w temperaturze pokojowej, w czterowodorofuranie, chloroformie, dwumetyloformamidzie lub podobnym, obojętnym rozpuszczalniku, w wyniku czego otrzymuje się z praktycznie ilościową wydajnością imidazol kwasu karboksylowego, z równoczesnym uwolnieniem dwutlenku węgla i jednego mola imidazolu. Z kwasów dwukarboksylowych otrzymuje się dwuimidazolidy. Imidazol, będący produktem ubocznym, wytrąca się i oddziela się od imidazolu, co jednak nie ma istotnego znaczenia. Powyższe reakcje są opisane w opisach patentowych Stanów Zjednoczonych Ameryki nr nr 3 079 314, 3 117 126 i 3 129 224 oraz w brytyjskich opisach patentowych nr nr 932 644, 937 570 i 959 053.

Blokowanie konamycyny w pozycji 6'-amino korzystnie przeprowadza się przy użyciu mniej niż 1 mola czynnika acylującego na 1 mol kanamycyny. Użycie czynnika acylującego w większej ilości powoduje obniżenie wydajności produktu przejściowego, w wyniku ubocznej reakcji prowadzącej do powstawania pochodnej poliacylowej.

Jak to ma miejsce w większości reakcji chemicznych, stosować można temperaturę niższą lub wyższą od podanej powyżej. Jednakże przy temperaturze znacznie przekraczającej 50°C, szybciej przebiegają reakcje uboczne, powodujące zmniejszenie wydajności produktu.

1-/L-/- $\gamma$ -amino- $\alpha$ -hydroksybutyrylo/kanamycyna A wykazuje doskonałą aktywność przeciwbakteryjną, wyższą od aktywności związku macierzystego. W poniższych tablicach zestawiono minimalne stężenia kanamycyny A i 1-/L-/- $\gamma$ -amino- $\alpha$ -hydroksybutyrylo/kanamycyny A inhibujące wzrost bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych (MIC). Badania przeprowadzone metodą rozcieńczeń Steersa na agarze (tablica 1) i metodą podwójnych rozcieńczeń (tablica 2). Jako pożywkę stosowano agar Mueller-Hintona (tablica 1) i wyciąg z serca (tablica 2).

Jak wynika z tablic 1 i 2, 1-/L-/- $\gamma$ -amino- $\alpha$ -hydroksybutyrylo/kanamycyna A wykazuje wyższą aktywność in vitro niż kanamycyna A, szczególnie w stosunku do organizmów odpornych na działanie antybiotyku pochodzenia naturalnego. Dane te potwierdzają badania przeprowadzone na trzech organizmach in vivo.

Tablica 1  
MIC (mg/ml)

Organizm	Kanamycyna A	1-/L-/-/γ-hydroksy- -amino-α- butyry- lo/kanamycyna A
1	2	3
1. Alk. faecalis A-9423	16	8
2. Alk. faecalis A-20648	>125	>125
3. Ent. oloacae A-9656	4	4
4. Ent. species A-20364	125	2
5. Ent. hafniae 1 A-20674	1	1
6. E.coli A-0636	2	1
7. E.coli A-20664	16	4
8. E.coli A-20665	>125	1
9. E.coli A-20507	32	2
10. E.coli A-20520	>125	4
11. E.coli A-20365	>125	1
12. E.coli A-20684	2	2
13. E.coli A-20682	>125	2
14. E.coli A-20683	>125	8
15. E.coli A-20681	125	2
16. E.coli A-15119	2	4
17. K.pneumoniae A-9867	4	4
18. K.species A-20328	>125	2
19. K.species A-20330	32	32
20. K.species A-20634	>125	4
21. K.pneumoniae A-20680	>125	4
22. K.pneumoniae A-8977	1	1
23. Pr. mirabilis A-9900	2	2
24. Pr. morgani A-15153	2	2
25. Pr. vulgaris A-9555	2	1
26. Pr. rettgeri A-9636	0, 25	0, 25
27. Pr. mirabilis A-20645	4	4
28. Pr. mirabilis A-20454	2	2
29. Providencia stuartii A-20615	2	1
30. Providencia alkali-faciens A-20676	1	1
31. Ps. aeruginosa A-20229	32	2
32. Ps. aeruginosa A-9843A	125	16
33. Ps. aeruginosa A-20653	>125	32
34. Ps. species A-20601	125, 63	16
35. Ps. species A-20621	>125	>125

dalszy ciąg tablicy 1

	1	2	3
36. Ps. maltophilia A-20620		32	>125
37. Sal. enteritidis A-9531		1	0, 5
38. Sal. derby A-20087		>125	1
39. Ser. marcescens A-20019	10	2	4
40. Ser. marcescens A-9933		4	8
41. Ser. marcescens A-20460		>125	4, 2
42. Ser. marcescens A-20459	15	4	16
43. Shig. flexneri A-9684		4	4
44. Aeromonas sp. A-20670	20	2	2
45. Arizona sp. A-20671		2	1
46. Citrobacter sp. A-20673		4	4
47. Edwardsiella sp. A-20678	25	4	4
48. Staph. aureus A-9606		1	1
49. Staph. aureus A-4749	30	0, 5	1
50. Staph. aureus A-9537		2	1
51. Staph. aureus A-20640		>125	2
52. Staph. aureus A-20240		>125	8
53. Staph. aureus A-15197			
40 Pożywka Mueller-Hintona + 4% krwi owczej		1	2
54. Str. faecalis A-9854	45	63	63
55. Str. faecalis A-9575		125	125
56. Str. pyogenes A-20200		32, 16	32
57. Str. pyogenes A-9604	50	125	125
58. Str. pyogenes A-15040		125	125
59. Str. pyogenes A-20065		125	125
60. D.pneumoniae A-9585	55	63, 32	63
61. D.pneumoniae A-20159		>125	>125

60 Kanamycyna A i jej pochodna 1-/L-/-/γ-amino-α-hydroksybutyrylowa wykazują jednakową aktywność w przypadku infekcji myszy, wywołanych odpornymi na kanamycynę A szczepami E. coli A 15 119 i Staph. aureus A 9537. Wprowadź wartości

7  
Tablica 2  
MIC (mg/ml)

Organizm	Kanamycyna A	1-L-/-/-γ- -amino-α- -hydro- ksybutyry- lo/-kanamycyna A
1	2	3
1. <i>D. pneumoniae</i> +5% serum A-9585	63	63
2. <i>Str. pyrogenes</i> +5% serum A-9604	125	125
3. <i>Staph. aureus</i> Smith A-9537	0,5	0,5
4. <i>Staph. aureus</i> A-9497	0,5	0,5
5. <i>Staph. aureus</i> A-20239	>125	4
6. <i>Staph. aureus</i> A-20240	>125	4
7. <i>Enter. cloacae</i> A-0656	2	2
8. <i>Enter. species</i> A-20364	>125	2
9. <i>K.pneumoniae</i> A-9867	2	4
10. <i>E.coli</i> K-12 ML1410 A-20361	2	4
11. <i>E.coli</i> K-12 ML1630 A-20363	>125	2
12. <i>E.coli</i> K-12 A-9632	2	1
13. <i>E.coli</i> A-20664	32	8
14. <i>E.coli</i> A-20665	125	8
15. <i>Pr. mirabilis</i> A-9900	2	16
16. <i>Pr. morgani</i> A-15153	4	16
17. <i>Pr. vulgaris</i> A-9436	1	2
18. <i>Ps. aeruginosa</i> A-20227	4	1
19. <i>Ps. species</i> A-20499	63	4
20. <i>Ps. aeruginosa</i> A-20653	>125	4

8  
ciąg dalszy tablicy 2

	1	2	3
5	21. <i>Ps. species</i> A-20621 22. <i>Ser.marcescens</i> A-20019	>125 2	125 4
10	23. <i>Ser.marcescens</i> A-20141	16	16

ED<sub>50</sub> (dawka doprowadzająca do wyzdrowienia 50% myszy zakażonych śmiertelną dawką) dla *Staph. aureus* A 9537 sugeruje nieco niższą aktywność pochodnej 1-L-/-/-γ-amino-α-hydroksybutyrylowej, lecz spowodowane jest to prawdopodobnie znaczną różnicą wielkości dawek (rozcieńczenie 5-krotne).

W stosunku do odpornego na kanamycynę szczepu *E. coli* A-20 520 kanamycyna A, jak należało oczekiwać nie jest aktywna, natomiast jej pochodna 1-L-/-/-γ-amino-α-hydroksybutyrylowa wykazuje umiarkowane działanie ochronne. Aktywność pochodnej 1-L-/-/-γ-amino-α-hydroksybutyrylowej zwiększa się mniej więcej 10-krotnie, jeżeli dawkę rozkłada się nie na dwie, a na cztery porcje.

a MIC — minimalne stężenie inhibitujące (u g/ml); badania przeprowadzone według Christolm et al., *Antimicrob. Agents and Chemotherapy* — 1969 strona 244 (1970), z zastosowaniem agaru Mueller-Hintena

b CD<sub>50</sub> — dawka lecznicza, 50% (mg/kg) w X porcjach; iniekcja podskórna myszom w 1 i 4 godziny po infekcji, w przypadku rozłożenia dawki na dwie porcje i w 0, 2, 4 i 6 godzin, w przypadku rozłożenia na cztery porcje. Badania przeprowadzone według Price et al., *J. Antihiotics*, 22, 1 (1969)

c — nie badano

Związki o wzorze 1 są cennymi czynnikami przeciwbakteryjnymi, które można stosować do leczenia drobiu i zwierząt, jak również ludzi, a szczególnie cenne są jako leki zwalczające infekcje bakteriami gram-dodatnimi i gram-ujemnymi. Stosowane doustnie są użyteczne jako środki sterylizu-

Tablica 3  
Porównanie aktywności in vitro i in vivo kanamycyny A i jej pochodnej 1-L-/-/-γ-amino-α-hydroksybutyrylowej

Antybiotyk	Próba nr	Staphylococcus aureus A-9537		Escherichia coli A-15119		Escherichia coli A-20520	
		MIC	CD <sub>50</sub>	MIC	CD <sub>50</sub>	MIC	CD <sub>50</sub>
1-L-/-/-γ-amino- -α-hydroksy/ka- namycyna A	1	1	2,0×2	2	2×2	2	66×2
	2	c	—	—	—	—	5×4
Kanamycyna A	1	2	0,5×2	4	4×2	125	200×2
	2	—	—	—	—	—	200×4

jące układ trawienny przed operacją, hamując wzrost w jelicie grubym flory aerobowej i anaerobowej wrażliwej na ich działanie. W połączeniu z zabiegami mechanicznymi są użyteczne w przygotowaniu pola do operacji okrężnicy.

Związki o wzorze 1 są efektywne w zwalczaniu bakteryjnych infekcji systemowych, wprowadzane w ilości 250—3000 mg na dobę, podzielonej na cztery dawki. Ogólnie są efektywne w dawkach 5—7,5 mg/kg wagi ciała co 12 godzin.

1-/L-/-γ-amino-α-hydroksybutyrylo/-kanamycyna B wykazują doskonałą aktywność przeciwbakteryjną, wyższą od aktywności kanamycyny A. W tablicy 4 zestawiono minimalne stężenie kanamycyny A i 1-/L-/-γ-amino-α-hydroksybutyrylo/kanamycyny B, hamujące wzrost szeregu bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych (MIC). Oznaczenia wykonano metodą rozcieńczeń na agarze.

Tablica 4  
MIC (mg/ml)

Organizm	Symbol kodu Bristol	Odporna	1-/L-/-γ-amino-α-hydroksybutyrylo/kanamycyna B	Kanamycyna B
1	2	3	4	5
<i>E.coli</i> N1HJ			0,4	0,8
<i>E.coli</i> Juhl	A 15119		1,6	0,8
<i>E.coli</i>	A 15169		1,6	1,6
<i>E.coli</i>	A 20363	KM	0,8	50
<i>E.coli</i>	A 9844		0,8	0,8
<i>E.coli</i>	A 20365	KM	0,4	>50
<i>E.coli</i> K-12			0,8	0,4
<i>E.coli</i> K-12	A 20664	KM	0,8	3,1
<i>E.coli</i> K-12	A 20665	KM	0,8	50
<i>K.pneumoniae</i> D11			0,2	0,2
<i>K.pneumoniae</i> D11	A 9678		0,8	0,8
<i>S.maroescens</i>	A 20019		1,6	1,6
<i>Ps. aeruginosa</i> D15			3,1	12,5
<i>Ps. aeruginosa</i> D113		KM	50	>50
<i>Ps. aeruginosa</i>	A 9923		1,6	25
<i>Ps. aeruginosa</i>	A 9930		0,8	6,3
<i>Ps. aeruginosa</i>	A 15150		6,3	25
<i>Ps. aeruginosa</i>	A 15194		1,6	12,5
<i>Ps. aeruginosa</i>	A 20479	KM	1,6	50
<i>Ps. aeruginosa</i>	A 20616	KM	3,1	25
<i>Ps. aeruginosa</i>	A 20653	KM	25	50
<i>Ps. aeruginosa</i>	A 9843		1,6	12,5
<i>Pseudomonas</i> sp.	A 20355		1,6	6,3
<i>Pseudomonas</i> sp.	A 20358	KM	3,1	12,5
<i>Pseudomonas</i> sp.	A 20368	GM	50	25
<i>Pseudomonas</i> sp.	A 20598	GM	6,3	25
<i>Pseudomonas</i> sp.	A 20600	GM	3,1	12,5
<i>Pseudomonas</i> sp.	A 20603	GM	6,3	>50
<i>Pseudomonas</i> sp.	A 20618	GM	50	50
<i>Pr. vulgaris</i>	A 9436		1,6	0,8
<i>Pr. vulgaris</i>	A 9526		0,8	0,8
<i>Pr. mirabilis</i>	A 9554		1,6	1,6
<i>Pr. mirabilis</i>	A 9900		1,6	1,6
<i>Pr. morgani</i>	A 9553		1,6	1,6
<i>Pr. morgani</i>	A 20031		6,3	3,1
<i>Pr. rettgeri</i>	A 15167		0,8	0,8
<i>S. aureus</i> 209P			1,6	0,8
<i>S. aureus</i> Smith			0,8	0,4
<i>S. aureus</i> 209P			1,6	0,8
<i>S. aureus</i>	A 20239	KM	1,6	25
<i>S. lutea</i> PCI-1001			1,6	3,1
<i>M.flavus</i>			0,4	0,8
<i>B.subtilis</i> PCI-219			0,1	0,1
<i>St. pyogenes</i> S-23			25	25

ciąg dalszy tablicy 4

1	2	3	4	5
St. pyogenes Dick			1,6	1,6
St. pyogenes Digonnet	A 9604		12,5	25
St. pyogenes	A 20065		25	25
D. pneumoniae			50	25
Mycobacterium 607			6,3	0,8
Mycobacterium 607 D105		KM	>100	>100
Mycobacterium 607 D107		KM	>100	>100
Mycobacterium phlei			1,6	1,6
Mycobacterium ranae			6,3	1,6
Mycobacterium H <sub>37</sub> Rv *)			0,8	0,4

\*) — oznaczone metodą rozcieńczeń w próbkach

KM — kanamycyna A

GM — gentamycyna

Jak wynika z danych przedstawionych w tablicy 4, 1-/L-/-/-γ-amino-α-hydroksybutyrylo/kanamycyna B jest aktywniejsza od kanamycyny A, szczególnie w stosunku do organizmów odpornych na kanamycynę A.

Ocenę 1-/L-/-/-γ-amino-α-hydroksybutyrylo/kanamycyny B in vivo przeprowadzono w stosunku do następujących odpornych i nieodpornych na kanamycynę B szczepów E. coli i Ps. aeruginosa:

	Liczba kodowa	Odporność w stosunku do kanamycyny
E.coli Juhl	A 15119	nie odporny
E.coli ML-1630	A 20363	odporny (fosforylacja)
Ps. aeruginosa D 15	—	umiarkowanie odporny
Ps. aeruginosa D 113	—	wysoce odporny (fosforylacja)

20 1-/L-/-/-γ-amino-α-hydroksybutyrylo/kanamycyna B i antybiotyk macierzysty są jednakowo skuteczne w stosunku do E. coli Juhl A 15119 w dawkach 6,3 mg/kg, w doświadczeniach na myszach. W stosunku do E. coli ML-1630 1-/L-/-/-γ-amino-α-hydroksybutyrylo/kanamycyna B jest skuteczna w dawce 6,3 mg/kg, podczas gdy skuteczna dawka antybiotyku macierzystego wynosi 100—400 mg/kg.

25 Jak wynika z poniższej tablicy 5, 1-/L-/-/-γ-amino-α-hydroksybutyrylo/kanamycyna B jest nieco aktywniejsza niż antybiotyk macierzysty w stosunku do umiarkowanie odpornego Ps. aeruginosa D 15, a znacznie aktywniejsza w stosunku do wysoce odpornego Ps. aeruginosa D-113.

30 Przykład I a) Wytwarzanie kwasu L-/-/-γ-benzoksykarbonyloamino-α-hydroksymasłowego.

35 Do roztworu 5,2 g (0,13 mola) wodorotlenku sodu w 50 ml wody dodaje się 7,4 g (0,062 mola) kwasu L-/-/-γ-amino-α-hydroksymasłowego. Do mieszanego roztworu, utrzymywanego w temperaturze 0°C, 40 wkrapla się w ciągu 0,5 godziny 11,7 g (0,068 mola)

Tablica 5

Dawka (podskórnice)	E.coli Juhl A 15119		E.coli ML-1630	
	1-/L-/-/-γ-amino-α-hydroksybutyrylo/kanamycyna B	Kanamycyna B *)	1-/L-/-/-γ-amino-α-hydroksybutyrylo/kanamycyna B	Kanamycyna B
400 mg/kg	—	—	—	2/5
100	5/5	5/5	5/5	2/5
25	5/5	5/5	5/5	0/5
1	2	3	4	5
6,3	5/5	5/5	5/5	0/5
1,6	0/5	0/5	2/5	—
CD <sub>50</sub> (mg/kg)	3,1	3,1	1,8	ca-300
	Ps. aeruginosa D15		Ps. aeruginosa D-113	
100 mg/kg	5/5	5/5	400 mg/kg	—
25	1/5	0/5	200	3/5
6,3	1/5	0/5	50	1/5
1,6	0/5	0/5	12,5	0/5
			3,1	0/5
CD <sub>50</sub> (mg/kg)	38	50	CD <sub>50</sub> (mg/kg)	145
				>400

\*) KM-B = kanamycyna B. Symbole 0/5, 1/5, 5/5 itp. oznaczają liczbę zwierząt przeżywiających na 5 podanych próbie: na przykład 5/5 oznacza, że z 5 zwierząt 5 przeżyło śmiertelną dawkę zakażenia, po iniekcji kanamycyny B lub 1-/L-/-/-γ-amino-α-hydroksybutyrylo/kanamycyny B.

estru benzyłowego kwasu chloromrówkowego, po czym w ciągu dalszej godziny kontynuuje się mieszanie w tej samej temperaturze. Następnie mieszaninę reakcyjną przemywa się 50 ml eteru, rozcieńczonym kwasem solnym wartość pH doprowadza do 2 i ekstrahuje czterema porcjami po 80 ml eteru. Połączone ekstrakty eterowe przemywa się małą ilością nasyconego roztworu chlorku sodu, suszy bezwodnym siarczanem sodu i przesącza. Przesącz odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość przekształca z benzenu, otrzymując 11,6 g (74% teoretycznej wydajności) produktu, w postaci bezbarwnych kryształów o temperaturze topnienia 78,5–79,5°C, skręcalności właściwej  $[\alpha]_D = 4,5^\circ$  ( $c=2$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). Widmo w podczerwieni (w KBr) wykazuje absorpcje grupy karbonyłowej przy 1740 i 1690  $\text{cm}^{-1}$ . W widmie magnetycznego rezonansu jądrowego (roztwór w deuterowanym acetonie, wzorzec TMS) obecne są sygnały przy 2,0 ppm (2 H, multiplet), 3,29 ppm H, dublet dubletów,  $J=6,7$  i 12 Hz), 4,16 ppm (1 H, dublet dubletów,  $J=4,5$  i 8 Hz), 4,99 ppm (2 H, singlet), 6,2 ppm (2 H, szerokie pasmo) i 7,21 ppm (5 H, singlet).

Analiza elementarna:

wartości obliczone dla  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_2$ :

C=56,91%, H=5,97%, N=5,53%, wartości znalezione: C=56,86%, H=5,97%, N=5,47%.

b) Wytwarzanie estru N-hydroksysukcynimidowego kwasu L-/-/-γ-benzoksykarbonyloamino-α-hydroksymasłowego.

Do roztworu 10,6 g (0,042 mola) kwasu L-/-/-γ-benzoksykarbonyloamino-α-hydroksymasłowego i 4,8 g (0,042 mola) N-hydroksysukcynimidu (G. W. Anderson et al., J. Am. Chem. Soc. 86, 1839 /1964/) w 200 ml octanu etylu, ochłodzonego do temperatury 0°C, dodaje się 0,6 g (0,042 mola) dwucykloheksylokarbonylodwuimidu i tak otrzymaną mieszaninę przechowuje w ciągu nocy w lodówce. Wytrącony dwucykloheksyloamocznik odsącza się, a przesącz pod zmniejszonym ciśnieniem zętaża do objętości około 60 ml i odsącza wytrącony produkt. Otrzymuje się 6,4 g kryształów o temperaturze topnienia 121–122,5°C. Przesącz odparowuje się do sucha, a krystaliczną pozostałość przemywa 20 ml mieszaniny benzenu z n-heksanem. Łączna wydajność produktu wynosi 13,4 g (92% teoretycznej). Skręcalność właściwa  $[\alpha]_D = 1,5^\circ$  ( $c=2$ ,  $\text{CHCl}_3$ ). Widmo w podczerwieni wykazuje absorpcję grupy karbonyłowej przy 1810, 1755, 1740 i 1680  $\text{cm}^{-1}$ . W widmie magnetycznego rezonansu jądrowego (roztwór w deuterowanym acetonie, wzorzec TMS) występujące sygnały przy 2,0 ppm (2 H, multiplet), 2,83 ppm (4 H, singlet), 3,37 ppm (2 H, dublet dubletów,  $J=6,5$  i 12,5 Hz), 4,56 ppm (1 H, multiplet), 4,99 ppm (2 H, singlet), 6,3 ppm (2 H, szeroki sygnał) i 7,23 ppm (5 H, singlet).

Analiza elementarna:

wartości obliczone dla  $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_7$ :

C=54,85%, H=5,18%, N=8,00%, wartości znalezione: C=54,79%, 4,70%, H=5,21%, 5,20%, N=8,14%, 8,12%.

c) Wytwarzanie 1-/L-/-/-γ-benzoksykarbonyloamino-α-hydroksybutyrylo/-6'-karbobenzoksykanamycyny A.

Do mieszanego roztworu 2,6 g (4,2 milimola) 6'-monobenzoksykarbonylokanamycyny A w 40 ml 50% wodnego eteru dwumetyłowego etylenoglikolu wkrapla się roztwór 1,6 g (4,6 milimola) estru N-hydroksysukcynimidowego kwasu L-/-/-γ-benzoksykarbonyloamino-α-hydroksymasłowego w 40 ml eteru dwumetyłowego glikolu etylenowego i kontynuuje mieszanie w ciągu nocy. Następnie mieszaninę odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem, a mającą brązowe zabarwienie pozostałość, którą stanowi 1-/L-/-/-γ-benzoksykarbonyloamino-α-hydroksybutyrylo/-6'-karbobenzoksykanamycyna A, nie oczyszczając, przerabia się w następnej reakcji.

d) Wytwarzanie 1-/L-/-/-γ-amino-α-hydroksybutyrylo/kanamycyny A.

Surowy produkt rozpuszcza się w 40 ml 50% wodnego dioksanu i przesącza, odrzucając niewielkie ilości nie rozpuszczonego materiału. Do przesącza dodaje się 0,8 ml lodowatego kwasu octowego i 1 g 10% palladu na węglu i mieszaninę uwodornia w temperaturze pokojowej w ciągu 24 godzin, w aparacie systemu Parra. Po odsączeniu katalizatora roztwór odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha. Pozostałość rozpuszcza się w 30 ml wody i poddaje chromatografii na kolumnie o wymiarach 50×1,8 cm, wypełnionej żywicą jonitową GG-50 w formie  $\text{NH}_4^+$ . Przez kolumnę przepuszcza się kolejno 200 ml wody, 800 ml 0,1 n  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 500 ml 0,2 n  $\text{NH}_4\text{OH}$  i 500 ml 0,5 n  $\text{NH}_4\text{OH}$ , zbierając frakcje wycieku o objętości 10 ml. Frakcje 146–154 zawierają 552 mg (22% ilości teoretycznej) karbobenzoksykanamycyny A 1-/L-/-/-γ-amino-α-hydroksybutyrylo/kanamycyny A o temperaturze topnienia 187°C (z rozkładem) i względnej aktywności w stosunku do B. subtilis (płyty agarowe) = 560 μg/mg (standard: zasada kanamycyny A).

250 g produktu rozpuszczonego w 10 ml wody poddaje się chromatografii na kolumnie o wymiarach 30×0,9 cm, wypełnionej żywicą jonitową CG-50 w formie  $\text{NH}_4^+$ . Kolumnę przemywa się 50 ml wody i eluuje 0,2 n  $\text{NH}_4\text{OH}$ , zbierając frakcje o objętości 10 ml. Połączone frakcje 50–63 odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha, otrzymując 98 mg produktu o temperaturze topnienia 194°C (z rozkładem), skręcalności właściwej  $[\alpha]_D = +85^\circ$  ( $c=2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ) i względnej aktywności w stosunku do B. subtilis (płyty agarowe) = 960 μg/mg (standard: zasada kanamycyny A).

Analiza elementarna:

wartości obliczone dla  $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_{13} \cdot 2\text{H}_2\text{CO}_3$

C=40,62%, H=6,68%, N=9,87%, wartości znalezione: C=40,21%, 39,79%, H=6,96%, 6,87%, N=9,37%, 9,49%.

Przykład II a) Wytwarzanie N-benzoksykarbonyloksy/sukcynimidu.

23 g (0,2 mola) N-hydroksysukcynimidu (G. W. Anderson et al., J. Am. Chem. Soc. 86, 1839 (1964), rozpuszcza się w roztworze 9 g (0,22 mola) wodorotlenku sodu w 200 ml wody. Do roztworu, chłodzonego wodą i mieszanego, wkrapla się 34 g (0,2 mola) estru benzyłowego kwasu chloromrówkowego, a następnie całość miesza w ciągu nocy, w temperaturze pokojowej. Wytrąconą pochodną karbobenzoksy odsącza się, przemywa wodą i suszy.

Wydajność 41,1 g (82%). Po przekrystalizowaniu z mieszaniny benzenu z n-heksanem (10:11) otrzymuje się bezbarwne kryształy o temperaturze topnienia 78–79°C.

b) Wytwarzanie 6'-karbobenzoksykanamycyny A.

Do utrzymywanego w temperaturze poniżej 0°C i silnie mieszanego roztworu 42,5 g (90 milimoli) zasady kanamycyny w 450 ml wody i 500 ml dwumetyloformamidu wkrapla się w ciągu 2 godzin roztwór 22,4 g (90 milimoli) N-/benzoksykarbonyloksy/sukcynimidu w 500 ml dwumetyloformamidu. Całość miesza się w temperaturze -10 do 0°C, a następnie w ciągu doby w temperaturze pokojowej, po czym odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem, w temperaturze poniżej 50°C. Oleistą pozostałość rozpuszcza się w mieszaninie 500 ml wody i 500 ml butanolu, odsącza części nierozpuszczone, a przesącz pozostawia do rozwarstwienia. Warstwę butanolową przemywa się dwiema porcjami po 500 ml butanolu wysyconego wodą, a warstwę wodną dwiema porcjami po 500 ml wody wysyconej butanolem, techniką zbliżoną do rozdzielu przeciwwądnego.

Połączone trzy warstwy odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha, otrzymując oleistą pozostałość, która, przechowywana w temperaturze pokojowej, częściowo krystalizuje. Całość, łącznie z kryształami, zadaje się około 100 ml metanolu, który rozpuszcza olej i oddziela go od kryształów. Po dodaniu około 300 ml etanolu mieszaninę utrzymuje się w ciągu nocy w temperaturze pokojowej, otrzymując krystaliczną masę, którą odsącza się. Wydajność: 44 g. Produkt zawiera małą ilość kanamycyny A, co wykazuje chromatografia cienkowarstwowa w układzie n-propanol/pirydyna/kwas octowy/woda (15:10:3:12) z wywołaniem ninhydryną.

Surowy produkt, rozpuszczony w 300 ml wody, poddaje się chromatografii na kolumnie o średnicy 30 mm, wypełnionej 500 ml żywicy jonitowej CG-50 w formie NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Przez kolumnę przepuszcza się 0,1 n NH<sub>4</sub>OH, zbierając frakcje wycieku o objętości 10 ml. Pożądany produkt znajduje się we frakcjach 10–100, kanamycyna A we frakcji wolniej wędrującej, a izomer(y) pozycyjne produktu prawdopodobnie zawarte są we frakcji wędrującej szybciej. Frakcje 10–110 łączy się otrzymując, po odparowaniu do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, 24,6 g (45%) bezbarwnej 6'-karbobenzoksykanamycyny A (6'-Cbz-kanamycyny A), która w temperaturze 204°C zaczyna ciemnieć i topnieć, a rozkłada się w temperaturze 212°C, z wydzieleniem gazu. Skręcalność właściwa [α]<sub>D</sub><sup>24</sup> = +106° (c=2, H<sub>2</sub>O).

Chromatografia cienkowarstwowa (żel krzemionkowy F<sub>254</sub>, wywołanie ninhydryną).

Układ	Wartości R <sub>f</sub>	
	6'-cbz.-kanamycyna A	kanamycyna A
1	2	3
n-propanol/pirydyna/ AcOH/H <sub>2</sub> O (15:10:3,12)	0,42 0,33 0,15 (główna) (dodatkowe)	0,04

	1	2	3
5	aceton/AcOH/H <sub>2</sub> O (20:6:74)	0,24	0,14
	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/stęż.		
	NH <sub>4</sub> OH/H <sub>2</sub> O (1:4:2:1)	0,22 *)	0,04 *)

\*) wywołanie antronem w kwasie siarkowym.

Jak wykazuje chromatografia cienkowarstwowa, produkt końcowy zawiera niewielką domieszkę dwóch składników. Do wytwarzania 1-/L-/-γ-amino-α-hydroksybutyrylo/kanamycyny A jest stosowany bez dodatkowego oczyszczania.

Przykład III. Wytwarzanie kwasu L-/-γ-amino-α-hydroksymasłowego z ambutyrozyny A lub B lub z ich mieszanin.

5,0 g ambutyrozyny A (opis patentowy St. Zjedn. Ameryki nr 3 541 078) ogrzewa się w ciągu godziny, pod chłodnicą zwrotną, z 160 ml 0,5 n wodorotlenku sodu. Hydrolizat zobojętnia się 6 n HCl i poddaje chromatografii kolumnowej na żywicy jonitowej CG-50 w formie NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Kolumnę rozwija się wodą, pożądany kwas L-/-γ-amino-α-hydroksymasłowy otrzymuje się z roztworu przez liofilizację. Krystaliczny produkt ma temperaturę topnienia 212,5–214,5°C (opis patentowy St. Zjedn. Ameryki nr 3 541 078).

Przykład IV. Wytwarzanie 6'-karbobenzoksykanamycyny B.

Do ochłodzonego roztworu 8,1 g (0,0168 mola) kanamycyny B w 120 ml wody i 80 ml 1,2-dwumetoksyetanu wkrapla się, mieszając, roztwór 4,2 g (0,0168 mola) N-/benzoksykarbonyloksy/sukcynimidu w 40 ml 1,2-dwumetoksyetanu. Mieszaninę kontynuuje się w ciągu nocy, po czym mieszaninę odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszcza się w 100 ml wody i dwukrotnie wytrząsa z porcjami po 50 ml n-butanolu wysyconego wodą. Warstwę wodną oddziela się i przepuszcza przez kolumnę zawierającą 100 ml żywicy CG-50 w formie NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Kolumnę przemywa się 200 ml wody i eluuje 0,05 n NH<sub>4</sub>OH, zbierając frakcje wycieku o objętości 10 ml. Połączone frakcje 121–180 odparowuje się i liofilizuje, otrzymując 1,58 g (15%) pożądanego produktu. Frakcje 1–120 odparowuje się i poddaje ponownej chromatografii na kolumnie CG-50 (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), otrzymując 1,21 g (12%) produktu. Temperatura topnienia 151–152°C. (z rozkładem), [α]<sub>D</sub><sup>24</sup> = +104° (c=2,5, H<sub>2</sub>O). Widmo w podczerwieni wykazuje absorpcję grupy karbonylowej przy 1710 cm<sup>-1</sup>.

Analiza elementarna:

wartości obliczone dla C<sub>26</sub>H<sub>43</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>:

C=50,56%, H=7,02%, N=11,34%, wartości znalezione: C=50,71%, H=7,38%, N=11,48%.

Chromatografia cienkowarstwowa na żelu krzemionkowym F 254; w układzie n-propanol/pirydyna/kwas octowy/woda (15:10:3:12) R<sub>f</sub>=0,03, w układzie aceton/kwas octowy/woda (20:6:74) R<sub>f</sub>=0,16.

Przykład V. Wytwarzanie 1-/L-/-γ-benzoksykarbonyloamino-α-hydroksybutyrylo-6'-karbobenzoksykanamycyny B.

Do mieszanego w temperaturze 5°C roztworu 1,85 g (3,0 mola) 6'-karbobenzoksykanamycyny B w 40 ml H<sub>2</sub>O i 50 ml 1,2-dwumetoksyetanu dodaje się



w jednej porcji 1,1 g (3,1 mola) N-/L- $\gamma$ -karbobenzozksy-amino- $\alpha$ -hydroksybutyryloksy/sukcynimidu.

Mieszanie kontynuuje się w ciągu nocy, w temperaturze pokojowej, a następnie nie wyodrębniając pochodnej karbobenzozksy-, poddaje się wodorolizie. Chromatografia cienkowarstwowa na żelu krzemionkowym F 254: w układzie n-propanol/pirydyna/kwas octowy/woda (15:10:3:12)  $R_f=0,06$  (substrat  $R_f=0,41$  i  $0,57$ ), w układzie aceton/kwas octowy/woda (20:6:74)  $R_f=0,11$  (substrat  $R_f=0,21$ ,  $0,34$  i  $0,46$ ).

Przykład VI. Wytwarzanie 1-/L-/- $\gamma$ -amino- $\alpha$ -hydroksybutyrylo/kanamycyny B.

Do roztworu otrzymanego w przykładzie V dodaje się 0,2 g 10% palladu na węglu. Po uwodornianiu mieszaniny pod ciśnieniem atmosferycznym w ciągu 5 godzin dodaje się dalszą porcję 10% palladu na węglu (0,1 g) i 10 ml wody, po czym kontynuuje uwodornianie w ciągu nocy. Po odsączeniu katalizatora roztwór odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszcza w 50 ml wody i poddaje chromatografii na kolumnie o wymiarach  $50 \times 1,2$  cm, wypełnionej żywicą jonitową CG-50 w formie  $\text{NH}_4^+$ . Kolumnę przemywa się 200 ml wody, a następnie eluuje kolejno 500 ml 0,1 n  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 500 ml 0,2 n  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 900 ml 0,5 n  $\text{NH}_4\text{OH}$  i 500 ml 1 n  $\text{NH}_4\text{OH}$ , zbierając frakcje wycieku o objętości 10 ml.

Z frakcji 60—76 odzyskuje się 459 mg (32%) kanamycyny B. Połączone frakcje 128—138 odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem i liofilizuje, otrzymując 318 mg (17% obliczone w stosunku do wprowadzonej do reakcji karbobenzozksykanamycyny B) 1-/L-/- $\gamma$ -amino- $\alpha$ -hydroksybutyrylo/kanamycyny B o temperaturze topnienia  $186$ — $187^\circ\text{C}$  (z rozkładem) i skręcalności właściwej  $[\alpha]_D^{24} = +78^\circ$  ( $c=1,15$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ). Widmo w podczerwieni wykazuje absorpcję grupy karbonylowej przy  $1640 \text{ cm}^{-1}$ .

Analiza elementarna:

wartości obliczone dla  $\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{N}_6\text{O}_{12} \cdot \text{H}_2\text{CO}_3$ :  
C=42,72%, H=7,17%, N=13,00%, wartości znalezione: C=42,23%, H=7,19%, N=13,00%.

Chromatografia cienkowarstwowa na żelu krzemionkowym F 254, z wywołaniem ninhydryną: w układzie aceton/kwas octowy/woda (20:6:74)  $R_f=0,11$ , w układzie  $\text{CHCl}_3$ /metanol/stężony amoniak (1:4:2:1),  $R_f=0,19$ .

Połączone frakcje 201—222 odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem i liofilizuje, otrzymując 209 mg dodatkowego aktywnego składnika o temperaturze topnienia  $183$ — $184^\circ\text{C}$  (z rozkładem), wykazującego absorpcję grupy karbonylowej przy  $1750 \text{ cm}^{-1}$ .

Analiza elementarna:

wartości obliczone dla  $\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{O}_{12} \cdot \text{H}_2\text{CO}_3$ :  
C=42,72%, H=7,17%, N=13,00%, wartości znalezione: C=42,25%, H=6,93%, N=12,18%.

Chromatografia cienkowarstwowa na żelu krzemionkowym F 254: w układzie aceton/kwas octowy/woda (20:6:74)  $R_f=0,07$ , w układzie  $\text{CHCl}_3$ /metanol/stężony amoniak (1:4:2:1)  $R_f=0,07$ .

Przykład VII. Wytwarzanie kwasu L-/L-/- $\gamma$ -amino- $\alpha$ -hydroksymasłowego z kwasu DL- $\gamma$ -hydroksy- $\alpha$ -ftalimidomasłowego.

A) L- $\gamma$ -hydroksy- $\alpha$ -ftalimidomasłan dehydroabietyloamoniowy.

Do roztworu 25 g (0,1 mola) kwasu 2-hydroksy- $\gamma$ - $\alpha$ -ftalimidomasłowego (Y. Saito et al., Tetrahedron Letters (1970, 4863) w 200 ml etanolu dodaje się roztwór 29 g (0,1 mola) dehydroabietyloaminy w 130 ml etanolu. Roztwór silnie wstrząsa się w ciągu minuty, po czym odstawia na przeciąg 5 godzin, utrzymując temperaturę pokojową. Z roztworu wykryształizują drobne igły, które odsąca się, przemywa 50 ml etanolu i suszy na powietrzu, otrzymując 30,1 g (56%) diastereoizomeru soli dehydroabietyloamoniowej o temperaturze topnienia  $93$ — $94^\circ\text{C}$  i skręcalności właściwej  $[\alpha]_D^{24} = +15^\circ$  ( $c=2,5$ , MeOH). Ponowna krystalizacja z 300 ml etanolu daje 23,2 g (43%) czystego produktu o temperaturze topnienia  $94$ — $95^\circ$  i skręcalności właściwej  $[\alpha]_D^{24} = +10,8^\circ$  ( $c=2,5$ , MeOH). Dalsza krystalizacja nie zmienia temperatury topnienia i skręcalności właściwej.

Analiza elementarna:

wartości obliczone dla  $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ :  
C=69,54%, H=8,02%, N=5,07%, wartości znalezione: C=69,58%, H=8,08%, N=5,07%.

B) Kwas L-/L-/- $\gamma$ -amino- $\alpha$ -hydroksymasłowy

Do roztworu 1,5 g (0,014 mola) węglanu sodu w 40 ml wody dodaje się 5,3 g (0,01 mola) L- $\gamma$ -hydroksy- $\alpha$ -ftalimidomasłanu dehydroabietyloamoniowego i 60 ml eteru. Mieszaninę energicznie wstrząsa się do rozpuszczenia substancji stałej. Warstwę eterową odziera się, a warstwę wodną dwukrotnie przemywa porcjami po 20 ml eteru i pod zmniejszonym ciśnieniem odparowuje do objętości 15 ml. Zateżony roztwór wlewa się do 10 ml stężonego kwasu solnego i w ciągu 10 godzin ogrzewa do wrzenia pod chłodnicą zwrotną. Po ochłodzeniu odsąca się wytrącony kwas ftalowy, a przesącz odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszcza się w 10 ml wody i roztwór odparowuje do sucha.

Powyższą operację powtarza się dwukrotnie, usuwając w ten sposób nadmiar kwasu solnego. Pozostały syrop rozpuszcza się w 10 ml wody i odsąca niewielkie ilości nierozpuszczalnego kwasu ftalowego. Przesącz przepuszcza się przez kolumnę o wymiarach  $35 \times 1$  cm, wypełnioną jonitem IR-120 w formie  $\text{H}^+$ , kolumnę przemywa 300 ml wody a następnie eluuje 1 n wodorotlenkiem amonu, zbierając frakcje wycieku o objętości 15 ml. Reagujące z ninhydryną frakcje 10—16 łączy się i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując syropowatą pozostałość, która stopniowo krystalizuje. Kryształ rozciera się z etanolem, odsąca i suszy w suszarce próżniowej, otrzymując 0,78 g (66%) kwasu L-/L-/- $\gamma$ -amino- $\alpha$ -hydroksymasłowego o temperaturze topnienia  $206$ — $207^\circ\text{C}$  i skręcalności właściwej  $[\alpha]_D^{24} = -29^\circ$  ( $c=2,5$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ). Widmo w podczerwieni powyższego produktu jest identyczne z widmem kwasu L-/L-/- $\gamma$ -amino- $\alpha$ -hydroksymasłowego otrzymanego z ambutyrozyny.

Przykład VIII. Wytwarzanie monosiarczanu 1-/L-/- $\gamma$ -amino- $\alpha$ -hydroksybutyrylo/kanamycyny A lub B.

Jeden mol 1-/L-/- $\gamma$ -amino- $\alpha$ -hydroksybutyrylo/kanamycyny A lub B rozpuszcza się w 1 do 3

litrach wody. Roztwór przesącza się, usuwając nierozpuszczone substancje stałe, następnie schładza się i mieszając dodaje 1 mol kwasu siarkowego, rozpuszczonego w 500 ml wody. Całość miesza się w ciągu 30 minut, następnie dodaje zimnego etanolu w takiej ilości, by wywołać wytrącenie osadu.

**Przykład IX.** Wytwarzanie dwusiarczuanu 1-/L-/-γ-amino-α-hydroksybutyrylo/kanamycyny A.

35 g 1-/L-/-γ-amino-α-hydroksybutyrylo/kanamycyny A (w postaci trójwodorotlenku mono-kwasnego węglanu) rozpuszcza się w 125 ml odmineralizowanej wody. Roztwór wykazuje wartość pH około 9,0. Dodaniem 50% (objętościowo) kwasu siarkowego obniża się wartość pH roztworu do 7—7,5.

Do roztworu dodaje się 8,5 g węgla aktywnego Darce G-60 i całość miesza w ciągu 0,5 godziny w temperaturze pokojowej. Węgiel odsącza się i przeemywa 40 ml wody. Popłuczyny łączy się z przesączem.

Przesącz z popłuczynami doprowadza się dodatkiem 50% kwasu siarkowego do wartości pH=2—2,6, co powoduje wydzielanie dużych ilości dwutlenku węgla. Roztwór miesza się w ciągu 20 minut pod obniżonym ciśnieniem, co powoduje uwolnienie dalszych ilości dwutlenku węgla.

Do odgazowanego roztworu dodaje się 8,5 g węgla aktywnego Darce G-60 i miesza w ciągu 0,5 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie węgiel odsącza się i przeemywa 35 ml odmineralizowanej wody. Popłuczyny łączy się z przesączem.

Wartość pH przesącza z popłuczynami doprowadza się do 1—1,3, dodatkiem 50% kwasu siarkowego, po czym mieszając w ciągu 10 minut dodaje go do 600—800 ml metanolu (3—4 objętości metanolu). Całość miesza się w ciągu 5 minut przy wartości pH=1—1,3; przesącza przez sito 100 mesh, miesza w ciągu dalszych 2 minut i odstawia na przeciąg 5 minut do osadzenia osadu. Ługi zlewa się, pozostałą breję przesącza, przeemywa 200 ml metanolu i śluzę pod obniżonym ciśnieniem w temperaturze 50°C w ciągu 24 godzin. Wydajność produktu wynosi 32—34 g. Skręcalność właściwa  $[\alpha]_D^{25} = +74,75^\circ$  (H<sub>2</sub>O). Substancja rozkłada się w temperaturze 220—230°C. Analiza elementarna w przeliczeniu na substancję bezwodną: zawartość wody, oznaczona metodą Fishera wynosi 2,33, 1,79 i 2,87 g, wartość teoretyczna dla jednowodzianu 2,25%; wartości teoretyczne: C=33,5%, N=8,97%, S=8,2%, wartości znalezione: C=32,7%, 33,5%, 32,3%, N=8,78%, 8,7%, 8,2%, 8,8%, S=8,75%, 8,9%, 7,8%, 8,85%, popiołu brak.

Otrzymana sól jest higroskopijna, lecz nie rozpuszcza się. Po przechowywaniu w ciągu 18 godzin w temperaturze pokojowej zawartość wody wzrasta do 9,80% (zawartość teoretyczna dla pięciowodzianu wynosi 10,33%).

#### Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania półsyntetycznych kanamycyn A i B, podstawionych w pozycji 1 rodnikiem L-/L-/-γ-amino-α-hydroksybutyrylowym o ogólnym wzorze 1, w którym R<sup>3</sup> oznacza grupę wodorotlenkową lub aminową, oraz ich soli addycyjnych z kwasami, znamienny tym, że acyluje się kanamycynę A lub kanamycynę B czynnikiem acylującym,

wybranych spośród związków o wzorach 5—13 i karbowudimidów związków o wzorach 12 i 13, w których to wzorach R<sup>4</sup> i R<sup>5</sup> są jednakowe lub różne i oznaczają atomy wodoru, fluoru, chloru lub bromu, grupy NO<sub>2</sub>, OH, niższe grupy alkilowe lub niższe grupy alkoksylowe, a X oznacza atom chloru, bromu lub jodu, lub funkcjonalnymi równoważnikami powyższych czynników acylujących, stosowanymi w ilości co najmniej 1 mol na 1 mol kanamycyny A lub B w rozpuszczalniku, w temperaturze poniżej 50°C, a powstały związek o wzorze 14, w którym R<sup>3</sup> ma znaczenie wyżej podane, Y oznacza rodnik o wzorze 15, 16, 17, 18, 19 lub 20, a R<sup>4</sup> i R<sup>5</sup> we wzorze 15 mają znaczenie wyżej podane poddaje się reakcji z pochodną kwasu L-/L-/-γ-amino-α-hydroksymasłowego o wzorze 21, w którym W oznacza rodnik o wzorze 15, 16, 17, 18, 19 lub 20, M oznacza rodnik o wzorze 22, 23, 24, 25 lub 26, a R<sup>4</sup> i R<sup>5</sup> we wzorze 15 mają znaczenie podane wyżej, lub funkcjonalnym równoważnikiem wymienionego czynnika acylującego, użytym w ilości co najmniej 0,5 mola na 1 mol związku o wzorze 14, w rozpuszczalniku, po czym w otrzymanym związku o wzorze 27, w którym R<sup>3</sup>, Y i W mają znaczenie podane wyżej usuwa się znanymi sposobami blokujące grupy W i Y i ewentualnie przeprowadza się otrzymany związek o wzorze 1 w nietekstycznej, nadającej się do zastosowań farmaceutycznych sól addycyjną z kwasem.

2. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że na kanamycynę A lub B działa się czynnikiem acylującym o wzorze 5, w którym R<sup>4</sup> i R<sup>5</sup> mają znaczenie podane w zastrz. 1, w rozpuszczalniku, takim jak dwumetyloformamid, dwumetyloacetamid, czterowodorofuran, dioksan, 1,2-dwumetoksyetan, metanol, etanol, woda, aceton, pirydyna, N-alkilopiperidyny lub mieszaniny tych rozpuszczalników, a na powstały związek o wzorze 14, w którym R<sup>3</sup> ma znaczenie podane w zastrz. 1, Y oznacza rodnik o wzorze 15, w którym R<sup>4</sup> i R<sup>5</sup> oznaczają atomy wodoru działa się czynnikiem acylującym o wzorze 21, w którym W oznacza rodnik o wzorze 15, w którym R<sup>4</sup> i R<sup>5</sup> mają znaczenie podane w zastrz. 1, a M oznacza rodnik o wzorze 22 użytym w ilości 0,5—1,4 mola na 1 mol związku o wzorze 14, w rozpuszczalniku, takim, jak mieszanina wody z eterem dwumetylowym etylenoglikolu, dioksan, dwumetyloacetamid, dwumetyloformamid, czterowodorofuran lub eter dwumetylowy, propylenoglikolu.

3. Sposób według zastrz. 2, znamienny tym, że pierwszą reakcją acylowania prowadzi się w dwumetyloformamidzie, w temperaturze poniżej 25°C, a drugą reakcją acylowania w mieszaninie wody z eterem dwumetylowym etylenoglikolu w stosunku 1:1, stosując czynnik acylujący w ilości 0,8—1,1 moli na mol związku o wzorze 14.

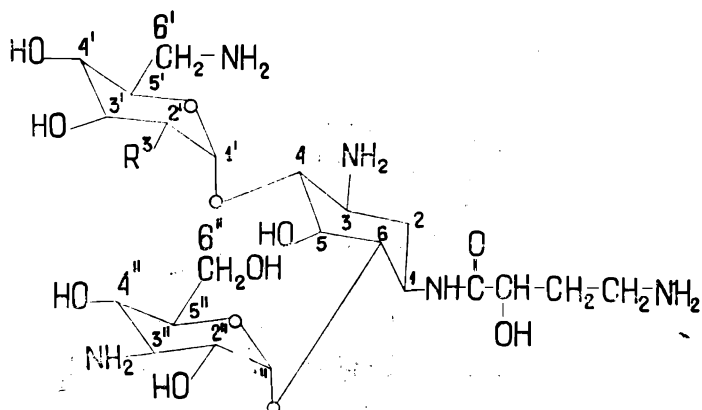
4. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że ze związku o wzorze 27, w którym R<sup>3</sup> ma znaczenie podane w zastrz. 1, a W i Y oznaczają rodnik o wzorze 15, w którym R<sup>4</sup> i R<sup>5</sup> oznaczają atomy wodoru, usuwa się blokujące grupy W i Y podając ten związek wodorolizie gazowym wodorem w obecności metalicznego katalizatora, w miesza-

nie wody z rozpuszczalnikiem, mieszającym się z wodą.

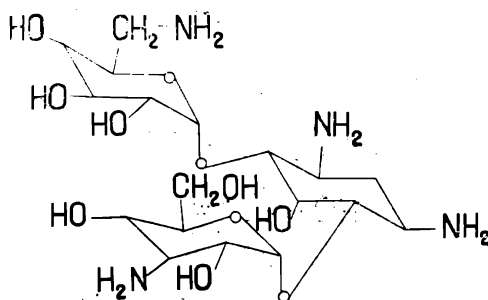
5. Sposób według zastrz. 4, znamienny tym, że jako katalizator stosuje się pallad, platynę, nikiel Raneya, rod, ruten lub nikiel, w mieszaninie wody z rozpuszczalnikiem, mieszającym się z wodą, takim jak dioksan, czterowodorofuran, eter dwume-

tylowy etylenoglikolu lub eter dwumetylowy propylenoglikolu, w obecności katalitycznych ilości kwasu octowego.

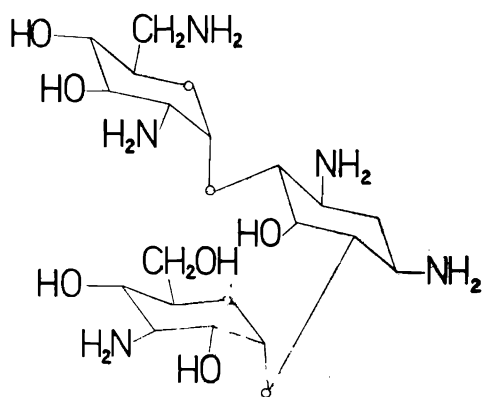
6. Sposób według zastrz. 5, znamienny tym, że jako katalizator stosuje się pallad na węglu aktywnym, w mieszaninie wody z dioksanem w stosunku 1 : 1.



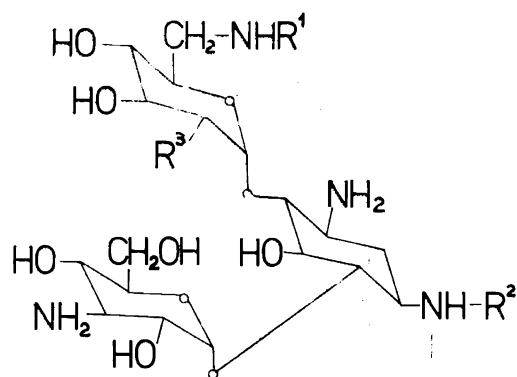
Wzór 1.



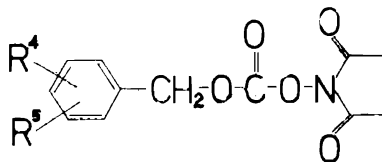
Wzór 2.



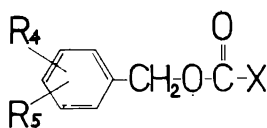
Wzór 3



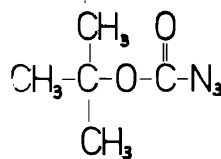
Wzór 4



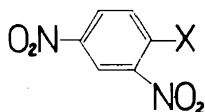
Wzór 5



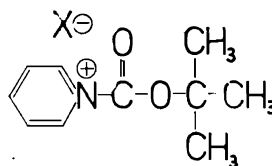
Wzór 6



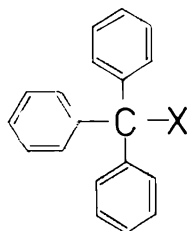
Wzór 7



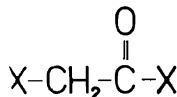
Wzór 8



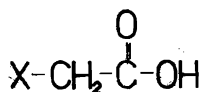
Wzór 9



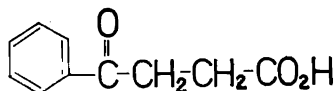
Wzór 10



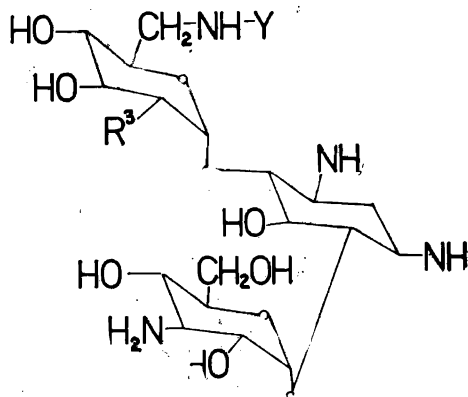
Wzór 11



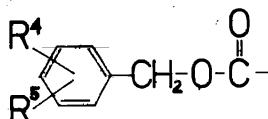
Wzór 12



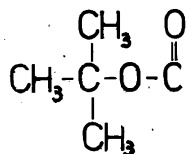
Wzór 13



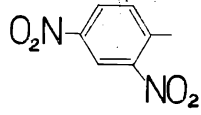
Wzór 14



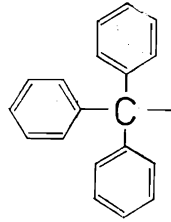
Wzór 15



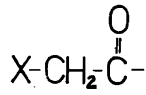
Wzór 16



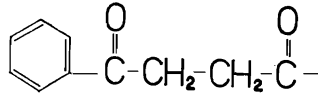
Wzór 17



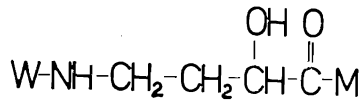
Wzór 18



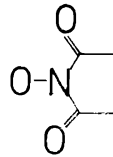
Wzór 19



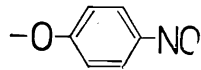
Wzór 20



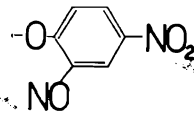
Wzór 21



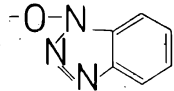
Wzór 22



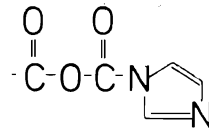
Wzór 23



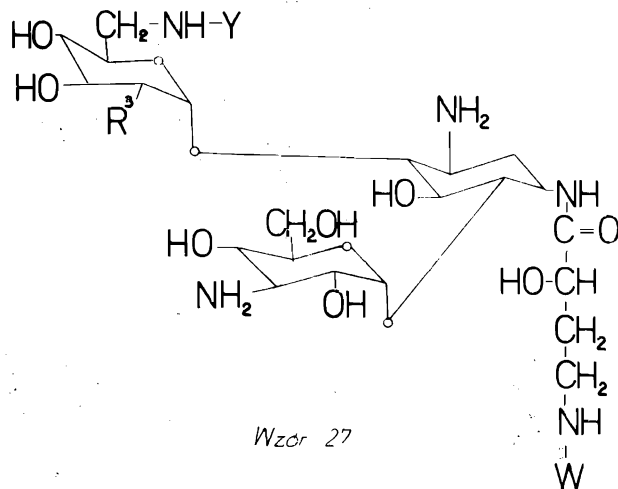
Wzór 24



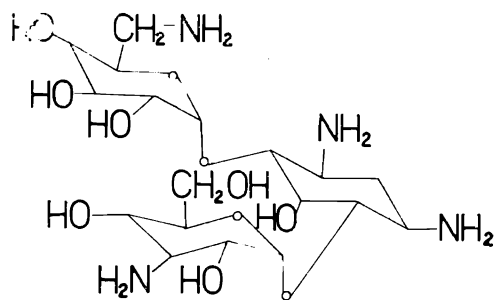
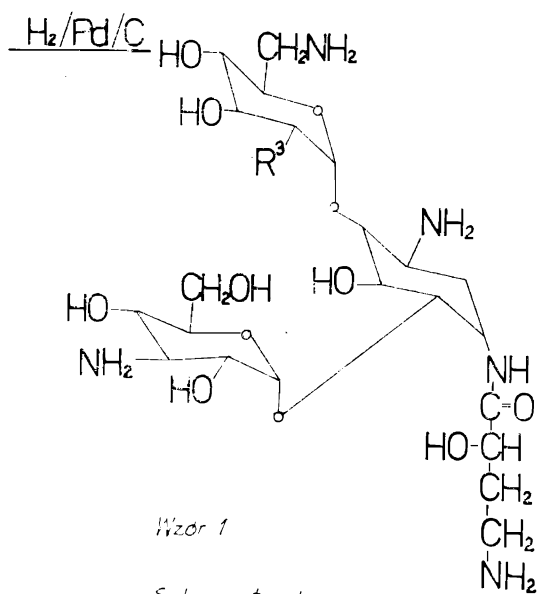
Wzór 25



Wzór 26

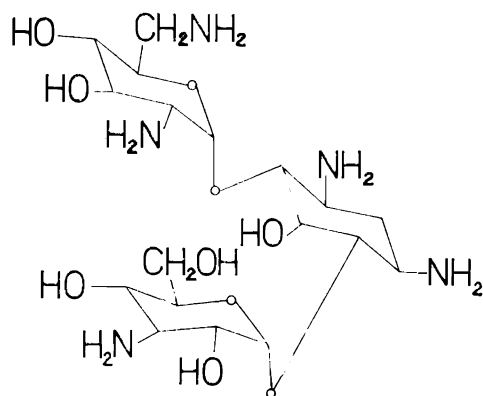


Wzór 27



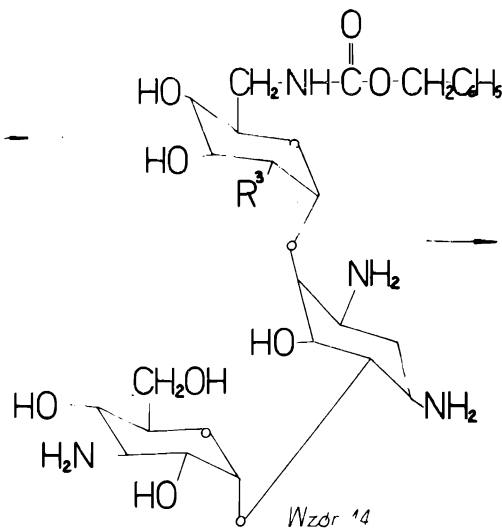
Wzór 2

$\xrightarrow{\text{N-benzyluksykarbonyloksy sukcyimid}}$

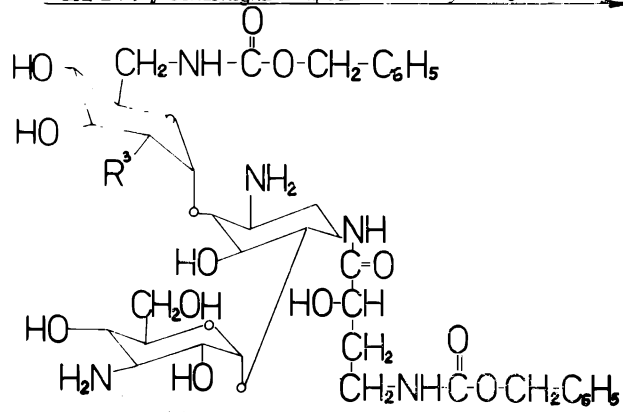


Wzór 3

Schemat



ester N-hydroksysukcynimidowy  
 kwasu L(-)-γ-benzoksykarbonyloamino-α-hydroksymasłowego



Schemat c.d.

OK II-61/16608