



[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU**
UTLÄGGNINGSSKRIFT 61685

C (45) Patentti myönnetty 10 09 1932
Patent meddelat

(51) Kv.lk.³/Int.Cl.³ C 07 C 91/14

SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus — Patensökningsdag 750405
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag 14.02.75
(23) Alkuperäpäivä — Giltighetsdag 14.02.75
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig 16.08.75
(44) Nähtävöksiannon ja kuuljulkaisun pvm. —
Ansökan utlagd och utskriften publicerad 31.05.82
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet 15.02.74
Ranska-Frankrike(FR) 7405110

(71) SANOFI, 40, avenue George V, 75008 Paris, Ranska-Frankrike(FR)

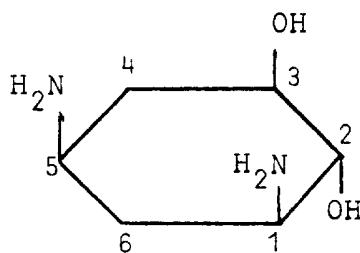
(72) André Cier, Neuilly-sur-Seine, Stephan Gero, Ablon, Alain Olesker,
Gif-sur-Yvette, Jean Leboul, Gif-sur-Yvette, Ranska-Frankrike(FR)

(74) Oy Borenius & Co Ab

(54) Antibioottien mikrobiologisessa valmistuksessa käyttökelpoinen
1D-(1,3,5/2)-1,5-diamino-2,3-sykloheksaanidioli - Vid mikrobiologisk framställning av antibiotika användbar 1D-(1,3,5/2)-1,5-diamino-2,3-cyklohexandiol

Tämä keksintö kohdistuu uuteen 1D-(1,3,5/2)-1,5-diamino-2,3-sykloheksaanidioliin ja menetelmään sen valmistamiseksi.

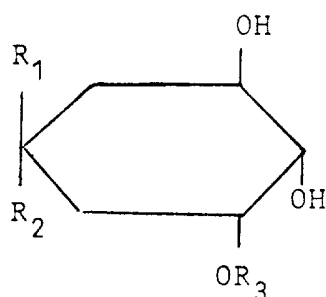
Keksinnön kohteena olevaa, antibioottien mikrobiologisessa valmistuksessa käyttökelpoista sykloheksaanidiolijohdannaisista esittää yleinen kaava:



Tämän keksinnön piiriin kuuluvat myös kaavan I mukaisen diaminosykli-tolin happoadditiosuolat. Nämä happoadditiosuolat voivat olla joko yksinkertaisia (mono-) t.s. muodostettu yhdestä diaminosykli-toli- ja yhdestä happomolekyylistä, tai kaksinkertaisia (di-) t.s. muodostettu yhdestä molekyylistä diaminosykli-tolia ja kahdesta molekyylisestä happea.

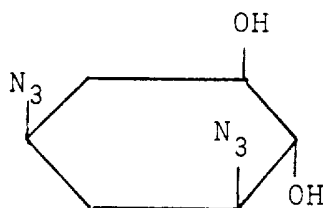
Tässä selityksessä on käytetty nimitystä, joka on esitetty aikakausi-lehdessä Eur. J. Biochem. 5, 1, (1968) "Recommended Rules by the I.U.P.A.C. - I.U.B. Tentative Cyclitol Nomenclature Rules".

Kaavan I mukainen yhdiste voidaan valmistaa kuumentamalla sopivassa väliaineessa kuten N,N-dimetyyliformamidissa tai heksametyylifosforitriamidissa ja alkalimetalliatsidin, esim. natriumatsidin, läsnäollessa kaavan:



(II)

mukaista yhdistettä, jossa R₁ merkitsee N₃-ryhmää, silloin kun R₂ merkitsee vetyatomia tai R₁ merkitsee vetyatomia, silloin, kun R₂ merkitsee alkaanisulfonyylioksi-ryhmää, kuten esim. metaanisulfonyylioksi-ryhmää tai areenisulfonyylioksi-ryhmää, kuten esim. p-tolueenisulfonyylioksi- tai p-bromibentseenisulfonyylioksi-ryhmää ja R₃ merkitsee alkaanisulfonyyliryhmää, kuten esim. metaanisulfonyyliryhmää tai areenisulfonyyliryhmää, kuten p-tolueenisulfonyyli- tai p-bromibentseenisulfonyyliryhmää, jolloin saadaan kaavan



(VI)

mukainen 1D-(1,3,5/2)-1,5-diatsido-2,3-sykloheksaanidioli. Tämä diatsidi hydrogenoidaan sitten liuottimessa, kuten metanolissa, etanolissa, isopropanolissa tai heksametyylifosforitriamidissa ja Raney-nikkeli-, platinaoksidi- tai palladiumhiilikatalyysaattorin läsnäollessa, jolloin saadaan kaavan I mukaista diaminosyklitolia, jota vielä voidaan käsitellä sopivalla hapolla, kuten kloorivetyhapolla tai rikkihapolla happoadditiosuolan saamiseksi.

Kaavan II mukaisia yhdisteitä voidaan saada käsittelemällä liuottimessa, esim. pyridiinissä, kaavan:



mukaista epoksidia, missä R_1 ja R_2 merkitsevät samaa kuin kaavassa II, kaavan:



mukaisella kloridilla, missä R_3 merkitsee samaa kuin kaavassa II, jolloin saadaan kaavan:



mukainen epoksidi, missä R_1 , R_2 ja R_3 merkitsevät samaa kuin kaavassa II.

Täten saatua kaavan V mukaista yhdistettä käsitellään sitten hapolla kuumentamalla esim. rikkihapon vesiliuoksessa, jolloin saadaan haluttu kaavan II mukainen yhdiste.

Kaavan III mukaisista yhdisteistä ovat tunnettuja 1L-2,3-anhydro-5-0-tosyyli-1,2,3,5/0-sykloheksaanitetrolä ja 1L-2,3-anhydro-(1,2,3/5)-5-atsido-1,2,3-sykloheksaanitrioli, jotka on tarkemmin kuvattu DE-hakemusjulkaisussa 2.352.061, julkaistu 16.5.1974.

Muita kaavan III mukaisia yhdisteitä voidaan valmistaa samalla menetelmällä, joka on esitetty edellä mainituissa patenttijulkaisuissa kahden edellä mainitun kaavan II johdannaisen valmistuksessa.

Kaavan I mukainen diaminosyklitoli ja sen suolat ovat hyvin hyödyllisiä välituotteita valmistettaessa sinänsä tunnetulla tavalla aineita, joilla on antibakteerisia ominaisuuksia. Yhdisteet ovat erityisen arvokkaita sen johdosta, että diaminosyklitoli sisältää kemiallisessa rakenteessaan amino- ja hydroksiryhmien steerisen järjestyksen, joka on analoginen, mutta kuitenkin erilainen kuin luonnon diaminosyklitoleissa, jotka sisältyvät hybrimysiinisarjan antibioottien molekyyliarakenteeseen.

US-patenttijulkaisusta 3.669.838 on tunnettua, että mikro-organismeista, joiden tiedetään muodostavan aminosyklitolialaryhmän, kuten neomysiini- tai paromysiiniryhmän, sisältäviä antibiootteja, voidaan muodostaa mutantteja, joilta puuttuu kyky biosyntetisoida aminosyklitolialaryhmä. Tällöin antibioottia ei voi muodostua. Tällaiset mutantit kuitenkin pystyvät käyttämään hyväkseen sopivaa aminosyklitolimolekyyliä, jos sellainen lisätään ravinneliuokseen, ja näin antibiootti voi muodostua. US-patenttijulkaisussa 3.669.838 esitetään streptamiini ja 2-epistreptamiini tällaisina sopivina aminosyklitoleina.

Kirjallisuudessa esitetyistä tuloksista ilmenee kuitenkin, että ei ole mahdollista etukäteen tietää, tuleeko tietty aminosyklitoli liittymään antibioottiin edellä esitetyn biokonversiotekniikan mukaisesti vai ei. Monessa tapauksessa nimittäin tällainen valmistusmenetelmä on todettu tehottomaksi, eikä sitä näin ollen voida pitää yleisenä menetelmänä puolisynteettisten tai täysin synteettisten antibioottien valmistamiseksi.

Esimerkiksi julkaisussa "The Journal of Antibiotics", Vol. XXVI, No 10, p. 551...561 (1973) on selitys kokeista, joita on suoritettu 29:llä eri aminosyklitolilla näiden liittämiseksi antibioottiin US-patenttijulkaisun 3.669.838 esittämällä tavalla. Näistä 29 aminosyklitolista todettiin ainoastaan streptamiinin ja 2-epistreptamiinin liittyvän tähän tarkoitukseen käytettyjen mutanttien eli Streptomyces fradiaen, Streptomyces rimosus forma paromycinus'n ja Streptomyces kanamycetius'n 2-deoksi-streptamiini-negatiivisten (D^-)-mutanttien avulla.

Samaten on todettu, etteivät DE-hakemusjulkaisun 2.352.061 mukaiset diaminosyklitolit liity antibioottiin, kun käytetään edellä mainittuja D^- -mutantteja.

Näin ollen on aivan yllättävää, että tämän keksinnön mukainen diaminosyklitoli ja sen suolat voidaan liittää antibiootteihin käyttämällä US-patenttijulkaisussa 3.669.838 selitettyä menetelmää.

Seuraava esimerkki valaisee keksintöä:

Esimerkki

1D-(1,3,5/2)-1,5-diamino-2,3-sykloheksaanidiolin valmistus

A. 1D-(1,3,5/2)-1,5-diatsido-2,3-sykloheksaanidioli (kaava VI)

a. 1L-2,3-anhydro-1,5-di-0-tosyyli-1,2,3,5/0-sykloheksaanitetrololi (kaava V)

4 g tosyylidikloridia (p-tolueenisulfonyylikloridia) liuotettuna 25 ml:aan pyridiiniä lisättiin 0 °C:n lämpötilassa tipoittain 4 g:n 1L-2,3-anhydro-5-0-tosyyli-1,2,3,5/0-sykloheksaanitetrolia liuokseen 20 ml:ssa pyridiiniä. Reaktioseoksen annettiin seistä 20 tuntia 0 °C:ssa ja kaadettiin sitten jään päälle. Seosta uutettiin useita kertoja kloroformilla ja kloroformiuutteet pestiin vedellä. Vedettömän natriumsulfaatin päällä kuivaamisen ja kloroformin ja pyridiinin haihduttamisen jälkeen erottui valkoinen vaahto, josta saatiin metanolista kiteytämisen jälkeen 4,3 g kiteitä. Saatu tuote pestiin kolme kertaa 10 ml:lla metanolia.

Tällä tavoin saatiin etyyliasetaatista uudelleenkiteyttämisen avulla analyysipuhtaita 1L-2,3-anhydro-1,5-di-0-tosyyli-1,2,3,5/0-sykloheksaanitetrolitekiteitä. Sp. 143,5...145 °C.

$[\alpha]_D^{25} = + 34^{\circ}$ (c = 1,93, kloroformista).

Metanolista kiteyttämisen jälkeen emäliuosta käsiteltiin huoneenlämmössä 6 ml:lla natriummetylaattiliuosta, joka oli valmistettu 2 g:sta natriumia 75 ml:ssa metanolia. Muutamien minuuttien kuluttua saostui kiteitä. Seoksen annettiin seistä vielä tunnin ja suodatettiin sitten.

Tällä tavoin saatiin vielä 1,3 g haluttua ditosylaattia, mikä vastaa lopullisesti 5,6 g 1L-2,3-anhydro-1,5-di-0-tosyyli-1,2,3,5/0-sykloheksaanitetrolia.

Kokonaissaanto: 90%.

b) 1L-1,5-di-O-tosyyli-1,2,5/3-sykloheksaanitetrololi (kaava II)

Fulloon, jossa oli 3,2 g 1L-2,3-anhydro-1,5-di-O-tosyyli-1,2,3,5/0-sykloheksaanitetrolia, joka oli valmistettu edellä kerrotulla tavalla ja liuotettuna 10 ml:aan 1,2-dimetoksietaania, lisättiin 50 ml 1,5 N rikkihapon vesiliuosta.

Reaktioseosta lämmitettiin palautusjäähdyttimen alla 150 minuuttia ja jäähdytettiin 0 °C:een, kun oli syntynyt sekoittumaton faasi. Seos neutraloitiin natriumbikarbonaatin vesiliuoksella ja uutettiin sitten etyyliasetaatilla. Orgaaninen faasi pestiin vedellä ja kuivattiin vedettömän natriumsulfaatin päällä. Liuottimen haihduttamisen jälkeen saatiin valkea vaahto, josta saatiin kloroformista kiteyttämisen jälkeen 3,1 g 1L-1,5-di-O-tosyyli-1,2,5/3-sykloheksaanitetrolia (saanto: 90%). Analyysipuhdas tuote sulii 121...123 °C:ssa uudelleenkiteytyksen jälkeen.

$$[\alpha]_D^{25} = +10^{\circ} \quad (c = 1, \text{ etanolista})$$

c) 1D-(1,3,5/2)-1,5-diatsido-2,3-sykloheksaanidioli (kaava VI)

Seokseen, jossa oli 2,6 g natriumatsidia 50 ml:ssa N,N-dimetyyliformamidia, lisättiin 4,5 g 1L-1,5-di-O-tosyyli-1,2,5/3-sykloheksaanitetrolia, joka oli valmistettu edellä kuvatulla tavalla.

Saatua mustaa liuosta lämmitettiin palautusjäähdyttimen alla 2 tuntia, kaadettiin jääveteen ja uutettiin sitten etyyliasetaatilla. Orgaaninen faasi pestiin vedellä, kuivattiin vedettömän natriumsulfaatin päällä ja liuotin haihdutettiin pois. Tällä tavoin erottui 1,92 g mustaa öljyä, joka oli hyvin juoksevaa ja sen väri poistettiin osittain etanolissa luuhiilen avulla.

Tällä tavoin saatiin 1,2 g 1D-(1,3,5 /2)-1,5-diatsido-2,3-sykloheksaanidiolia beige-väristen kiteiden muodossa kahden peräkkäisen uudelleenkiteytyksen jälkeen kloroformi/petrolieetteriseoksesta. Tämä vastaa 60%:n saantoa. Sp. 62...63,5 °C.

$$[\alpha]_D^{25} = 2^{\circ} \pm 1 \quad (c = 1, \text{ metanolista})$$

B. 1D-(1,3,5/2)-1,5-diatsido-2,3-sykloheksaanidioli (kaava VI)

a) 1L-2,3-anhydro-5-atsido-1-0-tosyyli-1,2,3/5-sykloheksaanitrioli (kaava V)

Liuokseen, jossa oli 125 mg 1L-2,3-anhydro-(1,2,3/5)-5-atsido-1,2,3-sykloheksaanitriolia 3 ml:ssa pyridiiniä ja joka oli valmiiksi jäähdytetty, lisättiin 280 mg tosyylidikloridia. Reaktion kulkua seurattiin ohutkerroskromatografian avulla käyttämällä 50/50 etyyliasetaatti/petrolieetteriseosta ja ultravioletti-ilmaisua. 12 tunnin kuluttua reaktio oli päättynyt ja suoritettiin uutto kloroformin avulla. Tällöin saatiin 192 mg hyvin paksujuoksuista kirkasta öljyä, joka sitten puhdistettiin ohutkerroskromatografian avulla.

Tällä tavoin saatiin 1L-2,3-anhydro-5-atsido-1-0-tosyyli-1,2,3/5-sykloheksaanidiolia.

$$[\alpha]_D^{25} = + 35^{\circ} \quad (c = 1,28, \text{ kloroformista})$$

Analyysi: $C_{13}H_{15}O_4SN_3$

	C%	H%	N%	S%
Laskettu	50,47	4,89	13,58	10,37
Mitattu	50,26	4,90	13,33	10,39

b) 1L-5-atsido-1-0-tosyyli-1,2/3,5-sykloheksaanitrioli (kaava II)

Liuokseen, jossa oli 150 mg edellä selostetulla tavalla valmistettua 1L-2,3-anhydro-5-atsido-1-0-tosyyli-1,2,3/5-sykloheksaanitriolia 2 ml:ssa 1,2 dimetoksietaania, lisättiin 2 ml 1,5 N rikkihapon vesiliuosta. Reaktioseosta lämmitettiin palautusjäähdyttimen alla 150 minuuttia ja reaktion kulkua seurattiin ohutkerroskromatografian avulla käyttämällä liuottimena 7/3 etyyliasetaatti/petrolieetteri-seosta. Seos jäähdytettiin sitten 0 °C:een ja neutraloitiin natriumbikarbonaatin vesiliuoksella. Tämän jälkeen seosta uutettiin etyyliasetaatilla, jolloin saatiin 102 mg öljymäistä tuotetta, josta ohutkerroskromatografialla saatiin näkyville useita likatahroja.

Tällä tavoin valmistettiin 1L-5-atsido-1-0-tosyyli-1,2/3,5-sykloheksaanitriolia 64%:n saannolla.

Kahden hydroksyyli-ryhmän läsnäolo varmistettiin tuotteen N.M.R-spektrin avulla deuteroinnisen jälkeen.

c) 1D-(1,3,5/2)-1,5-diatsido-2,3-sykloheksaanidioli (kaava I)

Seokseen, jossa oli 50 mg natriumatsidia ja 2 ml N,N-dimetyyli-formamiidia, lisättiin edellä selostetulla tavalla valmistettua 1L-5-atsido-1-/-tosyyli-1,2/3,5-sykloheksaanitriolia. Reaktioseosta lämmitettiin 2 tuntia palautusjäähdyttimen alla ja saatu liuos kaadettiin jääseen veteen. Seosta uutettiin etyyliasetaatilla ja orgaaninen faasi pestiin vedellä ja kuivattiin vedettömän natriumsulfaatin päällä. Liuotin haihdutettiin pois osatyhjössä ja saatiin erottumaan 30 mg ruskeata öljyä, josta poistettiin väri luuhiilen avulla ja haluttu tuote saatiin kiteyttämällä kloroformi/petrolieetteri-seoksesta.

Tällä tavoin saatiin 23 mg 1D-(1,3,5/2)-1,5-diatsido-2,3-sykloheksaanidiolia 61,5...63,5 °C:ssa sulavina kiteinä.

$[\alpha]_D^{25} = 2^{\circ} \pm 1$ (c = 1,36, metanolista).

C. 1D-(1,3,5/2)-1,5-diamino-2,3-sykloheksaanidioli-dihydrokloridi
(kaava I)

Liuokseen, jossa oli 0,49 g edellä kuvatulla tavalla valmistettua 1D-(1,3,5/2)-1,5-diatsido-2,3-sykloheksaanidiolia 25 ml:ssa etanolia, lisättiin 2 ml Raney-nikkeliä (t.s. hienojakoista nikkelikatalysaattoria, joka on saatu liuottamalla alkalien avulla alumiini nikkeli-alumiinilejeeringistä).

Reaktioseosta pelkistettiin vedyn avulla 5 tuntia. Sitten erotettiin katalysaattori pois suodattamalla Celiten läpi ("Celite" on rekisteröity tavaramerkki kaupalliselle piimaatuotteelle) ja pestiin useita kertoja seoksella, jossa oli 50 osaa metanolia ja 50 osaa vettä. Hydrattu liuos ja pesunesteet yhdistettiin ja haihdutettiin kuiviin. Tällä tavoin saatiin 0,33 g 1D-(1,3,5/2)-1,5-diamino-2,3-sykloheksaanidiolia heikosti violetinvärisenä vaahtona. Tämä vaahto jäi homogeeniseksi ohutkerroskromatograafisessa analyysissä selluloosalla, kun käytettiin liuottimena seosta, jossa oli 2 osaa pyridiiniä + 1 osa ammoniakki-liuosta + 2 osaa etanolia + 1 osa vettä.

Täten saadut 0,33 g diamiinia otettiin 5 ml:aan absoluuttista metanolia ja 3,5 ml:aan metanoli/10%-kloorivetyhappoliuosta.

Liuoksen annettiin seistä 12 tuntia 0 °C:ssa, minkä jälkeen muodostuneet kiteet erotettiin linkoamalla.

Tällä tavalla saatiin 0,2 g 1D-(1,3,5/2)-1,5-diamino-2,3-sykloheksaani-diolin dihydrokloridia hygroskooppisina kiteinä metanoli/eetteriseoksesta kiteyttämisen jälkeen. Sp. 230...232 °C.

$$[\alpha]_D^{25} = + 3,5^\circ \pm 1 \quad (c = 1,17, \text{ vedestä})$$

Eri emäliuosten metanoli/eetteriseoksista kiteyttämisen jälkeen saatiin erotetuksi vielä noin 0,25 g haluttua dihydrokloridia.

Kokonaissaanto: 90%.

Patenttivaatimukset

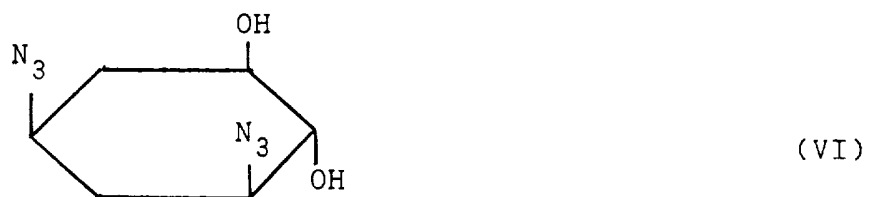
1. Aminosyklitoli, joka lisätään ravintoalustaan valmistettaessa mikrobiologisesti aminosyklitoli-rakenneyksikön sisältäviä antibiootteja, t u n n e t t u siitä, että aminosyklitoli on kaavan



mukainen 1D-(1,3,5/2)-1,5-diamino-2,3-sykloheksaanidioli tai sen happoadditiosuola.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen aminosyklitoli, t u n n e t t u siitä, että se on 1D-(1,3,5/2)-1,5-diamino-2,3-sykloheksaanidiolidihydrokloridia.

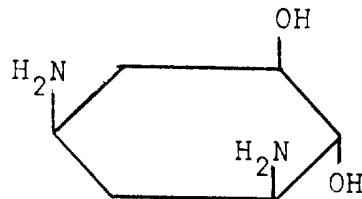
3. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisen aminosyklitolin ja sen happoadditiosuolan valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että diatsidi, jonka kaava on



hydrogenoidaan liuottimessa Raney-nikkelin, platinaoksidin tai palladiumhiilen läsnäollessa halutun diaminosyklitolin saamiseksi ja haluttaessa valmistetaan diaminosyklitolin happoadditiosuolaa käsittelemällä sopivalla määrällä orgaanista tai epäorgaanista happoa.

Patentkrav

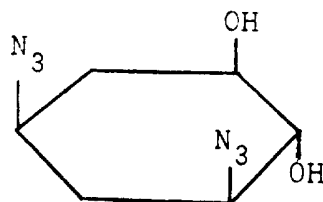
1. Aminocyklitol, som tillsätts i näringssubstratet vid mikrobiologisk framställning av antibiotika som innehåller aminocyklitol-enheten, k ä n n e t e c k n a d därav, att aminocyklitolen utgörs av 1D-(1,3,5/2)-1,5-diamino-2,3-cyklohexandiol med formeln



eller dess syraadditionssalt.

2. Aminocyklitol enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att det är 1D-(1,3,5/2)-1,5-diamino-2,3-cyklohexandioldihydroklorid.

3. Förfarande för framställning av aminocyklitolen eller dess syraadditionssalt enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att man hydrogenerar en diazid med formeln



i ett lösningsmedel i närvaro av Raney's nickel, platinaoxid eller palladiumkol för att erhålla den önskade diaminocyklitolen, som om så önskas kan behandlas med en lämplig mängd av en organisk eller en oorganisk syra för att åstadkomma ett syraadditionssalt av denna diaminocyklitol.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: USA(US) 3 669 838 (C 12 d 9/00).