



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 650 005 A5

⑤① Int. Cl.4: C 07 H 15/234
C 07 H 15/224

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

// A 61 K 31/71

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

②① Gesuchsnummer:	184/84	⑦③ Inhaber:	Zaidan Hojin Biseibutsu Kagaku Kenkyu Kai, Shinagawa-ku/Tokyo (JP)
⑥② Teilgesuch von:	9682/79		
②② Anmeldungsdatum:	29.10.1979	⑦② Erfinder:	Umezawa, Hamao, Nerima-ku/Tokyo (JP) Umezawa, Sumio, Shinjuku-ku/Tokyo (JP) Tsuchiya, Tsutomu, Yokohama-shi/Kanagawa-ken (JP) Takagi, Yasushi, Yokohama-shi/Kanagawa-ken (JP) Jikihara, Tomo, Kawasaki-shi/Kanagawa-ken (JP)
③⑦ Priorität(en):	11.11.1978 JP 53-138402 12.06.1979 JP 54-73064		
②④ Patent erteilt:	28.06.1985		
④⑤ Patentschrift veröffentlicht:	28.06.1985	⑦④ Vertreter:	Patentanwalts-Bureau Isler AG, Zürich

⑤④ **Verfahren zur Herstellung eines selektiv geschützten N-acylierten Aminoglycosid-Antibiotikums.**

⑤⑦ Aminoglycosid-Antibiotika, welche einen 6-O-(3"-Aminoglycosyl)-2-deoxystreptamin-Teil enthalten, der gegebenenfalls mit einer 4-O-Aminoglycosylgruppe substituiert ist und in welchen die 1-Aminogruppe ungeschützt ist aber alle anderen Aminogruppen im Aminoglycosidmolekül mit Acylgruppen geschützt sind, werden erhalten durch Umsetzen einer entsprechenden partiell N-acylierten Verbindung, deren 1- und 3"-Aminogruppen ungeschützt sind, mit gewissen Fettsäuren oder n-Formylimidazol. Diese Verbindungen sind wertvolle Ausgangsmaterialien für die 1-N-Acylierung mit einer α -Hydroxy- ω -aminofettsäure bei der Herstellung von bekannten semisynthetischen 1-N-(α -Hydroxy- ω -amino-alkanoyl)-aminoglycosid-Antibiotika.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung eines selektiv geschützten N-acylierten Aminoglycosid-Antibiotikums, welches einen 6-O-(3''-Amino- oder 3''-Alkylamino-3''-deoxyglycosyl)-2-deoxystreptaminteil enthält, der gegebenenfalls eine 4-O-(Aminoglycosyl)-gruppe aufweist, in welcher Verbindung die 1-Aminogruppe des Deoxystreptaminteils ungeschützt ist, aber alle anderen Aminogruppen im Aminoglycosidmolekül mit gleichen oder verschiedenen Acylgruppen geschützt sind, dadurch gekennzeichnet, dass man einen Fettsäureester der Formel VIII



[VIII]

in welcher R^a Wasserstoff oder eine Dihalogenalanyl- oder Trihalogenalkylgruppe mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen und R^b eine Alkoxygruppe mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, eine Aryloxygruppe oder eine Aryloxygruppe ist, oder N-Formylimidazol als Acylierungsmittel in einem inerten organischen Lösungsmittel mit einem entsprechenden partiell geschützten N-acylierten Aminoglycosid-Antibiotikum, in welchem die 1-Amino- und die 3''-Aminogruppe ungeschützt sind, während alle anderen Aminogruppen mit einer Acylgruppe als Aminoschutzgruppe geschützt sind umgesetzt, um die selektive Acylierung der 3''-Amino- oder der 3''-Alkylaminogruppe der partiell geschützten N-acylierten Verbindung zu bewirken und dadurch das gewünschte 1-N-ungeschützte und an allen anderen Aminogruppen voll geschützte Aminoglycosid-Antibiotikum zu ergeben.

2. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Fettsäureester der Formel VIII mit dem partiell geschützten N-acylierten Kanamycin-A, 6'-N-Alkylkanamycin-A, 3'-Deoxykanamycin-A, 6'-N-Methyl-3'-deoxykanamycin-A, 4'-Deoxykanamycin-A, 6'-N-Methyl-4'-deoxykanamycin-A, 3',4'-Dideoxykanamycin-A, 6''-Deoxykanamycin-A, 4'',6''-Dideoxykanamycin-A, Kanamycin-B, 3'-Deoxykanamycin-B, 4'-Deoxykanamycin-B, 3',4'-Dideoxykanamycin-B, 3',4'-Dideoxy-3'-eno-kanamycin-B, 6'-N-Methyl-3',4'-dideoxykanamycin-B, Kanamycin-C, 3'-Deoxykanamycin-C, 3',4'-Dideoxykanamycin-C, Gentamicin-A, Gentamicin-B, Gentamicin-C, Verdamicin, Sisomicin oder Netilmicin umgesetzt wird.

3. Verfahren nach Patentanspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Fettsäureester der Formel VIII als Acylierungsmittel ausgewählt ist aus Methylformiat, Äthylformiat, Butylformiat, Benzylformiat, Phenylformiat, Methylchloracetat, Äthylchloracetat, Methyltrichloracetat, Phenyltrichloracetat, Methyltrifluoracetat, Äthyltrifluoracetat oder Phenyltrifluoracetat.

4. Verfahren nach Patentanspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass N-Formylimidazol als Acylierungsmittel verwendet wird.

5. Verfahren nach einem der Patentansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Acylierungsmittel bei einer Temperatur zwischen -30 °C bis +120 °C während einer Dauer von 30 Minuten bis 48 Stunden in einem inerten organischen Lösungsmittel, ausgewählt aus Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid, Hexamethylphosphorsäuretriamid, Tetrahydrofuran, Dioxan, Acetonitril, Nitromethan, Sulfolan, Dimethylacetamid, Chloroform, Dichlormethan, Methan, Äthanol, n-Butanol, t-Butanol, Benzol, Toluol oder Äthyläther in wasserfreier oder wasserhaltiger Form umgesetzt wird.

6. Verfahren zur Herstellung eines 1-N-(α-Hydroxy-ω-amino-alkanoly)-aminoglycosidischen Antibiotikums, wel-

ches einen 6-O-(3''-Amino- oder 3''-Alkylamino-3''-deoxyglycosyl)-2-deoxystreptaminteil enthält, der gegebenenfalls eine 4-O-(Aminoglycosyl)-gruppe aufweist, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Verfahren gemäss Patentanspruch 1 ein Aminoglycosid-Antibiotikum herstellt, in welchem alle Aminogruppen mit Ausnahme der 1-Aminogruppe mit Acylgruppen geschützt sind, die derart erhaltene Verbindung mit einer α-Hydroxy-ω-aminoettsäure der Formel IX



15 in welcher m 1 oder 2 bedeutet, oder mit einem äquivalenten reaktionsfähigen Derivat davon, deren Aminogruppe entweder ungeschützt oder geschützt ist, umgesetzt, um die 1-Aminogruppe des 1-N-ungeschützten Derivates zu acylieren, und die restlichen Aminoschutzgruppen aus dem erhaltenen 1-N-20 Acylierungsprodukt abspaltet.

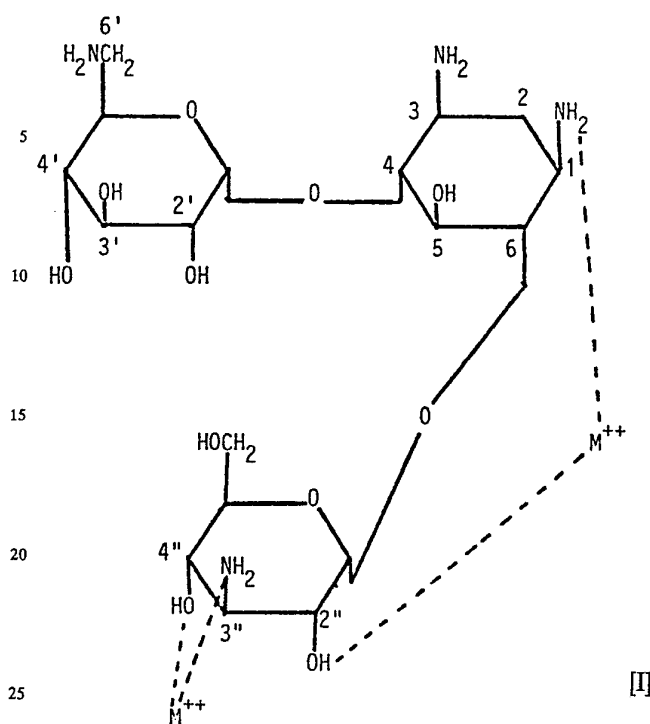
Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein neues Verfahren zur Herstellung eines selektiv geschützten N-acylierten Aminoglycosid-Antibiotikums, in welchem einige Amino- oder Alkylaminogruppen in besonderen Stellungen des Aminoglycosidmoleküls selektiv geschützt oder blockiert wurden mit der Acylgruppe. Diese Erfindung bezieht sich somit auf ein neues Verfahren zum selektiven Schutz gewisser Amino- oder Alkylaminogruppen in besonderen Stellungen des Aminoglycosid-Antibiotikums. Die Erfindung betrifft die Herstellung eines selektiv geschützten N-acylierten Aminoglycosid-Antibiotikums, welches einen 2-Deoxystreptaminteil enthält, der eine 3''-Aminoglycosylgruppe oder eine 3''-Alkylaminoglycosylgruppe gebunden an die 6-Hydroxylgruppe des 2-Deoxystreptaminteils im Aminoglycosidmolekül aufweist. Das Aminoglycosid-Antibiotikum, auf welches die vorliegende Erfindung anwendbar ist, ist somit ein 6-O-(3''-Amino- oder 3''-Alkylamino-3''-deoxyglycosyl)-2-deoxystreptamin, welches gegebenenfalls einen 4-O-6'-Aminoglycosyl-Substituenten tragen kann, und typische Beispiele solcher Verbindungen sind die Kanamycine, die Gentamicine, Sisomicin, Netilmicin und Verdamicin. Die vorliegende Erfindung umfasst ferner die Herstellung eines 1-N-(α-Hydroxy-ω-aminoalkanol)-aminoglycosid-Antibiotikums, welches bekannt ist als nützliches semisynthetisches antibakterielles Mittel, welches wirksam ist gegen arzneimittelresistente Bakterien.

Aminoglycosid-Antibiotika, wie z.B. Kanamycine, sind Substanzen, welche mehrere Aminofunktionen und Hydroxylfunktionen mit einem verhältnismässig hohen und verschiedenen starken Reaktionsgrad aufweisen. Zahlreiche Arten semisynthetischer Aminoglycosid-Antibiotika, welche von den Stamm-Aminoglycosid-Antibiotika abgeleitet sind, wurden bereits hergestellt. Bei der Semisynthese dieser Derivate ist es oft notwendig oder wünschenswert, sicherzustellen, dass einige Aminogruppen und/oder einige Hydroxylgruppen im Ausgangsaminoglycosid-Antibiotikum selektiv geschützt oder blockiert werden mit einer oder mehreren geeigneten Schutzgruppen.

Für den selektiven Schutz von Aminogruppen und/oder Hydroxylgruppen in dem Aminoglycosid-Antibiotikum wurden verschiedene erfolgreiche Methoden entwickelt und diese stehen zur Verfügung, soweit es sich um den selektiven Schutz von Hydroxylgruppen handelt. Für den selektiven Schutz von einigen besonderen, unter den zahlreichen vorhandenen Aminogruppen des Aminoglycosid-Antibiotikums sind jedoch die bisher bekannten Methoden entweder zu schwierig durchzu-

führen oder sie erfordern gewisse komplizierte Operationen. Dies beruht darauf, dass alle Aminogruppen im Aminoglycosid-Antibiotikum keinen grossen Unterschied in der Reaktionsfähigkeit aufweisen. Ein demonstratives Beispiel wird durch die 6'-Aminogruppe von Kanamycin-A geliefert, doch weist eine solche Aminogruppe oder Methylaminogruppe, welche an ein gewisses Kohlenstoffatom gebunden ist, das seinerseits an nur ein Kohlenstoffatom im Aminoglycosid-Molekül gebunden ist, eine höhere Reaktionsfähigkeit auf als die Amino- oder Methylaminogruppe, welche an ein gewisses Kohlenstoffatom gebunden ist, das zwei oder mehr Kohlenstoffatome in diesem Aminoglycosid-Molekül verbindet. Aus diesem Grund ist die erstgenannte Art von Amino- oder Methylaminogruppen befähigt, wesentlich bevorzugter mit einem Acylierungsmittel zu reagieren, welches eine in die Aminoschutzgruppe einzuführende Acylgruppe enthält, als die letztgenannte Art von Amino- oder Methylaminogruppen, wobei das N-geschützte Derivat, welches die erstgenannte Art von Amino- oder Methylaminogruppen preferentiell mit der Acylgruppe blockiert hat, in einer höheren Ausbeute erzeugt werden kann als die anderweitig N-geschützten Derivate. Vor einigen Jahren wurde gefunden, dass, wenn die Aminogruppe und die Hydroxylgruppe in der sterischen Konfiguration des Moleküls des Aminoglycosid-Antibiotikums zu einem Paar benachbart sind, diese Amino- und Hydroxylgruppen selektiv miteinander vereint werden können unter Bildung eines cyclischen Carbamates durch Behandlung mit Natriumhydrid, so dass das Paar von Amino- und Hydroxylgruppen gleichzeitig im cyclischen Carbamat blockiert werden kann, ohne die anderen Aminogruppen, welche im gleichen Molekül vorhanden sind, zu blockieren [siehe «Journal of Antibiotics», 25, No. 12, 741-742 (1972); US-Patente No. 3 925 354 und No. 3 965 089].

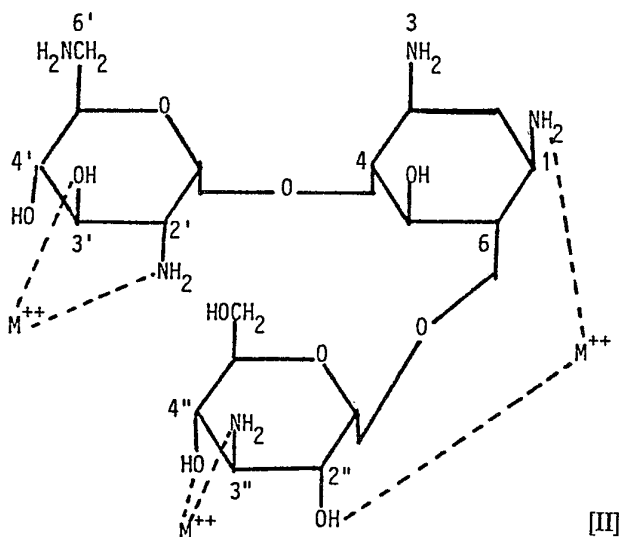
Vor kurzem haben Nagabhushan und Mitarbeiter gefunden, dass, wenn ein Salz eines bivalenten Transitionsmetalls (M^{++}), ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Kupfer-(II), Nickel-(II), Kobalt-(II) und Cadmium-(II) in einem inerten organischen Lösungsmittel mit einem aminoglycosidischen Antibiotikum umgesetzt wird, welches zu der Klasse der 4-O-(Aminoglycosyl)-6-O-(aminoglycosyl)-2-deoxystreptaminasen gehört, wie sie durch Kanamycine, Gentamicine und Sisomicin vertreten wird, dieses bivalente Transitionsmetallkation mit einem Paar der Amino- und Hydroxylgruppen komplex gebunden wird, welche an besonderen, vicinalen Stellen des Aminoglycosid-Moleküls vorhanden sind, wodurch der aminoglycosidische Antibiotikum-Transitionsmetallkation-Komplex gebildet wird [siehe japanische veröffentlichte Patentanmeldung Sho-52-153944 und US-Patent No. 4 136 254]. In diesem aminoglycosidischen Antibiotikum-Transitionsmetallkation-Komplex ist die komplexgebundene Aminogruppe durch das bivalente Transitionsmetallkation blockiert. Wenn dieser Komplex anschliessend mit einem Acylierungsmittel, welches eine Acylgruppe enthält, umgesetzt wird, können zur Hauptsache nur die nicht-komplexierten Aminogruppen im Metallkomplex, welche nicht durch das bivalente Metallkation blockiert sind, acyliert werden, so dass ein selektiver N-Schutz mit der Acylgruppe erzielt wird. Dies ist weiter unten unter Bezugnahme auf Kanamycin-A als Beispiel näher illustriert. Wenn somit ein bivalentes Transitionsmetallkation (M^{++}), ausgewählt aus Kupfer-(II)-, Nickel-(II)-, Kobalt-(II)- und Cadmium-(II)-Kationen mit Kanamycin-A umgesetzt wird, tritt eine Komplexbildung des bivalenten Metallkations (M^{++}) zwischen der 1-Aminogruppe und der 2''-Hydroxygruppe sowie zwischen der 3''-Aminogruppe und der 4''-Hydroxygruppe des Kanamycin-A-Moleküls ein, wie durch die Formel I unten dargestellt.



In der obigen Komplexbildungsreaktion ist daher ersichtlich, dass mindestens 2 Mol des Transitionmetallsalzes für 1 Mol Kanamycin-A erforderlich sind. Im erhaltenen Metallkomplex sind gleichzeitig die 1-Amino und die 3''-Aminogruppen blockiert. Wenn dieser Komplex der Formel I mit einem Acylierungsmittel behandelt wird, welches eine Acylgruppe aufweist, die als eine in den üblichen Synthesen von Polypeptiden bekannte Aminoschutzgruppe zur Verfügung steht, werden nur die nicht-komplex gebundenen 3-Amino- und 6'-Aminogruppen zur Hauptsache acyliert, um das 3,6'-di-N-acylierte Derivat zu ergeben [siehe «Journal of American Chemical Society», 100, 5253-5254 (1978)].

Die obige Tatsache hat sich als richtig erwiesen, doch wurden im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung weitere Untersuchungen über die Interaktion anderer, verschiedener Metallkationen mit aminoglycosidischen Antibiotika, wie Kanamycin-A und Kanamycin-B sowie mit semi-synthetischen Derivaten der aminoglycosidischen Antibiotika durchgeführt. Als Resultat wurde gefunden, dass sich zweiwertige Zinkkationen, obwohl sie sich wesentlich anders verhalten als die oben erwähnten zweiwertigen Nickel-, Kobalt-, Kupfer- und Cadmium-Kationen, sie letztlich befähigt sind, eine starke Komplexbildung sowohl mit der 1-Amino- oder 1-Alkylaminogruppe, wie mit der 3''-Aminogruppe (oder 3''-Alkylaminogruppe) einer Aminoglycosidverbindung (wie z.B. Kanamycin-A, -B oder -C) einzugehen, welche einen Deoxystreptaminteil enthält, der eine 3''-Aminoglycosyl- oder 3''-Alkylaminoglycosylgruppe an die 6-Hydroxylgruppe des Deoxystreptaminteiles gebunden enthält, und diese genannten Aminogruppen in 1- und 3''-Stellung zu blockieren.

Gemäss Nagabhushan und Mitarbeiter, könnte erwartet werden, dass, wenn bivalente Nickel-, Kobalt-, Kupfer- oder Cadmiumkationen z.B. mit Kanamycin-B umgesetzt werden, ein Kanamycin-B-Metallsalz-Komplex der folgenden Formel II entstehen würde:



Diese Erwartung stützt sich auf die Ausführungen von Nagabhushan und Mitarbeiter im oben genannten Artikel in «Journal of American Chemical Society», gemäss welchem vicinale Amino-Hydroxyl-Gruppen-Paare mit den bivalenten Transitionsmetallkationen reversible Komplexe bilden sollten, und in Anbetracht der Tatsache, dass Kanamycin-B drei Paare vicinaler Amino-Hydroxyl-Gruppen enthalten, nämlich in den Stellungen 1 und 2'', in den Stellungen 2' und 3' und in den Stellungen 2'' und 3'' des Kanamycin-Moleküls. Es wurde jedoch gefunden, dass wenn Kanamycin-B mit einem zweiwertigen Metallkation, nämlich Zinkkation umgesetzt wird, der tatsächlich gebildete Kanamycin-B-Zinksalz-Komplex freie 2'-Amino- und 3'-Hydroxylgruppen enthält, welche nicht durch das Zinkkation blockiert wurden, was im Gegensatz zur Annahme von Nagabhushan steht. Selbst wenn die Komplexbildung des Zinkkations mit der 2'-Amino- und 3'-Hydroxylgruppe auftritt, ist die komplexierende Kraft sehr gering, so dass im wesentlichen in der Praxis die 2'-Amino- und 3'-Hydroxylgruppen nicht blockiert sind.

Wenn daher der Kanamycin-B-Zinkkationen-Komplex anschliessend acyliert wird, z.B. durch Reaktion mit N-Benzoyloxycarbonyloxysuccinimid, um die Benzoyloxycarbonylgruppe als Aminoschutz-Acylgruppe einzuführen, wird das tri-3,2',6'-N-acylierte Derivat erhalten, in welchem drei Aminogruppen, nämlich die 3-, 2'- und 6'-Aminogruppe acyliert wurde, und zwar tatsächlich in einer höheren Ausbeute als die auf andere Weise N-acylierten Derivate, aber dann kann das 3,6'-di-N-acylierte Derivat nicht erhalten werden (siehe Beispiel 19 weiter unten). Diese experimentelle Tatsache lässt darauf schliessen, dass das Zinkkation ein anderes Verhalten zeigt als die oben genannten vier Transitionsmetallkationen, insbesondere, indem das Zinkkation keinen Komplex mit dem benachbarten Paar der 2'-Amino- und 3'-Hydroxylgruppe bildet.

Wenn als weiteres Beispiel Kanamycin-A mit Zinkkationen umgesetzt und anschliessend mit einer die Benzoyloxycarbonylgruppe abgebenden Verbindung acyliert wird (siehe Formel I oben) wird die Tatsache beobachtet, dass 3,6'-Di-N-benzoyloxycarbonylkanamycin-A als hauptsächliches Acylierungsprodukt gebildet wird, sofern das Zinkkation in einer Menge von genau 1 Mol oder etwas mehr pro Mol Kanamycin-A zur Verfügung steht. In diesem Fall ist zu beachten, dass diese Acylierungsreaktionen die Bildung des 1,3,6',3''-Tetra-N-benzoyloxycarbonylderivates von Kanamycin-A und die Bildung von nicht-acyliertem, ursprünglichem Kanamycin-A gleichzeitig einem gewissen Ausmass ergibt, jedoch die Bildung des Tri-N-benzoyloxycarbonylderivates von Kanamy-

cin-A lediglich in sehr niedriger Ausbeute erfolgt, trotzdem die Aufklärung des Reaktionsmechanismus durch Nagabhushan und Mitarbeiter erwarten lässt, dass das Tri-N-benzoyloxycarbonylderivat in einer höheren Ausbeute gebildet würde als die anderen N-acylierten Derivate.

In der Beschreibung und insbesondere in Anspruch 4 des US-Patentes No. 4.136.254 haben Nagabhushan und Mitarbeiter darauf hingewiesen, dass ein Salz eines bivalenten Transitionsmetalles, wie Kupfer-(II), Nickel-(II), Kobalt-(II), usw. in einer Gesamtmenge von mindestens 2 Mol pro Mol Kanamycin-A für die Bildung von Kanamycin-A-Transitionsmetallsalz-Komplex benötigt wird, wie aus Formel I oben ersichtlich ist. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Untersuchungen haben jedoch ergeben, dass im Gegensatz zu den vier genannten Transitionsmetallkationen, das Zinkkation befähigt ist, die Wirkung der Blockierung der 1-Amino- und 3''-Aminogruppe von Kanamycin-A zu erzielen, wenn Zinkkationen in einer Gesamtmenge von mindestens 1 Mol pro Mol Kanamycin-A verwendet werden.

Gemäss dieser Untersuchung wurde gefunden, dass, wenn ein Nickelsalz in einer Menge von etwas über 1 Mol pro Mol Kanamycin-A zur Reaktion gebracht wird und anschliessend der erhaltene Kanamycin-A-Nickelsalz-Komplex mit einer Benzoyloxycarbonyl abgebenden Verbindung acyliert wird, das 3,6'-Di-N-benzoyloxycarbonylkanamycin-A nur in sehr geringer Ausbeute erhalten wird, während es in einer bedeutenden Ausbeute erhalten wird, wenn der Kanamycin-A-Zinksalz-Komplex acyliert wird (siehe Beispiel 7 weiter unten). Aufgrund der obigen Tatsachen wird geschlossen, dass das Zink-(II)-Kation einen Mechanismus zur Komplexbildung mit einem Aminoglycosid anwendet, welcher verschieden ist von demjenigen der Nickel-(II)-, Kobalt-(II)-, Kupfer-(II)- und Cadmium-(II)-Kationen, und dass der Aminoglycid-Zinkkationen-Komplex eine Komplexierungsstabilität aufweist, welche verschieden ist von derjenigen des Komplexes des Aminoglycides mit Nickel-(II)-, Kobalt-(II)-, Kupfer-(II)- oder Cadmium-(II)-Kationen. Für die Komplexbildung des Zinkkations mit dem Aminoglycosid-Antibiotikum kann das Zinkkation in Form eines Zinksalzes verwendet werden, welches mit Vorteil ein billiges Zinksalz ist, und kaum als Quelle von Umweltverschmutzungen in Frage kommt.

Es wurde demzufolge überraschenderweise gefunden, dass, wenn Zinkkationen in einem inerten organischen Lösungsmittel mit einem Aminoglycosid-Antibiotikum umgesetzt werden, welches einen Deoxystreptaminteil enthält, der eine 3-Aminoglycosyl- oder 3-Alkylaminoglycosylgruppe gebunden an die 6-Hydroxylgruppe des Deoxystreptaminteils und gegebenenfalls eine Aminoglycosylgruppe gebunden an die 4-Hydroxylgruppe des Deoxystreptaminteils aufweist, die Zinkkationen komplex mit den Amino-Hydroxyl-Paaren an bestimmten Stellen, welche je nach der Natur des Aminoglycosid-Antibiotikums variieren können, komplex gebunden werden und diese blockieren, und dass, wenn der derart gebildete Aminoglycosid-Antibiotikum-Zinkkationen-Komplex mit einem Acylierungsmittel umgesetzt wird, welches eine Acylgruppe enthält, welche üblicherweise zur Einführung einer Aminoschutzgruppe bei der Synthese von Polypeptiden verwendet wird, diese Acylierungsmittel mindestens eine dieser Aminogruppen im Aminoglycid-Antibiotikum acyliert, welche nicht mit dem Zinkkationen-Komplex gebunden und daher nicht blockiert ist, so dass die derart acylierte Aminogruppe geschützt ist, und dass ferner, wenn das erhaltene Acylierungsprodukt (d.h. der Aminoglycosid-Antibiotikum-Zinkkationen-Komplex, welcher eine oder mehrere acylierte Aminogruppen enthält) mit einem geeigneten Reagens behandelt wird, welches die Zinkkationen aus dem Acylierungsprodukt entfernt, der Zinkkomplex zersetzt wird, wobei ein

selektiv geschütztes N-acyliertes Aminoglycosid-Antibiotikum erhalten wird, in welchem die ursprünglich nicht mit Zink komplexierten Aminogruppe(n) selektiv durch die Acylgruppe(n) geschützt wurde(n).

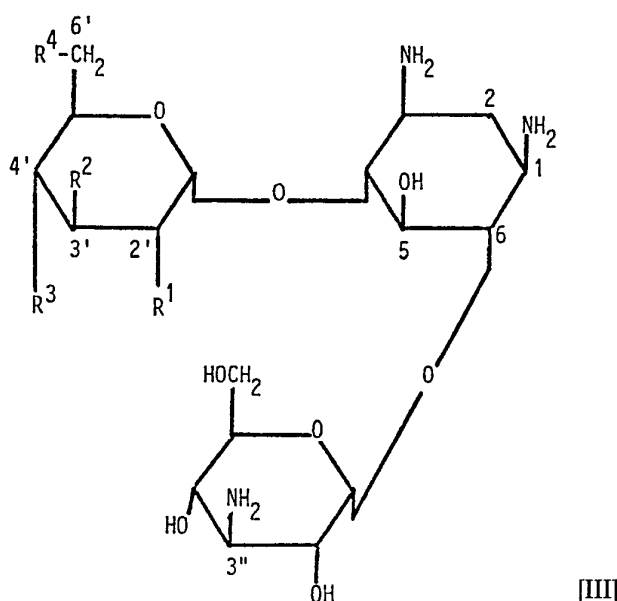
Ein derartiges partiell geschütztes N-acyliertes Aminoglycosid-Antibiotikum, welches aus einem 6-O-(3''-Amino- oder 3''-Alkylamino-3''-deoxyglycosyl)-2-deoxystreptamin, welches gegebenenfalls 4-O-Aminoglycosylgruppen enthält, besteht, dient als Ausgangsmaterial für das erfindungsgemässe Verfahren. In einer solchen Verbindung sind die 1-Amino- und die 3''-Amino- oder 3''-Alkylaminogruppen ungeschützt und alle anderen Aminogruppen geschützt. Diese partiell geschützte, N-acylierte Verbindung kann hergestellt werden durch:

(a) Umsetzung von Zinkkationen mit dem Aminoglycosid-Antibiotikum in einem inerten organischen Lösungsmittel, um den Komplex der Zinkkationen mit dem Aminoglycosid-Antibiotikum zu erzeugen,

(b) Umsetzung eines Acylierungsmittels, welches eine als Aminoschutzgruppe einzuführende Acylgruppe aufweist, mit dem Aminoglycosid-Antibiotikum-Zinkkationen-Komplex aus Stufe (a) in situ in dem inerten organischen Lösungsmittel, um einen Komplex der Zinkkationen mit dem selektiv N-acylierten Derivat des Aminoglycosid-Antibiotikums zu bilden, welches die ursprünglich nichtkomplex gebundenen Aminogruppen acyliert enthält, und

(c) die Umsetzung des selektiv N-acylierten Aminoglycosid-Antibiotikum-Derivat-Zinkkationen-Komplexes aus der obigen Stufe (b) mit einem Reagens, welches die Zinkkationen aus dem N-acylierten Zinkkomplex entfernt, um ein partiell und selektiv geschütztes N-acyliertes Aminoglycosid-Antibiotikum-Derivat zu erzeugen, welches frei von Zinkkationen ist und in welchem die 1-Amino- und die 3''-Amino- oder die 3''-Alkylaminogruppe ungeschützt sind, aber alle anderen Aminogruppen im Aminoglycosid-Molekül durch die Acylgruppe geschützt sind.

Typische Beispiele von Aminoglycosid-Antibiotika, auf welche dieses Verfahren anwendbar ist, umfassen Kanamycin-A, Kanamycin-B, Kanamycin-C und Deoxyderivate dieser Kanamycine, sowie 6'-N-Alkylderivate davon, welche alle durch die folgende allgemeine Formel III dargestellt werden können:



in welcher R¹ die Hydroxylgruppe oder Aminogruppe, R² und R³ jedes Wasserstoff oder die Hydroxylgruppe und R⁴ die Hydroxylgruppe oder Aminogruppe oder eine Alkylami-

nogruppe mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen, insbesondere die Methylaminogruppe bedeuten.

Gemäss dem oben beschriebenen Verfahren, welches z.B. Gegenstand des U.S.-Patentes No. 4 297 485 ist (im folgenden gelegentlich «zinkkomplexbildendes Verfahren» genannt) ist es möglich, ein solches selektives aber partiell geschütztes N-acyliertes Aminoglycosid-Antibiotikum zu erzeugen, in welchem alle Aminogruppen ausser den beiden 1-Amino- und 3''-Amino- (oder 3''-Alkylamino)-gruppen des Aminoglycosid-Moleküls durch eine Acylgruppe geschützt sind, und daher die 1-Amino- und 3''-Amino- (oder 3''-Alkylamino)-gruppen ungeschützt verbleiben. Selbst wenn dieses partiell geschützte N-acylierte Aminoglycosid-Antibiotikum mit einer α -Hydroxy- ω -aminofettsäure oder deren reaktionsfähigem Äquivalent zwecks Durchführung der 1-N-Acylierung umgesetzt wird, werden gemischte Acylierungsprodukte erhalten, welche (1) das 1-N-acylierte Produkt, in welchem nur die 1-Aminogruppe des Aminoglycosid-Moleküls mit der α -Hydroxy- ω -aminofettsäure acyliert wurde, (2) das 3''-N-acylierte Produkt, in welchem nur die 3''-Amino- oder (3''-Alkylamino)-gruppe acyliert wurde, (3) das Produkt, in welchem sowohl die 1-Amino- wie die 3''-Amino- (oder 3''-Alkylamino)-gruppen acyliert wurden, und (4) das nicht-umgesetzte Material, in welchem weder die 1- noch die 3''-Amino- (oder 3''-Alkylamino)-gruppen acyliert wurden, umfasst. Um das letztlich gewünschte 1-N-Acylierungsprodukt aus den obigen gemischten Acylierungsprodukten zu erhalten, ist es daher immer notwendig, eine zusätzliche Stufe durchzuführen, in welcher das 1-N-Acylierungsprodukt mittels Chromatographie oder jeder anderen Isoliermethode aus dem Gemisch isoliert wird. Da die 1-Aminogruppe glücklicherweise stärker reaktionsfähig ist als die 3''-Amino- (oder 3''-Alkylamino)-gruppe beträgt die tatsächliche Ausbeute an gewünschtem 1-N-Acylierungsprodukt üblicherweise etwa 40 bis 60% und übersteigt ein theoretisches Maximum von 25%, welches sich berechnen lässt in der Annahme, dass die Reaktionsfähigkeit von 1- und 3''-Amino- (oder 3''-Alkylamino)-gruppen einander vollständig gleich sind. Selbst wenn die Reaktionsbedingungen für die 1-N-Acylierung optimal gewählt werden, ist es trotz allem unvermeidbar, dass die unerwünschten N-acylierten Produkte als Nebenprodukte gebildet werden und es ist immer notwendig, eine zusätzliche Stufe zur Entfernung der unerwünschten N-acylierten Nebenprodukte durchzuführen, indem die gemischten acylierten Produkte sorgfältig einer Säulenchromatographie unterworfen werden.

Um diesen Nachteil auszuschalten ist es offensichtlich erforderlich, ein derart selektiv geschütztes N-acyliertes Aminoglycosid-Antibiotikum zu erzeugen, in welchem alle anderen Aminogruppen als die 1-Aminogruppe geschützt wurden.

Um diesem Erfordernis nachzukommen, wurden weitere Forschungsarbeiten durchgeführt, im Versuch, ein Verfahren zu entwickeln, welches fähig ist, selektiv die 3''-Amino- (oder 3''-Alkylamino)-gruppe des selektiv aber partiell geschützten N-acylierten Aminoglycosid-Antibiotikums, welches freie 1- und 3''-Aminogruppen enthält, wie es aus dem oben beschriebenen «zinkkomplexbildenden Verfahren» erhalten wird, zu schützen, während die 1-Aminogruppe unblockiert verbleibt.

Als Resultat wurde nun gefunden, dass, wenn das partiell geschützte N-acylierte Aminoglycosid-Antibiotikum-Derivat, wie es z.B. aus dem «zinkkomplexbildenden Verfahren» erhalten wird, mit einem Acylierungsmittel, ausgewählt aus Ameisensäureestern, Dihalogen- oder Trihalogenfettsäureestern und N-Formylimidazol, die 3''-Amino- oder 3''-Alkylaminogruppe bevorzugt zu Blockierungszwecken acyliert werden kann, ohne die 1-Aminogruppe zu acylieren. Dieses selektive 3''-N-Schutzverfahren kann mit dem oben beschriebenen «zinkkomplexbildenden Verfahren» kombiniert werden, so dass auf einfache und wirksame Weise ein derartiges

selektiv geschütztes N-acyliertes Aminoglycosid-Antibiotikum erhalten wird, welche einen 6-O-(3''-Amino- oder 3''-Alkylamino-3''-deoxyglycosyl)-2-deoxystreptaminteil enthält, in welchem Derivat alle Aminogruppen mit Ausnahme der 1-Aminogruppe des Aminoglycosid-Moleküls selektiv mit gleichen oder verschiedenen Acylgruppen geschützt wurden. Wenn dieses 1-N-ungeschützte, aber anderweitig N-vollgeschützte Derivat für die 1-N-Acylierung des Aminoglycosid-Antibiotikums verwendet wird, wird ein weiterer Vorteil vermittelt, indem die unerwünschten N-acylierten Produkte praktisch nicht entstehen, so dass die Gewinnung und Reinigung des gewünschten 1-N-Acylierungsproduktes stark erleichtert wird.

Gemäss der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren für die Herstellung eines selektiv geschützten N-acylierten Aminoglycosid-Antibiotikums, welches einen 6-O-(3''-Amino- oder 3''-Alkylamino-3''-deoxyglycosyl)-2-deoxystreptaminteil enthält, der gegebenenfalls eine 4-O-Aminoglycosylgruppe aufweist, geliefert, in welcher Verbindung die 1-Aminogruppe des Deoxystreptaminteils ungeschützt, aber alle anderen Aminogruppen im Aminoglycosid-Molekül mit gleichen oder verschiedenen Acylgruppen geschützt sind, wobei dieses Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, dass man einen Fettsäureester der Formel VIII:



in welcher R^a Wasserstoff oder eine Dihalogenalkyl- oder Trihalogenalkylgruppe mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen und R^b eine Alkoxygruppe mit 1 bis 6 Kohlenstoffatomen, eine Aralkoxygruppe oder eine Aryloxygruppe ist, oder N-Formylimidazol als Acylierungsmittel in einem inerten organischen Lösungsmittel mit einem entsprechenden partiell geschützten N-acylierten Aminoglycosid-Antibiotikum, in welchem die 1-Amino- und die 3''-Aminogruppe ungeschützt sind, während alle anderen Aminogruppen mit einer Acylgruppe als Aminoschutzgruppe geschützt sind umgesetzt, um die selektive Acylierung der 3''-Amino- oder der 3''-Alkylaminogruppe der partiell geschützten N-acylierten Verbindung zu bewirken und dadurch das gewünschte 1-N-ungeschützte und an allen anderen Aminogruppen voll geschützte Aminoglycosid-Antibiotikum zu ergeben.

Das partiell geschützte N-acylierte Aminoglycosid-Antibiotikum, welches mit dem Acylierungsmittel der Formel VIII gemäss der vorliegenden Erfindung umgesetzt werden soll, und welches alle Aminogruppen mit Ausnahme der 1-Amino- und der 3''-Amino- (oder der 3''-Alkylamino)-gruppen im Aminoglycosid-Molekül geschützt hat, kann ein solches sein, welches nach dem oben genannten «zinkkomplexbildenden Verfahren» hergestellt wurde. Die ursprünglich im partiell geschützten N-acylierten Aminoglycosid-Antibiotikum, welches nach der vorliegenden Erfindung verwendet wird, enthaltene Acylgruppe kann im allgemeinen eine Alkanoylgruppe, eine Aroylgruppe, eine Alkoxy-carbonylgruppe, eine Aralkyloxy-carbonylgruppe, eine Aryloxy-carbonylgruppe, eine Alkylsulfonylgruppe, eine Aralkylsulfonylgruppe oder eine Arylsulfonylgruppe sein, welche als übliche Aminoschutzgruppen bekannt sind. Ausserdem kann das partiell geschützte N-acylierte Aminoglycosid-Antibiotikum, welches als Ausgangsmaterial verwendet wird, auch ein solches sein, welches nach der oben genannten Methode von Nagbhusan und Mitarbeiter gemäss US-Patent No. 4 136 254 hergestellt wurde.

Bei der bevorzugten Durchführung des Verfahrens gemäss der vorliegenden Erfindung wird das partiell geschützte

N-acylierte Aminoglycosid-Antibiotikum-Derivat, welches die ungeschützte 1- und 3''-Amino- (oder die 3''-Alkylamino)-gruppe enthält, als Ausgangsmaterial verwendet und in einem geeigneten inerten organischen Lösungsmittel aufgelöst oder suspendiert. Zu der erhaltenen Lösung oder Suspension wird ein Fettsäureester der Formel VIII oder N-Formylimidazol als Acylierungsmittel im allgemeinen in einer Menge zugesetzt, welche mindestens äquimolar mit dem verwendeten Ausgangsmaterial ist. Das inerte organische Lösungsmittel kann bevorzugt ein solches sein, welches ein hohes Lösevermögen für das Ausgangsmaterial aufweist, wie z.B. Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid oder Hexamethylphosphorsäuretriamid, doch ist es auch möglich Tetrahydrofuran, Dioxan, Acetonitril, Nitromethan, Sulfolan, Dimethylacetamid, Chloroform, Dichlormethan, Methanol, Äthanol, n-Butanol und t-Butanol sowie Gemische dieser Lösungsmittel mit Wasser zu verwenden. Benzol, Toluol und Äthyläther können als Reaktionsmedium-Lösungsmittel verwendet werden, obwohl diese nicht sehr geeignet sind, weil sie niedrigere Ausbeuten am erwünschten Produkt ergeben. Im Acylierungsmittel der Formel VIII kann R^a vorzugsweise eine Dihalogenalkyl- oder Trihalogenalkylgruppe, insbesondere Dichlormethyl, Trifluormethyl oder Trichlormethyl sein, und R^b kann bevorzugt eine Alkyloxygruppe, wie Methoxy oder Äthoxy sein. Wenn R^b eine Aryloxygruppe ist, kann es die Phenoxygruppe sein. Besondere Beispiele der Acylierungsmittel der Formel VIII umfassen Methylformiat, Äthylformiat, Butylformiat, Benzylformiat, Phenylformiat, Methyl-dichloracetat, Methyltrichloracetat, Phenyltrichloracetat, Methyltrifluoracetat, Äthyltrifluoracetat und Phenyltrifluoracetat. Unter Verwendung dieser Klasse an Acylierungsmitteln kann die 3''-Aminogruppe des Ausgangsmaterials bevorzugt formyliert, dichloracetyliert, trichloracetyliert oder trifluoracetyliert werden. Der Trifluoressigester, insbesondere Äthyltrifluoracetat, wird am meisten bevorzugt. Diese Klasse von Acylgruppen ist vorteilhaft, indem sie sehr leicht in einer anschliessenden N-Schutzgruppenabtrennung nach üblichen Methoden entfernt werden können. Wenn der Fettsäurealkylester der Formel VIII nicht als Acylierungsmittel verwendet wird, sondern an seiner Stelle ein entsprechendes Fettsäureanhydrid oder ein aktiver Ester davon, wie z.B. N-Hydroxysuccinimidester für die Acylierung verwendet wird, kann die selektive Acylierung der 3''-Aminogruppe nicht erzielt werden, sondern es tritt als Nebenreaktion die Bildung des 1-N-acylierten Produktes und/oder die Bildung von gemischten Acylierungsprodukten, welche hauptsächlich das 1-N-acylierte Produkt enthalten, auf. Es ist beachtenswert, dass die bezweckte selektive Acylierung der 3''-Aminogruppe nicht erhalten werden kann, wenn ein Säureanhydrid oder ein aktiver Ester derselben Fettsäure als Acylierungsmittel verwendet wird.

Die Acylierungsmittel der Formel VIII, welche gemäss der vorliegenden Erfindung verwendet werden, sind in ihrer Reaktionsfähigkeit verschieden und ihre Reaktionsfähigkeit kann innerhalb eines weiten Bereiches zwischen «stark» bis «schwach» liegen. Wenn ein Acylierungsmittel von starker Reaktionsfähigkeit verwendet wird, kann die Acylierungsreaktion während einer kurzen Reaktionszeit unter Kühlung durchgeführt werden. Wenn jedoch ein Acylierungsmittel von schwacher Reaktionsfähigkeit verwendet wird, kann die Acylierungsreaktion entweder unter Erwärmen oder während einer längeren Reaktionszeit erfolgen. Im allgemeinen kann die Reaktionstemperatur mit Vorteil in einem Bereich von -30° bis +120 °C variieren und die Reaktionszeit kann in einem Bereich von 30 Minuten bis 24 Stunden oder sogar 48 Stunden liegen.

Das derart erhaltene selektive 3''-N-acylierte Produkt kann aus dem Reaktionsgemisch auf bekannte Weise gewon-

nen werden, z.B. durch Verdampfen des Lösungsmittels oder durch Ausfällung mittels Zusatz von Wasser, falls notwendig gefolgt von einer weiteren Reinigung des Produktes.

Der Reaktionsmechanismus, durch welchen die selektive 3''-N-Acylierung gemäss dem Verfahren der vorliegenden Erfindung erzielt werden kann, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine mögliche Interpretation besteht darin, dass das Acylierungsmittel der Formel VIII zuerst eine Hydroxylgruppe des Ausgangsmaterials acyliert, um ein Esterzwischenprodukt zu bilden und diese O-veresternde Acylgruppe sodann zu einer Aminogruppe verschoben wird oder wandert (entsprechend der 3''-Amino- oder 3''-Alkylaminogruppe im Fall des vorliegenden Verfahrens) wenn diese Aminogruppe zur gebildeten veresterten Hydroxylgruppe des Zwischenproduktes liegt, wodurch die Acylierung dieser Aminogruppe erhalten wird. Wenn diese Annahme verfolgt wird, ist es möglich, zu erklären, warum die 1-Aminogruppe, welche keine benachbarte Hydroxylgruppe aufweist, im Verfahren gemäss der Erfindung nicht acyliert werden kann. Ausserdem besteht die Tatsache, dass das Esterzwischenprodukt nicht erhalten werden kann, wenn die Trifluoracetylierung oder die Formylierung nach dem Verfahren der Erfindung durchgeführt wird. Der Grund, warum das Esterprodukt nach der Trifluoracetylierung oder Formylierung nicht gewonnen werden kann, ist wahrscheinlich, dass die O-Trifluoracetylgruppe oder die O-Formylgruppe instabil ist, und dass eine Menge der instabilen O-Acylgruppe, welche keine Verschiebung zur Aminogruppe erfährt (nämlich die bekannte O → N-Acylmigration) aus der acylierten Hydroxylgruppe im Laufe der Gewinnung und der Reinigung des 3''-N-Acylierungsproduktes entfernt wird, so dass wiederum die freie Hydroxylgruppe entsteht. Diese Erfindung ist jedoch nicht auf die obige Interpretation des Reaktionsmechanismus, welcher im vorliegenden Verfahren auftritt, eingeschränkt. Es scheint jedoch, dass unter den Verbindungen, welche als Acylierungsmittel der Formel VIII gemäss der vorliegenden Erfindung zur Verfügung stehen, solche sind, welche für die Zwecke der Erfindung besser geeignet sind, wenn sie eine Acylgruppe aufweisen, welche dazu neigt, ein stabileres Esterprodukt zu ergeben, wenn diese Acylgruppe in eine O-Acylgruppe durch Reaktion mit der Hydroxylgruppe übergeführt wird und dadurch das Esterprodukt ergibt. Unterdeuten ist es sehr interessant festzustellen, dass, wenn das Verfahren gemäss der Erfindung durchgeführt wird unter Verwendung eines N-Alkanoylimidazols, wie N-Acetylimidazol, N-Propionylimidazol und N-Butyrylimidazol, anstelle des N-Formylimidazols, die 3''-Amino- oder 3''-Alkylaminogruppe des partiell geschützten N-acylierten Aminoglycosid-Antibiotikums nicht acyliert wird, doch kann eine Hydroxylgruppe, welche zu dieser 3''-Amino- oder 3''-Alkylaminogruppe benachbart ist, verestert werden durch die Alkanoylgruppe des N-Alkanoylimidazols, welches zur Herstellung des O-Veresterungs-Zwischenproduktes verwendet wurde. Wenn dieses O-Veresterungsprodukt oder das ganze Reaktionsgemisch, welches dieses O-Veresterungsprodukt enthält, anschliessend mit einem alkalischen Reagens, wie Ammoniumhydroxid, bei Zimmertemperatur behandelt wird, wird die O-veresternde Alkanoylgruppe dazu veranlasst, zur benachbarten 3''-Amino- oder 3''-Alkylaminogruppe zu wandern, wodurch eine selektive Acylierung und damit der Schutz der 3''-Amino- oder 3''-Alkylaminogruppe erzielt wird. Das Reaktionsgemisch aus der Umsetzung des partiell geschützten N-acylierten Aminoglycosid-Antibiotikums mit einem N-Alkanoylimidazol ergibt somit zunächst keinen Gehalt an dem gewünschten 3''-N-acylierten Produkt, sondern das gewünschte 3''-N-acylierte Produkt kann aus diesem Reaktionsgemisch erst gewonnen werden, nachdem das Reaktionsgemisch durch Behandlung mit einem alkalischen Reagens, wie z.B. wässri-

gem Ammoniak alkalisch gemacht wurde (siehe Beispiel 39, unten).

Die Umsetzung des erfindungsgemäss erhaltenen 1-N-ungeschützten und anderweitig N-vollgeschützten Derivates mit einer α -Hydroxy- ω -aminofettsäure der Formel IX:



in welcher m 1 oder 2 ist, oder ein äquivalentes reaktionsfähiges Derivat davon, in welchem die Aminogruppe entweder ungeschützt oder geschützt ist, um die 1-Aminogruppe des 1-N-ungeschützten Derivates zu acylieren, und die Entfernung der restlichen Aminoschutzgruppen aus dem erhaltenen 1-N-Acylierungsprodukt nach einer üblichen Methode zur Entfernung der Schutzgruppe ergibt das entsprechende 1-N-(α -Hydroxy- ω -aminoalkanoyl)-aminoglycosid-Antibiotikum, welches als Arzneimittel gegen resistente Bakterien bekannt ist.

Hierbei wird das erfindungsgemäss erhaltene 1-N-ungeschützte und anderweitig N-vollständig geschützte Aminoglycosid-Antibiotikum mit einer α -Hydroxy- ω -aminofettsäure der Formel IX, insbesondere mit 3-Amino-2-hydroxypropionsäure (als DL-Isoserin, D-Isoserin oder L-Isoserin) oder mit L-4-Amino-2-hydroxybuttersäure, umgesetzt, um die 1-Aminogruppe des Aminoglycosid-Antibiotikums mit der 3-Amino-2-hydroxypropionyl- oder der 4-Amino-2-hydroxybutyrylgruppe zu acylieren. Diese 1-N-Acylierung kann im allgemeinen wie im britischen Patent No. 1 426 908 oder im US-Patent No. 4 001 208 beschrieben nach bekannten Methoden zur Synthese von Amidinen durch Umsetzung des geschützten Aminoglycosid-Antibiotikums mit einem Isoserin oder mit L-4-Amino-2-hydroxybuttersäure, entweder in ihrer freien Form oder in Form eines reaktionsfähigen Äquivalentes, wie eines aktiven Esters, z.B. des Dicyclohexylcarbodiimidesters, des gemischten Säureanhydrides oder des Säureazides in einem inerten organischen Lösungsmittel erfolgen, wie z.B. Dioxan, Dimethoxyäthan, Dimethylformamid, Tetrahydrofuran oder Gemische dieser Lösungsmittel mit Wasser. Isoserin und L-4-Amino-2-hydroxybuttersäure können ihre Aminogruppen mit einer Aminoschutzgruppe blockiert enthalten. Geeignete Aminoschutzgruppen für diesen Zweck können dieselben oder andere sein als jene, welche im 1-N-ungeschützten aber anderweitig N-vollgeschützten Aminoglycosid-Antibiotikum-Derivat, welches 1-N-acyliert werden soll, verwendet wurden. Die t-Butoxycarbonylgruppe ist eine bevorzugte Aminoschutzgruppe, weil sie leicht entferntbar ist durch Behandlung mit einer verdünnten Säure, wie wässriger Trifluoressigsäure, wässriger Essigsäure oder verdünnter Salzsäure. Die Benzyloxycarbonylgruppe, welche durch übliche katalytische Hydrogenolyse über einem Palladium- oder Platinoxidkatalysator entfernt wird, wie auch die Phthaloylgruppe, welche leicht durch Hydrolyse mit Hydrazin entfernt wird, sind sehr bequem als Aminoschutzgruppen zu dem genannten Zweck.

Die Acylierungsreaktion in der 1-N-Acylierungsstufe gemäss der vorliegenden Erfindung kann bevorzugt in einem wässrigen organischen Lösungsmittel unter Verwendung eines aktiven Esters der α -Hydroxy- ω -aminofettsäure der Formel IX durchgeführt werden. Der geeignete aktive Ester kann der N-Hydroxysuccinimidester von Isoserin oder L-4-Benzoyloxycarbonylamino-2-hydroxybuttersäure sein, und dieser aktive Ester kann in einer Menge von 1 bis 2 Mol, vorzugsweise 1 bis 1,5 Mol, pro Mol des 1-N- zu acylierenden Aminoglycosides vorliegen. Das mit Wasser mischbare organische Lösungsmittel zur Verwendung im Reaktionsmedium kann be-

vorzugt Dioxan, Dimethyloxyäthan, Dimethylformamid, oder Tetrahydrofuran sein.

Anschließend an die obige Stufe wird die Entfernung der N-Schutzgruppe durchgeführt, um alle restlichen Aminoschutzgruppen aus dem 1-N-Acylierungsprodukt zu entfernen. Diese Entfernung der restlichen Aminoschutzgruppen kann nach üblichen Methoden zur Entfernung von N-Schutzgruppen erfolgen. Eine solche restliche Aminoschutzgruppe, welche vom Aralkyloxycarbonyl-Typus ist, wie z.B. die Benzyloxycarbonylgruppe, wird leicht entfernt durch übliche katalytische Hydrogenolyse. Wenn alle restlichen Aminoschutzgruppen aus dem 1-N-Acylierungsprodukt entfernt sind, wird das gewünschte 1-N-(2-Hydroxy-3-aminopropionyl)- oder 1-N-(2-Hydroxy-4-aminobutyl)-aminoglycosid-Antibiotikum in hoher Ausbeute erhalten.

Beispiele der 1-N-(α -Hydroxy- ω -aminoalkanoyl)-aminoglycosid-Antibiotika, welche nach dem Verfahren gemäss diesem Aspekt der Erfindung hergestellt werden können, sind die folgenden:

- [1] 1-N-(L-4-Amino-2-hydroxybutyl)-Kanamycin-A.
- [2] 1-N-(L-4-Amino-2-hydroxybutyl)-3'-deoxy-Kanamycin-A.
- [3] 1-N-(L-4-Amino-2-hydroxybutyl)-3',4'-dideoxy-Kanamycin-A.
- [4] 1-N-(L-4-Amino-2-hydroxybutyl)-Tobramycin.
- [5] 1-N-(L-4-Amino-2-hydroxybutyl)-Dibekacin.
- [6] 1-N-(3-Amino-2-hydroxypropionyl)-Dibekacin.

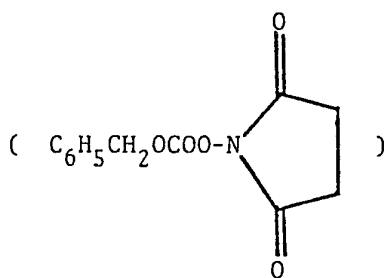
Eine andere Anwendung der erfindungsgemäss erhaltenen, mit Ausnahme der 1-Aminogruppe, vollständig acylierten Aminoglycosid-Derivate ist die Herstellung von 1-N-Alkylaminoglycosid-Antibiotika und ein Beispiel dieser Anwendung ist die Herstellung von Netilmicin oder dessen 1-N-Alkylanalogen aus Sisomicin durch Alkylierung mit einem niederen aliphatischen Aldehyd und Cyanoborhydrid.

Die vorliegende Erfindung wird ferner durch die folgenden Beispiele näher illustriert.

Präparation 1

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A

(1) 2,0 g (4,13 mMol) Kanamycin-A (freie Base) wurden in einem Gemisch von Dimethylsulfoxid (50 ml) und Tetrahydrofuran (20 ml) suspendiert und 4 g (18,1 mMol) Zink-(II)-Acetatdihydrat zu der Suspension zugesetzt, worauf das Reaktionsgemisch bei Zimmertemperatur gerührt wurde, bis eine homogene Lösung entstanden war. Es benötigte etwa 4 bis 5 Stunden zur Bildung des Zinkkomplexes von Kanamycin-A und zu dessen Auflösung. Die erhaltene Lösung wurde sodann auf 0 °C gekühlt, worauf ihr langsam im Laufe von etwa 1 Stunde eine gekühlte Lösung (bei 0 °C) von 2,37 g (9,5 mMol) N-Benzyloxycarbonyloxysuccinimid



gelöst in einem Gemisch (40 ml) von Tetrahydrofuran-Dimethylsulfoxid (1:1 Volumenverhältnis) zugesetzt wurde. Die Reaktionslösung wurde bei Zimmertemperatur während 4 Stunden stehen gelassen, während welcher Zeit der Zinkkomplex von Kanamycin-A einer Benzyloxycarbonylierung (der

Acylierung gemäss dem ersten Aspekt der Erfindung) unterzogen wurde.

Eine Probe, welche der derart erhaltenen Reaktionslösung entnommen wurde, wurde der Dünnschichtchromatographie auf Silicagel unterzogen, unter Verwendung der unteren flüssigen Phase eines Gemisches von Chloroform-Methanol-28% wässrigem Ammoniumhydroxid (Volumenverhältnis 1:1:1) als Entwicklungslösungsmittel, was einen Hauptfleck des gewünschten Produktes bei $R_f=0,23$ sowie zwei oder drei kleine Flecken, welche Nebenprodukten zugeschrieben wurden, an höheren Punkten ergab.

(2) Die oben erhaltene Reaktionslösung wurde in 500 ml Äthyläther gegossen, und das ausgeschiedene Öl wurde mehrmals mit weiteren Portionen Äthyläther gewaschen, wobei 8,8 g eines dicken sirupartigen Materials erhalten wurden.

(3) Die Entfernung der Zinkkationen aus dem sirupartigen Material, welches im wesentlichen den Zinkkomplex enthielt, wurde nach einem der folgenden verschiedenen Verfahren durchgeführt:

(A) Verfahren unter Verwendung eines schwachsauren Kationenaustauscherharzes, welches Carboxylgruppen ($-\text{COOH}$) als funktionelle Gruppen enthält und im Handel unter der Marke «Amberlite» CG 50-Harz (H^+ -Form) von Rohm & Haas Co., USA, erhältlich ist:

60 ml «Amberlite» CG 50-Harz (H^+ -Form) wurden zunächst tüchtig mit einem Gemisch von Wasser-Dioxan (2:1) gesättigt und anschliessend in eine Säule eingefüllt. Eine Lösung von 1 g des sirupartigen Materials gelöst in 20 ml Wasser-Dioxan (1:1) wurde sodann durch die Säule geleitet, welche sodann mit Wasser-Dioxan (2:1), welches 1% Essigsäure enthielt, entwickelt wurde. Das Eluat wurde in Fraktionen gesammelt. Das gewünschte 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A, welches auf Ninhydrin positiv reagierte, wurde zuerst aus der Säule eluiert, und das Zinkacetat, welches eine Farbreaktion mit Diphenylcarbazid ergab, wurde anschliessend eluiert. Die Fraktionen, welche das gewünschte Produkt enthielten, wurden vereint und zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde mit Äthyläther gewaschen und ergab 340 mg (81%) 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A als farblosen Feststoff. $[\alpha]_D^{25} + 76^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Elementaranalyse:

berechnet für: $\text{C}_{34}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_{15} \cdot 2\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} \cdot \text{H}_2\text{O}$
 C 51,23, H 6,56, N 6,29%
 gefunden: C 51,02, H 6,71, N 5,22%.

(B) Verfahren unter Verwendung eines schwachen Kationenaustauscherharzes, welches Carboxylatgruppen als funktionelle Gruppen enthält (im Handel erhältlich unter der Marke «Amberlite» CG 50-Harz (NH_4^+ -Form) von Rohm & Haas Co.):

1 g des in Präparation 1(2) erhaltenen sirupartigen Materials wurde in 20 ml Wasser-Dioxan (1:1) gelöst und die Lösung durch eine Säule aus 60 ml «Amberlite» CG 50-Harz (NH_4^+ -Form) geleitet und der linear wachsenden Eluierung mit Wasser-Dioxan (1:1), welches 0 bis 0,1 N Ammoniumhydroxid enthielt, unterworfen. Es wurden keine Zinkkationen eluiert, jedoch das gewünschte Produkt, nämlich 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A, wurde eluiert. Die Fraktionen des Eluates, welche das gewünschte Benzyloxycarbonylierungsprodukt enthielten, wurden gesammelt und zur Trockene eingedampft, wobei 328 mg (89%) des gewünschten Produktes als farbloser Feststoff erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +86^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Elementaranalyse:

berechnet für:

$C_{34}H_{48}N_4O_{15} \cdot 1/2 H_2CO_3$:

C 52,87, H 6,30, N 7,15%

gefunden: C 52,50, H 6,59, N 7,00%.

(C) Verfahren unter Verwendung eines Kationenaustauscherharzes, welches stark saure funktionelle Gruppen, $-SO_3H$ enthält (im Handel erhältlich als «Dowex» 50W $\times$ 2 -Harz von Dow Chemical Co.):

30 ml «Dowex» 50W $\times$ 2 -Harz (H^+ -Form), welche in Wasser-Dioxan (2:1) eingelegt worden waren, wurden in eine Säule eingefüllt, durch welche sodann eine Lösung von 1 g des in Präparation 1 (2) erhaltenen sirupartigen Materials in 20 ml Wasser-Dioxan (2:1) geführt wurde. Die Säule wurde mit Wasser-Dioxan (2:1) gewaschen, bis der Ausfluss aus der Säule eine neutrale Natur ergab, und anschliessend erfolgte die linear zunehmende Eluierung mit Wasser-Dioxan (2:1), welches 0 bis 1 N Ammoniumhydroxid enthielt. Die Eluatfraktionen, welche das gewünschte 3,6'-Di-N-benzoyloxycarbonyl-Kanamycin-A enthielten, wurden vereint und unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft, wobei 311 mg (84%) eines weissen Feststoffes erhalten wurden, welcher identisch war mit dem in Präparation 1 (3) (B) erhaltenen Produkt.

(D) Anderes Verfahren unter Verwendung von «Dowex» 50W $\times$ 2:

Eine Lösung von 1 g des in Präparation 1(2) erhaltenen sirupartigen Materials in 20 ml Wasser-Methanol (3:1) wurde über eine Säule aus 30 ml «Dowex» 50W $\times$ 2 (H^+ -Form), welche zuvor mit Wasser-Methanol (3:1) benetzt worden war, geleitet. Die Säule wurde mit Wasser-Methanol (3:1) gut gewaschen und anschliessend einer gradienten Eluierung mit Wasser-Methanol (3:1), welches 0 bis 6 N Salzsäure enthielt, unterzogen. Die aktiven Fraktionen, welche das gewünschte 3,6'-Di-N-benzoyloxycarbonyl-Kanamycin-A enthielten, wurden gesammelt und mit einem stark basischen Anionenaustauscherharz, «Dowex» 1 $\times$ 2 -Harz (OH-Form) in genügender Menge vermischt, um das Gemisch leicht sauer zu gestalten.

Das Gemisch wurde filtriert und das Filtrat zur Trockene konzentriert, wobei 285 mg (72%) des gewünschten Produktes in Form des Dihydrochlorides erhalten wurden.

$[\alpha]_D^{25} + 79^\circ$ ($c = 1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

(E) Verfahren unter Verwendung eines Anionenaustauscherharzes, welches stark basische funktionelle quaternäre Ammoniumgruppen enthält (im Handel erhältlich als «Dowex» 1 $\times$ 2 -Harz von Dow Chemical Co.):

Eine Lösung von 1 g des in Präparation 1(2) erhaltenen sirupartigen Materials in Wasser-Dioxan (1:1) wurde über eine Säule aus 30 ml «Dowex» 1 $\times$ 2 -Harz (OH-Form), welches zuvor mit Wasser-Dioxan (1:1) imprägniert worden war, geleitet und die Säule anschliessend mit Wasser-Dioxan (1:1) bei verhältnismässig hoher Geschwindigkeit entwickelt. Die Eluatfraktionen, welche das gewünschte Produkt enthielten, wurden gesammelt und zur Trockene eingedampft, wobei 305 mg (84%) eines farblosen Feststoffes erhalten wurden, welcher identisch war mit demjenigen aus Präparation 1 (3) (B).

(F) Verfahren unter Verwendung eines Anionenaustauscherharzes, welches schwach basische funktionelle Gruppen enthält (im Handel erhältlich als «Dowex» WGR -Harz, ein Produkt der Dow Chemical Co.):

1 g des in Präparation 1 (2) erhaltenen sirupartigen Materials wurden in 20 ml Wasser-Dioxan (2:1) gelöst und die Lösung über eine Säule aus 50 ml «Dowex» WGR -Harz (Basenform) geleitet, welches zuvor mit Wasser-Dioxan (2:1) gesättigt

worden war, und anschliessend mit Wasser-Dioxan (2:1) eluiert. Das gewünschte 3,6'-Di-N-benzoyloxycarbonyl-Kanamycin-A wurde in einigen Fraktionen zusammen mit einer Spur mitgerissener Zinkkationen eluiert. Diese Fraktionen wurden vereint und zur Trockene eingedampft, wobei 450 mg eines farblosen Feststoffes erhalten wurden. Der Feststoff konnte direkt als Ausgangsmaterial für die Herstellung von 1-N-((S)-4-Amino-2-hydroxybutyryl)-Kanamycin-A gemäss der 1-N-Acylierungsmethode der unten stehenden Präparation 31 verwendet werden, wobei die im festen Ausgangsmaterial verbleibende Spur an Zinkkationen keinen schädlichen Einfluss auf die Acylierungsreaktion in Präparation 31 ausübte.

(G) Verfahren unter Verwendung eines Chelat-Austauscherharzes, welches schwach saure funktionelle Gruppen enthält (im Handel erhältlich als «Dowex» A 1 -Harz, ein Produkt der Dow Chemical Co., USA):

Eine Lösung von 1 g des in Präparation 1(2) erhaltenen sirupartigen Materials in Wasser-Dioxan (1:1) wurde über eine Säule aus 50 ml «Dowex» A 1-Harz geleitet, welches zuvor mit Wasser-Dioxan (1:1), welches 1% Ammoniumhydroxid enthielt, gesättigt worden war, und anschliessend der Gradient-Eluierung mit Gemischen von Wasser-Dioxan (1:1), welche 0 bis 1 N Ammoniumhydroxid enthielten, unterworfen. Die Eluatfraktionen, welche das gewünschte 3,6'-Di-N-benzoyloxycarbonyl-Kanamycin-A enthielten und erst in einer späteren Phase als Ausfluss aus der Säule gewonnen wurden, wurden vereint und zur Trockene eingedampft, wobei 272 mg (74%) des gewünschten Produktes als weisser Feststoff erhalten wurden.

(H) Verfahren unter Verwendung von Chitosan (einem in Wasser unlöslichen Polymer, welches funktionelle Gruppen enthält, die fähig sind, sich mit einem Metall zu vereinen, im Handel erhältlich als ein Produkt der Toko Kasei Koyo Co., Ltd., Japan):

100 ml Chitosan wurden mit Wasser-Methanol (3:1) gut imprägniert und in eine Säule eingefüllt, über welche sodann eine Lösung von 1 g des in Präparation 1 (2) erhaltenen sirupartigen Materials in Wasser-Methanol (3:1) geleitet wurde. Die Säule wurde mit Wasser-Methanol (3:1) entwickelt, wobei das gewünschte 3,6'-Di-N-benzoyloxycarbonyl-Kanamycin-A zuerst eluiert wurde und das Zinkacetat viel später eluiert wurde. Die Eluatfraktionen, welche das gewünschte Produkt enthielten, wurden vereint und zur Trockene eingedampft, wobei ein Rückstand erhalten wurde, welcher in Wasser-Dioxan (1:1) gelöst und die Lösung über eine Säule aus «Amberlite» CG 50 -Harz (NH_4^+ -Form) geleitet, welches zuvor mit Wasser-Dioxan (1:1) vorbehandelt worden war. Die Säule wurde mit Wasser-Dioxan (1:1) gut gewaschen und anschliessend der Gradienten-Eluierung mit Wasser-Dioxan (1:1), welches 0 bis 0,1 N Ammoniumhydroxid enthielt, unterworfen. Jene Fraktionen, welche eine positive Ninhydrin-Reaktion ergaben, wurden vereint und zur Trockene eingedampft, wobei 301 mg (82%) eines farblosen Feststoffes erhalten wurden, welcher identisch war mit dem in Präparation 1 (3) (B) erhaltenen Produkt.

(I) Verfahren unter Verwendung eines Hochpolymeren, welches funktionelle Carboxylgruppen enthält (im Handel erhältlich als «CM-Sephadex» C-25, welches ein Ionenaustauscher-Gelfiltrationsmittel ist, das aus einem carboxymethylsubstituierten Dextrangel besteht, ein Produkt von Pharmacia Fine Chemical Co., Schweden):

Eine Lösung von 1 g des in Präparation 1(2) erhaltenen sirupartigen Materials in Wasser-Dioxan (1:1) wurde über eine Säule aus 40 ml «CM-Sephadex» C-25 (NH_4^+ -Form) geleitet, welches zuvor mit Wasser-Dioxan (1:1) gut gesättigt worden war. Die Säule wurde mit 200 ml Wasser-Dioxan (1:1) gewaschen und anschliessend der Gradienten-Eluierung, unter Verwendung von Wasser-Dioxan (1:1), welches 0 bis 0,1 N Ammoniumhydroxid enthielt, unterworfen. Es wurden keine Zinkkationen aus der Säule eluiert, sondern nur das gewünschte 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A. Das Eluat wurde zur Trockene eingedampft und ergab 303 mg (82%) eines farblosen Feststoffes, welcher identisch war mit demjenigen aus Präparation 1 (3) (B).

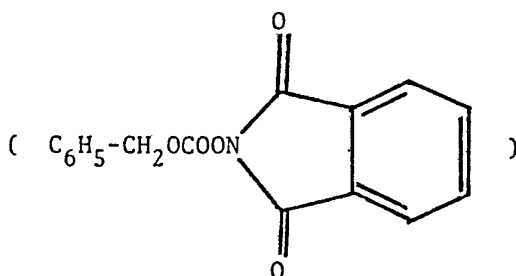
(J) Verfahren unter Verwendung von Schwefelwasserstoff als Zink fällendes Mittel:

1 g des in Präparation 1(2) erhaltenen sirupartigen Materials wurden in 20 ml Wasser-Methanol (1:1) gelöst, zu welchem sodann wässriges Ammoniumhydroxid zugesetzt wurde, gefolgt von der Einführung einer genügenden Menge von Schwefelwasserstoff. Das Reaktionsgemisch, welches den gebildeten Zinksulfidniederschlag enthielt, wurde auf einem Glasfilter, welcher mit «Celite»-Filterhilfsmittel gefüllt war, filtriert, und das Filtrat wurde unter vermindertem Druck eingeeengt, wobei ein sirupartiges Material zurückblieb, welches mit Äthyläther gut gewaschen wurde, und einen festen Rückstand ergab. Dieser Rückstand wurde in einem Volumen Wasser-Dioxan (1:1) aufgenommen und die Lösung wurde über eine Säule aus 30 ml «Amberlite» IRA 900 (OH-Form, stark basisches Harz, ein Produkt von Rohm & Haas Co.) chromatographiert unter Verwendung von Wasser-Dioxan (1:1) als Entwicklungslösungsmittel. Das Eluat wurde in Fraktionen gesammelt und die Fraktionen, welche 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A enthielten, wurden vereint und zur Trockene eingedampft, wobei 235 mg (64%) eines farblosen Feststoffes erhalten wurden, welcher identisch war mit demjenigen aus Präparation 1 (3) (B).

Präparation 2

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A

500 mg (1,03 mMol) Kanamycin-A (freie Base) wurden in 15 ml Dimethylsulfoxid suspendiert, worauf 420 mg (3,09 mMol) Zinkchlorid und 840 mg (6,18 mMol) Natriumacetat-trihydrat zugesetzt wurden. Das Gemisch wurde während 10 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt, worauf dem erhaltenen Gemisch, welches den gebildeten Kanamycin-A-Zinkkomplex enthielt, langsam im Laufe von 1 Stunde eine Lösung von 675 mg (2,27 mMol) N-Benzyloxycarbonyloxyphtalimid



gelöst in 10 ml Dimethylsulfoxid zugesetzt wurde. Das erhaltene Gemisch wurde bei Zimmertemperatur während 4 Stunden stehen gelassen.

Anschliessend wurde das Reaktionsgemisch auf dieselbe Weise wie in Präparation 1 (2) und (3) (I) behandelt wobei 598 mg (74%) 3,5'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A in Form eines farblosen Feststoffes erhalten wurden.

Präparation 3

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A

600 mg (0,95 mMol) Kanamycin-A-Tetrahydrochlorid und 150 mg (3,8 mMol) Natriumhydroxid in 15 ml Dimethylsulfoxid wurden während 1 Stunde gerührt, worauf 1 g (4,55 mMol) Zinkacetatdihydrat zugesetzt wurde und anschliessend das Gemisch während weiteren 5 Stunden gerührt wurde. Zu dem erhaltenen Gemisch, welches den gebildeten Kanamycin-A-Zinkkomplex enthielt, wurde im Laufe von 30 Minuten eine Lösung von 545 mg (2,2 mMol) N-Benzyloxycarbonyloxysuccinimid gelöst in 5 ml Dimethylsulfoxid-Tetrahydrofuran (1:1) zugesetzt. Das erhaltene Gemisch wurde über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt, worauf Äthyläther zugesetzt wurde, um den N-acylierten Zinkkomplex als Niederschlag auszufällen. Der Niederschlag wurde sodann nach demselben Verfahren wie in Beispiel 1 (3) (H) beschrieben behandelt, wobei 581 mg (78%) der Titelverbindung als farbloser Feststoff erhalten wurden.

Präparation 4

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A

(1) 500 mg (1,03 mMol) Kanamycin-A (freie Base) wurden in 20 ml eines Gemisches von Wasser und Dimethylsulfoxid (1:9) gelöst, worauf 1 g (4,55 mMol) Zinkacetatdihydrat und anschliessend 590 mg (2,4 mMol) N-Benzyloxycarbonyloxysuccinimid zugesetzt wurden. Nachdem das Gemisch bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen worden war, wurde eine grosse Menge Äthyläther zum Gemisch zugesetzt, was zur Abtrennung einer wässrigen sirupartigen Schicht führte, welche mehrmals mit Äthyläther gewaschen wurde, um eine dicke sirupartige Schicht zu ergeben.

(2) Das derart erhaltene sirupartige Material wurde in Wasser-Methanol (3:1) gelöst und die Lösung durch eine Säule von 200 ml Chitosan geleitet. Die Säule wurde mit Wasser-Methanol (3:1) eluiert, und das Eluat wurde in Fraktionen gesammelt. Die auf Ninhydrin positiv reagierenden Fraktionen wurden vereint und auf ein schmales Volumen eingeeengt. Das Konzentrat wurde auf eine Säule aus «Amberlite» CG 50 -Harz (NH_4^+ -Form) gegeben und die Säule gut mit einem Gemisch von Wasser und Dioxan (1:1) gewaschen und anschliessend der Gradienten-Eluierung mit Wasser-Dioxan (1:1), welches 0 bis 0,1 N Ammoniumhydroxid enthielt, unterworfen. Die Eluatfraktionen, welche das gewünschte Produkt enthielten, wurden vereint und zur Trockene eingedampft, wobei 494 mg (61%) eines farblosen Feststoffes erhalten wurden, der identisch mit demjenigen aus Präparation 1 (3) (B) war.

Präparation 5

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A

500 mg (1,03 mMol) Kanamycin-A (freie Base) wurde in 20 ml eines Gemisches aus Wasser und Tetrahydrofuran (1:3) gelöst und anschliessend mit 1 g (4,5 mMol) Zinkacetatdihydrat versetzt, gefolgt von dem Zusatz von 590 mg (2,4 mMol) N-Benzyloxycarbonyloxysuccinimid. Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen und die erhaltene Reaktionslösung anschliessend unter vermindertem Druck reduziert. Der Rückstand wurde über eine Säule aus 200 ml Chitosan geleitet, und die aus der Säule ausfliessende Flüssigkeit anschliessend auf dieselbe Weise wie in Präparation 4 (2) behandelt, wobei 414 mg (51%) der Titelverbindung als farbloser Feststoff gewonnen wurden.

Präparation 6

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A

500 mg (1,03 mMol) Kanamycin-A (freie Base) wurden in 15 ml eines Gemisches von Wasser und Methanol (1:7) gelöst und diese Lösung sodann mit 1,5 g (6,8 mMol) Zinkacetatdi-

hydrat zugesetzt, gefolgt von der Zugabe von 590 mg (2,4 mMol) N-Benzylloxycarbonyloxysuccinimid in 7 ml Tetrahydrofuran. Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen, und die derart erhaltene Reaktionslösung wurde sodann unter vermindertem Druck eingengt. Der Rückstand wurde über eine Säule aus 200 ml Chitosan geleitet, und die aus der Säule austretende Flüssigkeit anschliessend auf dieselbe Weise wie in Präparation 4 (2) behandelt, wobei 442 mg (55%) der Titelverbindung als farbloser Feststoff erhalten wurden.

Präparation 7

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzylloxycarbonyl-Kanamycin-A

500 mg (1,03 mMol) Kanamycin-A (freie Base) wurden in 20 ml Dimethylsulfoxid suspendiert und 272 mg (1,24 mMol) Zinkacetatdihydrat dieser Suspension zugesetzt. Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur während 10 Stunden gerührt, wobei eine praktisch durchsichtige Lösung entstand, zu welcher sodann in kleinen Portionen im Laufe von etwa 2 Stunden 540 mg (2,17 mMol) N-Benzylloxycarbonyloxysuccinimid zugesetzt wurden. Nachdem das erhaltene Gemisch bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen worden war, wurde eine grosse Menge Äthyläther zugesetzt, und das abgeschiedene ölige Material abgezogen und mehrmals mit Äthyläther gewaschen, wobei ein dickes sirupartiges Material erhalten wurde.

Die Dünnschichtchromatographie auf Silicagel mit einer Probe dieses sirupartigen Materials unter Verwendung von Chloroform-Methanol- 28%iges wässriges Ammoniumhydroxid (Volumenverhältnis 1:1:1, untere Phase) als Entwicklungslösungsmittel ergab folgende Flecken:

- Kleiner Fleck bei R_f 0,4 von 1,3,6',3''-Tetra-N-benzylloxycarbonyl-Kanamycin-A (welches beim Besprühen mit Schwefelsäure und anschliessendem Erwärmen eine Farbreaktion entwickelte);
- schwacher Fleck bei R_f 0,28;
- Hauptfleck bei R_f 0,23 des gewünschten Produktes, 3,6'-Di-N-benzylloxycarbonyl-Kanamycin-A;
- kleiner Fleck bei R_f 0,12 von 6'-N-Benzylloxycarbonyl-Kanamycin-A; und
- äusserst schwacher Fleck bei R_f 0 von nicht-umgesetztem Kanamycin-A.

Es wurde kein Fleck entsprechend Tri-N-benzylloxycarbonyl-Kanamycin-A beobachtet, welcher bei R_f 0,28 bis 0,4 hätte auftreten können.

Das obige dicke sirupartige Material wurde in Wasser-Dioxan (1:1) gelöst und die Lösung wurde über eine Säule aus 100 ml «CM-Sephadex» C-25 -Harz (NH_4^+ -Form) geleitet, welches zuvor mit Wasser-Dioxan (1:1) benetzt worden war. Anschliessend wurde die Säule der Eluierung wie in Präparation 1 (3) (I) beschrieben unterworfen, wodurch die Zinkkationen entfernt wurden, und das gewünschte Produkt von den anderen Produkten getrennt wurde, um 412 mg (51%) der Titelverbindung als farblosen Feststoff zu ergeben.

Zum Vergleich wurde das soeben beschriebene Verfahren wiederholt, jedoch das Zinkacetatdihydrat durch 308 mg (1,24 mMol) Nickel-(II)-Acetatdihydrat ersetzt, mit dem Resultat, dass das gewünschte 3,6'-Di-N-benzylloxycarbonyl-Kanamycin-A als farbloser Feststoff nur in der schwachen Ausbeute von 59 mg (7,3%) erhalten wurde.

Präparation 8

Herstellung von 3,6'-Di-N-(p-methoxybenzylloxycarbonyl)-Kanamycin-A

500 mg (1,03 mMol) Kanamycin-A (freie Base) wurden in 12 ml Dimethylsulfoxid suspendiert und 1 g (4,55 mMol) Zinkacetatdihydrat wurde zu der Suspension zugesetzt. Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur gerührt, bis eine ho-

mogene Lösung entstanden war, zu welcher sodann im Laufe von etwa 30 Minuten eine Lösung von 789 mg (2,6 mMol) p-Methoxycarbonylbenzoyl-p-nitrophenylester ($\text{p-CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{OCOOC}_6\text{H}_4\text{-NO}_2$) gelöst in 10 ml Dimethylsulfoxid zugesetzt wurde. Das erhaltene Gemisch wurde über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschliessend auf dieselbe Weise behandelt, wie in Präparation 1 (2) und (3) (B) beschrieben, wobei 722 mg (83%) der Titelverbindung als farbloser Feststoff erhalten wurden. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 87^\circ$ (c=1, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Elementaranalyse:

berechnet für: $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_4\text{O}_{17} \cdot 1/2 \text{H}_2\text{CO}_3$:

gefunden: C 51,95, H 6,33, N 6,64%
C 51,56, H 6,41, N 6,53%.

Präparation 9

Herstellung von 6'-N-(t-Butoxycarbonyl)-Kanamycin-A

Nach demselben Verfahren wie in Präparation 8 beschrieben, mit dem einzigen Unterschied, dass der p-Methoxycarbonylbenzoyl-p-nitrophenylester durch 220 mg (1,54 mMol) t-Butoxycarbonylazid ersetzt wurde, wurde die Titelverbindung in Form eines farblosen Feststoffes erhalten. Ausbeute:

627 mg. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +96^\circ$ (c=1, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Präparation 10

Herstellung von 3,6'-Di-N-trifluoracetyl-Kanamycin-A

500 mg (1,03 mMol) Kanamycin-A (freie Base) wurden in 12 ml Dimethylsulfoxid suspendiert, und 1 g (4,55 mMol) Zinkacetatdihydrat wurde der Suspension zugesetzt. Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur gerührt, bis eine homogene Lösung erhalten worden war, zu welcher eine Lösung von 1,2 g (5,1 mMol) p-Nitrophenolester der Trifluoressigsäure, gelöst in 10 ml Dimethylsulfoxid, zugesetzt wurde. Das erhaltene Gemisch wurde bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen und anschliessend mit Äthyläther behandelt, wie in Präparation 1 (2) beschrieben. Das in Äther unlösliche sirupartige Material wurde weiter wie Präparation 1 (3) (A) behandelt, um 590 mg (70%) der Titelverbindung in Form eines farblosen Feststoffes zu ergeben. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +81^\circ$ (c=1, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Elementaranalyse:

berechnet für: $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_{13}\text{F}_6 \cdot 2\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} \cdot \text{H}_2\text{O}$:

gefunden: C 38,33, H 5,44, N 6,88, F 13,99%
C 38,03, H 5,48, N 6,54%.

Präparation 11

Herstellung von 3,6'-Di-N-phenoxybenzylloxycarbonyl-Kanamycin-A

500 mg (1,03 mMol) Kanamycin-A (freie Base) wurden in einem Gemisch von Dimethylsulfoxid (15 ml) und Tetrahydrofuran (5 ml) suspendiert, und 1 g (4,55 mMol) Zinkacetatdihydrat wurde zu der Suspension zugesetzt, worauf das Gemisch bei Zimmertemperatur gerührt wurde, bis es eine homogene Lösung gebildet hatte. Die erhaltene Lösung wurde sodann auf 0 °C gekühlt und anschliessend langsam mit einer gekühlten Lösung (auf 0 °C) von 400 mg (2,55 mMol) Phenoxybenzylchlorid ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OCOCl}$) in 3 ml Tetrahydrofuran versetzt. Die Reaktionslösung wurde im Laufe 1 Stunde auf Zimmertemperatur gebracht und anschliessend bei dieser Temperatur während 3 Stunden stehen gelassen. Das Reak-

tionsgemisch wurde sodann mit Äthyläther behandelt, wie in Präparation 1 (2) beschrieben, und das in Äther unlösliche sirupartige Material wurde nach demselben Verfahren, wie in Präparation 1 (3) (A) beschrieben weiterbehandelt, wobei 625 mg (70%) der Titelverbindung als farbloser Feststoff erhalten wurden. $[\alpha]_D^{25} = +73^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Elementaranalyse:

berechnet für: $C_{32}H_{44}N_4O_{15} \cdot 2CH_3CO_2H \cdot H_2O$:
C 50,11, H 6,31, N 6,49%
gefunden: C 49,77, H 6,60, N 6,11%.

Präparation 12

Herstellung von 3,6'-Di-N-acetyl-Kanamycin-A

Das Reaktionsgemisch, welches nach demselben Verfahren in Präparation 8 erhalten worden war, mit Ausnahme, dass 260 mg (2,6 mMol) Essigsäureanhydrid anstelle des p-Methoxycarbobenzyloxy-p-nitrophenylesters verwendet wurden, wurde auf dieselbe Weise wie in Präparation 1 (3) (A) beschrieben behandelt. Auf diese Weise wurden 525 mg (72%) der Titelverbindung als farbloser Feststoff erhalten.

$[\alpha]_D^{25} = +93^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Analyse:

berechnet für: $C_{22}H_{40}N_4O_{13} \cdot 2CH_3CO_2H \cdot H_2O$:
C 44,19, H 7,13, N 7,93%
gefunden: C 44,20, H 7,07, N 7,85%.

Präparation 13

Herstellung von 3,6'-Di-N-formyl-Kanamycin-A

500 mg (1,03 mMol) Kanamycin-A (freie Base) wurden in 12 ml Dimethylsulfoxid suspendiert, und 1 g (4,55 mMol) Zinkacetatdihydrat wurde zu der Suspension zugesetzt. Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur gerührt, bis eine homogene Lösung vorlag, zu welcher sodann 690 mg (4,12 mMol) p-Nitrophenylformiat ($OHCO_6H_4-p-NO_2$) zugesetzt wurden. Das erhaltene Gemisch wurde über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschliessend auf dieselbe Weise behandelt, wie in Präparation 1 (3) (H) beschrieben. Die auf Ninhydrin positiv reagierenden Fraktionen wurden vereint, mit gasförmigem Kohlenstoffdioxid durchtaut und anschliessend zur Trockene eingedampft. Auf diese Weise wurden 430 mg (67%) der Titelverbindung als farbloser Feststoff erhalten. $[\alpha]_D^{25} = +101^\circ$ ($c=1$, Wasser).

Analyse:

berechnet für: $C_{20}H_{36}N_4O_{13} \cdot H_2CO_3 \cdot H_2O$:
C 40,64, H 6,50, N 9,03%
gefunden: C 40,43, H 6,47, N 8,83%.

Präparation 14

Herstellung von 3,6'-Di-N-tosyl-Kanamycin-A

500 mg (1,03 mMol) Kanamycin-A (freie Base) wurden in 15 ml Dimethylsulfoxid suspendiert und 1 g (4,55 mMol) Zinkacetatdihydrat wurde zu der Suspension zugesetzt. Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur gerührt, bis es eine homogene Lösung gebildet hatte, zu welcher sodann langsam eine Lösung von 400 mg (2,1 mMol) Tosylchlorid in 7 ml Tetrahydrofuran zugesetzt wurde. Das erhaltene Gemisch wurde bei Zimmertemperatur während 1 Stunde stehen gelassen, worauf weitere 200 mg Tosylchlorid, gelöst in 3,5 ml Te-

tetrahydrofuran, zugesetzt wurden. Das Reaktionsgemisch wurde während weiteren 2 Stunden stehen gelassen und anschliessend nach demselben Verfahren, wie in Beispiel 1 (2) und (3) (A) beschrieben, weiterbehandelt, wobei 270 mg (28%) der Titelverbindung als farbloser Feststoff erhalten wurden. $[\alpha]_D^{25} = +68^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

10 Analyse:

berechnet für: $C_{32}H_{48}N_4O_{15}S_2 \cdot 2CH_3CO_2H \cdot H_2O$:
C 46,44, H 6,28, N 6,02, S 6,89%
gefunden: C 46,31, H 5,98, N 6,31, S 6,55%.

15 Bei der Wiederholung des obigen Verfahrens unter Weglassen des Zinkacetates wurden keine wesentlichen Mengen an farblosem Feststoff gewonnen.

Präparation 15

20 Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-6'-N-methyl-Kanamycin-A

500 mg (1,0 mMol) 6'-N-Methyl-Kanamycin-A (freie Base) wurden in 12 ml Dimethylsulfoxid suspendiert und mit 1 g (4,55 mMol) Zinkacetatdihydrat versetzt. Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur gerührt, bis eine homogene Lösung vorlag, zu welcher sodann im Laufe von 30 Minuten eine Lösung von 550 mg (2,2 mMol) N-Benzyloxycarbonyloxysuccinimid, gelöst in 5 ml Dimethylsulfoxid-Tetrahydrofuran (1:1) zugesetzt wurde. Das erhaltene Gemisch wurde bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen und anschliessend auf dieselbe Weise behandelt, wie in Präparation 1 (2) und (3) (A) beschrieben, wobei 720 mg (79%) der Titelverbindung als farbloser Feststoff erhalten wurden. $[\alpha]_D^{25} = +74^\circ$ ($c=1$, Wasser - Dimethylformamid, 1:2).

Die anschliessende Behandlung der Titelverbindung nach einem ähnlichen Verfahren wie in Präparation 31 weiter unten beschrieben, ergab 1-N-(S)-4-Amino-2-hydroxybutyryl)-6'-N-methyl-Kanamycin-A.

Präparation 16

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3'-deoxy-Kanamycin-A

Die Titelverbindung wurde in Form eines farblosen Feststoffes in einer Ausbeute von 765 mg (82%) erhalten durch Wiederholung des Verfahrens nach Präparation 15, jedoch unter Verwendung von 500 mg (1,07 mMol) 3'-Deoxy-Kanamycin-A (freie Base) als Ausgangsmaterial und 610 mg (2,45 mMol) N-Benzyloxycarbonyloxysuccinimid. $[\alpha]_D^{25} = +76^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Analyse:

berechnet für: $C_{34}H_{48}N_4O_{14} \cdot 2CH_3CO_2H \cdot H_2O$:
C 52,16, H 6,68, N 6,40%
gefunden: C 51,99, H 6,75, N 6,20%.

Die anschliessende Behandlung der Titelverbindung nach einem ähnlichen Verfahren wie in Präparation 31 weiter unten beschrieben, ergab 1-N-(S)-4-Amino-2-hydroxybutyryl)-3'-deoxy-Kanamycin-A.

Präparation 17

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3'-deoxy-6'-N-methyl-Kanamycin-A

Die Titelverbindung wurde in einer Ausbeute von 737 mg (80%) erhalten durch Wiederholen des Verfahrens nach Präparation 15 mit 500 mg (1,04 mMol) 3'-Deoxy-6'-N-methyl-

Kanamycin-A (freie Base) als Ausgangsverbindung und 595 mg (2,4 mMol) N-Benzylloxycarbonyloxysuccinimid.

$[\alpha]_D^{25} = +73^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Die anschliessende Behandlung der Titelverbindung nach einem ähnlichen Verfahren wie in Präparation 31 weiter unten beschrieben, ergab 1-N-((S)-4-Amino-2-hydroxybutyryl)-3'-deoxy-6'-N-methyl-Kanamycin-A.

Präparation 18

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzylloxycarbonyl-4'-deoxy-Kanamycin-A

Ausgehend von 500 mg (1,07 mMol) 4'-Deoxy-Kanamycin-A als freie Base [siehe «Journal of Antibiotics», Vol. 27, Seiten 838–847 (1974); «Bulletin of the Chemical Society of Japan», Vol. 50, Seiten 2362–1268 (1977)], wurde die Titelverbindung in Form eines farblosen Feststoffes in einer Ausbeute von 666 mg (71%) nach demselben Verfahren wie in Präparation 15 erhalten, mit Ausnahme, dass 580 mg (2,3 mMol) N-Benzylloxycarbonyloxysuccinimid gelöst in 4 ml Dimethylsulfoxid langsam im Laufe von 1 Stunde zur homogenen Lösung zugesetzt wurden. $[\alpha]_D^{25} = +77^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Analyse:

berechnet für: $C_{34}H_{48}N_4O_{18} \cdot 2CH_3CO_2H \cdot H_2O$:

C 52,16, H 6,68, N 6,40%

gefunden: C 51,77, H 6,79, N 6,31%.

Präparation 19

Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-benzylloxycarbonyl-Kanamycin-B

500 mg (1,03 mMol) Kanamycin-B (freie Base) wurden in einem Gemisch von 12 ml Dimethylsulfoxid und 4 ml Tetrahydrofuran suspendiert, und 1 g (4,55 mMol) Zinkacetatdihydrat wurde der Suspension zugesetzt. Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur gerührt, bis eine homogene Lösung vorlag und anschliessend auf 0 °C gekühlt. Zu der gekühlten Lösung wurde langsam im Laufe 1 Stunde eine kalte Lösung von 825 mg (3,3 mMol) N-Benzylloxycarbonyloxysuccinimid gelöst in 10 ml Tetrahydrofuran-Dimethylsulfoxid (1:1) zugesetzt. Das erhaltene Gemisch wurde bei 0 °C während 2 Stunden stehen gelassen und anschliessend bei Zimmertemperatur über Nacht, worauf das Gemisch auf dieselbe Weise wie in Präparation 1 (2) und (3) (A) beschrieben behandelt wurde, um 740 mg (70%) der Titelverbindung als farblosen Feststoff zu ergeben. $[\alpha]_D^{25} = +63^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Analyse:

berechnet für: $C_{42}H_{55}N_5O_{16} \cdot 2CH_3CO_2J \cdot J_2O$:

C 53,95, H 6,40, N 6,84%

gefunden: C 53,66, H 6,67, N 6,63%.

Die anschliessende Behandlung der Titelverbindung nach einem ähnlichen Verfahren wie in Präparation 31 beschrieben, ergab 1-N-((S)-4-Amino-2-hydroxybutyryl)-Kanamycin-B.

Präparation 20

Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-benzylloxycarbonyl-Tobramycin

480 mg (1,03 mMol) Tobramycin (freie Base) wurden in 12 ml Dimethylsulfoxid suspendiert, und 1 g (4,55 mMol) Zinkacetatdihydrat zu der Suspension zugesetzt. Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur während 1 Stunde gerührt, um eine homogene Lösung zu bilden, zu welcher so-

dann im Laufe von etwa 1 Stunde eine Lösung von 850 mg (3,4 mMol) N-Benzylloxycarbonyloxysuccinimid gelöst in 10 ml Tetrahydrofuran-Dimethylsulfoxid (1:1) zugesetzt wurde. Das Gemisch wurde über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen, worauf die erhaltene Reaktionslösung mit einem grossen Volumen Äthyläther, wie in Präparation 1 (2) beschrieben behandelt wurde, um ein dickes sirupartiges Material zu ergeben.

Das sirupartige Material wurde in derselben Weise wie in Präparation 1 (3) (A) weiter behandelt, jedoch unter Verwendung von Wasser-Dioxan (1:2 anstelle von 2:1), wobei 810 mg (78%) der Titelverbindung als farbloser Feststoff erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +65^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid 1:2).

Analyse:

berechnet für: $C_{42}H_{55}N_5O_{15} \cdot 2CH_3CO_2H \cdot H_2O$:

C 54,81, H 6,50, N 6,95%

gefunden: C 54,77, H 6,71, N 6,88%.

Die anschliessende Behandlung der Titelverbindung nach einem ähnlichen Verfahren wie beschrieben, ergab 1-N-((S)-4-Amino-2-hydroxybutyryl)-Tobramycin.

Präparation 21

Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-benzylloxycarbonyl-6'-N-methyl-Tobramycin

Die Titelverbindung wurde in Form eines farblosen Feststoffes in einer Ausbeute von 890 mg (84%) erhalten durch Wiederholung des Verfahrens von Präparation 20, jedoch ausgehend von 500 mg (1,04 mMol) 6'-N-Methyl-Tobramycin (freie Base). $[\alpha]_D^{25} = +63^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Präparation 22

Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-benzylloxycarbonyl-4'-deoxy-Kanamycin-B

Ausgehend von 480 mg (1,03 mMol) 4'-Deoxy-Kanamycin-B als freie Base [siehe «Bulletin of the Chemical Society of Japan» Vol. 50, Seiten 2362–2368 (1977)], wurde die Titelverbindung in Form eines farblosen Feststoffes in einer Ausbeute von 815 mg (79%) nach demselben Verfahren wie in Beispiel 20 beschrieben erhalten. $[\alpha]_D^{25} = +65^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Präparation 23

Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-benzylloxycarbonyl-Dibekacin

600 mg (1,33 mMol) Dibekacin (3',4'-Dideoxy-Kanamycin-B) (freie Base) wurden in 15 ml Dimethylsulfoxid suspendiert, und die Suspension wurde gerührt zur Bildung einer Lösung, zu welcher 1,4 g (6,4 mMol) Zinkacetatdihydrat zugesetzt wurde, worauf das Gemisch weiter gerührt wurde. Zu der erhaltenen Lösung wurde langsam im Laufe von etwa 1 Stunde eine Lösung von 1,1 g (4,4 mMol) N-Benzylloxycarbonyloxysuccinimid in 12 ml Dimethylsulfoxid zugesetzt und das Gemisch bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen. Anschliessend wurde ein grosses Volumen Äthyläther mit der Reaktionslösung gemischt, um einen öligen Niederschlag auszuscheiden (welcher hauptsächlich den N-benzylloxycarbonylierten Dibekacin-Zinkkomplex als das gewünschte Produkt und einen gewissen Anteil Dimethylsulfoxid enthielt), welcher mit Äthyläther gewaschen wurde, wobei ein dickes sirupartiges Material erhalten wurde.

Dieses sirupartige Material wurde wiederholt mit Wasser gewaschen, wodurch der N-acylierte Zinkkomplex mit Was-

ser zerstört wurde und die freien Zinkkationen zusammen mit dem ursprünglich bestehenden Überschuss an Zinkacetat entfernt wurde. Auf diese Weise wurden 1,1 g eines in Wasser unlöslichen Feststoffes erhalten, welcher das N-acylierte Dibekacin enthielt. Der Feststoff wurde einer Dünnschichtchromatographie aus Silicagel unterworfen unter Verwendung von Chloroform-Äthanol- 18%igem wässrigem Ammoniumhydroxid (1:1:1, untere Phase) als Entwicklungslösungsmittel, wobei ein einziger Fleck bei R_f 0,3 erhalten wurde, was anzeigte, dass der Feststoff im wesentlichen aus 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-Dibekacin mit einer Spur von Zink bestand.

Die anschließende Behandlung der Titelverbindung nach einem ähnlichen Verfahren wie dem in Präparation 31 beschriebenen, ergab 1-N-((S)-4-Amino-2-hydroxybutyryl)-Dibekacin.

Zur weiteren Reinigung wurde das rohe Produkt der Titelverbindung, wie es oben erhalten wurde, mit 3M-Ammoniumhydroxidlösung gewaschen, um ein Produkt ohne Verunreinigung mit Zinkionen zu ergeben. $[\alpha]_D^{25} = +71^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Präparation 24

Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-6'-N-methyl-Dibekacin

500 mg (1,07 mMol) 6'-N-Methyl-Dibekacin (freie Base) und 1,2 g (5,45 mMol) Zinkacetatdihydrat wurden in 20 ml Dimethylsulfoxid gelöst, wonach der Lösung langsam im Laufe von etwa 30 Minuten 910 mg (3,6 mMol) N-Benzyloxycarbonyloxysuccinimid zugesetzt wurden. Die Reaktionslösung wurde bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen und anschliessend in derselben Weise, wie in Präparation 23 beschrieben, behandelt, wobei 910 mg der Titelverbindung erhalten wurden, welche praktisch rein war.

Die anschließende Behandlung der Titelverbindung nach einem ähnlichen Verfahren wie in Präparation 31 beschrieben, ergab 1-N-((S)-4-Amino-2-hydroxybutyryl) 6'-N-Methyl-Dibekacin.

Präparation 25

Herstellung von 3,2'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-C

Die Titelverbindung wurde in Form eines gefärbten Feststoffes in einer Ausbeute von 730 mg (79%) nach demselben Verfahren wie in Präparation 1(1) (2) und (3) (A) beschrieben, erhalten, wobei von 500 mg (1,03 mMol) Kanamycin-C (freie Base) ausgegangen wurde. $[\alpha]_D^{25} = +75^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Die anschließende Behandlung der Titelverbindung nach einem ähnlichen Verfahren wie dem in Präparation 31 beschriebenen, ergab 1-N-((S)-4-Amino-2-hydroxybutyryl)-Kanamycin-C.

Präparation 26

Herstellung von 6'-N-Benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A

500 mg (1,03 mMol) Kanamycin-A (freie Base) wurden in 20 ml Dimethylsulfoxid suspendiert und 0,5 g (2,3 mMol) Zinkacetatdihydrat zu der Suspension zugesetzt. Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur gerührt, bis eine homogene Lösung entstanden war, zu welcher sodann 283 mg (1,13 mMol) N-Benzyloxycarbonyloxysuccinimid zugesetzt wurden. Das erhaltene Gemisch wurde über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschliessend auf dieselbe Weise wie in Präparation 1 (2) und (3) (I) beschrieben, behandelt, um 556 mg der Titelverbindung als farblosen Feststoff zu erhalten. $[\alpha]_D^{25} = +92^\circ$ ($c=1$, Wasser).

Präparation 27

Herstellung von 6'-N-Benzyloxycarbonyl-Dibekacin

Nach dem Verfahren von Präparation 26 wurden 382 mg der Titelverbindung erhalten unter Verwendung von 500 mg 5 Dibekacin (freie Base), 12 ml Dimethylsulfoxid, 0,7 g Zinkacetatdihydrat und 305 mg N-Benzyloxycarbonyloxysuccinimid. $[\alpha]_D^{25} = +105^\circ$ ($c=0,5$, Wasser).

Präparation 28

Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-3',4'-dideoxy-3'-eno-Kanamycin-B

500 mg (1,11 mMol) 3',4'-Dideoxy-3'-eno-Kanamycin-B als freie Base [siehe «Bulletin of the Chemical Society of Japan», Vol. 50, Seiten 1580 bis 1583 (1977)] wurden in 12 ml 15 Dimethylsulfoxid gelöst und 1 g (4,55 mMol) Zinkacetatdihydrat zu der Lösung zugesetzt, worauf das Gemisch während 1 Stunde gerührt wurde. Zur erhaltenen Lösung wurden langsam im Laufe von 30 Minuten 870 mg (3,49 mMol) N-20 Benzyloxycarbonyloxysuccinimid zugesetzt. Nachdem das Gemisch bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen worden war, wurde die erhaltene Reaktionslösung mit einem grossen Volumen Äthyläther behandelt, wie in Präparation 1 (2) beschrieben, um ein dickes sirupartiges Material zu erhalten.

Das sirupartige Material wurde in derselben Weise, wie in Präparation 1 (3) (B) weiterbehandelt, jedoch unter Verwendung von Wasser-Dioxan (1:2 anstelle von 2:1), wobei 784 mg der Titelverbindung als farbloser Feststoff erhalten

30 wurde. $[\alpha]_D^{25} = +30^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Präparation 29

Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-Sisomicin

Die Titelverbindung wurde in Form eines farblosen Feststoffes in einer Ausbeute von 780 mg erhalten nach demselben Verfahren wie in Präparation 28 beschrieben, jedoch ausgehend von 500 mg (1,12 mMol) Sisomicin (freie Base).

40 $[\alpha]_D^{25} = +110^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Präparation 30

Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-Gentamicinen

787 mg der Titelverbindung wurde in Form eines farblosen Feststoffes erhalten nach demselben Verfahren wie in Präparation 28 beschrieben, jedoch ausgehend von 500 mg gemischten Gentamicinen (C, C_{1a}, C₂ etc).

Präparation 31 (als Referenz)

Herstellung von 1-N-((S)-4-Amino-2-hydroxybutyryl)-Kanamycin-A (Amikacin)

55 mg (0,062 mMol) 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A-Acetat, hergestellt wie in Präparation 1 beschrieben, wurden in 1,5 ml Wasser-Tetrahydrofuran (2:5) gelöst und die Lösung mit 13 mg (0,12 mMol) wasserfreiem Natriumcarbonat und anschliessend mit 23 mg (0,066 mMol) N-Hydroxysuccinimidester von (S)-4-Benzyloxycarbonylamino-60 2-hydroxybuttersäure versetzt. Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur während 10 Stunden stehen gelassen. Die erhaltene Reaktionslösung wurde auf ein kleines Volumen konzentriert, und das Konzentrat wurde in 4 ml Wasser-Dioxan (1:1) aufgenommen. Eine kleine Menge Essigsäure wurde zu 65 der Lösung zugesetzt, um sie schwach sauer zu gestalten und diese Lösung wurde sodann der Hydrogenolyse unterworfen, indem Wasserstoffgas unter atmosphärischem Druck während 1 Stunde in Gegenwart von Palladiumschwarz hindurch-

geleitet wurde (zur Entfernung der Benzyloxycarbonylgruppe). Die erhaltene Reaktionslösung wurde filtriert und konzentriert, und das Konzentrat wurde durch eine Säule von «CM-Sephadex» C-25 (NH_4^+ -Form) [ein Produkt der Pharmacia Fine Chemical Co., Schweden] geleitet. Die Säule wurde der Gradienten-Eluierung mit 0 bis 0,5 N wässrigem Ammoniumhydroxid unterworfen. Die Eluatfraktionen, welche das gewünschte Produkt enthielten, wurden vereint und zur Trockene eingedampft, wobei 24 mg (Ausbeute: 60%) der Titelverbindung als ihr Monocarbonat erhalten wurde, deren physikalische Eigenschaften und antibakterielle Wirksamkeit identisch waren mit denjenigen einer authentischen Probe.

Präparation 32 (als Referenz)

Herstellung von 1-N-(DL-Isoseryl)-Dibekacin

58 mg (0,06 mMol) 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-Dibekacin, hergestellt wie in Präparation 23, wurden in 1,5 ml Wasser-Tetrahydrofuran (2:5) gelöst, und dieser Lösung wurden 13 mg (0,12 mMol) wasserfreies Natriumcarbonat und anschliessend 21 mg (0,063 mMol) N-Hydroxysuccinimid-ester von N-Benzyloxycarbonyl-DL-Isoserin zugesetzt. Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschliessend nach dem Verfahren behandelt, wie in Präparation 31 beschrieben, wobei 21 mg (Ausbeute: 59%) der Titelverbindung als Monocarbonat erhalten wurde, deren physikalische Eigenschaften und antibakterielle Wirksamkeit identisch waren mit denjenigen einer authentischen Probe.

Beispiel 1

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-trifluoracetyl-Kanamycin-A

Eine Lösung von 504 mg 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A (siehe Präparation 1) in 4 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 220 mg Äthyltrifluoracetat vermischt und das erhaltene Gemisch über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dem Reaktionsgemisch wurde sodann eine kleine Menge Trifluoressigsäure zugesetzt und die Reaktionslösung sodann in ein grosses Volumen Äthyläther gegossen und die erhaltene ölige Ausscheidung mit Äthyläther gut gewaschen, um ein verfestigtes Material zu ergeben. Dieses Material wurde gut getrocknet und ergab 640 mg der Titelverbindung als feste Substanz. Ausbeute: 99%. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +98^\circ$ ($c = 1$, Pyridin).

Elementaranalyse:

berechnet für: $\text{C}_{36}\text{H}_{47}\text{N}_4\text{O}_{16}\text{F}_3 \cdot \text{CF}_3\text{COOH}$:

C 47,40, H 5,02, N 5,82%

gefunden: C 47,13, H 5,15, N 5,79%.

Beispiel 2

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-trifluoracetyl-Kanamycin-A

Eine Lösung von 20 mg 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A in 0,4 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 6 mg Phenyltrifluoracetat vermischt und das erhaltene Gemisch über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde sodann in derselben Weise wie in Beispiel 1 behandelt, wobei 24,8 mg der Titelverbindung erhalten wurden, welche sich als identisch mit denjenigen aus Beispiel 33 erwies. Ausbeute: 97%.

Beispiel 3

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-trifluoracetyl-Kanamycin-A

Eine Lösung von 10 mg 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A in 0,3 ml Hexamethylphosphorsäuretriamid wurde mit 7 mg Äthyltrifluoracetat vermischt und das erhal-

tene Gemisch über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Reaktionslösung wurde sodann mit einem kleinen Volumen Trifluoressigsäure versetzt und anschliessend in ein grosses Volumen Äthyläther gegossen. Das ausgeschiedene ölige Material wurde gut mit Äthyläther gewaschen und die erhaltene feste Substanz getrocknet, wobei 11,7 mg (Ausbeute: 91%) der Titelverbindung als Monotrifluoracetat in Form eines Feststoffes erhalten wurde.

Beispiel 4

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-trifluoracetyl-Kanamycin-A

Eine Suspension von 10 mg 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A in 0,3 ml Dimethylformamid wurde mit 7 mg Äthyltrifluoracetat versetzt und das erhaltene Gemisch über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die derart erhaltene homogene Reaktionslösung wurde mit einem kleinen Volumen Trifluoressigsäure versetzt und anschliessend in ein grosses Volumen Äthyläther gegossen. Das ausgeschiedene ölige Material wurde gut mit Äthyläther gewaschen, um es zu verfestigen, und die erhaltene feste Substanz wurde getrocknet, wobei 11,5 mg (Ausbeute: 90%) der Titelverbindung als Monotrifluoracetat in Form eines Feststoffes erhalten wurde.

Beispiel 5

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-trifluoracetyl-Kanamycin-A

Eine Suspension von 10 mg 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A in 0,35 ml Sulfolan wurde mit 7 mg Äthyltrifluoracetat versetzt und das Gemisch über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde sodann auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 verarbeitet, wobei 12,0 mg (Ausbeute: 94%) der Titelverbindung als Monotrifluoracetat in Form einer festen Substanz erhalten wurde.

Beispiel 6

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-trifluoracetyl-Kanamycin-A

Eine Suspension von 22 mg 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A in 0,8 ml Tetrahydrofuran wurde mit 10 mg Äthyltrifluoracetat versetzt und das Gemisch während 2 Tagen gerührt. Die erhaltene homogene Reaktionslösung wurde mit 15 mg Äthyltrifluoracetat und 8 mg wasserfreiem Natriumcarbonat versetzt, über Nacht gerührt und anschliessend während 2 Tagen stehen gelassen. Die erhaltene Reaktionslösung wurde auf ein kleines Volumen eingengt und das Konzentrat mit Wasser gewaschen und anschliessend getrocknet, wobei ein festes Material erhalten wurde. Das feste Material wurde in einem kleinen Volumen Tetrahydrofuran zusammen mit einer kleinen Menge Trifluoressigsäure suspendiert. Das derart erhaltene Gemisch wurde gerührt und anschliessend mit Äthyläther versetzt. Der ausgeschiedene Feststoff wurde abfiltriert, mit Äther gewaschen und getrocknet, wobei 21 mg (Ausbeute: 74%) der Titelverbindung als Monotrifluoracetat in Form einer festen Substanz erhalten wurde. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +95^\circ$ ($c = 1$, Pyridin).

Beispiel 7

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-trifluoracetyl-Kanamycin-A

Eine Lösung von 10 mg 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A in Wasser-Tetrahydrofuran (1:1, 0,3 ml) wurde mit einer Lösung von 5 mg Äthyltrifluoracetat in 0,1 ml Tetrahydrofuran vermischt und das erhaltene Gemisch bei Zimmertemperatur während 1 Tag stehen gelassen. Anschliessend wurde ein Gemisch von Äthyltrifluoracetat

(10 mg), wasserfreiem Natriumcarbonat (4,4 mg) und Tetrahydrofuran (0,1 ml) zur erhaltenen Lösung in 5 stündigem Intervall (im ganzen viermal) zugesetzt, um die 3''-N-Trifluoracetylierung zu bewirken. Die Reaktionslösung wurde konzentriert und anschliessend in derselben Weise behandelt, wie in Beispiel 38 beschrieben, wobei 5,5 mg (Ausbeute: 43%) der Titelverbindung als Monotrifluoracetat in Form einer festen Substanz erhalten wurde.

Beispiel 8

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-trifluoracetyl-Kanamycin-A

Eine Lösung von 10 mg 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A in Wasser-Äthanol (2:3, 0,6 ml) wurde mit einer Lösung von 5 mg Äthyltrifluoracetat in 0,1 ml Tetrahydrofuran versetzt und das Gemisch bei Zimmertemperatur während 1 Tag stehen gelassen. Die erhaltene Reaktionslösung wurde sodann in derselben Weise wie in Beispiel 3 beschrieben weiter verarbeitet, wobei 2,3 mg (Ausbeute: 18%) der Titelverbindung als Monotrifluoracetat in Form einer festen Substanz erhalten wurde.

Beispiel 9

Herstellung von 3,6'-Di-N-t-butoxycarbonyl-3''-N-trifluoracetyl-Kanamycin-A

(a) Herstellung von 3,6'-Di-N-t-butoxycarbonyl-Kanamycin-A

500 mg (1,03 mMol) Kanamycin-A (freie Base) wurden in 12 ml Dimethylsulfoxid suspendiert und 1 g (4,55 mMol) Zinkacetatdihydrat zu der erhaltenen Suspension zugesetzt. Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur gerührt, bis eine homogene Lösung vorlag, zu welcher sodann 370 mg (2,59 mMol) t-Butoxycarbonylazid zugesetzt wurden. Das erhaltene Gemisch wurde über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschliessend in derselben Weise wie in Präparation 1 (2) und (3) (B) beschrieben behandelt, wobei 590 mg (80%) der Titelverbindung als farbloser Feststoff erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +89^\circ$ (c = 1, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

(b) Herstellung von 3,6'-Di-N-t-butoxycarbonyl-3''-N-trifluoracetyl-Kanamycin-A

3,6'-Di-N-t-butoxycarbonyl-Kanamycin-A (60 mg) wurde in 0,5 ml Dimethylsulfoxid gelöst und die erhaltene Lösung wurde mit 25 mg Äthyltrifluoracetat versetzt, worauf das erhaltene Gemisch über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen wurde. Die Reaktionslösung wurde sodann auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 beschrieben weiterverarbeitet, wobei 76,8 mg (Ausbeute: 98%) der Titelverbindung als Trifluoracetat in Form eines Feststoffes erhalten wurde.

$[\alpha]_D^{25} = +72^\circ$ (c = 1, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Elementaranalyse:

berechnet für: $C_{30}H_{51}N_4O_{16}F_3 \cdot CF_3COOH$:

gefunden: C 42,95, H 5,86, N 6,26%
C 42,77, H 5,92, N 6,38%.

Beispiel 10

Herstellung von 3,6'-Di-N-(p-methoxybenzyloxycarbonyl)-3''-N-trifluoracetyl-Kanamycin-A

Eine Lösung von 40 mg 3,6'-Di-N-(p-methoxybenzyloxycarbonyl)-Kanamycin-A (siehe Präparation 8) in 0,4 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 18 mg Äthyltrifluoracetat versetzt und das Gemisch über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Reaktionslösung wurde sodann auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 beschrieben weiterverarbeitet, wobei 49,3 mg (Ausbeute: 98%) der Titelverbindung als feste Sub-

stanz erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +78^\circ$ (c = 1, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Elementaranalyse:

berechnet für: $C_{38}H_{51}N_4O_{18}F_3 \cdot CF_3COOH$:

gefunden: C 46,97, H 5,12, N 5,48%
C 47,18, H 5,03, N 5,31%.

Beispiel 11

Herstellung von 3,6',3''-Tri-N-trifluoracetyl-Kanamycin-A

75 mg 3,6'-Di-N-trifluoracetyl-Kanamycin-A (siehe Präparation 10) und 12 mg Triäthylamin wurden mit 0,6 ml Dimethylsulfoxid vermischt und dann mit 35 mg Äthyltrifluoracetat, und das Gemisch gerührt, um die gewünschte 3''-N-Trifluoracetylierung zu bewirken. Die Reaktionslösung wurde sodann auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 weiterverarbeitet, wobei 94,2 mg (Ausbeute: 96%) der Titelverbindung als feste Substanz erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +76^\circ$ (c = 1, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Elementaranalyse:

berechnet für: $C_{24}H_{33}N_4O_{14}F_9 \cdot CF_3COOH$:

gefunden: C 35,22, H 3,87, N 6,32%
C 35,09, H 3,99, N 6,07%.

Beispiel 12

Herstellung von 3,6'-Di-N-phenoxy-carbonyl-3''-t-trifluoracetyl-Kanamycin-A

Eine Lösung von 53 mg 3,6'-Di-N-phenoxy-carbonyl-Kanamycin-A (siehe Präparation 11) und 9 mg Trimethylamin in 0,5 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 23 mg Methyltrifluoracetat versetzt und das Gemisch sodann auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 beschrieben weiterverarbeitet, wobei 65 mg (Ausbeute: 95%) der Titelverbindung als festes Material erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +70^\circ$ (c = 1, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Elementaranalyse:

berechnet für: $C_{34}H_{43}N_4O_{16}F_3 \cdot CF_3COOH$:

gefunden: C 46,26, H 4,74, N 5,99%
C 45,88, H 4,96, N 5,77%.

Beispiel 13

Herstellung von 3,6',3''-Tri-N-formyl-Kanamycin-A

Ein Gemisch von 62 mg 3,6'-Di-N-formyl-Kanamycin-A (siehe Präparation 13), 90 mg Äthylformiat und 1 ml Dimethylsulfoxid wurde während 12 Stunden in einem versiegelten Rohr auf 100°C erhitzt, um die gewünschte 3''-N-Formylierung zu bewirken. Die erhaltene Reaktionslösung wurde mit einer kleinen Menge Ameisensäure versetzt, dann in ein grosses Volumen Äthyläther gegossen und in derselben Weise wie in Beispiel 1 beschrieben weiterverarbeitet, wobei 69 mg (Ausbeute: 98%) der Titelverbindung als festes Material erhalten wurde, welches auf Ninhydrin positiv reagierte. $[\alpha]_D^{25} = +109^\circ$ (c = 1, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Elementaranalyse:

berechnet für: $C_{21}H_{36}N_4O_{14} \cdot HCOOH$:

gefunden: C 43,00, H 6,23, N 9,12%
C 42,83, H 6,19, N 9,10%.

Beispiel 14

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-6'-N-methyl-3''-N-trifluoracetyl-Kanamycin-A

Ein Gemisch von 68 mg 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-6'-N-methyl-Kanamycin-A (siehe Präparation 15) und 11 mg Triäthylamin, 30 mg Äthyltrifluoracetat und 0,7 ml Methylsulfoxid wurde auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 beschrieben behandelt, wobei 86 mg (Ausbeute: 99%) der Titelverbindung als Monotrifluoracetat in Form einer festen Substanz erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +65^\circ$ (c=1, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Beispiel 15

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3'-deoxy-3''-N-trifluoracetyl-Kanamycin-A

Eine Lösung von 52 mg 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3'-deoxy-Kanamycin-A (siehe Präparation 16) und 11 mg Triäthylamin in 0,4 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 21 mg Äthyltrifluoracetat versetzt und das Gemisch über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Anschliessend wurde die Reaktionslösung auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 verarbeitet, wobei 64,8 mg (Ausbeute: 97%) der Titelverbindung als festes Material erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +70^\circ$ (c=1, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Elementaranalyse:

berechnet für: $C_{36}H_{47}N_4O_{15}F_3 \cdot CF_3COOH$:

C 48,21, H 5,11, N 5,92%

gefunden: C 47,94, H 5,35, N 5,77%.

Beispiel 16

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3'-deoxy-3''-N-formyl-Kanamycin-A

Eine Lösung von 78 mg 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3'-deoxy-Kanamycin-A in 0,7 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 65 mg Phenylformiat versetzt und das Gemisch über Nacht bei 50 °C zur 3''-N-Formylierung erhitzt.

Die Reaktionslösung wurde mit einer kleinen Menge Ameisensäure versetzt und auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 weiterverarbeitet, wobei 83 mg (Ausbeute: 97%) der Titelverbindung als Monoformiat in Form einer festen Substanz erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +84^\circ$ (c=1, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Beispiel 17

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-dichloracetyl-3'-deoxy-Kanamycin-A

Eine Lösung von 35 mg 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3'-deoxy-Kanamycin-A in 0,5 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 12 mg Methylchloracetat versetzt und das Gemisch über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Reaktionslösung wurde mit einem kleinen Volumen Dichloressigsäure versetzt und anschliessend auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 behandelt, wobei 44,5 mg (Ausbeute: 96%) der Titelverbindung als feste Substanz erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +65^\circ$ (c=1, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Elementaranalyse:

berechnet für: $C_{36}H_{48}N_4O_{15}Cl_2 \cdot CHCl_2COOH$:

C 46,73, H 5,16, N 5,74, Cl 14,52%

gefunden: C 46,58, H 5,33, N 5,62, Cl 14,28%.

Beispiel 18

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-trichloracetyl-3'-deoxy-Kanamycin-A

Eine Lösung von 58 mg 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3'-deoxy-Kanamycin-A in 0,7 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 25 mg Methyltrichloracetat versetzt und das Gemisch über

Nacht bei 50 °C stehen gelassen. Die Reaktionslösung wurde mit einem kleinen Volumen Trichloressigsäure versetzt und anschliessend auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 weiterverarbeitet, wobei 80,5 mg (Ausbeute: 98%) der Titelverbindung

als feste Substanz erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +65^\circ$ (c=1, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Elementaranalyse:

berechnet für: $C_{36}H_{47}N_4O_{15}Cl_3 \cdot CCl_3CO_2H$:

C 43,65, H 4,63, N 5,36, Cl 20,34%

gefunden: C 43,44, H 4,77, N 5,30, Cl 20,19%.

Beispiel 19

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3'-deoxy-3''-N-trifluoracetyl-6'-N-methyl-Kanamycin-A

Eine Lösung von 72 mg 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3'-deoxy-6'-N-methyl-Kanamycin-A in 1 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 30 mg Äthyltrifluoracetat versetzt und das Gemisch über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Reaktionslösung wurde sodann auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 weiterverarbeitet, wobei 89,5 mg (Ausbeute: 97%) der Titelverbindung als Monotrifluoracetat in Form einer festen Substanz erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +70^\circ$ (c=1, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Beispiel 20

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-4'-deoxy-3''-N-trifluoracetyl-Kanamycin-A

Eine Lösung von 71 mg 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-4'-deoxy-Kanamycin-A (siehe Präparation 18) 12 mg Triäthylamin und 30 mg Äthyltrifluoracetat in 1 ml Dimethylsulfoxid wurde auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 beschrieben, verarbeitet, wobei 90 mg (Ausbeute: 99%) der Titelverbindung als Monotrifluoracetat in Form einer festen Substanz erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +72^\circ$ (c=1, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Beispiel 21

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3',4'-dideoxy-3''-N-trifluoracetyl-Kanamycin-A

Eine Lösung von 75 mg 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3',4'-dideoxy-Kanamycin-A und 30 mg Äthyltrifluoracetat in 1 ml Dimethylsulfoxid wurde auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 beschrieben, behandelt, wobei 96 mg (Ausbeute: 99%) der Titelverbindung als feste Substanz erhalten wurde.

$[\alpha]_D^{25} = +72^\circ$ (c=1, Wasser-Dimethylsulfoxid, 1:2).

Elementaranalyse:

berechnet für: $C_{36}H_{47}N_4O_{14}F_3 \cdot CF_3COOH$:

C 49,03, H 5,20, N 6,02%

gefunden: C 48,83, H 5,46, N 5,87%.

Beispiel 22

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3',4'-dideoxy-3''-N-formyl-Kanamycin-A

75 mg 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3',4'-dideoxy-Kanamycin-A und 65 mg Phenylformiat wurden in 1 ml Dimethylsulfoxid gelöst und die erhaltene Lösung auf dieselbe Weise wie in Beispiel 16 beschrieben, verarbeitet, wobei 80 mg (Ausbeute: 97%) der Titelverbindung als Monoformiat in Form einer festen Substanz erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +80^\circ$ (c=1, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Beispiel 23

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3',4'-dideoxy-3''-N-dichloracetyl-Kanamycin-A

Eine Lösung von 68 mg 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3',4'-dideoxy-Kanamycin-A in 0,9 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 25 mg Methylchloracetat versetzt und das Gemisch über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Reaktionslösung wurde mit einer kleinen Menge Dichlorsäure versetzt und anschliessend in derselben Weise wie in Beispiel 1 weiter verarbeitet, wobei 88 mg (Ausbeute: 97%) der Titelverbindung als Monodichloracetat in Form einer festen Substanz erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +67^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Beispiel 24

Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-trifluoracetyl-Kanamycin-B

Eine Lösung von 78 mg 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-B (siehe Präparation 19) und 11 mg Triäthylamin in 1 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 35 mg Äthyltrifluoracetat vermischt und das Gemisch auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 weiter verarbeitet, wobei 92 mg (Ausbeute: 95%) der Titelverbindung als Monotrifluoracetat in Form einer festen Substanz erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +60^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Beispiel 25

Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-formyl-Tobramycin

Eine Lösung von 82 mg 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-Tobramycin (siehe Präparation 20) und 12 mg Triäthylamin in 1,2 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 60 mg Phenylformiat versetzt und das Gemisch auf dieselbe Weise wie in Beispiel 16 weiter verarbeitet, wobei 86 mg (Ausbeute: 97%) der Titelverbindung als feste Substanz erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +71^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Elementaranalyse:

berechnet für: $C_{43}H_{55}N_5O_{16} \cdot HCOOH$:

gefunden: C 55,98, H 6,09, N 7,42%
C 55,50, H 6,22, N 7,28%.

Beispiel 26

Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-6'-N-methyl-3''-N-trifluoracetyl-Tobramycin

Eine Lösung von 80 mg 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-6'-N-methyl-Tobramycin (siehe Präparation 21) und 12 mg Triäthylamin in 1,2 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 30 mg Äthyltrifluoracetat vermischt und das Gemisch sodann in derselben Weise wie in Beispiel 1 weiter verarbeitet, wobei 97 mg (Ausbeute: 98%) der Titelverbindung als Monotrifluoracetat in Form einer festen Substanz erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +60^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Beispiel 27

Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-trifluoracetyl-Dibekacin

Eine Lösung von 82 mg 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-Dibekacin (siehe Präparation 23) in 1 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 30 mg Äthyltrifluoracetat vermischt und das Gemisch in derselben Weise wie in Beispiel 1 beschrieben verarbeitet, wobei 100 mg (Ausbeute: 98%) der Titelverbindung

als feste Substanz erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +61^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

5 Elementaranalyse:

berechnet für: $C_{44}H_{54}N_5O_{15}F_3 \cdot CF_3COOH$:

gefunden: C 51,93, H 5,21, N 6,58%
C 51,84, H 5,38, N 6,47%.

Beispiel 28

Herstellung von 3,2',6',3''-Tetra-N-trifluoracetyl-Dibekacin

Ein Gemisch von 71 mg 3,2',6'-Tri-N-trifluoracetyl-Dibekacin und 30 mg Äthyltrifluoracetat in 1 ml Dimethylsulfoxid wurde über Nacht bei 40 °C stehen gelassen. Die Reaktionslösung wurde anschliessend in derselben Weise wie in Beispiel 1 beschrieben weiter verarbeitet, wobei 90 mg (Ausbeute: 99%) der Titelverbindung als feste Substanz gewonnen wurde. $[\alpha]_D^{25} = +70^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Elementaranalyse:

berechnet für: $C_{26}H_{33}N_5O_{12}F_{12} \cdot CF_3COOH$:

gefunden: C 35,42, H 3,61, N 7,38%
C 35,40, H 3,89, N 7,17%.

Beispiel 29

Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-formyl-Dibekacin

Ein Gemisch von 79 mg 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-Dibekacin und 60 mg Phenylformiat in 1,1 ml Dimethylsulfoxid wurde auf dieselbe Weise wie in Beispiel 16 verarbeitet, wobei 84 mg (Ausbeute: 98%) der Titelverbindung als Monoformiat in Form einer festen Substanz erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +70^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Beispiel 30

Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-dichloracetyl-Dibekacin

40 Eine Lösung von 84 mg 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-Dibekacin in 1,2 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 25 mg Methylchloracetat auf dieselbe Weise wie in Beispiel 17 umgesetzt, wobei 104 mg (Ausbeute: 97%) der Titelverbindung als Monodichloracetat in Form einer festen Substanz erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +59^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Beispiel 31

50 *Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-6'-N-methyl-3''-N-trifluoracetyl-Dibekacin*

Eine Lösung von 85 mg 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-6'-N-methyl-Dibekacin (siehe Präparation 24) in 1 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 30 mg Äthyltrifluoracetat vermischt und das Gemisch in derselben Weise wie in Beispiel 1 verarbeitet, wobei 103,5 mg (Ausbeute: 98%) der Titelverbindung als Monotrifluoracetat in Form einer festen Substanz erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +60^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Beispiel 32

Herstellung von 3,2'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-formyl-Kanamycin-C

65 Eine Lösung von 81 mg 3,2'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-C (siehe Präparation 25) und 14 mg Triäthylamin in 1,5 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 90 mg Äthylformiat versetzt und das Gemisch in derselben Weise wie in Bei-

spiel 16 behandelt, wobei 85,5 mg (Ausbeute: 96%) der Titelverbindung als Monoformiat in Form einer festen Substanz erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +81^\circ$ ($c=1$, Wasser - Dimethylformamid, 1:2).

Beispiel 33

Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-trifluoracetyl-Sisomicin

Eine Lösung von 82 mg 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-Sisomicin (siehe Präparation 29) in 1,5 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 30 mg Äthyltrifluoracetat versetzt und das Gemisch in derselben Weise wie in Beispiel 1 verarbeitet, wobei 99 mg (Ausbeute: 97%) der Titelverbindung als Monotrifluoracetat in Form einer festen Substanz erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +151^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Beispiel 34

Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-trifluoracetyl-Netilmicin

Eine Lösung von 85 mg 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-Netilmicin in 1,3 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 30 mg Äthyltrifluoracetat vermischt und das Gemisch auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 verarbeitet, wobei 103 mg (Ausbeute: 98%) der Titelverbindung als Monotrifluoracetat in Form einer festen Substanz erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +145^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Beispiel 35

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-trifluoracetyl-Gentamicin-B

Eine Lösung von 72 mg 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Gentamicin-B in 1,2 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 30 mg Äthyltrifluoracetat versetzt und das Gemisch auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 verarbeitet, wobei 91 mg (Ausbeute: 99%) der Titelverbindung als Monotrifluoracetat in Form einer festen Substanz erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +92^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Beispiel 36

Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-Trifluoracetyl-Gentamicin-C₁-und-C_{1a}-Gemisch

Eine Lösung von 84 mg 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-Gentamicin-C₁-und-C_{1a}-Gemisch in 1,5 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 30 mg Äthyltrifluoracetat versetzt und das erhaltene Gemisch in derselben Weise wie in Beispiel 1 verarbeitet, wobei 101 mg der Titelverbindung als Monotrifluoracetat in Form einer festen Substanz erhalten wurde.

$[\alpha]_D^{25} = +87^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Beispiel 37

Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-3',4'-dideoxy-3'-eno-3''-N-trifluoracetyl-Kanamycin-B

Ein Gemisch von 83 mg 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-3',4'-dideoxy-3'-eno-Kanamycin-B (siehe Präparation 28) und 35 mg Äthyltrifluoracetat in 1,2 ml Dimethylsulfoxid wurde über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Anschliessend wurde die Reaktionslösung auf dieselbe Weise wie in Beispiel 1 verarbeitet, wobei 99,5 mg (Ausbeute: 96%) der Titelverbindung als Monotrifluoracetat in Form einer festen Substanz erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +26^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Beispiel 38

Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3'-deoxy-3''-N-formyl-Kanamycin-A

Eine Lösung von 90 mg 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3'-deoxy-Kanamycin-A in 0,8 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 13 mg N-Formylimidazol vermischt und das Gemisch bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen. Die Reaktionslösung wurde mit einer kleinen Menge Ameisensäure vermischt und anschliessend mit Äthyläther, wie in Beispiel 1, verarbeitet, wobei 94 mg (Ausbeute: 95%) der Titelverbindung als Monoformiat in Form einer festen Substanz erhalten wurde.

Vergleichsbeispiel

15 *Herstellung von 3,6',3''-Tri-N-acetyl-Kanamycin-A*

Ein Gemisch von 100 mg 3,6'-Di-N-acetyl-Kanamycin-A und 20 mg (1,03 Mol pro Mol des Ausgangsmaterials) N-Acetylimidazol in 1 ml Dimethylsulfoxid wurde unter Eiskühlung während 3 Stunden gerührt und anschliessend bei 20 Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen. Die Reaktionslösung wurde durch Zusatz von 0,3 ml einer 28%igen wässrigen Ammoniumhydroxidlösung alkalisch gemacht und anschliessend während 3 Tagen bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Das erhaltene Reaktionsgemisch wurde mit Äthyläther behandelt, um einen in Äther unlöslichen Sirup zu ergeben. Der Sirup wurde in Wasser aufgenommen und anschliessend durch eine Säule aus «CM-Sephadex» C-25 (NH₄⁺-Form) (ein Produkt der Pharmacia Fine Chemicals Co., Schweden) geleitet. Die Harzsäule wurde mit 0,05N wässriger Ammoniumhydroxidlösung entwickelt. Die Fraktionen, welche das gewünschte Produkt enthielten, wurden vereint und zur Trockene eingedampft. Das Konzentrat wurde in Wasser aufgenommen und die wässrige Lösung mit Essigsäure neutralisiert und wiederum zur Trockene eingedampft, 35 wobei 109 mg (Ausbeute: 90%) der Titelverbindung in Form eines festen Produktes erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +98^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

40 Elementaranalyse:

berechnet für: C₂₄H₄₂N₄O₁₄ · CH₃COOH · H₂O:

C 45,34, H 7,02, N 8,14%

gefunden: C 45,22, H 7,20, N 8,11%.

Beispiel 39

Herstellung von 1-N-(L-4-Amino-2-hydroxybutyryl)-Kanamycin-A (Amikacin)

(a) *Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A*

50 (1) Eine Suspension von 2,0 g (4,13 mMol) Kanamycin-A (freie Base) in einem Lösungsmittelgemisch von Dimethylsulfoxid (50 ml) und Tetrahydrofuran (20 ml) wurde mit 4 g (18,1 mMol) Zink-(II)-acetatdihydrat versetzt und das erhaltene Gemisch bei Zimmertemperatur gerührt bis zur Bildung 55 einer homogenen Lösung. Es erforderte etwa 4 bis 5 Stunden, bis das suspendierte Kanamycin-A gelöst war unter Bildung eines Kanamycin-A-Zinkkationen-Komplexes. Die erhaltene Lösung wurde sodann auf 0°C gekühlt, tropfenweise im Laufe von etwa 1 Stunde mit einer kalten Lösung (0°C) von 60 2,37 g (9,5 mMol) N-Benzyloxycarbonyloxysuccinimid in 40 ml eines Lösungsmittelgemisches aus Tetrahydrofuran und Dimethylsulfoxid (Volumenverhältnis 1:1) versetzt. Die Reaktionslösung wurde sodann bei Zimmertemperatur während 4 Stunden stehen gelassen. Während dieser Zeit erfolgte 65 die Benzyloxycarbonylierung des Zinkkomplexes von Kanamycin-A. Die erhaltene Reaktionslösung wurde der Silicagel-Dünnschichtchromatographie unterzogen unter Verwendung einer unteren Schicht von Chloroform-Methanol-28%igem

wässrigem Ammoniumhydroxid (Volumenverhältnis 1:1:1) als Entwicklungslösungsmittel, und es wurde dann beobachtet, dass die Silicagelplatte einen Hauptfleck bei R_f 0,23 und zwei oder drei kaum wahrnehmbare kleine Flecken, welche oberhalb des Hauptflecks lagen und anderen Nebenprodukten zuschreiben waren, aufwies.

(2) Die Reaktionslösung, welche den N-benzyloxycarbonylierten Kanamycin-A-Zinkkationen-Komplex aus der Vorstufe (1) enthielt, wurde in 500 ml Äthyläther gegossen und das ausgeschiedene ölige Produkt sodann mehrmals mit Äthyläther gewaschen, wobei 8,8 g eines dicken sirupartigen Produktes erhalten wurde, welches den N-benzyloxycarbonylierten Komplex enthielt.

(3) Die Entfernung der Zinkkationen aus dem sirupartigen Komplexprodukt erfolgte in der unten erwähnten Weise unter Verwendung eines schwach sauren Kationenaustauscherharzes, welches Carbonsäurefunktionen ($-\text{COOH}$) enthielt [«Amberlite» CG-50-Harz (H^+ -Form), ein Produkt der Rohm & Haas Co., USA].

60 ml «Amberlite» CG-50 (H^+ -Form)-Harz wurde zuvor mit Wasser-Dioxan (Volumenverhältnis 2:1) gut gesättigt. Eine Säule wurde sodann mit diesem Harz gepackt und die Lösung von 1 g des sirupartigen Komplexproduktes in Wasser-Dioxan (1:1) durch die Säule geleitet, welche anschliessend mit Wasser-Dioxan (2:1), welches 1% Essigsäure enthielt, entwickelt wurde. Die Eluatfraktionen, welche das gewünschte Produkt, nämlich 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A, welches auf Ninhydrin positiv reagiert, enthielten, liefen zuerst aus und dann erst die Fraktionen, welche das Zinkacetat enthielten und eine Farbreaktion mit Diphenylcarbazid ergaben. Die ersten Fraktionen, welche das gewünschte Produkt enthielten, wurden vereint und zur Trockene eingedampft und das Konzentrat dann mit Äthyläther gewaschen, wobei 340 mg (Ausbeute: 81%) 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-Kanamycin-A in Form eines farblosen Feststoffes erhalten wurde. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +76^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Elementaranalyse:

berechnet für: $\text{C}_{34}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_{15} \cdot 2\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} \cdot \text{H}_2\text{O}$:

C 51,23, H 6,56, N 6,29%

gefunden: C 51,02, H 6,71, N 6,22%.

(b) Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-trifluoracetyl-Kanamycin-A-Trifluoracetat

Das in der obigen Stufe (a) erhaltene Produkt wurde in derselben Weise wie in Beispiel 33 beschrieben verarbeitet, jedoch unter Zusatz von 1,5 Moläquivalenten Triäthylamin, wobei die Titelverbindung erhalten wurde.

(c) Herstellung von 1-N-(L-4-Amino-2-hydroxybutyryl)-Kanamycin-A

Eine Lösung von 60 mg 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-trifluoracetyl-Kanamycin-A-Trifluoracetat, hergestellt nach dem obigen Verfahren (b) in 1,5 ml Wasser-Tetrahydrofuran (Volumenverhältnis 1:1) wurde mit 7 mg wasserfreiem Natriumcarbonat versetzt, gefolgt von der Zugabe von 23 mg N-Hydroxysuccinimidester von L-4-Benzyloxycarbonylamino-2-hydroxybuttersäure, und das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur während 10 Stunden stehen gelassen.

Die derart erhaltene Reaktionslösung wurde auf ein kleines Volumen eingeeengt und mit Wasser vermischt, wobei ein fester Niederschlag entstand. Der Feststoff wurde in 3 ml 2N wässrigem Ammoniumhydroxid-Tetrahydrofuran (Volumenverhältnis 5:3) aufgenommen und die Lösung über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen, um die Entfernung der 3''-N-Trifluoracetylgruppe zu bewirken. Das Reaktionsgemisch wurde zur Trockene eingedampft und ergab einen festen Rückstand. Dieser feste Rückstand wurde in 4 ml Was-

ser-Dioxan (1:1) gelöst und die Lösung durch Zusatz einer sehr kleinen Menge Essigsäure schwach sauer gemacht und der katalytischen Hydrogenolyse mit Wasserstoff bei atmosphärischem Druck während 1 Stunde in Gegenwart von Palladiumschwarz-Katalysator unterworfen, um die Entfernung der Benzyloxycarbonylgruppe zu bewirken. Die erhaltene Reaktionslösung wurde filtriert und konzentriert, und das Konzentrat wurde durch eine Säule aus «CM-Sephadex» C-25 (NH_4^+ -Form) (ein Produkt von Pharmacia Fine Chemicals Co., Schweden) geleitet, welches sodann der Gradienten-Entwicklung mit 0 bis 0,5N wässriger Ammoniumhydroxid-Lösung unterworfen wurde. Die Fraktionen, welche das gewünschte Produkt enthielten wurden vereint und zur Trockene eingedampft, wobei 36 mg (Ausbeute: 89%) des Monocarbonates der Titelverbindung erhalten wurde. Die physicochemischen Eigenschaften und die antibakterielle Wirksamkeit dieses Produktes erwiesen sich als vollständig identisch mit jenen einer authentischen Probe.

Beispiel 40

Herstellung von 1-N-[(L)-4-Amino-2-hydroxybutyryl]-3'-deoxy-Kanamycin-A

(a) Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3'-deoxy-Kanamycin-A

Eine Suspension von 500 mg (1,07 mMol) 3'-Deoxy-Kanamycin-A (freie Base) in 12 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 1 g (4,55 mMol) Zinkacetatdihydrat vermischt und das erhaltene Gemisch bis zur Bildung einer homogenen Lösung gerührt. Zu dieser Lösung wurde sodann eine Lösung von 610 mg (2,45 mMol) N-Benzyloxycarbonyloxysuccinimid in 5 ml Dimethylsulfoxid-Tetrahydrofuran (Volumenverhältnis 1:1) zugesetzt und die Reaktionslösung sodann bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen. Die Reaktionslösung wurde sodann in derselben Weise wie in Beispiel 72 (a) (3) verarbeitet, wobei 765 mg (Ausbeute: 82%) der Titelverbindung in Form eines farblosen Feststoffes erhalten wurde. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +76^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Elementaranalyse:

berechnet für: $\text{C}_{34}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_{14} \cdot 2\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} \cdot \text{H}_2\text{O}$:

C 52,16, H 6,68, N 6,40%

gefunden: C 51,99, H 6,75, N 6,20%.

(b) Herstellung von 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3'-deoxy-3''-N-trifluoracetyl-Kanamycin-A-Trifluoracetat

Das in der obigen Stufe (a) erhaltene Produkt wurde wie in Beispiel 15 behandelt, um die Titelverbindung zu ergeben.

(c) Herstellung von 1-N-(L-4-Amino-2-hydroxybutyryl)-3'-deoxy-Kanamycin-A

Eine Lösung von 50 mg 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3'-deoxy-3''-N-trifluoracetyl-Kanamycin-A-Trifluoracetat, erhalten nach der obigen Stufe (b) in 1,5 ml Wasser-Tetrahydrofuran (Volumenverhältnis 1:2) wurde mit 6 mg wasserfreiem Natriumcarbonat und anschliessend mit 20 mg N-Hydroxysuccinimidester von L-4-Benzyloxycarbonylamino-2-hydroxybuttersäure versetzt. Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur während 8 Stunden stehen gelassen. Die Reaktionslösung wurde sodann auf ein kleines Volumen eingeeengt und mit Wasser vermischt, wobei ein fester Niederschlag erhalten wurde.

Der Feststoff wurde mit 3 ml 2N wässrigem Ammoniumhydroxid-Tetrahydrofuran (Volumenverhältnis 1:1) vermischt und das Gemisch über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen, um die Entfernung der 3''-N-trifluoracetylgruppe zu bewirken. Die Reaktionslösung wurde sodann zur Trockene eingedampft, wobei ein fester Rückstand erhalten wurde, und dieser Rückstand wurde mit 4 ml Wasser-Dioxan (Volumenverhältnis 1:1) vermischt. Die Lösung wurde durch

Zusatz einer sehr kleinen Menge Essigsäure schwach sauer gemacht und anschliessend der Hydrogenolyse mit Wasserstoff unter atmosphärischem Druck während 1 Stunde über Palladiumschwarz-Katalysator unterworfen, um die Benzyloxycarbonylgruppen zu entfernen. Die erhaltene Reaktionslösung wurde sodann in derselben Weise wie in Beispiel 40 (c) verarbeitet, wobei 30 mg (Ausbeute: 87%) der Titelverbindung als Monocarbonatmonohydrat erhalten wurde.

$[\alpha]_D^{25} = +89^\circ$ (c=1, Wasser).

Beispiel 41

Herstellung von 1-N-(L-4-Amino-2-hydroxybutyryl)-3',4'-dideoxy-Kanamycin-A

Eine Lösung von 70 mg 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonyl-3',4'-dideoxy-3''-N-trifluoracetyl-Kanamycin-A-Trifluoracetat, hergestellt nach Beispiel 20, in 2 ml Wasser-Tetrahydrofuran (1:2) wurde mit 9 mg wasserfreiem Natriumcarbonat vermischt, gefolgt vom Zusatz von 28 mg N-Hydroxysuccinimidester von L-4-Benzyloxycarbonylamino-2-hydroxybuttersäure. Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur während 10 Stunden stehen gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde sodann auf ein kleines Volumen eingengt und mit Wasser vermischt, um einen festen Niederschlag zu erhalten.

Der Feststoff wurde mit 4 ml eines Lösungsmittelgemisches von 3N wässrigem Ammoniumhydroxid und Tetrahydrofuran (1:2) vermischt und das Gemisch sodann bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen. Die Reaktionslösung wurde zur Trockene eingedampft und ergab einen festen Rückstand. Dieser Rückstand wurde mit 6 ml Wasser-Dioxan (1:3) vermischt und die Lösung durch Zusatz einer sehr kleinen Menge Essigsäure schwach sauer gemacht und anschliessend der Hydrogenolyse mit Wasserstoff bei atmosphärischem Druck während 1,5 Stunden über Palladiumschwarz-Katalysator unterworfen. Die Reaktionslösung wurde sodann in derselben Weise wie in Beispiel 40 (c) verarbeitet, wobei 42 mg (Ausbeute: 91%) der Titelverbindung als Monocarbonat erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +91^\circ$ (c=1, Wasser).

Beispiel 42

Herstellung von 1-N-(L-4-Amino-2-hydroxybutyryl)-Tobramycin

(a) Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-Tobramycin

Eine Suspension von 480 mg (1,03 mMol) Tobramycin (freie Base) in 12 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 1 g (4,55 mMol) Zinkacetatdihydrat versetzt und das Gemisch während 1 Stunde gerührt. Zur erhaltenen Reaktionslösung, welche den Tobramycin-Zinkkationen-Komplex enthielt, wurde tropfenweise im Laufe von etwa 1 Stunde eine Lösung von 850 mg (3,4 mMol) N-Benzyloxycarbonyloxysuccinimid in 10 ml Tetrahydrofuran-Dimethylsulfoxid (Volumenverhältnis 1:1) zugesetzt, und das derart gebildete Reaktionsgemisch bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen. Die erhaltene Reaktionslösung wurde mit einem grossen Volumen Äthyläther in derselben Weise wie in Beispiel 40 (a) (2) behandelt, wobei ein sirupartiges Produkt erhalten wurde, welches den N-benzyloxycarbonylierten Tobramycin-Zink-Komplex enthielt. Anschliessend wurde das sirupartige Komplexprodukt in derselben Weise wie in Beispiel 40 (a) (3) verarbeitet, wobei jedoch das Verhältnis von Wasser zu Dioxan (2:1) geändert wurde in ein Volumenverhältnis von 1:2. 810 mg (Ausbeute: 78%) der Titelverbindung in Form eines farblosen Feststoffes wurden auf diese Weise erhalten. $[\alpha]_D^{25} = +65^\circ$ (c=1, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

Elementaranalyse:

berechnet für: $C_{42}H_{55}N_5O_{15} \cdot 2CH_3CO_2H \cdot H_2O$:
C 54,81, H 6,50, N 6,95%
gefunden: C 51,77, H 6,71, N 6,88%.

(b) Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-formyl-Tobramycin-Monoformiat

Das in Stufe (a) erhaltene Produkt wurde auf dieselbe Weise wie in Beispiel 25 verarbeitet, um die Titelverbindung zu ergeben.

(c) Herstellung von 1-N-(L-4-Amino-2-hydroxybutyryl)-Tobramycin

Eine Lösung von 100 mg 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-formyl-Tobramycin-Monoformiat, erhalten in der obigen Stufe (b), in 3 ml Wasser-Tetrahydrofuran (1:3) wurde mit 12 mg wasserfreiem Natriumcarbonat vermischt, gefolgt vom Zusatz von 40 mg N-Hydroxysuccinimidester von (L)-4-Benzyloxycarbonylamino-2-hydroxybuttersäure. Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur während 10 Stunden stehen gelassen. Die derart gebildete Reaktionslösung wurde auf ein kleines Volumen eingengt und mit Wasser vermischt, um einen festen Niederschlag auszuscheiden.

Der Feststoff wurde in 2 ml 10%igem wässrigem Wasserstoffperoxid suspendiert und die Suspension wurde während 3 Stunden bei 60 °C kräftig gerührt und anschliessend filtriert, wobei ein fester Rückstand, welcher das De-N-Formyl-derivat enthielt, erhalten wurde. Der feste Rückstand wurde in 8 ml Wasser-Dioxan (1:3) aufgenommen und die Lösung wurde durch Zusatz eines sehr kleinen Volumens Essigsäure schwach sauer gemacht und der Hydrogenolyse bei atmosphärischem Druck während 1,5 Stunden über Palladiumschwarz-Katalysator unterworfen. Die Reaktionslösung wurde sodann in derselben Weise wie in Beispiel 40 (c) verarbeitet und über eine «CM-Sephadex» C-25-Säule geführt, welche sodann der Gradienten-Entwicklung mit 0 bis 1N wässriger Ammoniumhydroxidlösung unterworfen wurde. Die Fraktionen, welche das gewünschte Produkt enthielten, wurden vereint und zur Trockene eingedampft, wobei 67 mg (Ausbeute: 87%) der Titelverbindung in Form ihres Dicarbo-

natdihydrates erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +78^\circ$ (c=1, Wasser). Dieses Produkt stimmte mit einer authentischen Probe überein.

Beispiel 43

Herstellung von 1-N-(L-4-Amino-2-hydroxybutyryl)-Dibekacin

(a) Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-Dibekacin

600 mg (1,33 mMol) Dibekacin (freie Base) wurden mit 15 ml Dimethylsulfoxid unter Rühren vermischt. Die Lösung wurde mit 1,4 g (6,4 mMol) Zinkacetatdihydrat unter Rühren versetzt. Zu der Lösung wurde im Laufe von etwa 1 Stunde tropfenweise eine Lösung von 1,1 g (4,4 mMol) N-Benzyloxycarbonyloxysuccinimid in 12 ml Dimethylsulfoxid zugesetzt und das Gemisch sodann über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die erhaltene Reaktionslösung wurde weiter mit einem grossen Volumen Äthyläther vermischt, wobei eine ölige Ausscheidung erhalten wurde, welche hauptsächlich das gewünschte Produkt und einen Anteil an Dimethylsulfoxid enthielt. Die erhaltene ölige Abscheidung wurde von der oberen flüssigen Phase getrennt und weiter mit Äthyläther gewaschen, wobei ein dickes sirupartiges Produkt erhalten wurde.

Dieses sirupartige Produkt wurde wiederholt mit Wasser gewaschen. Durch diese Wasserbehandlung wurde der ursprünglich vorhandene Überschuss an Zinkacetat entfernt und ferner der N-benzyloxycarbonylierte Zinkkomplex zerstört, wobei 1,1 g eines in Wasser unlöslichen festen Rück-

standes erhalten wurde. Dieser Feststoff ergab in einer Silica-gel-Dünnschichtchromatographie, welche mit der unteren Phase von Chloroform-Methanol-18%iger wässriger Ammoniumhydroxidlösung (Volumenverhältnis 1:1:1) als Entwicklerlösungsmittel entwickelt wurde, einen einzigen Fleck bei R_f 0,13, und bestand aus praktisch reinem 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-Dibekacin zusammen mit einer Spur darin einverleibtem Zink. $[\alpha]_D^{25} = +71^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2). Wenn jedoch der Feststoff mit 3M wässriger Ammoniumhydroxidlösung gewaschen wurde, wurde das reine Produkt ohne Verunreinigung mit Zinkkationen erhalten.

(b) *Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-trifluoracetyl-Dibekacin-Trifluoracetat*

Das Produkt der obigen Stufe (a) wurde wie in Beispiel 27 verarbeitet, um die Titelverbindung zu ergeben.

(c) *Herstellung von 1-N-(L-4-Amino-2-hydroxybutyryl)-Dibekacin*

Eine Lösung von 170 mg 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-trifluoracetyl-Dibekacin-Trifluoracetat, erhalten nach Stufe (b), in 5 ml Wasser-Tetrahydrofuran (1:3) wurde mit 18 mg wasserfreiem Natriumcarbonat vermischt, gefolgt vom Zusatz von 60 mg N-Hydroxysuccinimidester von (S)-4-Benzyloxycarbonylamino-2-hydroxybuttersäure und das Gemisch wurde während 9 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Reaktionslösung wurde auf ein kleines Volumen eingengt und mit Wasser vermischt, wobei ein fester Niederschlag ausfiel.

Der Feststoff wurde mit 12 ml 4N wässrigem Ammoniumhydroxid-Tetrahydrofuran (1:3) vermischt und das Gemisch über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Reaktionslösung wurde sodann zur Trockene eingedampft, wobei ein fester Rückstand erhalten wurde. Der erhaltene feste Rückstand wurde in 12 ml Wasser-Dioxan (1:3) gelöst und die Lösung durch Zusatz einer sehr kleinen Menge Essigsäure schwach sauer gemacht und anschliessend der Hydrolyse bei atmosphärischem Druck während 1,5 Stunden über Palladiumschwarz-Katalysator unterworfen. Die Reaktionslösung wurde sodann in derselben Weise wie in Beispiel 43 (c) verarbeitet, wobei 96 mg (Ausbeute: 89%) der Titelverbindung als Dicarbonat erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +86^\circ$ ($c=1$, Wasser). Die physicochemischen Eigenschaften sowie die antibakterielle Wirksamkeit des erhaltenen Produktes erwiesen sich als übereinstimmend mit denjenigen einer authentischen Probe [Journal of Antibiotics, Vol. 26, Seite 412 (1973)].

Beispiel 44

Herstellung von 1-N-(DL-3-Amino-2-hydroxypropionyl)-Dibekacin, d.h. 1-N-DL-Isoseryl-Dibekacin

Eine Lösung von 150 mg 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonyl-3''-N-trifluoracetyl-Dibekacin-Trifluoracetat aus Beispiel 27 in 5 ml Wasser-Tetrahydrofuran (1:3) wurde mit 16 mg wasserfreiem Natriumcarbonat versetzt, gefolgt unter Zugabe von 51 mg N-Hydroxysuccinimidester von DL-3-Benzyloxycarbonylamino-2-hydroxypropionsäure (d.h. DL-3-Benzyl-oxycarbonylisoserin). Das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur während 10 Stunden stehen gelassen. Anschliessend wurde die Reaktionslösung in derselben Weise wie in Beispiel 44 (c) verarbeitet, wobei 82 mg (Ausbeute: 88%) der Titelverbindung als Dicarbonat erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +82^\circ$ ($c=0,32$, Wasser).

Die physicochemischen Eigenschaften und die antibakte-

rielle Wirksamkeit dieses Produktes erwiesen sich als identisch mit demjenigen einer authentischen Probe.

Beispiel 45

Herstellung von 1-N-(L-4-Amino-2-hydroxybutyryl)-Dibekacin

(a) *Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-p-methoxybenzyloxycarbonyl-Dibekacin*

500 mg (1,11 mMol) Dibekacin (freie Base) wurden in 15 ml Dimethylsulfoxid suspendiert und die Suspension gerührt bis zur Bildung einer Lösung, zu welcher 1,2 g (5,5 mMol) Zinkacetatdihydrat unter Rühren zugesetzt wurde. Zu der erhaltenen Lösung wurde sodann im Laufe von 30 Minuten tropfenweise eine Lösung von 1,17 g (3,86 mMol) p-Methoxycarbobenzoxy-p-nitrophenylester, gelöst in 10 ml Dimethylsulfoxid zugesetzt, und das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen. Die erhaltene Lösung wurde sodann in derselben Weise wie in Beispiel 76 (a) verarbeitet, wobei 893 mg (Ausbeute: 85%) der Titelverbindung erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +69^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

(b) *Herstellung von 3,2',6'-Tri-N-p-methoxybenzyloxycarbonyl-3''-N-trifluoracetyl-Dibekacin-Trifluoracetat*

Eine Lösung von 160 mg 3,2',6'-Tri-N-p-methoxybenzyloxycarbonyl-Dibekacin in 2 ml Dimethylsulfoxid wurde mit 48 mg Äthyltrifluoracetat vermischt und das Gemisch sodann in derselben Weise wie in Beispiel 1 beschrieben verarbeitet, wobei 188 mg (Ausbeute: 96%) der Titelverbindung als feste

Substanz erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +58^\circ$ ($c=1$, Wasser-Dimethylformamid, 1:2).

(c) *Herstellung von 1-N-(L-4-Amino-2-hydroxybutyryl)-Dibekacin*

Eine Lösung von 150 mg 3,2',6'-Tri-N-p-methoxybenzyloxycarbonyl-3''-N-trifluoracetyl-Dibekacin-Trifluoracetat, erhalten nach der obigen Stufe (b), gelöst in 5 ml Wasser-Tetrahydrofuran (1:3) wurde mit 14 mg wasserfreiem Natriumcarbonat versetzt, gefolgt von der Zugabe von 54 mg N-Hydroxysuccinimidester von (S)-4-(p-Methoxybenzyloxycarbonyl)-amino-2-hydroxybuttersäure, und das Gemisch wurde bei Zimmertemperatur während 8 Stunden stehen gelassen. Die Reaktionslösung wurde auf ein kleines Volumen konzentriert und anschliessend mit Wasser vermischt, um einen festen Niederschlag auszufällen.

Zu dem festen Niederschlag wurde eine Lösung von 1N-HCl in wässrigem Methanol (1:3, 6 ml) zugesetzt und das Gemisch während 4 Stunden bei 60 °C erhitzt, um die p-Methoxybenzyloxycarbonylgruppe zu entfernen. Die erhaltene Lösung wurde auf ein kleines Volumen konzentriert und anschliessend mit 5N wässrigem Ammoniumhydroxid versetzt, bis die Lösung ein pH von 10 aufwies. Die Lösung wurde bei Zimmertemperatur über Nacht stehen gelassen und anschliessend konzentriert, wobei ein Rückstand erhalten wurde. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und die Lösung wurde über eine Säule von «CM-Sephadex» C-25 (NH_4^+ -Form) geleitet, welche anschliessend mit Wasser gut gewaschen wurde und dann der Gradienten-Entwicklung mit 0 bis 1N wässriger Ammoniumhydroxidlösung unterworfen wurde. Die Fraktionen, welche das gewünschte Produkt enthielten, wurden vereint und zur Trockene eingedampft, wobei 77 mg (Ausbeute: 87%) der Titelverbindung als Dicarbonat erhalten wurde. $[\alpha]_D^{25} = +85^\circ$ ($c=1$, Wasser).