

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 150202 B



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 0527/79

(51) Int.Cl.⁴: C 07 H 15/236

(22) Indleveringsdag: 08 feb 1979

(24) Løbedag: 01 aug 1974

(41) Alm. tilgængelig: 01 dec 1984

(44) Fremlagt: 05 jan 1987

(86) International ansøgning nr.: -

(62) Stamansøgning nr.: 4124/74

(30) Prioritet: 06 aug 1973 US 385751 19 mar 1974 US 452600

(71) Ansøger: *SCHERICO LTD.: Luzerne, CH.

(72) Opfinder: Marvin Joseph *Weinstein: US, Peter John Lowell *Daniels: US, Gerald Howard *Wagman: US,
Raymond *Testa: US, Alan Keith *Mailams: US, John Jesson *Wright: US, Tattanahalli Lakshminarayan
*Nagabhushan: US.

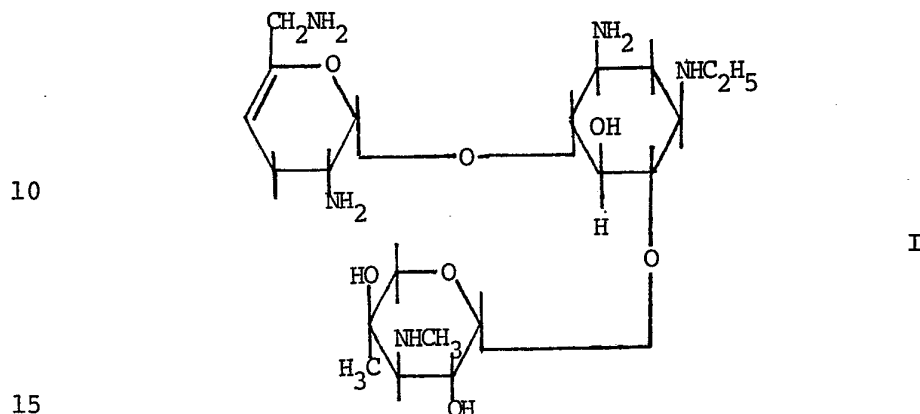
(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af farmaceutisk acceptable syreadditionssalte af 1-N-ethylisomicin

DK 150202 B

1

Den foreliggende opfindelse angår en analogi-
fremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte farma-
ceutisk acceptable syreadditionssalte af 1-N-ethylsiso-
micin, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at
5 forbindelsen med formlen I:



omsættes med en syre, og at det således vundne syreaddi-
tionssalt isoleres.

I stamansøgningen, dansk patentansøgning nr.
20 4124/74, er omhandlet en analogifremgangsmåde til frem-
stilling af en række 1-N-substituerede derivater af
4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler eller
farmaceutisk acceptable syreadditionssalte deraf,
herunder også derivater af sisomicin. Den i stamansøg-
25 ningens beskrivelse dokumenterede uventede, nyttige
antibiotiske aktivitet af de fremstillede forbindelser
er den samme for henholdsvis de frie baser og deres
syreadditionssalte, idet den antibiotiske aktivitet
skyldes basedelen.

30 Den foreliggende opfindelse er baseret på den
erkendelse, at syreadditionssaltene af 1-N-ethylsiso-
micin er meget let fremstillelige i ren krystallinsk
form, og at de er meget opløselige i vand ved det
pH-område, der normalt benyttes til injicerbare anti-
35 biotica, nemlig pH 4-7. Disse egenskaber ved syreaddi-
tionssaltene af 1-N-ethylsisomicin gør disse salte sær-
ligt velegnede at benytte i praksis.

Det har ved den omhandlede fremgangsmåde navnlig vist sig hensigtsmæssigt, at forbindelsen med formlen I omsættes med svovlsyre.

Saltene fremstilles ved i og for sig kendte fremgangsmåder, såsom ved at neutralisere den fri base med den pågældende syre sædvanligvis til ca. pH 5. Egnede syrer til dette formål omfatter sådanne syrer som saltsyre, svovlsyre, phosphorsyre, salpetersyre, hydrogenbromidsyre, eddikesyre, propionsyre, maleinsyre, ascorbinsyre og citronsyre. Fysisk karakteriseres syreadditionssaltene af 1-N-ethylsisomicin som hvide faste stoffer, der er opløselige i vand, sparsomt opløselige i de fleste polære opløsningsmidler og uopløselige i ikke-polære opløsningsmidler.

Forbindelserne er, som dokumenteret i stamansøgningens beskrivelse, bredspektrede antibakterielle midler, der fordelagtigt udviser aktivitet over for mange organismer, navnlig gram-negative organismer. Aktiviteten af forbindelserne over for gram-negative bakterier gør forbindelserne nyttige til bekæmpelse af infektioner forårsaget af gram-negative organismer, f.eks. arter af *Proteus* og *Pseudomonas*. De har veterinære anvendelser, navnlig ved behandling af mastitis hos kvæg og *Salmonella*-induceret diarré hos husdyr, såsom hunde og katte.

Udgangsmaterialet for fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan fremstilles ved i og for sig kendte fremgangsmåder ud fra sisomicin eller ved fermentering af stammen *Micromonospora inyoensis* 1550F-1G, hvoraf en kultur er deponeret hos U.S. Department of Agriculture, Northern Utilization Research and Development Division, Peoria, Illinois, under betegnelsen NRRL 5742.

1-N-Ethylering af sisomicin gennemføres fortrinsvis ved omsætning med acetaldehyd i nærværelse af et reduktionsmiddel.

Dyrkning af NRRL 5742 skal foregå i nærværelse af 1-N-ethyl-2-deoxy-D-streptamin.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen beskrives nærmere gennem følgende eksempel.

Eksempel

5 1-N-Ethylsisomicinsulfat.

A. 1-N-Ethylsisomicin

a) 1-N-Ethylering af sisomicin.

Til en opløsning af 5 g sisomicin i 250 ml vand blev der sat 1N svovlsyre, indtil opløsningens pH-værdi 10 var indstillet på ca. 5. Til den derved dannede opløsning af sisomicin-svovlsyreadditionssalt blev der sat 2 ml acetaldehyd, og der blev omrørt i 10 minutter, hvorefter der blev tilsat 0,85 g natriumcyanoborhydrid. Omrøring blev fortsat ved stuetemperatur i 15 minutter, 15 hvorefter opløsningen blev koncentreret i vakuum til et volumen på ca. 100 ml, og opløsningen blev derefter behandlet med en basisk ionbytterharpiks (f.eks. "Amberlite" [®] IRA 401S (OH⁻)), hvorefter der blev lyofiliseret til en rest omfattende 1-N-ethylsisomicin.

20 Der blev rensat ved chromatografering på 200 g silicagel, idet der blev elueret med den nedre fase af et chloroform:methanol:7% vandig ammoniumhydroxid (2:1:1)-system. De ensartede eluater, bestemt ved tyndtlagschromatografi, blev samlet, og de samlede eluater af 25 hovedkomponenten blev koncentreret i vakuum til en rest omfattende 1-N-ethylsisomicin (udbytte 1,25 g). Der blev rensat yderligere ved igen at chromatografere på 100 g silicagel, idet der blev elueret med et chloroform:methanol:3,5% ammoniumhydroxid (1:2:1)-system. De 30 samlede ensartede eluater (bestemt ved tyndtlagschromatografi) blev ledt gennem en søjle af basisk ionbytterharpiks, og eluatet blev lyofiliseret, hvorved vandtes 1-N-ethylsisomicin (udbytte 0,54 g).

$[\alpha]_D^{26} + 164^{\circ}$ (0,3%, H₂O), PMR (ppm) (D₂O): δ 1,05 (3H, t, 35 J=7Hz, -CH₂CH₃), 1,19 (3H, s, -C-CH₃), 2,5 (3H, s, N-CH₃), 4,85 (1H, m, =CH-), 4,95 (1H, d, J=4Hz, H₁"),

4

5,33 (1H, d, J=2,5 Hz, H₁[']).

Massespektrum: (M + 1)⁺ m/e 476,
også m/e 127, 154, 160, 173, 191,
201, 219, 256, 299, 317, 332, 345, 350, 360, 378, 390,
5 400.

b) Fremstilling af l-N-ethylsisomicin ved forgøring.

(i); Fremstilling af inokulum af *Micromonospora inyoensis* stamme 1550F-1G.

10 Spiringstrin 1:

Under aseptiske betingelser blev en lyofiliseret kultur (eller celler vundet fra en skråkultur) af *Micromonospora inyoensis* stamme 1550F-1G sat til en 300 ml-rystekolbe indeholdende 100 ml af følgende sterile me-
15 dium:

	Kødekstrakt	3 g
	Tryptose	5 g
	Gærekstrakt	5 g
	Dextrose	1 g
20	Stivele	24 g
	Calciumcarbonat	2 g
	Vandværksvand	1000 ml

Kolben og dens indhold blev inkuberet i 2-5 dage ved 35°C på en roterryster (280 rpm, udsving 5 cm).

25 Spiringstrin 2:

Af forgæringsmediet fra spiringstrin 1 blev 25ml aseptisk overført til en 2 liter-rystekolbe indeholdende 500 ml af ovennævnte sterile spiringsmedium. Kolben og dens indhold blev inkuberet i 3 dage ved 28°C på en
30 roterryster (280 rpm, udsving 5 cm).

Forgøringstrin:

Af det ved spiringstrin 2 vundne inokulum blev 500 ml aseptisk overført til en 14 liters forgøringstank indeholdende 9,5 liter af følgende sterile medium:

35	Dextrin	50 g
	Dextrose	5 g
	Sojabønneemel	35 g

5

Calciumcarbonat	7 g
Cobaltchlorid	10^{-6} molær
Vandværksvand	1000 ml
Antiskummemiddel (GE 60)	10 ml

- 5 (ii): Forud for sterilisering af det i trin (i) beskrevne medium blev pH indstillet på 8, og der blev tilsat en vandig opløsning indeholdende 8,0 g l-N-ethyl-2-deoxy-D-streptamin. Indholdet blev forgæret under aerobe betin-
- 10 gelse i 48-240 timer under omrøring ved 250 rpm, med en lufttilførsel på 4,5 liter pr. minut og ved 2,5 at. Forgæringsmediets pH-værdi ændredes en lille smule under antibiotikum-produktionen, idet den varierede inden for området fra ca. 6,8 til ca. 7,3.
- 15 Antibiotikum-produktionen fulgtes ved anvendelse af prøvemethoden beskrevet i J. Antibiotics (Japan) Vol. XXIII, og da spidsproduktion var nået, blev produktet indhøstet (forgæringen er sædvanligvis fuldendt i løbet af ca. 7 dage).
- 20 (iii): Isolering af l-N-ethylsisomicin.
- Til hele væsken fra trin (II) blev der under omrøring sat 7,0 g oxalsyre. Væsken blev syrnet til pH 2,0 under anvendelse af 6N svovlsyre. Blandingen blev omrørt i ca. 15 minutter og filtreret under anvendelse af et
- 25 egnet filterhjelpestof. Filtratet blev neutraliseret (pH 7,0) med 6N ammoniumhydroxid. Filtratet blev ledt gennem en 1,0 liters kationbytterharpikssøjle i ammonium-formen (f.eks. "Amberlite" [®] IRC-50, Rohm og Haas, Philadelphia, Pa.). Den forbrugte væske blev bortkastet,
- 30 og søjlen blev elueret med 2N ammoniumhydroxid, idet der blev opsamlet fraktioner på ca. 100 ml. Søjleeluatet fulgtes ved at pladeprøve hver fraktion over for Staphylococcus aureus ATCC 6538P. De aktive fraktioner blev samlet og inddampet til ca. 100 ml i vakuum, hvorefter
- 35 der blev lyofiliseret til opnåelse af et fast produkt. Produktet blev tritureret flere gange med varm methanol, filtreret, og filtratet blev inddampet til en rest. Pro-

duktet blev chromatograferet på silicagel (25 g) under anvendelse af den nedre fase af et chloroform:methanol: koncentreret ammoniumhydroxid (1:1:1)-system som elueringsmiddel. Fraktionerne indeholdende antibiotisk aktivitet blev samlet og inddampet, hvorved vandtes 1-N-ethylsisomicin.

B. 1-N-Ethylsisomicinsulfat

5,0 g 1-N-Ethylsisomicin blev opløst i 25 ml vand, og pH af opløsningen blev indstillet på 4,5 med 1N svovlsyre. Der blev hældt i ca. 300 ml methanol under kraftig omrøring, og omrøring blev fortsat i ca. 10-20 minutter, hvorefter der blev filtreret. Bundfaldet blev vasket med methanol og tørret ved ca. 60°C i vakuum, hvorved vandtes 1-N-ethylsisomicinsulfat.

NMR-Spektrum for 1-N-ethylsisomicinsulfat, 20% opløsning (vægt/vol.) i denteriumoxid med natrium-2,2-dimethyl-2-sila-pentan-5-sulfonat som indre reference, 20°C.

20	Proton	Kemisk forskydning δ (ppm)	Intensitet	Multiplisitet
	1-NHCH ₂ CH ₃	1,33	3H	triplet, J = 7Hz
	4"-CH ₃	1,35	3H	singlet
25	2,3	1,67-2,83	4H	multipletter
	3"-NHCH ₃	2,93	3H	singlet
	1-NHCH ₂ CH ₃	3,18	2H	kvartet, J = 7Hz
	3"	3,45	1H	dublet, J = 11Hz
30	5"-axial	3,47	1H	dublet, J = 12Hz
	2"	4,26	1H	dublet af dubletter J=4Hz, J=10Hz
	1"	5,20	1H	dublet, J = 4Hz
35	4'	5,25	1H	multiplet
	1'	5,67	1H	dublet, J = 1,5Hz
	HDO	4,78		

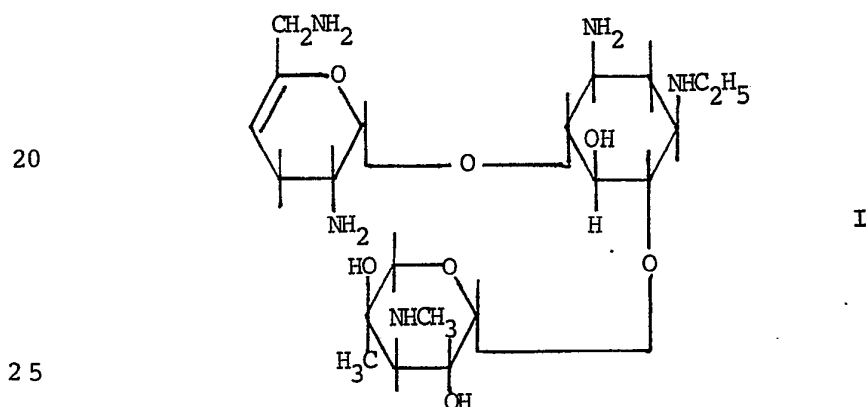
IR-spektrum for l-N-ethylsisomicinsulfat (KBr)

Frekvens (cm^{-1})	Strukturelle grupper og ioner
3500 - 2500 (s, br)	OH, NH_3^+ , NH_2^+ , NH-strækning
1690 (w)	cyklisk C=C strækning
1620 (m)	NH_3^+ , NH_2^+ -asymmetrisk vridning
1530 - 950 (vs, br)	C-O, SO_4 -strækning
610 (s), 440 (w)	SO_2 -vridning

(w = svag, m = medium, s = stærk, vs = meget stærk,
10 br = bred)

P A T E N T K R A V

1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af farmaceutisk acceptable syreadditionssalte af l-N-ethyl-15 sisomicin, k e n d e t e g n e t ved, at forbindelsen med formlen I:



omsættes med en syre, og at det således vundne syreadditionssalt isoleres.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1 til fremstilling af l-N-ethylsisomicinsulfat, k e n d e t e g n e t ved, at forbindelsen med formlen I omsættes med svovlsyre.

Fremdragne publikationer:
