



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Int. Cl. 3: C 07 H 15/20

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



PATENT SCHRIFT A5

11

630 644

21 Gesuchsnummer: 4257/75 22 Anmeldungsdatum: 03.04.1975 30 Priorität(en): 10.04.1974 JP 49-41367 10.04.1974 JP 49-41368 25.06.1974 JP 49-72945 24 Patent erteilt: 30.06.1982 45 Patentschrift veröffentlicht: 30.06.1982	73 Inhaber: Takeda Chemical Industries, Ltd., Osaka (JP) 72 Erfinder: Kentaro Hiraga, Kyoto (JP) Tetsuya Okutani, Osaka (JP) Tsunehiko Asako, Kyoto (JP) Kouichi Yoshioka, Ukyo-ku/Kyoto (JP) 74 Vertreter: A. Braun, Braun, Héritier, Eschmann AG, Patentanwälte, Basel
--	---

54 Verfahren zur Herstellung von Desoxyaminoglykosid-Antibiotika.

57 Desoxyaminoglykosid-Antibiotika werden aus phosphorylierten Aminoglykosid-Antibiotika durch Dehydroxylierung hergestellt, indem man letztere mit einem Silylierungsmittel, oder mit einem Silylierungsmittel und einem Halogenierungsmittel, oder mit einem Acylierungsmittel, einem Silylierungsmittel und einem Halogenierungsmittel umsetzt und das entstandene Epimino-deamino-desoxyaminoglykosid bzw. Halogendesoxyaminoglykosid oder das Gemisch der beiden reduziert. Die Verbindungen werden in hoher Ausbeute und über wenige Stufen erhalten; sie haben antibakterielle Eigenschaften und sind auch gegen Bakterien wirksam, welche gegen die Aminoglykosid-Antibiotika resistent sind.

PATENTANSPRÜCHE

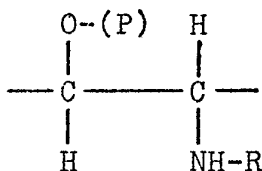
1. Verfahren zur Herstellung von Desoxyaminoglykosid-Antibiotika, dadurch gekennzeichnet, dass man ein phosphoryliertes Aminoglykosid-Antibiotikum,

a) dessen Phosphonoxygruppe an ein sekundäres Kohlenstoffatom gebunden ist,

b) welches seinerseits an ein eine primäre oder sekundäre Aminogruppe aufweisendes Kohlenstoffatom gebunden ist, und

c) dessen Phosphonoxygruppe und Aminogruppe trans-Konfiguration zueinander haben

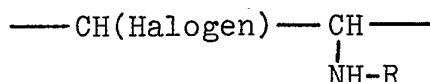
und welches folgender Teilformel entspricht:



in welcher -O-(P) eine Phosphonoxygruppe und -NH-R eine primäre oder sekundäre Aminogruppe darstellen, mit einem Silylierungsmittel und mit einem Halogenierungsmittel umgesetzt und das hierbei gebildete Halogendesoxyaminoglykosid,

a) dessen Halogenatom an ein sekundäres Kohlenstoffatom gebunden ist,

b) welches seinerseits an ein eine primäre oder sekundäre Aminogruppe aufweisendes Kohlenstoffatom gebunden ist und welches folgender Teilformel entspricht:



der Reduktion unterwirft.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Halogenierungsmittel Trialkylsilylhalogenide, Triarylsilylhalogenide, Arylalkylsilylhalogenide, Trialkoxysilylhalogenide, Thionylchlorid, Trimethoxymethylphosphoniumjodid, Phosphoroxchlorid, Phosphorthiooxchlorid, Phosphorpen-tachlorid, Oxalylchlorid und/oder Phosphorpentabromid verwendet.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man als Antibiotikum vom Desoxyneomycintyp 3'-Desoxybuti-rosin A herstellt.

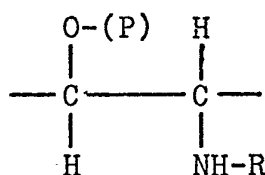
4. Verfahren zur Herstellung von Desoxyaminoglykosid-Antibiotika, dadurch gekennzeichnet, dass man ein phos-phoryliertes Aminoglykosid-Antibiotikum,

a) dessen Phosphonoxygruppe an ein sekundäres Kohlenstoffatom gebunden ist,

b) welches seinerseits an ein eine primäre oder sekundäre Aminogruppe aufweisendes Kohlenstoffatom gebunden ist, und

c) dessen Phosphonoxygruppe und Aminogruppe trans-Konfiguration zueinander haben

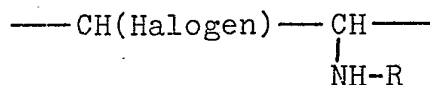
und welches folgender Teilformel entspricht:



in welcher -O-(P) eine Phosphonoxygruppe und -NH-R eine primäre oder sekundäre Aminogruppe darstellen, mit einem Silylierungsmittel und mit einem Halogenierungsmittel umgesetzt und das hierbei gebildete Gemisch von Epiminodeaminodesoxyaminoglykosid und Halogendesoxyaminoglykosid,

a) dessen Halogenatom an ein sekundäres Kohlenstoffatom gebunden ist,

b) welches seinerseits an ein eine primäre oder sekundäre Aminogruppe aufweisendes Kohlenstoffatom gebunden ist und welches folgender Teilformel entspricht:



der Reduktion unterwirft.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass man als Antibiotikum vom Desoxyneomycintyp 3'-Desoxybuti-rosin A oder 3'-Desoxybutirosin B herstellt.

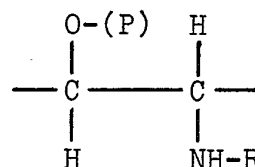
6. Verfahren zur Herstellung von Desoxyaminoglykosid-Antibiotika, dadurch gekennzeichnet, dass man ein phos-phoryliertes Aminoglykosid-Antibiotikum,

a) dessen Phosphonoxygruppe an ein sekundäres Kohlenstoffatom gebunden ist,

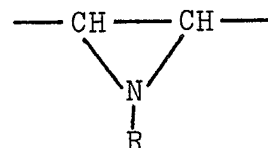
b) welches seinerseits an ein eine primäre oder sekundäre

20 Aminogruppe aufweisendes Kohlenstoffatom gebunden ist, und c) dessen Phosphonoxygruppe und Aminogruppe trans-Konfiguration zueinander haben

und welches folgender Teilformel entspricht:



in welcher -O-(P) eine Phosphonoxygruppe und -NH-R eine primäre oder sekundäre Aminogruppe darstellen, mit einem Silylierungsmittel umgesetzt und das hierbei gebildete Epiminodeaminodesoxyaminoglykosid der folgenden Teilformel:



der Reduktion unterwirft.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man als Desoxyaminoglykosid-Antibiotika solche der 3'-Desoxyneomycin-Reihe herstellt.

8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man als Desoxyaminoglykosid-Antibiotika solche der 3'- und/oder 2"-Desoxykanamycin-Reihe herstellt.

9. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man als Silylierungsmittel Halogensilane, Silylamine, N,N-Bissilyl-carbonsäureamide, N-Silyl-carbonsäureamide, Silylimidazole oder Gemische eines Trialkylsilans oder Dialkylarylsilans mit einem Metallkatalysator verwendet.

10. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reduktion als katalytische Reduktion durchführt.

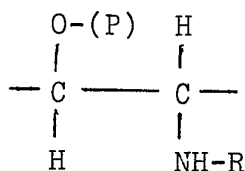
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man die katalytische Reduktion mittels Raney-Nickel durchführt.

12. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man als Antibiotikum vom Desoxyneomycintyp 3'-Desoxybutirosin A herstellt.

13. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man als Antibiotikum vom Desoxyneomycintyp 3'-Desoxybutirosin B herstellt.

14. Verfahren zur Herstellung von Desoxyaminoglykosid-Antibiotika, dadurch gekennzeichnet, dass man ein phosphoryliertes Aminoglykosid-Antibiotikum,

- a) dessen Phosphonoxygruppe an ein sekundäres Kohlenstoffatom gebunden ist,
 b) welches seinerseits an ein eine primäre oder sekundäre Aminogruppe aufweisendes Kohlenstoffatom gebunden ist, und
 c) dessen Phosphonoxygruppe und Aminogruppe trans-Konfiguration zueinander haben
 und welches folgender Teilformel entspricht:



in welcher -O-(P) eine Phosphonoxygruppe und -NH-R eine primäre oder sekundäre Aminogruppe darstellen, mit einem Acylierungsmittel und dann mit einem Silylierungsmittel und mit einem Halogenierungsmittel umgesetzt und das hierbei gebildete Halogenendesoxyaminoglykosid der Reduktion unterwirft.

Aminoglykosid-Antibiotika werden in grossem Umfange für die Behandlung von Infektionen, die durch Mikroorganismen verursacht werden, bei der Therapie von Mensch und Tier verwendet. Als Folge der Behandlung mit den Antibiotika ist jedoch eine Anzahl von Mikroorganismen aufgetreten, die gegen die Antibiotika resistent sind.

Kürzlich wurde in mehreren Veröffentlichungen mitgeteilt, dass Desoxyaminoglykosid-Antibiotika gegen diese Mikroorganismen, die gegen Aminoglykosid-Antibiotika resistent sind, wirksam sind. Bezüglich der Dehydroxylierung von Aminoglykosid-Antibiotika wird beispielsweise im Journal of Antibiotics 21 (1972) 613–616 festgestellt, dass 3',4'-Didesoxyribostamycin, ausgehend von Ribostamycin über neun Stufen mit einer Gesamtausbeute von höchstens 15 % synthetisiert wird. Eine solche Synthese kann natürlich keineswegs als ein für die Grossherstellung geeignetes Verfahren angesehen werden.

Angesichts dieses Standes der Technik wurde von der Erfinderin eine umfassende Untersuchung mit dem Ziel durchgeführt, ein wirksames Verfahren für die Dehydroxylierung von Aminoglykosid-Antibiotika zu finden. Diese Untersuchung gipfelte in der Entwicklung von neuen Verfahren zur Dehydroxylierung von Aminoglykosid-Antibiotika.

Gegenstand der Erfindung ist demgemäss die Dehydroxylierung von Aminoglykosid-Antibiotika nach völlig neuen Verfahren, welche die Herstellung von dehydroxylierten Aminoglykosid-Antibiotika in hoher Ausbeute ermöglichen. Dabei werden auch neue Zwischenprodukte erhalten, die gegen Mikroorganismen, die gegen Aminoglykosid-Antibiotika resistent sind, wirksam sind.

Die Verfahren gemäss der Erfindung zur Herstellung von Desoxyaminoglykosid-Antibiotika sind gekennzeichnet, wie in den Ansprüchen 1, 2, 3 und 12 angegeben wird. Im Prinzip können diese Verfahren dadurch zusammengefasst werden, dass man ein phosphoryliertes Aminoglykosid (a) mit einem Silylierungsmittel oder (b) nacheinander mit (I) einem Silylierungsmittel bzw. einem Acylierungsmittel und einem Silylierungsmittel, und (II) mit einem Halogenierungsmittel umgesetzt (Stufe 1) und das hierbei gebildete Zwischenprodukt der Reduktion unterwirft (Stufe 2).

Zu den Aminoglykosid-Antibiotika gehören Aminoglykosid-Antibiotika vom Neomycintyp mit Zuckern in 4- und/oder 5-Stellung von 2-Desoxystreptamin, beispielsweise die Neomycine (z. B. Neomycin A, Neomycin B, Neomycin C, Neomycin LPb, Neomycin LPe), die Paromomycine (z. B. Paromomycin I und Paromomycin II), die Butirosine (z. B. Butirosin A, Butirosin B,

Butirosin 1709E₁ und Butirosin 1709E₂), Ribostamycin, Xylostasin, die Lividomycine (z. B. Lividomycin A und Lividomycin B) oder von Streptamin, z. B. die Hybrimycine (z. B. Hybrimycin A₁, Hybrimycin A₂, Hybrimycin A₃, Hybrimycin B₁, Hybrimycin B₂ und Hybrimycin B₃), Aminoglykosid-Antibiotika vom Kanamycintyp mit Zuckern in 4- und 6-Stellung von 2-Desoxystreptamin, z. B. die Kanamycine (z. B. Kanamycin A, Kanamycin B und Kanamycin C), 3',4'-Didesoxykanamycin B, die Gentamycine (z. B. Gentamycin C_{1a}, Gentamycin C₁, Gentamycin C₂, Gentamycin A, Gentamycin B, Gentamycin B₁ und Gentamycin X), Tobramycin, Sisomicin, Aminoglykosid-Antibiotika vom Streptomycintyp, z. B. Streptomycine (z. B. Streptomycin, Streptomycin B, Dihydrostreptomycin und Dihydrodesoxystreptomycin), Hydroxylstreptomycin, Bluensomycin und andere Aminoglykosid-Antibiotika, z. B. die Destomycine (z. B. Destomycin A und Destomycin B), Hygromycin B, Trehalamin, Mannosilglukosamin und Actinospectasen.

Unter «Desoxyaminoglykosid-Antibiotika» sind Verbindungen zu verstehen, die durch Dehydroxylierung der eingesetzten Aminoglykosid-Antibiotika erhalten werden. Die als Ausgangsmaterialien eingesetzten Aminoglykosid-Antibiotika umfassen daher die Desoxyaminoglykosid-Antibiotika als solche, z. B. Monodesoxyaminoglykosid-Antibiotika und Didesoxyaminoglykosid-Antibiotika.

Beim Verfahren gemäss der Erfindung werden phosphorylierte Aminoglykosid-Antibiotika als Ausgangsmaterialien verwendet. Der Phosphatesterrest ist beispielsweise ein Ester von Phosphorsäure, Nucleotidylphosphorsäure (z. B. Adenylsäure, Guanylsäure, Cytidylsäure, Uridinsäure und Inosinsäure), Alkylphosphorsäure (z. B. Dimethylphosphorsäure, Diäthylphosphorsäure und Methylphosphorsäure). Die phosphorylierten Aminoglykosid-Antibiotika werden durch Phosphorylierung der entsprechenden Aminoglykosid-Antibiotika erhalten.

Die Phosphorylierung der Aminoglykosid-Antibiotika wird beispielsweise durchgeführt, indem die Aminoglykosid-Antibiotika mit einem Fermentationsmedium oder einem Enzym oder mit der Phosphotransferase eines Mikroorganismus, der beispielsweise zu *Pseudomonas aeruginosa* oder *Escherichia coli* gehört, in Gegenwart eines Phosphatdonators zusammengeführt werden (siehe Bezugsbeispiele 2, 3 und 4). Als typische Beispiele solcher Mikroorganismen seien genannt: *Escherichia coli* R11, welcher am 13. Juni 1973 unter der Bezeichnung IFO 13560 beim Institute for Fermentation, 17–85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka (Japan), am selben Datum unter der Bezeichnung FERM-P 2123 beim Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology 8–1, Inage-Higashi 5-chome, Chiba City (281 Japan) und am 5. November 1973 unter der Bezeichnung ATCC 21990 bei der American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville (Maryland, USA 20852) hinterlegt worden ist, *Bacillus vitellinus* Z-1159, welcher am 12. Oktober 1971 (IFO 13296), am 26. November 1971 (FERM-P 1203) und am 29. August 1974 (ATCC 31078) bei den oben erwähnten Sammlungen hinterlegt worden ist, *Escherichia coli* K12 ML 1629 [Journal of Antibiotics, 21, Nr. 1 (1968) 22–29], *Escherichia coli* ML 1401 Rm₈₁ + [Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2, Nr. 3 (1972) 142–146] und *Escherichia coli* JR66/W677 [Febs Letters 14, Nr. 5 (1971) 293]. Die Klammerzahlen hinter den Abkürzungen FERM-P, IFO und ATCC sind die Hinterlegungsnummern der genannten Stämme beim Fermentation Research Institute of the Agency of Industrial Science and Technology, Chiba, Japan (FERM), beim Institute for Fermentation Osaka Japan (IFO) bzw. bei der American Type Culture Collection (ATCC). Als typische Beispiele von Phosphatdonatoren sind Adenosintriphosphat, Adenosindiphosphat, Desoxyadenosintriphosphat, Desoxyadenosindiphosphat, Cytidintriphosphat, Guanosintriphosphat und Uridintriphosphat zu nennen. Durch die Phosphorylierung werden eine

oder mehrere Hydroxylgruppen der Aminoglykosid-Antibiotika phosphoryliert. Die phosphorylierte Hydroxylgruppe wird nachstehend zuweilen als «Phosphonoxygruppe» bezeichnet. Die Stellungen der Phosphonoxygruppen ändern sich mit der Art der Aminoglykosid-Antibiotika und den Phosphorylierungsbedingungen, insbesondere mit der Art der verwendeten Phosphotransferase. Als Phosphonoxygruppen kommen die unsubstituierte Phosphonoxygruppe ($-\text{OPO}_3\text{H}_2$), substituierte Phosphonoxygruppen, z. B. Nucleotidylphosphonoxygruppen (z. B. Adenosylphosphonoxy, Uridylphosphonoxy, 5'-Inosinylphosphonoxy und 5'-Guanosylphosphonoxy) und Alkylphosphonoxygruppen (z. B. Dimethylphosphonoxy, Diäthylphosphonoxy, Methylphosphonoxy und Äthylphosphonoxy) in Frage. Die in dieser Weise erhaltenen phosphorylierten Aminoglykosid-Antibiotika werden nach üblichen Methoden, z. B. durch Extraktion, 15 Ausfällung, Gefriertrocknung und Säulenchromatographie mit Ionenaustauschharzen, Ionenaustauschcellulose oder Aktivkohle, vom Reaktionsgemisch abgetrennt.

Nachstehend werden die Einzelheiten der Stufen der Verfahren gemäss der Erfindung erläutert.

Stufe 1

In der ersten Stufe des Verfahrens gemäss der Erfindung wird ein phosphoryliertes Aminoglykosid (a) mit einem Silylierungsmittel (Stufe 1-A) oder (b) mit (I) einem Acylierungsmittel oder/und einem Silylierungsmittel und (II) einem Halogenierungsmittel (Stufe 1-B) umgesetzt.

Stufe 1-A

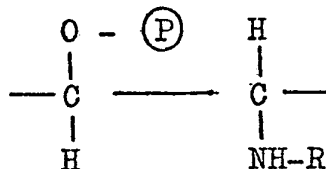
Zunächst wird das phosphorylierte Aminoglykosid-Antibiotikum mit einem Silylierungsmittel umgesetzt. Als Silylierungsmittel eignen sich beispielsweise Halogensilane (z. B. Trimethylsilylchlorid, Trimethylsilylbromid, Trimethylsilyljodid, Dimethylphenylsilylchlorid, Dimethyl-tert.-butylsilylchlorid, Dimethyldichlorsilan, Chlormethyltrimethylchlorsilan, Brommethyltrimethylchlorsilan, Trichlorsilan und Triphenylsilylchlorid), Silylverbindungen von Aminen (z. B. Hexamethyldisilazan, N-Trimethylsilyldimethylamin, N-Trimethylsilyl-tert.-butylamin und N-Trimethylsilyldiäthylamin), Bissilylverbindungen von Carbonsäureamiden (z. B. Bis(trimethylsilyl)acetamid, Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid und Bis(trimethylsilyl)propionamid), Monosilylverbindungen von Carbonsäureamiden (z. B. N-Trimethylsilylacetamid, N-Methyl-N-trimethylsilylacetamid, N-Äthyl-N-trimethylsilylacetamid, N-Trimethylsilylpyridon und N-Trimethylsilylpyrrolidon), Silylderivate von Imidazol (z. B. Trimethylsilylimidazol und Trimethylsilyl-2-methylimidazol), Gemische eines Trialkylsilans (z. B. Trimethylsilan und Triäthylsilan) oder Dialkylarylsilans (z. B. Dimethylphenylsilan) mit einem Metallkatalysator (z. B. Wilkinson-Komplex (Tris(triphenylphosphin)rhodiumchlorid), Palladiumchlorid und Zinkchlorid) und Gemische von wenigstens zwei dieser Silylierungsmittel. Das Silylierungsmittel kann in einer Menge von 10 bis 500 Mol, vorzugsweise 50 bis 200 Mol pro Mol des eingesetzten phosphorylierten Aminoglykosids verwendet werden. Die Silylierungsreaktion kann in einem Lösungsmittel durchgeführt werden. Bevorzugt werden Lösungsmittel, die keine Protonendonatoren sind, z. B. Pyridin, Benzol, Toluol, Xylol, Dioxan, Tetrahydrofuran, Dimethylformamid, Hexamethylphosphorsäuretriamid, Hexamethylphosphorsäuretriamid und Acetonitril. Die Reaktion verläuft glatter in Gegenwart eines Phosphins, beispielsweise eines Triarylphosphins wie Triphenylphosphin oder eines Trialkylphosphins, z. B. Tri-n-butylphosphin, oder eines Metallhalogenids (z. B. Zinkchlorid, Lithiumchlorid, Aluminiumchlorid, Titanchlorid, Zinnchlorid, Antimonchlorid und Bortrifluorid). Die Reaktion wird vorteilhaft unter Erhitzen auf eine Temperatur von etwa 50 bis etwa 200°C, vorzugsweise auf etwa 80 bis 150°C durchgeführt.

Die Epiminodeaminodesoxyaminoglykoside werden in der

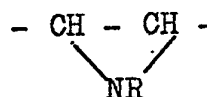
Stufe 1-A unter Verwendung eines phosphorylierten Aminoglykosids der folgenden Teilstruktur hergestellt:

- a) Die Phosphonoxygruppe ist an ein sekundäres C-Atom gebunden;
- b) das Kohlenstoffatom ist an ein Kohlenstoffatom gebunden, das eine primäre oder sekundäre Aminogruppe aufweist, und
- c) die Aminogruppe und die Phosphonoxygruppe haben die trans-Konfiguration zueinander.

Mit anderen Worten, das phosphorylierte Aminoglykosid hat die Struktur



in der $-\text{O}-\text{P}$ eine Phosphonoxygruppe und $-\text{NH-R}$ eine primäre oder sekundäre Aminogruppe ist. Das Epiminodiaminodesoxyaminoglykosid hat die folgende Teilstruktur (Aziridinring) im entsprechenden Teil:



Hierin hat R die oben genannte Bedeutung. Der genannte Aziridinring liegt vorzugsweise an der 2'- und 3'-Stellung in der Aminoglykosidverbindung.

Stufe 1-B

Als Alternative wird das als Ausgangsmaterial verwendete phosphorylierte Aminoglykosid-Antibiotikum mit (I) einem Silylierungsmittel oder einem Acylierungsmittel, dann einem Silylierungsmittel und (II) mit einem Halogenierungsmittel umgesetzt.

In diesem Fall wird die Ausgangsverbindung mit einem Acylierungsmittel, z. B. Essigsäureanhydrid, Acetylchlorid und Benzoylchlorid, umgesetzt. Diese Reaktion kann in einem Lösungsmittel, z. B. Pyridin, Collidin, Dimethylformamid, Acetonitril und Hexamethylphosphoramid, und in Gegenwart einer Base als Katalysator durchgeführt werden. Als Basen eignen sich beispielsweise Triäthylamin, Triäthylendiamin und Pyridin. Diese Reaktion wird bei -50°C bis 200°C , vorzugsweise bei 80°C bis 150°C durchgeführt. Die Menge des Acylierungsmittels braucht nicht grösser zu sein als die zum Schutz aller funktionellen Gruppen der Ausgangsverbindung erforderliche Menge, jedoch kann es auch im Überschuss verwendet werden.

Als Silylierungsmittel eignen sich in der zweiten Stufe beispielsweise Hexamethyldisilazan, Trimethylchlorsilan, Bis(trimethylsilyl)acetamid, Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid, Trimethylsilylacetamid, N-Methyl-N-trimethylsilylacetamid, N-Trimethylsilylimidazol, N-(Trimethylsilyl)diäthylamin und Halogensilane (z. B. Dimethyldichlorsilan). Bei Verwendung des Silylierungsmittels muss die Reaktion nicht unbedingt in einem Lösungsmittel durchgeführt werden, jedoch kann ein Lösungsmittel, das kein Protonendonator ist, verwendet werden. Als Lösungsmittel, die keine Protonen abgeben, eignen sich beispielsweise Pyridin, Benzol, Dimethylformamid, Tetrahydrofuran, Dioxan, Acetonitril und Hexamethylphosphoramid. Gegebenenfalls kann der Reaktion durch Verwendung eines tertiären Amins, z. B. Triäthylamin, Pyridin, Diisopropylmethylamin und Triäthylendiamin, als Katalysator ein vorteilhafter Verlauf gegeben werden. Diese Silylierungsreaktion wird bei etwa -50°C bis 200°C , vorzugsweise bei 0°C bis 150°C durchgeführt. Die erforderliche Menge des Silylierungsmittels ist nicht

größer als die Menge, die zum Schutz aller funktionellen Gruppen (z. B. Hydroxyl-, Amino- und Guanidiongruppen) der Ausgangsverbindung notwendig ist, jedoch kann das Silylierungsmittel auch im Überschuss verwendet werden.

Das erhaltene phosphorylierte und geschützte Aminoglykosid wird mit einem Halogenierungsmittel umgesetzt. Als Halogenierungsmittel eignen sich beispielsweise Halogensilane, z. B. Trialkylsilylhalogenide (z. B. Trimethylsilylchlorid, Dimethyl-tert.-butylsilylchlorid, Trimethylsilylbromid, Dimethyldichlorosilan und Trimethylsilyljodid), Triarylsilylhalogenide (z. B. Triphenylsilylchlorid), Arylalkylsilylhalogenide (z. B. Phenyldimethylsilylchlorid, Methyl-diphenylsilylchlorid), Trialkoxysilylhalogenide (z. B. Trimethoxysilylchlorid und Triäthoxysilylchlorid), Thionylchlorid, Pyridiniumchlorid, Pyridiniumbromid, Trimethoxymethylphosphoniumjodid, Phosphoroxychlorid, Phosphorthiooxychlorid, Phosphorpentachlorid, Oxalylchlorid und Phosphorpentabromid. Das Halogenierungsmittel und die durch die vorstehend beschriebene Reaktion erhaltene Verbindung können in äquimolaren Mengen verwendet werden, jedoch wird das Halogenierungsmittel im allgemeinen im Überschuss verwendet. Auch Gemische der Halogenierungsmittel können verwendet werden. Die Reaktion wird bei einer Temperatur von -50°C bis 200°C und zur Erzielung besserer Ergebnisse bei 80°C bis 150°C durchgeführt. Die Reaktion kann in Abwesenheit eines Lösungsmittels durchgeführt werden, jedoch kann gegebenenfalls ein Lösungsmittel, das keine Protonen abgibt, verwendet werden. Als Lösungsmittel, die keine Protonen abgeben, eignen sich beispielsweise Pyridin, Benzol, Dimethylformamid, Tetrahydrofuran, Dioxan, Hexamethylphosphoramid und Acetonitril. Die Reaktion verläuft glatter in Gegenwart eines Phosphins (z. B. eines Triarylphosphins (z. B. Triphenylphosphin), eines Trialkylphosphins (z. B. Tri-n-butylphosphin), eines Metallhalogenids (z. B. Zinkchlorid, Lithiumchlorid, Aluminiumchlorid, Bortrifluorid und Titanchlorid) oder eines Gemisches dieser Verbindungen. Von den genannten Halogenierungsmitteln sind die Halogensilane sowohl als Halogenierungsmittel als auch als Schutzmittel wirksam. Die Halogenierung verläuft sehr glatt, wenn das phosphorylierte Aminoglykosid die folgenden Strukturmerkmale hat:

- a) Die Phosphonoxgruppe ist an das sekundäre C-Atom gebunden;
- b) das C-Atom ist an ein C-Atom gebunden, das eine primäre oder sekundäre Aminogruppe aufweist, und
- c) die Aminogruppe und die Phosphonoxgruppe stehen in trans-Konfiguration zueinander.

Als typische Beispiele von phosphorylierten Aminoglykosiden sind Antibiotika vom Neomycintyp von Phosphonoxgruppen in 3'-Stellung, Antibiotika vom Kanamycintyp mit Phosphonoxgruppen in 3'- und/oder 2"-Stellung und Antibiotika vom Streptomycintyp mit Phosphonoxgruppen in 3"-Stellung zu nennen. Durch die Halogenierung werden halogenierte Aminoglykosid-Antibiotika mit folgenden Strukturmerkmalen erhalten:

- a) Das Halogenatom ist an ein sekundäres C-Atom gebunden;
- b) das Kohlenstoffatom ist an ein Kohlenstoffatom mit einer primären oder sekundären Aminogruppe gebunden. Als Halogen kommen Chlor, Brom, Fluor und Jod in Frage.

Die vorstehende Feststellung bezüglich der Halogenierung wurde erstmals von der Inhaberin getroffen und gilt auch für die Halogenierung aller Aminoglykosidverbindungen.

In der Stufe 1 des Verfahrens gemäß der Erfindung werden in der Reaktion der Stufe 1-A hauptsächlich Epiminodeaminodesoxyaminoglykoside gebildet, während in der Reaktion der Stufe 1-B hauptsächlich Halogenodesoxyaminoglykoside gebildet werden. Gegebenenfalls können diese Zwischenprodukte nach an sich bekannten üblichen Verfahren, z. B. durch Entsalzen mit

einem Ionenaustauschharz und Säulenchromatographie, gereinigt werden.

Die genannten Epiminodeaminodesoxyaminoglykoside und Halogenodesoxyaminoglykoside sind wertvolle Zwischenprodukte für Desoxyaminoglykoside und auch als Antibiotika wertvoll, die nicht nur gegen übliche Mikroorganismen, sondern auch gegen Mikroorganismen, die gegen Aminoglykosid-Antibiotika resistent sind, wirksam sind.

Nach der vorstehend beschriebenen Stufe 1 werden die erhaltenen Produkte der Reaktion der Stufe 2 unterworfen. Als Ausgangsmaterialien für die Stufe 2 können entweder Epiminodeaminodesoxyaminoglykoside oder Halogenodesoxyaminoglykoside oder gegebenenfalls Gemische dieser Verbindungen verwendet werden. Ferner kann das Ausgangsmaterial ausserdem eine Silylgruppe und/oder einen Acylrest, die in der Stufe 1 in das Molekül eingeführt worden sind, enthalten.

Stufe 2

Die Produkte der Stufe 1 werden dann der Reduktion unterworfen. Diese Reduktion kann in an sich bekannter Weise, z. B. als katalytische Reduktion, elektrolytische Reduktion, Reduktion unter Verwendung eines Reduktionsmittels und Reduktion unter Verwendung einer Grignard-Verbindung, durchgeführt werden.

Wenn die Reduktion als katalytische Reduktion, d. h. in Gegenwart eines Katalysators durchgeführt wird, kann wie folgt gearbeitet werden: Das Ausgangsmaterial wird zunächst in einem üblichen Lösungsmittel wie Wasser, Alkohol (z. B. Methanol, Äthanol und Isopropanol), Aceton, Dioxan, Tetrahydrofuran, Dimethylformamid oder ihren Gemischen gelöst. In die Lösung lässt man Wasserstoffgas in Gegenwart eines Katalysators (z. B. Raney-Nickel, Palladiumkohle, Palladiumbariumcarbonat, Platinoxid, Rhodiumkomplex, Raney-Kobalt, Raney-Eisen und Raney-Kupfer) perlen. Diese Reaktion wird bei einer Temperatur von -30°C bis 150°C , vorzugsweise bei Raumtemperatur bis 100°C , durchgeführt. Die Reaktion verläuft leicht bei Normaldruck, jedoch kann auch bei erhöhtem Druck zwischen 5 und 100 kg/cm^2 gearbeitet werden. Die Reaktion kann beschleunigt werden, und in Abhängigkeit von der Art des jeweiligen Ausgangsmaterials kann die Ausbeute an gewünschtem Produkt durch Zugabe einer geeigneten Base, z. B. Triäthylamin, Diäthylamin und Alkalihydroxid, gesteigert werden.

Bei Anwendung der elektrolytischen Reduktion wird das Ausgangsmaterial in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst, worauf nach dem üblichen Verfahren vorgegangen wird. Beispielsweise wird die Verbindung in einem Lösungsmittel, z. B. in Wasser, einem Alkohol (z. B. Methanol und Äthanol), Ammoniak und Dimethylformamid, gelöst, worauf die Reduktion unter Verwendung einer Elektrode mit niedriger Überspannung (z. B. Platin und Wolfram) oder einer Elektrode mit hoher Überspannung (z. B. Blei, Zink und Quecksilber) durchgeführt wird. Bessere Ergebnisse werden zuweilen erhalten wenn der pH-Wert der Lösung im sauren Bereich, z. B. auf einen Wert von 2 bis 3, eingestellt wird.

Wenn die Reduktion mit einem Reduktionsmittel vorgenommen wird, wird das Ausgangsmaterial mit einem Reduktionsmittel behandelt. Als Reduktionsmittel eignen sich beispielsweise Metallhydride (z. B. Lithiumaluminiumhydrid, Natriumaluminiumhydrid, Natriumborhydrid, Tributylzinnhydrid und Tributylzinkhydrid), Alkalimetalle (z. B. Lithium und Natrium), Metallsalze (z. B. zweiwertige Chromsalze wie Chrom(II)-chlorid und Chrom(II)-acetat), Zink, amalgamiertes Zink und Aluminiumamalgam. Die Reaktion wird in einem geeigneten Lösungsmittel, z. B. einem Alkohol wie Äthanol, Propanol, Isopropanol, Butanol, Amylalkohol und Isoamylalkohol oder einem Äther, z. B. Äthyläther, Dioxan und Tetrahydrofuran, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, Äthylenglykol, Äthylendiamin, Diäthylentriamin, Glyme und Diglyme bei einer Tempe-

ratur von -30°C bis 150°C , vorzugsweise bei Raumtemperatur bis 80°C , durchgeführt.

Bei Verwendung einer Grignard-Verbindung wird wie folgt gearbeitet: Das Ausgangsmaterial wird mit Magnesiummetall in einem für Grignard-Reaktionen üblicherweise verwendeten Lösungsmittel, z. B. Tetrahydrofuran, Äther oder Dioxan, behandelt und die gebildete Grignard-Verbindung mit Wasser, Methanol, Äthanol, n-Butanol oder dergleichen bei Raumtemperatur oder, falls erforderlich, unter Erhitzen zersetzt.

Durch die Silylierungsreaktion in der Stufe 1 wird eine Verbindung erhalten, deren Hydroxylgruppe, Aminogruppe und Guanidinogruppe gleichzeitig silyliert sind. Die Acylierungsreaktion in der Stufe 1 ergibt eine Verbindung, deren Hydroxylgruppe, Aminogruppe und Guanidinogruppe gleichzeitig acyliert worden sind. Diese Silyl- und Acylgruppen können in einer der folgenden Stufen, die beliebig gewählt werden können, entfernt werden. Die Entfernung der Silylgruppe kann durch Zusammenführen der Verbindung mit einem Protonendonator wie Wasser, einem Alkohol (z. B. Methylalkohol oder Äthylalkohol), einer Carbonsäure (z. B. Essigsäure oder Propionsäure), einer Sulfonsäure (z. B. p-Toluolsulfonsäure) oder durch Umsetzung der erhaltenen Verbindung mit einer Mineralsäure (z. B. Salzsäure oder Schwefelsäure) leicht erfolgen. Die Acylreste können durch Hydrolysieren des Produktes mit einem Katalysator in Form einer Säure, z. B. Salzsäure und Schwefelsäure, oder eines Alkalis, z. B. Natriumhydroxyd, Bariumhydroxyd und Kaliumhydroxyd, entfernt werden.

Einige der nach dem Verfahren gemäss der Erfindung herstellbaren Desoxyaminoglykosid-Antibiotika sind an sich bekannte Verbindungen, jedoch ist wenigstens die folgende Verbindung neu: 3'-Desoxyxylostasin, d. h. O- β -D-Xylofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 5)-O-[α -2,6-diamino-2,6-didesoxy-D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]-2-desoxystreptamin.

Die Abtrennung und Reinigung der gewünschten Desoxyaminoglykosid-Antibiotika können nach üblichen Verfahren, z. B. durch Extraktion, Ausfällung, Gefriertrocknung oder Säulenchromatographie an einem schwachsauren Ionenaustauscherharz erfolgen.

Die erfindungsgemäss erhältlichen Verbindungen können Säureadditionssalze durch Behandeln mit einer geeigneten Säure in üblicher Weise bilden. Als Säuren eignen sich beispielsweise anorganische Säuren, z. B. Salzsäure, Schwefelsäure, Salpetersäure und Phosphorsäure, und organische Säuren, z. B. Trifluoressigsäure und Weinsäure. Von diesen Säuren wird Schwefelsäure bevorzugt.

Die Epiminodeaminodesoxyaminoglykosid-, Halogendesoxyaminoglykosid- und Desoxyaminoglykosid-Antibiotika haben im wesentlichen die gleichen antibakteriellen Wirkungen wie die entsprechenden Aminoglykosid-Antibiotika. Ausserdem sind sie gegen Bakterien wirksam, die gegen die Aminoglykosid-Antibiotika resistent sind. Sie eignen sich daher zur Behandlung von Krankheiten, die durch diese Bakterien verursacht werden. Die gemäss der Erfindung hergestellten Antibiotika sind als Mittel zur Bekämpfung von Tuberkulose, Dysenterie, Staphylokokken und zur Behandlung von Krankheiten, die durch Pseudomonas oder Escherichia verursacht werden, geeignet.

Die Epiminodeaminodesoxyaminoglykosid-, Halogendesoxyaminoglykosid- und Desoxyaminoglykosid-Antibiotika werden gewöhnlich in Form von Tabletten, Injektionslösungen usw., zusammen mit pharmazeutisch unbedenklichen Trägern, in einer täglichen Routinedosis von 1 bis 30 mg/kg an Säugetiere, z. B. Mensch, Rind, Schwein oder Ratte, verabreicht. Beispielsweise wird 3'-Desoxybutirosin A in Form von Tabletten in einer täglichen Routinedosis von etwa 4 mg/kg und 3'-Desoxyxylostasin in Form einer Injektionslösung in einer Tagesdosis von etwa 20 mg/kg verabreicht.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele weiter erläutert. In diesen Beispielen verstehen sich die Teile als

Gewichtsteile, falls nicht anders angegeben. Hierbei verhält sich Gewichtsteil zu Raumteil wie Gramm zu Kubikzentimeter. Die Harze der Handelsbezeichnung «Amberlite» sind Produkte der Firma Rohm and Haas Company, Ltd., USA.

Bezugsbeispiel 1

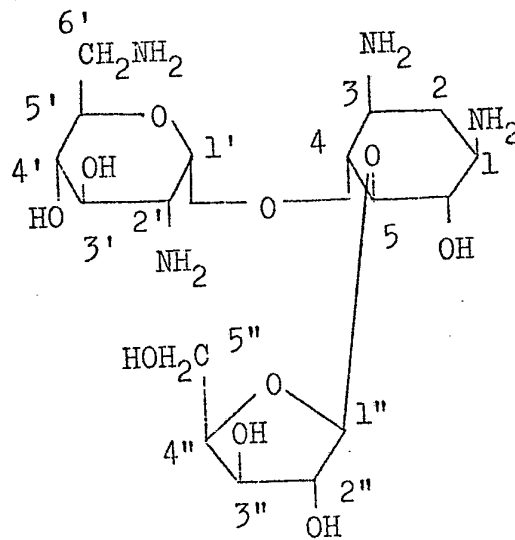
Herstellung von Xylostasin auf chemischem Wege

In 250 Raumteilen einer wässrigen 0,5n Bariumhydroxydlösung werden 5,0 Teile Butirosin A gelöst. Die Lösung wird 2 h am Rückfluss erhitzt und dann gekühlt. Die Lösung wird mit 1n Schwefelsäure neutralisiert. Das hierbei ausgefällte Bariumsulfat wird durch Zentrifugieren entfernt. Die überstehende Flüssigkeit wird auf eine Säule von 300 Raumteilen des Kationenaustauscherharzes «Amberlite CG-50» (NH_4^+ -Form) (Hersteller Rohm and Haas Co.) aufgegeben. Die Säule wird mit Wasser gewaschen und mit wässrigem 0,2n Ammoniak eluiert. Die Xylostasin enthaltenden Fraktionen, die durch Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden, werden zusammengegossen, unter vermindertem Druck zur Trockene eingengt und gefriertrocknet, wobei 3,8 Teile Xylostasin als weisses Pulver erhalten werden.

Elementaranalyse:

Gefunden:	C 44,23	H 7,53	N 12,10
Berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_{10}$:	C 44,93	H 7,54	N 12,33
Optische Drehung: $[\alpha]_D^{25} = +34^{\circ}$ (c = 1 in Wasser)			

Xylostasin hat die chemische Bezeichnung O- β -D-Xylofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 5)-O-[α -2,6-diamino-2,6-didesoxy-D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)]-2-desoxystreptamin und die folgende chemische Struktur:



Bezugsbeispiel 2

Phosphorylierung von Xylostasin

200 Raumteile eines wässrigen Impfkulturmediums (pH 7,2), das 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % Polypepton und 0,3 % Fleischextrakt enthält, wird mit Escherichia coli R11 (IFO-13560) geimpft. Die Kultivierung wird 16 h bei 37°C unter Schütteln durchgeführt. Mit dieser Impfkultur wird dann ein wässriges Hauptkulturmedium (1800 Raumteile, pH 7,2) geimpft, das die gleiche Zusammensetzung wie das Impfkulturmedium hat. Die Kultivierung wird 4 h bei 37°C unter Schütteln durchgeführt. Das Fermentationsmedium wird zentrifugiert, wobei 4,4 Teile nasse Zellen erhalten werden. Die Zellen werden in 17,6 Raumteilen eines 0,05-molaren Phosphatpuffers (pH 7,0) suspendiert.

Die Suspension wird der Einwirkung von Ultraschall unterworfen (Kaijo Denki Co., Ltd., T-A-4201, Typ 4280, 2A), um die Zellen zu zerreißen, worauf die Trümmer (unlösliche Materialien) durch Zentrifugieren entfernt werden. Hierbei werden 17 Raumteile einer rohen Enzymlösung erhalten.

Zu 17 Raumteilen der rohen Enzymlösung werden 5 Teile Xylostasin, 50 Raumteile eines 0,5-molaren Phosphatpuffers (pH 7,0), 100 Raumteile 1-molare Adenosintriphosphatlösung, 50 Raumteile einer 0,1-molaren Magnesiumacetatlösung und 50 Raumteile 0,1-molares 2-Mercaptoäthanol gegeben. Das Gemisch wird mit destilliertem Wasser auf 500 Raumteile aufgefüllt und dann 20 h der enzymatischen Reaktion bei 37°C unterworfen.

Das Reaktionsgemisch wird 5 min auf 80°C erhitzt, um die Reaktion zu beenden, und dann zentrifugiert. Der Überstand wird auf eine Säule von 900 Raumteilen des Kationenaustauscherharzes «Amberlite IRC-50» (NH_4^+ -Form) aufgegeben. Die Säule wird mit Wasser gewaschen und mit wässrigem 1n Ammoniak eluiert, wobei Fraktionen erhalten werden, die Xylostasin-3'-phosphat enthalten. Die Fraktionen werden vereinigt, eingengt und auf eine Säule von 150 Raumteilen des Kationenaustauscherharzes «Amberlite CG-50» (NH_4^+ -Form) aufgegeben.

Die Säule wird mit Wasser gewaschen und durch Elution mit linearen Gradienten mit 1200 Raumteilen destilliertem Wasser und 1200 Raumteilen wässrigem 0,2n Ammoniak fraktioniert. Die Fraktionen, die Xylostasin-3'-phosphat enthalten, werden aufgefangen, unter vermindertem Druck eingengt und gefriergetrocknet, wobei 4,4 Teile Xylostasin-3'-phosphatmonohydrat als weisses Pulver erhalten werden.

Elementaranalyse:

Berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_{13}$

P.H ₂ O:	C 36,96	H 6,75	N 10,14	P 5,61
Gefunden:	C 37,52	H 6,73	N 9,78	P 5,41
Optische Drehung: $[\alpha]_D^{24}$	= +40,0° (c = 0,60 in Wasser)			
IR $\gamma_{\text{max}}^{\text{KBr}}$	968 cm^{-1}			

Der Rf-Wert betrug 0,55 bei der Dünnschichtchromatographie unter Verwendung einer Kieselgel-Glasplatte (Merck, Art. 5721) in einem Lösungsmittelsystem, das 5 Raumteile obere Schicht aus CHCl_3 : CH_3OH :28%iges Ammoniak: H_2O (4:3:2:1) und 3 Raumteile Methanol enthielt, während der Rf-Wert für das als Vergleichsprobe verwendete freie Xylostasin 0,23 betrug.

Zur Ermittlung weiterer genauer Analysenwerte für das vorstehend genannte Produkt wurde es acetyliert, wobei Tetra-N-acetylxylostasin-3'-phosphatdihydrat erhalten wurde, das der Elementaranalyse unterworfen wurde.

Elementaranalyse:

Berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{N}_4$

$\text{O}_{17}\text{P} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:	C 40,65	H 6,41	N 7,59	P 4,19
Gefunden:	C 40,95	H 6,52	N 7,70	P 4,16

Bezugsbeispiel 3

Herstellung von Butirosin-A-3'-phosphat

100 Raumteile Peptonmedium [Trypticase Soy Broth; BBL (Division of Becton, Dickinson and Company, Cockysville, Maryland)] werden mit *Bacillus vitallinus* Z-1159 (IFO-13296) geimpft. Das Medium wird 48 h bei 28°C kultiviert. Die Impfkultur wird in 3900 Raumteile des genannten Peptonmediums überführt und die Kultur 17 h bei 37°C bebrütet. Das Fermentationsmedium wird zentrifugiert, wobei 23 Teile nasse Zellen erhalten werden.

Die nassen Zellen werden mit 46 Teilen Aluminiumoxyd zerrissen und in 138 Raumteilen eines 0,05-molaren Phosphatpuffers (pH 7,5) suspendiert. Die Suspension wird zentrifugiert, wobei 100 Raumteile einer rohen Enzymlösung erhalten werden.

Zu 100 Raumteilen der rohen Enzymlösung (Proteinmenge 16 mg/ml) werden 1 Teil Butirosin A, 100 Raumteile eines 0,5-molaren Phosphatpuffers (pH 7,5), 20 Raumteile einer 1-molaren wässrigen Magnesiumacetatlösung, 10 Raumteile einer 1-molaren wässrigen Lösung von 2-Mercaptoäthanol, 100 Raumteile einer 2-molaren wässrigen Lösung von Adenosintriphos-

phat (pH 7,0) gegeben. Das Gemisch wird mit destilliertem Wasser auf 1000 Raumteile aufgefüllt und 16 h bei 37°C stehen gelassen. Das Gemisch wird 5 min auf 80°C erhitzt, um die Reaktion zu beenden, worauf es zur Entfernung der Fällung 5 zentrifugiert wird.

Der in dieser Weise erhaltene Überstand wird auf eine Säule von 500 Raumteilen Aktivkohle, die vorher mit Alkali behandelt worden ist, aufgegeben. Die Säule wird mit destilliertem Wasser gewaschen und mit 0,1n Salzsäure eluiert. Die Fraktionen, die Butirosin-A-3'-phosphat enthalten, werden aufgefangen und mit 1000 Raumteilen des Anionenaustauscherharzes «Amberlite IR-45», OH-Form, zur Neutralisation versetzt. Das Harz wird abfiltriert und die Mutterlauge unter vermindertem Druck eingengt. Das Konzentrat wird auf eine Säule des Kationenaustauscherharzes «Amberlite CG-50», NH_4^+ -Form (200 Raumteile) aufgegeben. Die Säule wird mit destilliertem Wasser gewaschen und mit wässrigem 0,3n Ammoniak eluiert. Die Fraktionen, die Butirosin-A-3'-phosphat enthalten, werden aufgefangen und unter vermindertem Druck eingengt. Die unlöslichen Bestandteile werden abfiltriert und das Filtrat gefriergetrocknet, wobei 0,92 Teile eines weissen Pulvers (Butirosin-A-3'-phosphat) erhalten werden.

Elementaranalyse:

Berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{N}_5\text{O}_{15}$

P.2H ₂ O:	C 37,55	H 6,90	N 10,42	P 4,61
Gefunden:	C 37,73	H 6,81	N 10,09	P 4,51
Optische Drehung: $[\alpha]_D^{24}$	+29,5° (c = 0,61, in Wasser)			
IR: $\gamma_{\text{max}}^{\text{KBr}}$	1640, 973 cm^{-1}			

Bezugsbeispiel 4

Herstellung von Butirosin-B-3'-phosphat

2000 Raumteile eines wässrigen Nährmediums (pH 7,2), das 0,5 % Glycerin, 0,5 % Polypepton, 0,5 % Hefeextrakt und 0,3 % Fleischextrakt enthält, werden mit *Escherichia coli* R11 (IFO-13560) geimpft. Das Medium wird 18 h bei 37°C unter Belüftung bebrütet. Das Fermentationsmedium wird zentrifugiert, wobei 4,4 Teile nasse Zellen gewonnen werden. Die Zellen werden in 17,6 Raumteilen eines 0,05-molaren Phosphatpuffers (pH 7,0) suspendiert. Die Suspension wird der Ultraschalloszillierung unterworfen (Kaijo Denki Co., Ltd.; T-A-4201, Typ 4280, 2A), um die Zellen zu zerreißen, worauf die Trümmer (unlösliche Materialien) durch Zentrifugieren entfernt werden. Hierbei werden 17 Raumteile einer rohen Enzymlösung erhalten.

Zu 17 Raumteilen der rohen Enzymlösung werden 5 Teile Butirosin-B, 50 Raumteile eines 0,5-molaren Phosphatpuffers (pH 7,0), 100 Raumteile 1-molare Adenosintriphosphatlösung, 50 Raumteile einer 0,1-molaren Magnesiumacetatlösung und 50 Raumteile 0,1-molares 2-Mercaptoäthanol gegeben. Das Gemisch wird mit destilliertem Wasser auf 500 Raumteile aufgefüllt. Es wird dann 20 h der enzymatischen Reaktion bei 37°C unterworfen.

Das Reaktionsgemisch wird 5 min auf 80°C erhitzt, um die Reaktion zu beenden, und dann zentrifugiert. Der Überstand wird auf eine Säule von 100 Raumteilen des Kationenaustauscherharzes «Amberlite IRC-50», NH_4^+ -Form, aufgegeben. Die Säule wird mit Wasser gewaschen und dann mit wässrigem 1n Ammoniak eluiert, wobei Fraktionen erhalten werden, die Butirosin-B-3'-phosphat enthalten. Die Fraktionen werden aufgefangen und unter vermindertem Druck eingengt. Das Konzentrat wird auf eine Säule von 100 Raumteilen des Kationenaustauscherharzes Carboxymethyl-Sephadex C-25, NH_4^+ -Form, aufgegeben. Die Säule wird mit Wasser gewaschen und mit wässrigem 0,2n Ammoniak eluiert, wobei Fraktionen erhalten werden, die Butirosin-B-3'-phosphat enthalten. Die Fraktionen werden aufgefangen, eingengt und gefriergetrocknet, wobei 4,5 Teile Butirosin-B-3'-phosphat erhalten werden.

Elementaranalyse:

Berechnet für $C_{21}H_{42}N_5O_{15}$ P.2H₂O: C 37,55 H 6,90 N 10,42 P 4,61

Gefunden: C 37,60 H 6,91 N 10,40 P 4,78

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{24} +38,8^\circ$ (c = 1, in Wasser)IR $\gamma_{\max}^{KBr}$: 1640, 975 cm⁻¹

Bezugsbeispiel 5

Herstellung von Neomycin-A-3'-phosphat

Neomycin-A-3'-phosphat wird in ähnlicher Weise, wie in Bezugsbeispiel 4 beschrieben, hergestellt, indem die rohe Enzymlösung von Escherichia coli R11 (IFO-13560) auf Neomycin A zur Einwirkung gebracht wird.

Elementaranalyse:

Berechnet für

C₁₂H₂₆O₉N₄P·3H₂O: C 31,65 H 7,08 N 12,30 P 6,80

Gefunden: C 31,78 H 7,22 N 12,09 P 6,81

NMR (D₂O) δ: 3,14 (2-H), 4,01 (3'-H), 5,78 (1H, d, J = 4 Hz, 1-H)IR $\gamma_{\max}^{KBr}$: 965 cm⁻¹Optische Drehung: $[\alpha]_D^{27} +95,17^\circ$ (c = 1,01, in Wasser)

Bezugsbeispiel 6

Herstellung von Kanamycin-B-3'-phosphat

Kanamycin-B-3'-phosphat wird in ähnlicher Weise, wie in Bezugsbeispiel 4 beschrieben, hergestellt, wobei die rohe Enzymlösung von Escherichia coli R11 (IFO-13560) auf Kanamycin B zur Einwirkung gebracht wird.

Elementaranalyse:

Berechnet für

C₁₈H₃₈N₅O₁₃P·3H₂O: C 35,00 H 7,18 N 11,34 P 5,01

Gefunden: C 35,23 H 7,06 N 10,99 P 5,06

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{23} +108,6^\circ$ (c = 0,53, in Wasser)NMR (δ in D₂O): 4,36 (3'-H, Quartett), 5,18 (1"-H, Dublett), 5,78 (1'-H, Dublett)IR $\gamma_{\max}^{KBr}$: 970 cm⁻¹ (Phosphat)

Beispiel 1

1. Herstellung von 3'-Chlor-3'-desoxyxylostasin und 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxyxylostasin

Ein Gemisch von 0,1 Teilen Xylostasin-3'-phosphat, 1 Raumteil O,N-Bis-trimethylsilylacetamid und 1 Raumteil Trimethylchlorsilan wird 24 h bei 110°C gehalten. Nach der Reaktion wird das Trimethylchlorsilan unter vermindertem Druck abdestilliert, worauf 50 Raumteile Wasser und 30 Raumteile Methanol zugesetzt werden. Das Gemisch wird eine Stunde gerührt. Der pH-Wert des Gemisches wird mit Natriumhydrogencarbonat auf etwa 5 eingestellt. Das Methanol wird abdestilliert. Die erhaltene Lösung wird auf eine Säule von 10 Raumteilen des Kationenaustauscherharzes «Amberlite CG-50», NH₄⁺-Form, aufgegeben. Die Säule wird mit 50 Raumteilen Wasser gewaschen und dann nach der Methode des linearen Gradienten mit 150 Raumteilen Wasser und 150 Raumteilen wässrigem 0,2n Ammoniak fraktioniert, wobei jede Fraktion 5 Gew.-Teile wiegt.

Aus den Fraktionen 29 bis 34 wird 3'-Chlor-3'-desoxyxylostasindihydrat durch Einengen isoliert. Die Fraktionen 36 bis 45 werden aufgefangen und eingengt, wobei 0,07 Teile 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxyxylostasin erhalten werden.

a) Physikalisch-chemische Eigenschaften von 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxyxylostasin:

Elementaranalyse:

Berechnet für

C₁₇H₃₂N₄O₉·2H₂O: C 43,21 H 7,67 N 11,85

Gefunden: C 42,79 H 6,90 N 11,00

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{23} +44,3^\circ$ (c = 1,05, in Wasser)

Massenspektrum (gemessen als O-Trimethylsilyl-N-acetylderivat): m/e 949 (M⁺-15), 299

RF-Wert der Dünnschichtchromatographie:

Platte: Kieselgel-Glasplatte (Hersteller Merck & Co.):

5 Entwicklerlösungsmittelsysteme: Gemisch von (I) 5 Raumteilen oberer Schicht aus Chloroform-Methanol-17%iges wässriges Ammoniak-Wasser (4:3:2:1) und (II) 3 Raumteilen Methanol. 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxyxylostasin: 0,37 Xylostasin: 0,33

10 b) Physikalische und chemische Eigenschaften von 3'-Chlor-3'-desoxyxylostasindihydrat:

Elementaranalyse:

Berechnet für

C₁₇H₃₃N₄O₈Cl·2H₂O: C 40,12 H 7,33 N 11,01 Cl 6,97

Gefunden: C 40,08 H 7,29 N 10,73 Cl 6,55

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{24} = +29,7^\circ$ (c = 0,6, in Wasser)

Der Rf-Wert betrug 0,41 bei der Dünnschichtchromatographie unter Verwendung einer Kieselgel-Glasplatte (Art. 5721, Hersteller Merck & Co.) in einem Lösungsmittelsystem, das 5 Raumteile obere Schicht aus CHCl₃:CH₃OH: wässrigem Ammoniak: Wasser (4:3:2:1) und 3 Raumteile Methanol enthielt, während der Rf-Wert des als Vergleichsprobe verwendeten freien Xylostasins 0,23 betrug.

2. Herstellung von 3'-Desoxyxylostasin aus

2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxyxylostasin

In 20 Raumteilen Wasser werden 0,03 Teile 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxyxylostasin gelöst. Das Gemisch wird in Gegenwart von 0,35 Raumteilen Raney-Nickel gerührt, während Wasserstoffgas 6 h bei Raumtemperatur eingeführt wird. Nach der Reaktion wird das Raney-Nickel abfiltriert. Das Raney-Nickel wird mit wässrigem 1n Ammoniak gut gewaschen. Die Waschflüssigkeit wird dem Filtrat zugesetzt und das Gemisch auf etwa 20 Raumteile eingengt. Das Konzentrat wird auf eine Säule von 10 Raumteilen des Kationenaustauscherharzes «Amberlite CG-50», NH₄⁺-Form, aufgegeben. Die Säule wird mit 30 Raumteilen Wasser gewaschen und dann nach der Methode des linearen Gradienten mit 200 Raumteilen Wasser und 200 Raumteilen wässrigem Ammoniak fraktioniert, wobei jede Fraktion eine Grösse von 5 Raumteilen hat.

Aus den Fraktionen Nr. 43 bis 58 werden 0,019 Teile 3'-Desoxyxylostasin durch Einengen gewonnen:

45 Elementaranalyse:

Berechnet für

C₁₇H₃₄N₄O₉·H₂O: C 44,73 H 7,95 N 12,27

Gefunden: C 44,75 H 7,87 N 12,24

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{24} +28,0^\circ$ (c = 0,61, in Wasser)

Rf-Wert der Dünnschichtchromatographie:

Entwicklerlösungsmittelsystem: Gemisch von 1) 5 Raumteilen der oberen Schicht aus Chloroform-Methanol-wässrigem Ammoniak-Wasser (4:3:2:1) und 2) 3 Raumteilen Methanol. 3'-Desoxyxylostasin: 0,26

Xylostasin: 0,23

3. Herstellung von 3'-Desoxyxylostasin

aus einem Gemisch von 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxyxylostasin und 3'-Chlor-3'-desoxyxylostasin

Ein Gemisch von 0,1 Teilen 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxyxylostasin und 0,1 Teilen 3'-Chlor-3'-desoxyxylostasin wird der Reduktion in ähnlicher Weise, wie vorstehend in Beispiel 1-(2) beschrieben, unterworfen, wobei 0,13 Teile 3'-Desoxyxylostasin erhalten werden.

Beispiel 2

1. Herstellung von 3'-Chlor-3'-desoxybutirosin A und 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxybutirosin A

Ein Gemisch von 0,1 Teilen Butirosin-A-3'-phosphat, 1

Raumteil N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid, 1 Raumteil Trimethylchlorsilan und 1 Raumteil Pyridin wird 24 h bei 110°C gehalten und dann unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft. Dem Konzentrat werden 30 Raumteile Wasser und 10 Raumteile Methanol zugesetzt. Das Gemisch wird eine Stunde gerührt. Nach Einstellung des pH-Wertes auf etwa 5 wird das Gemisch unter vermindertem Druck auf etwa 30 Raumteile eingengt. Das Konzentrat wird auf eine Säule von 15 Raumteilen des Kationenaustauscherharzes «Amberlite IRC-50», NH_4^+ -Form, aufgegeben. Die Säule wird mit Wasser gewaschen und mit 200 Raumteilen wässrigem 2n Ammoniak eluiert. Das Eluat wird auf etwa 20 Raumteile eingengt. Das Konzentrat wird auf eine Säule von 10 Raumteilen des Kationenaustauscherharzes «Amberlite CG-50», NH_4^+ -Form, aufgegeben. Die Säule wird mit Wasser gewaschen, worauf nach der Methode des linearen Gradienten mit 200 Raumteilen wässrigem 0,1n Ammoniak und 200 Raumteilen wässrigem 0,6n Ammoniak fraktioniert wird. Jede Fraktion hat einen Umfang von 5 Gew.-Teilen.

Aus den Fraktionen Nr. 28 bis 31 wird 3'-Chlor-3'-desoxybutirosin A durch Einengen isoliert. Durch Einengen der Fraktionen Nr. 34 bis 41 werden 0,06 Teile 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxybutirosin A erhalten.

a) Physikalische und chemische Eigenschaften von 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxybutirosin A

Elementaranalyse:

Berechnet für

$\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_{11}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C 43,97 H 7,55 N 12,20

Gefunden: C 43,42 H 7,63 N 11,88

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{23} + 25,3^\circ$ ($c = 1,07$, in Wasser)

Rf-Wert bei der Dünnschichtchromatographie:

Platte: Kieselgel-Glasplatte (Hersteller Merck & Co.)

Entwicklerlösungsmittelsystem: Methanol-Wasser-15%ige

Natriumchloridlösung (9:1:5)

2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxybutirosin A: 0,44

Butirosin A: 0,08

b) Physikalische und chemische Eigenschaften von 3'-Chlor-3'-desoxybutirosin A

Elementaranalyse:

Berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$:

C 41,34 H 7,26 N 11,47 Cl 5,81

Gefunden: C 41,03 H 7,31 N 11,21 Cl 5,60

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{23} + 21,3^\circ$ ($c = 0,75$, in Wasser)

Rf-Wert bei der Dünnschichtchromatographie:

Platte: Kieselgel-Glasplatte (Hersteller Merck & Co.)

Entwickler-Lösungsmittelsystem: obere Schicht aus Chloroform-Methanol-17%igem wässrigem Ammoniak-Wasser

(4:3:2:1)

3'-Chlor-3'-desoxybutirosin A: 0,41

Butirosin A: 0,31

2. Herstellung von 3'-Desoxybutirosin A

aus 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxybutirosin A

In 20 Raumteilen Wasser werden 0,06 Teile 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxybutirosin A gelöst. Das Gemisch wird in Gegenwart von 1,5 Raumteilen Raney-Nickel 4,5 h bei 60°C gerührt, während Wasserstoffgas eingeführt wird. Nach der Reaktion wird das Raney-Nickel abfiltriert. Das Raney-Nickel wird mit wässrigem 1n Ammoniak gut gewaschen und die Waschflüssigkeit wird dem Filtrat zugegeben. Das Gemisch wird auf etwa 50 Raumteile eingengt. Das Konzentrat wird auf eine Säule von 40 Raumteilen des Kationenaustauscherharzes «Amberlite CG-50», NH_4^+ -Form, aufgegeben. Die Säule wird mit 150 Raumteilen Wasser gewaschen, worauf nach der Methode des linearen Gradienten mit 750 Raumteilen Wasser und 750 Raumteilen wässrigem 1,0n Ammoniak fraktioniert

wird, wobei jede Fraktion einen Umfang von 15 Teilen hat. Aus den Fraktionen Nr. 50 bis 71 werden 0,042 Teile 3'-Desoxybutirosin A durch Einengen isoliert.

Elementaranalyse:

Berechnet für

$\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_{11}\cdot \text{H}_2\text{O}$: C 45,23 H 7,77 N 12,55

Gefunden: C 44,98 H 7,57 N 12,37

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{24} + 24,4^\circ$ ($c = 1,0$, in Wasser)

IR-Spektrum (KBr): 3370, 2935, 1650, 1580, 1345, 1100, 1026

Rf-Wert bei der Dünnschichtchromatographie:

Platte: Kieselgel-Glasplatte (Hersteller Merck & Co.)

Entwickler-Lösungsmittel: obere Schicht aus Chloroform:

Methanol: 17%iges wässriges Ammoniak: Wasser (4:3:2:1)

3'-Desoxybutirosin A: 0,32

Butirosin A: 0,31

3. Herstellung von 3'-Desoxybutirosin A aus einem Gemisch von 2',3'-Epimino-2'-diamino-3'-desoxybutirosin A und 3'-Chlor-3'-desoxybutirosin A

Ein Gemisch von 0,05 Teilen 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxybutirosin A und 0,05 Teilen 3'-Chlor-3'-desoxybutirosin A wird in ähnlicher Weise, wie in Beispiel 2-(2) beschrieben, der Reduktion unterworfen, wobei 0,07 Teile 3'-Desoxybutirosin A erhalten werden.

Beispiel 3

Herstellung von 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxybutirosin A

Ein Gemisch von 0,05 Teilen Butirosin-A-3'-phosphat, 0,5 Raumteilen O,N-Bis(trimethylsilyl)acetamid und 0,5 Raumteilen Hexamethylphosphorsäuretriamid wird auf die in Beispiel 2 beschriebene Weise behandelt, wobei 0,012 Teile der gewünschten Verbindung erhalten werden.

Beispiel 4

1. Herstellung von 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxybutirosin B und 3'-Chlor-3'-desoxybutirosin B

Ein Gemisch von 0,3 Teilen Butirosin B-3'-phosphat, 3 Raumteilen Bis(trimethyl)silylacetamid, 0,6 Raumteilen Trimethylchlorsilan, 0,6 Raumteilen Pyridin und 0,09 Teilen Triphenylphosphin wird 30 h bei 110°C gehalten. Nach dem Abkühlen wird das Reaktionsgemisch unter vermindertem Druck eingengt. Zum Rückstand wird Methanol gegeben, um die Silylgruppen freizusetzen. Die Methanollösung wird unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft. Zum Rückstand werden 40 Raumteile Wasser gegeben. Die wässrige Lösung wird zweimal mit 60 Raumteilen Äthylacetat extrahiert. Die wässrige Schicht wird auf eine Säule von 30 Raumteilen des Kationenaustauscherharzes «Amberlite CG-50», NH_4^+ -Form, gegeben. Die Säule wird mit Wasser gewaschen und dann nach der Methode des linearen Gradienten mit 450 Raumteilen wässrigem 0,5n Ammoniak und 450 Raumteilen wässrigem 0,5n Ammoniak fraktioniert. Jede Fraktion hat einen Umfang von 1 Gew.-Teil.

Aus den Fraktionen Nr. 43 bis 47 wird 3'-Chlor-3'-desoxybutirosin B durch Einengen isoliert. Durch Einengen der Fraktionen 54 bis 62 werden 0,21 Teile 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxybutirosin B erhalten.

a) Physikalische und chemische Eigenschaften von 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxybutirosin B

Elementaranalyse:

Berechnet für

$\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_{11}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C 43,97 H 7,55 N 12,20

Gefunden: C 43,51 H 7,29 N 12,33

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{24} + 36,9^\circ$ ($c = 1,0$, in Wasser)

Rf-Wert bei der Dünnschichtchromatographie:

Platte: Kieselgel-Glasplatte (Hersteller Merck & Co.)

Entwickler Lösungsmittelsystem: 15%ige wässrige Lösung von Natriumchlorid-Methanol (5:3)
 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxybutirosin B: 0,68
 Butirosin B: 0,32

b) Physikalische und chemische Eigenschaften
 von 3'-Chlor-3'-desoxybutirosin B

Elementaranalyse:

Berechnet für $C_{21}H_{40}N_5O_{11}Cl \cdot 2H_2O$:

C 41,34 H 7,26 N 11,47 Cl 5,81
 Gefunden: C 40,98 H 7,15 N 11,31 Cl 5,71

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{25} +30,4^\circ$ ($c = 0,7$, in Wasser)

Rf-Wert bei der Dünnschichtchromatographie:

Platte: Kieselgel-Glasplatte (Hersteller Merck & Co.)

Entwickler Lösungsmittelsystem: 15%ige wässrige Lösung von Natriumchlorid-Methanol (5:3)

3'-Chlor-3'-desoxybutirosin B: 0,49

Butirosin B: 0,32

2. Herstellung von 3'-Desoxybutirosin B

aus 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxybutirosin B

In 300 Raumteilen Wasser werden 2 Teile 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxybutirosin B gelöst. Das Gemisch wird in Gegenwart von 10 Teilen Raney-Nickel 7 h bei $40^\circ C$ und Normaldruck gerührt, während Wasserstoffgas eingeführt wird. Nach der Reaktion wird das Raney-Nickel abfiltriert. Das Raney-Nickel wird mit 1000 Raumteilen wässrigem 1n Ammoniak gut gewaschen. Die Waschflüssigkeit wird dem Filtrat zugesetzt und das Gemisch auf etwa 500 Raumteile eingengt. Das Konzentrat wird auf eine Säule von 250 Raumteilen des Kationenaustauscherharzes «Amberlite CG-50», NH_4^+ -Form, aufgegeben. Die Säule wird mit 500 Raumteilen Wasser gewaschen und nach der Methode des linearen Gradienten mit 1200 Raumteilen wässrigem 0,3n Ammoniak und 1200 Raumteilen wässrigem 0,7n Ammoniak fraktioniert, wobei jede Fraktion einen Umfang von 16 Gew.-Teilen hat. Durch Einengen der Fraktionen Nr. 113 bis 134 werden 1,2 Teile 3'-Desoxybutirosin B erhalten.

Elementaranalyse:

Berechnet für

$C_{21}H_{41}N_5O_{11} \cdot H_2O$: C 45,23 H 7,77 N 12,55

Gefunden: C 45,62 H 7,92 N 12,22

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{24} +35^\circ$ ($c = 1$, in Wasser)

3. Herstellung von 3'-Desoxybutirosin B

aus 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxybutirosin B
 und 3'-Chlor-3'-desoxybutirosin B

Ein Gemisch von 1 Teil 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxybutirosin B und 1 Teil 3'-Chlor-3'-desoxybutirosin B wird in ähnlicher Weise, wie in Beispiel 4-(2) beschrieben, der Reduktion unterworfen, wobei 1,4 Teile 3'-Desoxybutirosin B erhalten werden.

Beispiel 5

1. Herstellung von 3'-Chlor-3'-desoxybutirosin A

Ein Gemisch von 1 Teil Butirosin A-3'-phosphat, 10 Raumteilen N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid und 5 Raumteilen Trimethylchlorsilan wird 24 h bei $110^\circ C$ gehalten. Nach der Reaktion wird das Reaktionsgemisch gekühlt und das Trimethylchlorsilan abgedampft. Dem Rückstand werden 100 Raumteile Wasser und 50 Raumteile Methanol zugesetzt. Das Gemisch wird 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wird mit $NaHCO_3$ auf einen pH-Wert von etwa 5,5 eingestellt und zur Entfernung des Methanols unter vermindertem Druck eingengt. Das Konzentrat wird auf eine Säule von 100 Raumteilen des Kationenaustauscherharzes «Amberlite IRC-50», NH_4^+ -Form, aufgegeben. Die Säule wird mit 500 Raumteilen Wasser gewaschen und dann mit

500 Raumteilen wässrigem 1n Ammoniak eluiert. Das Eluat wird unter vermindertem Druck auf etwa 50 Raumteile eingengt. Das Konzentrat wird auf eine Säule von 40 Raumteilen des Kationenaustauscherharzes «Amberlite CG-50», NH_4^+ -Form, aufgegeben. Die Säule wird nach der Methode des linearen Gradienten mit 600 Raumteilen Wasser und 600 Raumteilen wässrigem 0,5n Ammoniak fraktioniert, wobei jede Fraktion 10 Gew.-Teile wiegt. Aus den Fraktionen Nr. 55 bis 68 werden durch Einengen 0,22 Teile 3'-Chlor-3'-desoxybutirosin A erhalten.

Elementaranalyse:

Berechnet für $C_{21}H_{40}N_5O_{11}Cl \cdot 2H_2O$:

C 41,34 H 7,26 N 11,47 Cl 5,81

Gefunden: C 41,03 H 7,31 N 11,21 Cl 5,60

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{23} +21,3^\circ$ ($c = 0,75$, in Wasser)

Rf-Wert bei der Dünnschichtchromatographie:

Platte: Kieselgel-Glasplatte (Hersteller Merck & Co.)

Entwickler-Lösungsmittelsystem: obere Schicht aus Chloroform-Methanol-17%igem wässrigem Ammoniak-Wasser (4:3:2:1)

3'-Chlor-3'-desoxybutirosin A: 0,41

Butirosin A: 0,31

2. Herstellung von 3'-Desoxybutirosin A
 aus 3'-Chlor-3'-desoxybutirosin A

In 0,05 Raumteilen Triäthylamin und 10 Raumteilen H_2O

werden 0,1 Teil 3'-Chlor-3'-desoxybutirosin A gelöst. Das Gemisch wird in Gegenwart von 1 Raumteil Raney-Nickel 4,5 h bei Raumtemperatur gerührt, während Wasserstoffgas bei Normaldruck eingeführt wird. Nach der Reaktion wird das Raney-Nickel abfiltriert. Das Raney-Nickel wird mit 100 Raumteilen wässrigem 1n Ammoniak gut gewaschen. Die Waschflüssigkeit wird dem Filtrat zugesetzt. Das Gemisch wird unter vermindertem Druck auf etwa 20 Raumteile eingengt.

Das Konzentrat wird auf eine Säule von 40 Raumteilen des Kationenaustauscherharzes «Amberlite CG-50», NH_4^+ -Form, aufgegeben. Die Säule wird mit 500 Raumteilen Wasser gewaschen und nach der Methode des linearen Gradienten mit 600 Raumteilen wässrigem 0,3n Ammoniak und 600 Raumteilen wässrigem 1n Ammoniak fraktioniert, wobei jede Fraktion einen Umfang von 10 Gew.-Teilen hat. Durch Einengen und Gefrier-trocknen der Fraktionen Nr. 48 bis 70 werden 0,063 Teile 3'-Desoxybutirosin A erhalten.

Elementaranalyse:

Berechnet für

$C_{21}H_{41}N_5O_{11} \cdot H_2O$: C 45,23 H 7,77 N 12,55

Gefunden: C 44,98 H 7,57 N 12,37

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{24} +24,4^\circ$ ($c = 1,0$, in Wasser)

IR-Spektrum (KBr): 3370, 2935, 1650, 1580, 1345, 1100, 1026

Rf-Wert bei der Dünnschichtchromatographie:

Platte: Kieselgel G-Glasplatte (Hersteller Merck & Co.)

Entwickler Lösungsmittelsystem: obere Schicht aus Chloroform-Methanol-17%igem wässrigem Ammoniak-Wasser (4:3:2:1)

3'-Desoxybutirosin A: 0,32

Butirosin A: 0,31

Beispiel 6

1. Herstellung von 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxyneomycin A

Eine Lösung von 3 Teilen Neomycin A-3'-phosphat, 30 Raumteilen Hexamethyldisilazan und 30 Raumteilen Hexamethylphosphorsäuretriamid wird 66 h bei $120^\circ C$ gehalten. Nach dem Abkühlen werden 100 Raumteile Wasser zugesetzt. Das Gemisch wird mit Essigsäure auf einen pH-Wert von etwa 5,0 eingestellt und eine Stunde gerührt. Die erhaltene Lösung wird

auf eine Säule von 150 Raumteilen des Kationenaustauscherharzes «Amberlite CG-50», NH_4^+ -Form, aufgegeben. Die Säule wird mit 500 Raumteilen Wasser gewaschen und nach der Methode des linearen Gradienten mit 1200 Raumteilen Wasser und 1200 Raumteilen wässrigem 0,3n Ammoniak und dann mit wässrigem 0,3n Ammoniak fraktioniert. Jede Fraktion hat einen Umfang von 12 Gew.-Teilen. Durch Einengen der Fraktionen Nr. 180 bis 280 werden 1,05 Teile der gewünschten Verbindung erhalten.

Physikalische und chemische Eigenschaften von 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxyneomycin A:

Rf-Wert bei der Dünnschichtchromatographie:

Platte: Kieselgel-Glasplatte (Hersteller Merck & Co.)

Entwickler Lösungsmittel: obere Schicht aus Chloroform-Methanol-wässrigem Ammoniak-Wasser (4:3:2:1)-Methanol (5:3)

2',3'-Epimino-2'-desamino-3'-desoxyneomycin A: 0,27

Neomycin A: 0,30

Massenspektrum (gemessen als O-Trimethylsilyl, N-Acetylderivat) m/e 673 ($\text{M}^+ - 15$)

2. Herstellung von 3'-Desoxyneomycin A

aus 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxyneomycin A

In 50 Raumteilen Wasser werden 0,3 Teile 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxyneomycin A gelöst. Das Gemisch wird in Gegenwart von 3 Raumteilen Raney-Nickel 5 h bei 60°C gerührt, während Wasserstoffgas bei einem Druck von 100 kg/cm² eingeführt wird. Nach der Reaktion wird das Raney-Nickel abfiltriert. Das Raney-Nickel wird mit 100 Raumteilen wässrigem 1n Ammoniak gut gewaschen und die Waschflüssigkeit zum Filtrat gegeben. Das Gemisch wird auf etwa 50 Raumteile eingengt. Das Konzentrat wird mit Salzsäure auf einen pH-Wert von etwa 5,0 eingestellt und das Gemisch auf eine Säule von 40 Raumteilen des Kationenaustauscherharzes «Amberlite CG-50», NH_4^+ -Form, aufgegeben.

Die Säule wird mit 100 Raumteilen Wasser gewaschen und nach der Methode des linearen Gradienten mit 300 Raumteilen wässrigem 0,4n Ammoniak und 300 Raumteilen wässrigem 0,6n Ammoniak fraktioniert, wobei jede Fraktion 10 Gew.-Teile ausmacht. Aus den Fraktionen Nr. 23 bis 39 werden 0,17 Teile 3'-Desoxyneomycin A erhalten.

Physikalische und chemische Eigenschaften von 3'-Desoxyneomycin A:

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{25} +75,6^\circ$ ($c = 0,94$, in Wasser)

Massenspektrum (gemessen als O-Trimethylsilyl, N-Acetylderivat): 690 (M^+), 675 ($\text{M}^+ - 15$), 301

Rf-Wert bei der Dünnschichtchromatographie:

Platte: Kieselgel-Glasplatte (Hersteller Merck & Co.)

Entwickler Lösungsmittel: obere Schicht aus [Chloroform-Methanol-wässriges Ammoniak-Wasser (4:3:2:1)]-Methanol (5:3)

3'-Desoxyneomycin A: 0,38

Neomycin A: 0,30

Beispiel 7

1. Herstellung von 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxykanamycin B

Eine Lösung von 1 Teil Kanamycin B-3'-phosphat, 10 Raumteilen Bis(trimethylsilyl)acetamid, 2 Raumteilen Trimethylchlorosilan und 0,4 Teilen Triphenylphosphin wird 30 h bei 115°C gehalten. Nach der Abkühlung wird das Reaktionsgemisch unter vermindertem Druck eingengt. Zum Konzentrat werden 100 Raumteile Methanol und 50 Raumteile Wasser gegeben. Das Gemisch wird eine Stunde gerührt. Das Methanol wird abdestilliert und der in Äthylacetat lösliche Teil entfernt. Die wässrige Schicht wird auf eine Säule von 60 Raumteilen des Kationenaus-

tauscherharzes «Amberlite CG-50», NH_4^+ -Form, aufgegeben. Die Säule wird mit 200 Raumteilen Wasser gewaschen und nach der Methode des linearen Gradienten mit 600 Raumteilen Wasser und 600 Raumteilen wässrigem 0,5n Ammoniak fraktioniert, wobei jede Fraktion 10 Gew.-Teile ausmacht.

Aus den Fraktionen Nr. 24 bis 34 wird 3'-Chlor-3'-desoxykanamycin B durch Einengen isoliert. Durch Einengen der Fraktionen Nr. 55 bis 80 werden 0,61 Teile 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxykanamycin B erhalten.

10

a) Physikalische und chemische Eigenschaften von 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxykanamycin B:

Rf-Wert bei der Dünnschichtchromatographie:

Platte: Kieselgel-Glasplatte (Hersteller Merck & Co.)

15 Entwicklerlösungsmittel: obere Schicht aus Chloroform-Methanol-17%igem wässrigem Ammoniak (2:1:1)

2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxykanamycin B: 0,70

Kanamycin B: 0,78

20

b) Physikalische und chemische Eigenschaften von 3'-Chlor-3'-desoxykanamycin B:

Rf-Wert bei der Dünnschichtchromatographie:

Platte: Kieselgel-Glasplatte (Hersteller Merck & Co.)

25 Entwicklerlösungsmittel: obere Schicht aus [Chloroform-Methanol-Wasser-wässrigem Ammoniak (2,0:1,5:0,5:1,0)]-Methanol (1:1)

3'-Chlor-3'-desoxykanamycin B: 0,55

Kanamycin B: 0,39

30

2. Herstellung von 3'-Desoxykanamycin B

aus 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxykanamycin B

In 40 Raumteilen Wasser werden 0,6 Teile 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxykanamycin B gelöst. In Gegenwart von 9

35 Raumteilen Raney-Nickel wird das Gemisch 6 h bei 60°C gerührt, während Wasserstoffgas bei einem Druck von 100 kg/cm² eingeführt wird. Nach der Reaktion wird das Raney-Nickel abfiltriert. Das Raney-Nickel wird mit 300 Raumteilen wässrigem 1n Ammoniak gut gewaschen. Die Waschflüssigkeit wird

40 dem Filtrat zugesetzt. Das Gemisch wird auf etwa 100 Raumteile eingengt. Die ausgefällten unlöslichen Bestandteile werden abfiltriert. Der Überstand wird mit Salzsäure auf einen pH-Wert von etwa 5,0 eingestellt. Das Gemisch wird auf eine Säule von 50 ml des Kationenaustauscherharzes «Amberlite CG-50», NH_4^+ -Form, aufgegeben.

45 Die Säule wird mit 150 Raumteilen Wasser gut gewaschen und nach der Methode des linearen Gradienten mit 1400 Raumteilen Wasser und 1400 Raumteilen wässrigem 0,3n Ammoniak fraktioniert, wobei jede Fraktion 14 Gew.-Teile ausmacht. Aus den Fraktionen Nr. 146 bis 162 werden 0,30 Teile 3'-Desoxykanamycin B erhalten.

Elementaranalyse:

Berechnet für

$\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_9 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C 42,93 H 8,20 N 13,90

55 Gefunden: C 42,11 H 8,04 N 13,05

Optische Drehung: $[\alpha]_D^{25} +123,2^\circ$ ($c = 1,085$, in Wasser)

Rf-Wert bei der Dünnschichtchromatographie:

Platte: Kieselgel-Glasplatte (Hersteller Merck & Co.)

60 Entwicklerlösungsmittel: obere Schicht aus Chloroform-Methanol-17%igem wässrigem Ammoniak (2:1:1)

3'-Desoxykanamycin B: 0,74

3'-Chlor-3'-desoxykanamycin B: 0,78

3. Herstellung von 3'-Desoxykanamycin B aus einem Gemisch von 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxykanamycin B und 3'-Chlor-3'-desoxykanamycin B

Ein Gemisch von 0,5 Teilen 2',3'-Epimino-2'-deamino-3'-desoxykanamycin B und 0,5 Teilen 3'-Chlor-3'-desoxykanamycin B

cin B wird in ähnlicher Weise, wie in Beispiel 7-(2) beschrieben, der Reduktion unterworfen, wobei 0,65 Teile 3'-Desoxykanamycin B erhalten werden.

Beispiel 8

Eine Lösung von 0,5 Gew.-Teilen 3'-Desoxy-3'-chlorbutirosin A in 15 Volumenteilen Phosphorsäure-hexamethyltriämid wird tropfenweise bei Raumtemperatur in eine dunkelblaue Lösung von 150 Gew.-Teilen metallischen Lithium in 15 Vol.-Teilen Phosphorsäure-hexamethyltriämid, 5 Vol.-Teilen Tetrahydrofuran und 1 Vol.-Teil tert.-Butanol zugegeben. Nach Abschluss der Zugabe wird die Lösung während 30 min gerührt,

hierauf in Wasser gegossen und der pH-Wert des Gemisches wird auf 6 eingestellt. Durch Versetzen mit Chloroform, Ausschütteln und Abtrennen der Chloroformphase wird das Phosphorsäure-hexamethyltriämid entfernt und die wässrige Lösung wird einer Ionenaustauschchromatographie auf einer Säule von 10 Vol.-Teilen Amberlite IRC-50 in der NH_4^+ -Form unterworfen. Die Säule wird zuerst mit 100 Vol.-Teilen 0,2-normaler wässriger Ammoniaklösung und dann mit 0,5-normaler wässriger Ammoniaklösung eluiert. Die den Fraktionen 14 bis 23 entsprechenden Lösungen (10 Vol.-Teile/Röhrchen) werden vereinigt, eingengt und lyophilisiert, wobei 0,250 Gew.-Teile 3'-Desoxybutirosin A erhalten werden.