



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 2632/77

(51) Int.Cl.5

C 07 H 15/236

(22) Indleveringsdag: 14 jun 1977

C 07 H 15/238

(41) Alm. tilgængelig: 18 dec 1977

(44) Fremlagt: 30 nov 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 17 jun 1976 US 697297

(71) Ansøger: *SCHERICO LTD.; Toepferstrasse 5; Luzern, CH

(72) Opfinder: Tattanahalli Lakshminarayan *Nagabhushan; US, Alan *Cooper; US, William Nelson *Turner; US

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Fremgangsmåde til selektiv blokering af aminogrupeer i aminocyclitolaminoglycosider samt selektivt aminoblokerede aminocyclitolaminoglycosider, der kan fremstilles ved fremgangsmåden, til anvendelse som mellemprodukter ved fremstilling af 1-N-substituerede derivater af 4,6-di-O-)aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler

(56) Fremdragne publikationer

GB off.g.skrift nr. 1426908

SE freml.skrift. nr. 424994

US pat. nr. 4002742, 3939143

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til selektiv blokering af aminogruupper med acyl-beskyttelsesgrupper Y i aminocyclitolaminoglycosider, hvori mindst én af aminogruupperne udviser en tilgængelig, nabostillet hydroxygruppe, og hvori mindst én af aminogruupperne ikke har nogen tilgængelig, nabostillet hydroxygruppe eller mindst en af aminogruupperne er sterisk mindre tilgængelig for en sådan. Opfindelsen angår endvidere visse selektivt aminoblokerede aminocyclitolaminoglycosider, der kan fremstilles ved en sådan fremgangsmåde og som er egnede mellemprodukter for fremstilling af en række nyttige 1-N-substituerede derivater af 4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler.

Ved gennemførelse af visse kemiske omdannelser hos en polyamino-organisk forbindelse, navnlig sådanne på området for carbonhydrater og aminocyclitol-aminoglycosider, er det for at opnå gode udbytter af et ønsket produkt nødvendigt først at fremstille derivater af aminofunktioner i molekylet med "blokerende" eller "be-

skyttende" grupper for at hindre aminofunktionerne i at indgå i konkurrerende reaktioner med de anvendte reagenser. Almindeligt benyttede blokerende grupper er blokerende acylgrupper, der let bindes til aminogrupeer og kan fjernes, efter at den ønskede omdannelse er fuldendt, men som er stabile under de reaktionsbetingelser, der skal anvendes.

Kemiske omdannelser i en polyamino-organisk forbindelse, hvori reaktionsstedet skal være én af aminofunktionerne, gennemføres ideelt på mellemprodukter, hvor enhver anden aminofunktion er beskyttet selektivt med en blokerende gruppe. I modsat fald dannes blandinger af forskellige mono-N- og poly-N-derivater, der kræver besværlig opdelingsteknik (sædvanligvis chromatografi eller flere chromatografiprocesser) for at isolere det ønskede omdannelsesprodukt. Det er imidlertid ikke altid muligt ved på området kendte metoder at fremstille det ideelle, selektivt blokerede mellemprodukt, hvorfor der, med ubeskyttede aminogrupeer, kun opnås lave udbytter af det ønskede omdannelsesprodukt.

Når en polyamino-organisk forbindelse indeholder aminofunktioner med forskellig reaktivitetsgrad, der skyldes enten steriske faktorer og/eller den primære og/eller sekundære og/eller tertiære natur af aminogrupeerne, er det undertiden muligt, omend i moderate til lave udbytter, selektivt at beskytte nogle aminofunktioner, mens andre aminofunktioner lades ubeskyttede, ved hvilke en ønsket reaktion kan finde sted. Sådanne metoder indebærer sædvanligvis flertrins-omdannelser, der kræver isolering og rensning af hvert mellemprodukt. Det er ofte umuligt at beskytte alle andre aminofunktioner end den ene, for hvilken der ønskes en omdannelse, som for eksempel når to aminofunktioner har samme reaktivitet, således at i bedste tilfælde kun nogle aminofunktioner blokeres, hvilket begrænser antallet af produkter dannet ved en given reaktion, men stadig giver anledning til en blanding af produkter med deraf følgende ringe udbytter af ønskede produkter, der kun med vanskelighed kan isoleres og renses.

Gennem den foreliggende opfindelse er det nu muligt let og i gode udbytter at fremstille selektivt blokerede aminoderivater af aminocyclitolaminoglycosider, hvori mindst én aminofunktion har en tilgængelig nabostillet hydroxygruppe. Opfindelsen betyder, at det nu er muligt let og i gode udbytter at fremstille N-acylerede derivater, som det hidtil har været umuligt at fremstille, eller som hidtil kun har kunnet fremstilles i små mængder. Endvidere er det fremstillede selektivt N-acylerede aminocyclitolaminoglycosid af tilstrækkelig renhed og forudsigeligt udbytte til at tillade yderligere reaktioner at blive gennemført uden isolering af det N-acylerede aminocyclitolaminoglycosid.

Forud for den foreliggende opfindelse var komplekser af salte af divalent overgangsmetal med par af nabostillede amino- og hydroxy-grupper ukendte. Den kendte teknik postulerer (Bull. Chem. Soc. Japan, Vol. 39, nr. 6, 1235-1248 (1966))

forekomsten af cupraammonium-komplekser mellem aminer på et chiralt center og nærtbeliggende vicinale hydroxygrupper på et chiralt center in situ i fortyndede vandige ammoniakopløsninger, hvilke cupra-ammonium-komplekser anvendes til undersøgelser af optisk rotation som et analytisk redskab ved bestemmelse af det absolute rumlige forhold mellem vicinale amino/hydroxy-gruppepar.

Det har nu vist sig, at komplekser af salt af divalent overgangsmetal med par af nabostillede amino/hydroxy-grupper (hvor amino- og hydroxy-grupperne eventuelt kan være vicinale eller eventuelt kan foreligge på chirale centre) kan dannes og yderligere kan dannes i et organisk opløsningsmiddel med en minimal mængde af divalent overgangsmetalion, uden at det er nødvendigt at anvende ammoniumhydroxid til dannelse af en overgangsmetal-ammoniumion (f.eks. cupraammoniumion). Det har også vist sig, at (aminocyclitolaminoglycosid)-overgangsmetalsalt-komplekserne ifølge den foreliggende opfindelse vil bevares under acylerende reaktionsbetingelser, der omdanner en fri aminogruppe til et N-acyleret derivat deraf, og yderligere at overgangsmetalsalt-komplekserne fremstillet ifølge opfindelsen vil hindre de kompleksbundne amino/hydroxy-grupper i at indgå i reaktionen.

I overensstemmelse hermed er fremgangsmåden ifølge opfindelsen ejendommelig ved, at en 4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol med hydroxygrupper, der er tilgængelige for og nabostillet til enhver aminogruppe bortset fra dem i stillingerne 3 og 6' eller i stillingerne 2' og 3 eller i stillingerne 2' og 6' eller i stillingerne 3, 2' og 6', i et aprotisk eller protisk, indifferent organisk opløsningsmiddel, der kan indeholde op til ca. 25 vol% vand, omsættes med mindst 2 molækvivalenter af et salt af en divalent kation af overgangsmetallerne kobber, nikkel, cobalt eller cadmium eller af blandinger af disse overgangsmetaller pr. molækvivalent 4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol, hvorefter det således dannede kompleks mellem overgangsmetalsaltet og mindst ét gruppepar bestående af aminogruppen og den for denne tilgængelige, nabostillede hydroxygruppe omsættes med omtrent så mange molækvivalenter af et aminoacyleringsmiddel, som svarer til antallet af aminogruupper, henholdsvis 3 og 6' eller 2' og 3 eller 2' og 6' eller 3, 2' og 6', der skal acyleres med Y, og at det således vundne, tilsvarende Y-acylerede kompleks ved hjælp af et fældningsmiddel for overgangsmetal-kationer eller med ammoniumhydroxid omsættes til den tilsvarende 3,6'-di-, 2',3-di-, 2',6'-di- eller 3,2',6'-tri-N-Y-4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol.

Udtrykkene "én af nævnte aminogruupper har en tilgængelig nabostillet hydroxygruppe" og "gruppepar bestående af aminogruppen og den for denne tilgængelige, nabostillede hydroxygruppe" omfatter anvendt her amino- og hydroxy-funktioner, der er beliggende på nabostillede

carbonatomer på cis-vicinal- eller diækvatorial trans-vicinal måde og omfatter også amino- og hydroxy-grupper, der ikke er beliggende på vicinale carbonatomer, men som er rumligt nærtbeliggende (dvs. de er tæt nok til at blive hydrogenbundne) og tilgængelige for hinanden. Ved udtrykket "tilgængelig" menes endvidere, at parrene af nabostillede amino- og hydroxy-grupper skal, for at være anvendelige ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, foruden at være tilgængelige for hinanden, være således beliggende i molekylet af aminocyclitolaminoglycosidet, at de er sterisk tilgængelige for et indkommende reagens, såsom en kation af et divalent overgangsmetal. I for eksempel en 4,6-di-O-(aminoglycosyl)-2-deoxystreptamin med en 2'-aminogruppe, såsom i sisomicin, tobramycin, verdamycin og gentamiciner C_1 , C_{1a} og C_2 , er således 5-hydroxygruppen, selvom 5-hydroxygruppen af 2-deoxystreptamin-delen er nabostillet til og tilgængelig for 2'-aminogruppen, så sterisk hindret, at et salt af et divalent overgangsmetal, såsom cupriacetat, ikke kan komme i tilstrækkelig nærhed af 5-hydroxy-2'-amino-parret til at danne et overgangsmetalsalt-kompleks deraf.

De overgangsmetalsalte, der kan anvendes som kompleksdannende midler ved den foreliggende fremgangsmåde, omfatter et hvilket som helst divalent salt af kobber (II), nikkel (II), cobalt (II) og cadmium (II). Blandt de, der har stærkest kompleksdannende aktivitet, er salte af divalent overgangsmetal med svage syrer, fortrinsvis svage organiske syrer, såsom benzoesyre, propionsyre og eddikesyre. Foretrukne salte af divalent overgangsmetal omfatter acetatsaltet af kobber (II), nikkel (II), cobalt (II) og cadmium (II) og blandinger deraf. Særligt anvendeligt er nikkel(II)acetat, kobber(II)acetat og cobalt(II)acetat.

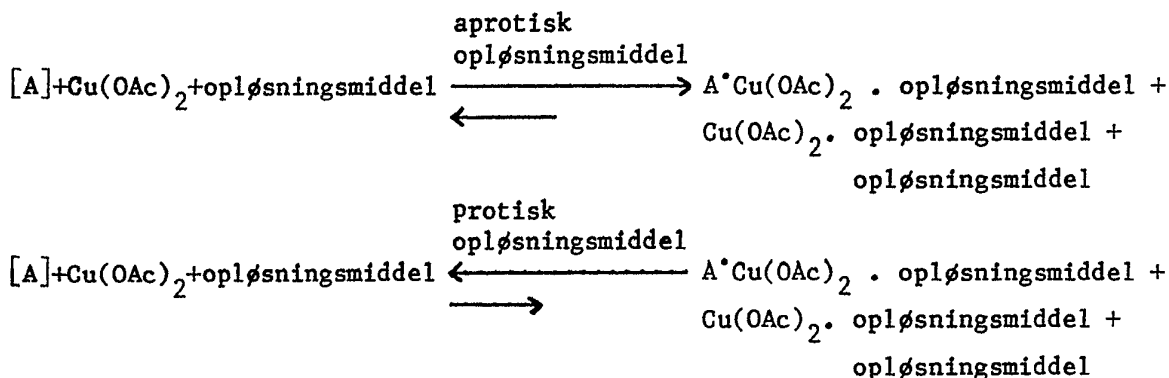
Hvis man anvendte salte af monovalent overgangsmetal, f.eks. cuproacetat, ville cuproacetatkomplekset af par af tilgængelige nabostillede hydroxy- og amino-grupper blive dannet i ringe udbytter og være svagt bundet, således at der, når N-acyleringstrinnet gennemføres, indtræder N-acylering ved stillingerne for svagt kompleksbundne aminogrupeer (omend med en noget lavere hastighed) såvel som ved stillingerne med ikke-kompleksbundne aminogrupeer resulterende i produktblandinger og ringere udbytter af ønsket produkt.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen gennemføres i et indifferent organisk opløsningsmiddel, der omfatter et hvilket som helst organisk opløsningsmiddel, hvori aminocyclitolaminoglycosidet og overgangsmetalsaltet såvel som det resulterende (aminocyclitolaminoglycosid)-overgangsmetalsalt-kompleks-mellemprodukt er rimeligt opløselige, og som ikke vil reagere i nogen væsentlig grad med de i processen indgående reagenser. Foretrukne opløsningsmidler er polære, aprotiske organiske opløsningsmidler, navnlig dialkylamider (f.eks. dimethylformamid) og dialkylsulfoxider (f.eks. dimethylsulfoxid). Polære protiske opløsningsmidler, såsom lavere alkanoler, navnlig methanol og ethanol, kan også anvendes ved

fremgangsmåden, når sådanne opløsningsmidler kræves af hensyn til opløselighed. Når der anvendes protiske opløsningsmidler, er det i almindelighed ønskeligt at anvende en større mængde salt af divalent overgangsmetal end tilfældet er, når der anvendes aprotiske opløsningsmidler, da protiske opløsningsmidler svækker de kompleksbundne funktioner i (aminocyclitolaminoglycosid)-overgangsmetalsalt-komplekset.

Det foretrækkes at anvende i det væsentlige vandfri opløsningsmidler med henblik på at vinde maksimale udbytter. Vand kan imidlertid være til stede (og er ofte ønskeligt af hensyn til opløselighed) selv i mængder på op til ca. 25% (efter volumen) og mere, uden at påvirke udbytterne af selektivt blokeret N-acyleret aminocyclitolaminoglycosid, forudsat at yderligere salt af divalent overgangsmetal anvendes, da vand, der er et protisk opløsningsmiddel, også svækker de kompleksbundne funktioner i (aminocyclitolaminoglycosidet)-overgangsmetalsalt-kompleks-mellemprodukterne.

Ved den foreliggende fremgangsmåde synes der at foreligge en ligevægt mellem aminocyclitolaminoglycosidet med mindst ét par af nabostillede tilgængelige amino/hydroxy-grupper [A], overgangsmetalsaltet (f.eks. cupriacetat, $\text{Cu}(\text{OAc})_2$) og opløsningsmidlet, hvilken ligevægt kan angives på følgende måde:



Med et aprotisk opløsningsmiddel begunstiger ligevægten dannelsen af et overgangsmetalsalt-kompleks af et aminocyclitolaminoglycosid med tilgængelige, nabostillede amino/hydroxy-grupper, mens et organisk protisk opløsningsmiddel eller tilstedeværelsen af overskud af vand i et organisk aprotisk opløsningsmiddel begunstiger kompleksopløsning for (aminocyclitolaminoglycosid)-overgangsmetalsalt-komplekset. I sidstnævnte tilfælde vil der således, med henblik at opnå højere udbytter af (aminocyclitolaminoglycosid)-salt-komplekset i opløsning, kræves større mængder af overgangsmetalsaltet for at tvinge ligevægten i den ønskede retning, end det er nødvendigt, når der anvendes et i det væsentlige vandfrit aprotisk opløsningsmiddel.

Ved gennemførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen er i almindelighed den molære mængde overgangsmetalsalt, der anvendes i det første trin af processen, mindst lig den molære mængde af aminocyclitolaminoglycosidet gange antallet

deri af paraf tilgængelige, nabostillede amino- og hydroxygrupper, og den molære mængde af acyleringsmiddel, der anvendes i det andet trin af fremgangsmåden, der fortrinsvis gennemføres in situ, er omtrent lig den molære mængde af aminocyclitolaminoglycosidet gange det antal af ikke-kompleksbundne aminofunktioner i molekylet, der skal beskyttes.

Når der imidlertid foreligger en forskel i reaktivitet hos de ikke-kompleksbundne aminer, kan der anvendes mindre N-acyleringsreagens, hvis det kun ønskes at N-acylere de mere reaktive aminer.

Efter at (aminocyclitolaminoglycosid)-overgangsmetalsalt-komplekset er omsat med et acyleringsmiddel for at N-acylere de ikke-kompleksbundne aminogrupper, bliver overgangsmetal-kationen som nævnt fjernet fra det N-acylerede (aminocyclitolaminoglycosid)-overgangsmetalsalt-kompleks ved hjælp af et overgangsmetal-fældende reagens eller ved hjælp af ammoniumhydroxid. I sidstnævnte tilfælde bliver overgangsmetal-kationen fjernet ved den fortrinsvise dannelselse af et kompleks med ammoniumhydroxid, hvilket kompleks er opløseligt i ammoniumhydroxid og vand. Denne metode til at fjerne overgangsmetal-kationen er hensigtsmæssig, når det selektivt blokerede N-acyl-aminocyclitolaminoglycosidderivat er opløseligt i organiske opløsningsmidler, da det derefter kan ekstraheres fra den blanding af vand og organisk opløsningsmiddel, der indeholder ammoniumhydroxid-overgangsmetalsalt-komplekset.

Det er sædvanligvis mere hensigtsmæssigt at fjerne overgangsmetal-kationen ved hjælp af på området kendte udfældende reagenser. Anvendelige fældningsreagenser omfatter dioxim af dimethylglyoxal, 1,3-dicarbonylalkaner, såsom acetyl-acetone og heptan-3,5-dion, såvel som sulfid-fældningsreagenser, såsom ammoniumsulfid, alkalimetalsulfider (f.eks. natriumsulfid), jordalkalimetalsulfider (f.eks. calciumsulfid), jordalkalimetalhydrosulfider (f.eks. natriumhydrosulfid) og hydrogensulfid. Blandt de foregående er særligt anvendelige fældningsreagenser dioxim af dimethylglyoxal, acetylacetone og hydrogensulfid.

Ved fjernelse af overgangsmetal-kationen er hydrogensulfid et foretrukket fældningsreagens, da det er en simpel operation blot at boble hydrogensulfid gennem reaktionsblandingen, og endvidere bliver det resulterende overgangsmetalsulfid fældet fuldstændigt på kort tid og fjernes let ved filtrering.

Acyl-blokeringsgrupperne, Y, og de tilsvarende acyleringsmidler, med hvilke de dannes, er velkendte på området ligesom metoder til deres fjernelse, efter at en ønsket kemisk omdannelse er gennemført ved en anden stilling i molekylet. I den foreliggende sammenhæng bliver acylblokeringsgrupper, Y, der kan indføres selektivt på ikke-kompleksbundne aminofunktioner i (aminocyclitolaminoglycosid)-overgangsmetalsalt-kompleks-mellemproduktet, betragtet som omfattende benzyloxy-carbonyl- og substituerede benzyloxy-carbonyl-grupper, såsom p-nitrobenzyloxy-carbonyl og p-methoxybenzyloxy-carbonyl (der let kan fjernes ved katalytisk reduktion),

aryloxycarbonylgrupper, såsom phenoxycarbonyl, og alkoxycarbonylgrupper, såsom methoxycarbonyl, ethoxycarbonyl og lignende (der fortrinsvis fjernes ved basisk hydrolyse), trichlorethoxycarbonylgrupper (der kan fjernes med zink i eddikesyre), tert.alkoxycarbonylgrupper, såsom tert.butoxycarbonyl og tert.amyloxycarbonylgrupper (der kan fjernes ved mild syrehydrolyse), halogenalkylcarbonylgrupper, såsom chloracetyl (der kan fjernes med base eller med thiourinstof eller lignende reagens), og trifluoracetyl (der let kan fjernes under milde basiske betingelser), succinimido- og phthalimidogrupeer (der let kan fjernes med hydrazin), og alkanoylgrupper, såsom acetyl, propionyl og lignende, såvel som aroylgrupper, såsom benzoyl (der fjernes ved basisk hydrolyse). De reaktionsbetingelser, der er nødvendige for at indføre et hvilket som helst af de foregående N-acyl-derivater på en fri aminofunktion, er velkendte på området.

Fremgangsmåden finder anvendelse på aminocyclitolaminoglycosid-området, hvor kemiske omdannelser af aminoglycosid-antibiotica foretages til stadighed for at syntetisere nye derivater med forbedret antibakteriel aktivitet og/eller et mere gunstigt antibakterielt spektrum. De fleste af disse omdannelser er flertrins-processer med lavt udbytte, hvor flere indledende trin er rettet på blot at beskytte amino- og/eller hydroxy-funktioner med blokerende grupper forud for gennemførelse af det egentlige kemiske omdannelsestrin, i et forsøg på at forbedre udbyttet af det ønskede omdannelsesprodukt. Ved den foreliggende fremgangsmåde bliver de amino-grupper, der kræver beskyttelse, blokeret selektivt i udmærket udbytte ved en simpel tottrins-énbeholder-proces.

Den foretrukne udførelsesform for fremgangsmåden er den, hvor aminogrupeer blokeres selektivt i et antibakterielt 4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol-middel. Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er det nu muligt let og i gode udbytter at fremstille selektivt blokerede antibiotiske aminoglycosid-derivater, såsom 2',6'-di-N-acyl-, 3,6'-di-N-acyl-, 3,2',6'-tri-N-acyl- og 1,3,2',6'-tetra-N-acyl-derivater af 4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol-derivater ved en tottrins-énbeholder-proces, hvilke derivater alle er hidtil ukendte, og som er værdifulde som mellemprodukter ved fremstilling af antibakterielt aktive omdannelsesprodukter af stam-aminoglycosidet.

En særligt værdifuld udførelsesform er den, hvor der fremstilles et 3,2',6'-tri-N-acyl-derivat af en 4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol, såsom sisomicin, tobramycin, verdamicin, gentamicin C₁, gentamicin C_{1a} og gentamicin C₂, der er værdifulde mellemprodukter ved fremstilling af de tilsvarende 1-N-alkylaminoglycosider (efter fjernelse af N-acylgrupperne ved 3-, 2'- og 6'-stillingerne), der er værdifulde antibakterielle midler beskrevet i USA-patentskrift nr. 4002742. Blandt de foregående er 3,2',6'-tri-N-acylsisomiciner, navnlig 3,2',6'-tri-N-acetylsisomicin, af stor værdi som mellemprodukter ved fremstilling af 1-N-ethylsisomicin, der er et virksomt antibakterielt middel.

Ved gennemførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen har det vist sig, at blandinger af overgangsmetalsalt-komplekser undertiden med fordel kan anvendes til at opnå gode udbytter af selektivt N-acylerede polyaminoforbindelser. Det menes, at dette skyldes det forhold, at nogle overgangsmetalsalte danner mere stærkt bundne overgangsmetalsalt-komplekser med visse par af tilgængelige nabostillede amino-/hydroxy-grupper, end tilfældet er med andre overgangsmetalsalte. Ved fremstilling af 3,2',6'-tri-N-acetylsisomicin opnås således forbedrede udbytter, når fremgangsmåden gennemføres under anvendelse, som salt af divalent overgangsmetal, af en ækvimolær blanding af nikkel(II)acetat og cupriacetat (idet de totale molære ækvivalenter af overgangsmetalsalte er fire gange ækvivalentet af sisomicin). Det herved vundne udbytte er mindst 90% af det teoretiske sammenlignet med et udbytte på 76% af det teoretiske, når der anvendes cupriacetat alene. En særligt værdifuld udførelsesform er den, der gør brug af cobalt(II)acetat som overgangsmetal, hvorved der opnås næsten teoretiske udbytter af i det væsentlige rene selektivt blokerede N-acylerede derivater.

Ved at modificere mængden af overgangsmetalsalt og af acyleringsmiddel og (eventuelt) ændre opløsningsmidlet kan der vindes gode udbytter af 1,3,2',6'-tetra-N-acetylsisomicin i stedet for 3,2',6'-tri-N-acetylsisomicin. Ved at tilsætte fra ca. en halv til én ækvimolær ækvivalent mængde af cupriacetathydrat pr. mol sisomicin i en vandig methanolisk opløsning er der således in situ vundet et sisomicin-cupriacetat-kompleks involverende 3"-amino-4"-hydroxy-gruppeparret. Omsætning af dette in situ med ca. 4 molære ækvivalenter eddikesyreanhydrid efterfulgt af fjernelse af cupri-kationen ved fældning som sulfidsaltet og derefter isolering og rensning ved anvendelse af kendt teknik giver 1,3,2',6'-tetra-N-acetylsisomicin i udbytter på næsten 80% af det teoretiske, hvilket er et mellemprodukt, der kan anvendes, når der ønskes omdannelse ved 3"-amino-gruppen.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen tilvejebringer også den mulighed trinvis in situ at fremstille blandede N-acyl-derivater af de resterende ikke-kompleksbundne aminogrupper, når nævnte aminer har forskellig reaktivitetsgrad. Alt efter typerne af N-acylgrupper, der er indført i molekylet, og den relative lethed, hvorved de kan fjernes, er det muligt at fremstille en hvilken som helst ønsket kombination af selektivt N-acyleret polyamino-organisk forbindelse. Således bliver der for eksempel, ved omsætning af sisomicin i 95% vandig methanol med ca. en ækvimolær mængde cupriacetat, in situ vundet et sisomicin-cupriacetat-kompleks i det væsentlige involverende 3"-amino- og 4"-hydroxy-grupperne. Omsætning af dette sisomicin-cupriacetat-kompleks med ca. en molær ækvivalent af ethylthioltrifluoracetat frembringer et monoacyl-derivat af den mest reaktive ikke-kompleksbundne aminofunktion deri, nemlig 6'-amino, under dannelse in situ af 6'-N-trifluoracetylsisomicin-cupriacetat-kompleks. Ved derefter at tilsætte ca. tre molære ækvivalenter eddike-

syreanhydrid til det foregående derivat in situ bliver de resterende tre ikke-kompleksbundne aminogrupper N-acetylerede, hvorved dannes 1,3,2'-tri-N-acetyl-6'-N-trifluoracetylsisomicin-cupriacetat-kompleks. Efter nedbrydning af cupriacetat-komplekset efterfulgt af behandling af resten indeholdende 1,3,2'-tri-N-acetyl-6'-N-trifluoracetylsisomicin med ammoniumhydroxid, hvilket bevirker hydrolyse af 6'-N-trifluoracetyl-gruppen uden at påvirke N-acetyl-grupperne, isoleres 1,3,2'-tri-N-acetyl-sisomicin ved kendt teknik. 1,3,2'-Tri-N-acylaminoglycosiderne er værdifulde mellemprodukter ved fremstilling af 6'-N-alkylaminoglycosider, der er nyttige antibakterielle midler.

Ved in situ at danne 6'-N-trifluoracetylsisomicin-cupriacetatnikkel(II)acetat-kompleks i dimethylsulfoxid og tilsætte to ækvivalenter eddikesyreanhydrid dannes et di-N-acetyl-derivat involverende de to yderligere reaktive ikke-kompleksbundne aminofunktioner ved 3- og 2'-stillingerne, hvorved in situ dannes 3,2'-di-N-acetyl-6'-N-trifluoracetylsisomicin-cupriacetat-kompleks, der efter fjernelse af komplekset med hydrogensulfid og hydrolyse af 6'-N-trifluoroacetylgruppen ved mild basisk hydrolyse giver 3,2'-di-N-acetylsisomicin. 3,2'-Di-N-acetylaminocyclitol-aminoglycosiderne er værdifulde mellemprodukter ved fremstilling af 1,6'-di-N-alkylaminoglycosider, der er værdifulde antibakterielle midler beskrevet i belqisk patentskrift nr. 847.900.

Ligeledes kan der fremstilles blandede N-acyl-derivater af et aminocyclitolaminoglycosid ved in situ at indføre nogle N-acyl-derivater på (aminocyclitolaminoglycosid)-overgangsmetalsalt-komplekset, derefter nedbryde komplekset efterfulgt af N-acylering af de amino-funktioner, der tidligere var blevet gjort inaktive på grund af kompleksernes tilstedeværelse. Ved at anvende denne metode er det muligt at vinde et 1,3,3''-tri-N-acetylsisomicin-derivat, der er et nyttigt mellemprodukt ved fremstillingen af 2',6'-di-N-substituerede derivater, såsom 2',6'-di-N-alkylsisomicin, der har antibakteriel aktivitet. Således giver for eksempel behandling af sisomicin med ca. 2 til 3 molære ækvivalenter af nikkel(II)acetat i methanol in situ et sisomicin-nikkel(II)acetat-kompleks involverende 3''-amino-4''-hydroxy-gruppeparret og 1-amino-2''-hydroxy-gruppeparret. Omsætning af sisomicin-nikkel(II)acetat-komplekset in situ med ca. to mol N-tert.butoxycarbonyloxyphthalimid fører til et di-N-acyl-derivat involverende de mere reaktive ikke-kompleksbundne 2'- og 6'-aminogrupper sammenlignet med den ikke-kompleksbundne 3-aminogruppe, hvorved der dannes 2',6'-di-N-tert.butoxycarbonyl-sisomicin-nikkel(II)acetat-kompleks. Fjernelse af nikkel(II)-ionen som nikkelsulfid efterfulgt af omsætning in situ af det resulterende filtrat indeholdende 2',6'-di-N-tert.butoxycarbonylsisomicin med eddikesyreanhydrid giver 1,3,3''-tri-N-acetyl-2',6'-di-N-tert.butoxycarbonylsisomicin, der ved styret syrehydrolyse in situ, såsom med 5% trifluoroeddikesyre i tetrahydrofuran, giver 1,3,3''-tri-N-acetylsisomicin.

Alternativt kan 2',6'-di-N-tert.butoxycarbonylsisomicin-mellemproduktet, fremstillet ved ovennævnte metode, isoleres per se og derefter reduceres med lithiumaluminiumhydrid i tetrahydrofuran, hvorved dannes 2',6'-di-N-methylsisomicin, der er anvendeligt som antibakterielt middel.

Den ovenstående diskussion, der beskriver fremstillingen af selektivt N-acylerede sisomicin-derivater, der er særligt værdifulde mellemprodukter fremstillet ved den foreliggende fremgangsmåde, illustrerer processens smidighed og de værdifulde mellemprodukter, der vindes ved processen.

Den foreliggende opfindelse angår følgelig også de hidtil ukendte selektivt blokerede aminocyclitol-aminoglycosid-derivater, der fremstilles ved den ovennævnte fremgangsmåde og kan defineres som 4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler, der er selektivt blokerede i stillingerne 3, 2' og 6', og som er valgt blandt:

3,2',6'-tri-N-Y-sisomicin, 3,2',6'-tri-N-Y-verdamycin,
 3,2',6'-tri-N-Y-tobramycin, 3,2',6'-tri-N-Y-gentamicin C₁,
 3,2',6'-tri-N-Y-gentamicin C_{1a}, 3,2',6'-tri-N-Y-gentamicin C₂,
 3,2',6'-tri-N-Y-gentamicin C_{2a}, 3,2',6'-tri-N-Y-gentamicin C_{2b},
 3,2',6'-tri-N-Y-Antibioticum 66-40B,
 3,2',6'-tri-N-Y-Antibioticum 66-40D,
 3,2',6'-tri-N-Y-Antibioticum JI-20A,
 3,2',6'-tri-N-Y-Antibioticum JI-20B,
 3,2',6'-tri-N-Y-Antibioticum G-52,
 de 5-epi- og 5-epi-azido-5-deoxy-analoge af de foregående,
 3,2',6'-tri-N-Y-kanamycin B,
 3,2',6'-tri-N-Y-3',4'-dideoxykanamycin B,
 3,2',6'-tri-N-Y-nebramycin-faktor 4,
 3,2',6'-tri-N-Y-nebramycin-faktor 5',
 3,2',6'-tri-N-Y-3',4'-dideoxy-3',4'-dehydrokanamycin B,
 3,2',6'-tri-N-Y-3',4'-dideoxy-6'-N-methylkanamycin B og
 3,2',6'-tri-N-Y-5-deoxysisomicin,

hvor Y er en acylgruppe omfattende acetyl, 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl og benzyloxycarbonyl.

Af særlig værdi som mellemprodukter er de forbindelser, hvor Y er lavere alkanoyl, fortrinsvis acetyl. Blandt disse er særligt foretrukket 3,2',6'-tri-N-acetylsisomicin.

Andre værdifulde 3,2',6'-tri-N-acylaminocyclitol-aminoglycosider er de, hvor Y er 2,2,2-trichlorethoxycarbonyl, idet der særligt foretrækkes 3,2',6'-tri-N-(2,2,2-trichlorethoxycarbonyl)sisomicin, der er et værdifuldt mellemprodukt ved fremstilling af 1-N-acyl-4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler, navnlig 1-N-acyl-derivater af sisomicin, f.eks. 1-N-acetylsisomicin, der er værdifulde som

antibakterielle midler og som mellemprodukter ved fremstilling af de tilsvarende 1-N-alkyl-derivater.

Andre hidtil ukendte mellemprodukter er 4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler, der er selektivt blokeret i stillingerne 2',6', og som er valgt blandt:

2',6'-di-N-Y-sisomicin, 2',6'-di-N-Y-verdamycin,
 2',6'-di-N-Y-tobramycin, 2',6'-di-N-Y-gentamicin C₁,
 2',6'-di-N-Y-gentamicin C_{1a}, 2',6'-di-N-Y-gentamicin C₂,
 2',6'-di-N-Y-gentamicin C_{2a}, 2',6'-di-N-Y-gentamicin C_{2b},
 2',6'-di-N-Y-Antibioticum 66-40B, 2',6'-di-N-Y-Antibioticum 66-40D,
 2',6'-di-N-Y-Antibioticum JI-20A, 2',6'-di-N-Y-Antibioticum JI-20B,
 2',6'-di-N-Y-Antibioticum G-52,
 de 5-epi- og 5-epi-azido-5-deoxy-analoge af de foregående,
 2',6'-di-N-Y-kanamycin B, 2',6'-di-N-Y-3',4'-dideoxykanamycin B,
 2',6'-di-N-Y-nebramycin-faktor 4,
 2',6'-di-N-Y-nebramycin-faktor 5',
 2',6'-di-N-Y-3',4'-dideoxy-3',4'-dehydrokanamycin B,
 2',6'-di-N-Y-3',4'-dideoxy-6'-N-methylkanamycin B og
 2',6'-di-N-Y-5-deoxysisomicin,
 hvor Y er en acyl-gruppe.

Særligt værdifulde derivater af de foregående er de, hvor Y er 2,2,2-trichlorethoxycarbonyl eller tert.butoxycarbonyl, navnlig 2',6'-di-N-(2,2,2-trichlorethoxycarbonyl)sisomicin og 2',6'-di-N-(tert.butoxycarbonyl)sisomicin, der er værdifulde mellemprodukter ved fremstilling af 2',6'-di-N-alkyl-4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler med antibakteriel aktivitet, f.eks. 2',6'-di-N-ethylsisomicin.

Endnu andre hidtil ukendte mellemprodukter er 4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler, der er selektivt blokeret i stillingerne 3,6', og som er valgt blandt 3,6'-di-N-Y-kanamycin A, 3,6'-di-N-Y-gentamicin B, 3,6'-di-N-Y-gentamicin B₁, 3,6'-di-N-Y-gentamicin A₃ og 3,6'-di-N-Y-6'-N-methylkanamycin A, hvor Y er en acylgruppe, fortrinsvis acetyl, tert.butoxycarbonyl, benzyloxycarbonyl og 2,2,2-trichlorethoxycarbonyl. Når Y er acetyl, er de foregående derivater hovedsageligt værdifulde som mellemprodukter ved fremstilling af de tilsvarende 1-N-alkyl-derivater. Når Y er f.eks. tert.butoxycarbonyl, er de foregående forbindelser af særlig værdi ved fremstillingen af de tilsvarende 1-N-(β-amino-α-hydroxybutyryl)-, 1-N-(β-amino-α-hydroxypropionyl)- og 1-N-(δ-amino-α-hydroxyvaleryl)-derivater, der, når 3,6'-di-N-acylgrupperne er fjernet, er virksomme antibakterielle midler, der er kendt på området.

De ovenfor beskrevne 4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler ifølge opfindelsen, er anvendelige ved fremstilling af 4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-

diaminocyclitoler med substituenten ved aminogrupper, der ikke var beskyttet under processen til deres fremstilling. Substitution i 1-stilling af molekylet giver særligt foretrukne forbindelser. Således kan man herudaf fremstille 1-N-substituerede derivater af 4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitolerne sisomicin, verdamicin, tobramycin, gentamicin C₁, gentamicin C_{1a}, gentamicin C₂, gentamicin C_{2a}, gentamicin C_{2b}, Antibioticum 66-40B, Antibioticum 66-40D, Antibioticum JI-20A, Antibioticum JI-20B, Antibioticum G-52, de 5-epi- og 5-epi-azido-5-deoxy-analoge af de foregående, kanamycin B, 3',4'-dideoxykanamycin B, nebramycin-faktor 4, nebramycin-faktor 5', 3',4'-dideoxy-3',4'-dehydrokanamycin B, 3',4'-dideoxy-6',N-methylkanamycin B, 5-deoxysisomicin, gentamicin B, gentamicin B₁, gentamicin A₃, kanamycin A, 6'-N-methylkanamycin A, kanamycin C, Antibioticum G-418, gentamicin A, gentamicin A₁ og gentamicin X₂, hvor 1-N-substituenten er -CH₂X eller $\text{-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-X}$, hvor X er hydrogen, alkyl, alkenyl, cycloalkyl, cycloalkylalkyl, hydroxyalkyl, aminoalkyl, mono- eller di-N-alkylaminoalkyl, amino-hydroxyalkyl, mono- eller di-N-alkylaminohydroxyalkyl, phenyl, benzyl eller tolyl, hvilke alifatiske grupper har op til 7 carbonatomer og, hvis de er substitueret med amino og hydroxy, bærer substituenterne på forskellige carbonatomer, og farmaceutisk acceptable syreadditionssalte deraf, ved en fremgangsmåde omfattende, at der i en forbindelse ifølge opfindelsen indføres 1-N-substituenten -CH₂X eller $\text{-}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-X}$, hvor X er som ovenfor defineret, og alle amino-blokerende grupper, der er til stede i molekylet, derefter fjernes, og det 1-N-substituerede derivat isoleres som sådant eller som et farmaceutisk acceptabelt syreadditionssalt.

Indføring af 1-N-substituenten -CH₂X kan foregå ved på området kendte metoder til alkylering af primære aminogrupper. For eksempel er sådanne metoder beskrevet i belgisk patentskrift nr. 818.431, og en særligt foretrukket metode omfatter omsætning af et syreadditionssalt af 3,2',6'-tri-N-Y- eller 3,6'-di-N-Y- eller 3,2'-di-N-Y-4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitolen med ca. ét ækvivalent af et reducerende hydriddonor-reagens valgt fra gruppen bestående af dialkylaminoboran, tetraalkylammoniumcyanoborohydrid, alkalimetalcyanoborohydrid og alkalimetallborohydrid i et indifferent opløsningsmiddel og med mindst ét ækvivalent af et aldehyd med formlen XCHO, hvor X er som ovenfor defineret. Efter fjernelse af N-acyl-blokeringsgrupperne vindes 1-N-alkyl-derivatet i langt større totale udbytter (f.eks. sædvanligvis over 50% af det teoretiske) af renere produkt end ved de hidtil kendte fremgangsmåder til fremstilling af 1-N-alkylaminoglycosider (sædvanligvis mindre end 20% af det teoretiske).

For eksempel bliver der ved fremstilling af 1-N-ethylsisomicin ved først at omdanne sisomicin til 3,2',6'-tri-N-acetylsisomicin via in situ-overgangsmetalsaltkompleksprocessen ifølge den foreliggende opfindelse efterfulgt af omsætning af et svovlsyreadditionssalt af den resulterende 3,2',6'-tri-N-acetylsisomicin med ace-

tylsisomicin med acetaldehyd efterfulgt af reduktion med natriumcyanoborohydrid og påfølgende fjernelse af 3,2',6'-tri-N-acetyl-funktioner ved basisk hydrolyse, vundet 1-N-ethylsisomicin med høj renhed i udbytter på ca. 60% af det teoretiske, mens omdannelse af sisomicin til 1-N-ethyl-sisomicin ved samme fremgangsmåde, men uden acetylering ved 3-, 2'- og 6'-stillingerne, frembringer 1-N-ethylsisomicin i udbytter på ca. 11% af det teoretiske.

Indføring af 1-N-substituenten $\text{-C}(=\text{O})\text{-X}$ omfatter omsætning af 3,2',6'-tri-N-Y- eller 3,6'-di-N-Y- eller 3,2'-di-N-Y-4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diamino-cyclitolen, hvor Y er en blokerende gruppe, der kan fjernes uden at påvirke 1-N-acyl-substituenten, med en syre med formlen $\text{HO-C}(=\text{O})\text{-X}$, hvor X er som ovenfor defineret, med enhver primær eller sekundær aminogruppe beskyttet, i nærværelse af et carbo-diimid, eller med et reaktivt derivat af nævnte syre. Ved en foretrukket udførelsesform for denne fremgangsmåde anvendes 3,6'-di-N-Y-derivater af kanamycin A, gentamicin B og gentamicin B₁, hvor Y er tert.butoxycarbonyl eller benzyloxycarbonyl, og acyldelen af syren $\text{HO-C}(=\text{O})\text{-X}$ er β -amino- α -hydroxypropionyl, γ -amino- α -hydroxybutyryl eller δ -amino- α -hydroxyvaleryl, hvor aminogruppen deri er beskyttet.

Det skal bemærkes, at 1-N-(aminohydroxyalkanoyl)-substituenten i de således vundne 1-N-(aminohydroxyalkanoyl)-aminocyclitol-aminoglycosider kan foreligge i R,S-formen eller i R-formen eller i S-formen.

Ved hjælp af de hidtil ukendte 3,6'-di-N-acyl-derivater af gentamiciner B og B₁ og af kanamycin A, fremstillet ifølge opfindelsen, kan hver af gentamicinerne B og B₁ og kanamycin A nu omdannes til de tilsvarende 1-N-aminohydroxyalkanoyl-derivater i høje udbytte af rent produkt. Således er for eksempel kanamycin A omdanneligt til krystallinsk 3,6'-di-N-benzyloxycarbonyl-kanamycin A, uden at der kræves chromatografisk rensning, via di-nikkel(II)acetat-komplekset i dimethylsulfoxid i udbytter på over 80% af det teoretiske. Omsætning af det foregående 3,6'-di-N-acyl-derivat med N-(S- γ -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxybutyryloxy)succinimid efterfulgt af behandling af det resulterende 1-N-(S- γ -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxybutyryl)-3,6'-di-N-benzyloxycarbonylkanamycin A med hydrogen og en katalysator for at fjerne benzyloxycarbonyl-beskyttelsesgrupperne frembringer 1-N-(S- γ -amino- α -hydroxybutyryl)kanamycin A (også kendt som amikacin og som Antibioticum BB-K-8) af høj renhed i udmærkede totale udbytter på over 50%.

Den foreliggende opfindelse repræsenterer således en betydelig forbedring sammenlignet med de på området kendte fremgangsmåder til omdannelse af kanamycin A til amikacin, såsom den der er beskrevet i J. Antibiotics 25, 695-708 (1972), hvor kanamycin A først omdannes til 6'-N-benzyloxycarbonyl-derivatet i udbytter på 45%, og som ved omdannelse gennem i det væsentlige de samme omdannelser, som beskrevet ovenfor, frembringer rensset amikacin i totale udbytter på mindre end 10%. Tilsvarende er ved hjælp af fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse kanamycin A omdanneligt via 3,6'-di-N-benzyloxycarbonyl-mellemproduktet til 1-N-(β -

amino- α -hydroxypropionyl)kanamycin A (også kendt som 1-N-isoserylkanamycin A) i totale udbytter højere end 50% af det teoretiske sammenlignet med totale udbytter på mindre end 8% via de på området kendte fremgangsmåder under anvendelse af 6'-N-tert.butoxycarbonyl-mellemproduktet, såsom beskrevet i USA-patentskrift nr. 3939143.

Tilsvarende bliver der ved omsætning af gentamicin B i dimethylsulfoxid med ca. 3 molære ækvivalenter cupriacetat, in situ vundet det tilsvarende gentamicin B-cupriacetat-kompleks involverende 3"-amino-4"-hydroxy- og 1-amino-2"-hydroxy-gruppeparrene. Omsætning af dette in situ med ca. 1 molært ækvivalent af N-tert.-butoxycarbonyloxyphtalimid giver det tilsvarende 6'-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B-di-cupriacetat-kompleks, mens omsætning med mindst to mol N-tert.butoxycarbonyloxyphtalimid giver det tilsvarende 3,6'-di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B-di-cupriacetat-kompleks. Omsætning af hver af disse med hydrogensulfid efterfulgt af fraskillelse af det resulterende cuprisulfid ved filtrering giver en opløsning omfattende henholdsvis 6'-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B eller 3,6'-di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B. Hver af disse kan isoleres fra deres respektive reaktionsopløsninger og renses på kendt måde og derefter omsættes med N-(S- γ -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxybutyryloxy)succinimid eller med N-(S- β -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxypropionyloxy)succinimid eller med N-(S- δ -amino- α -hydroxyvaleryl)succinimid til dannelselse af henholdsvis 1-N-(S- γ -amino- α -hydroxybutyryl)gentamicin B eller 1-N-(S- β -amino- α -hydroxypropionyl)gentamicin B eller 1-N-(S- δ -amino- α -hydroxyvaleryl)gentamicin B, der alle er værdifulde antibakterielle midler.

Alternativt kan den kemiske omdannelse gennemføres ved C-1 in situ uden at isolere 3,6'-di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B til dannelselse af det tilsvarende 1-N-(S- γ -amino- α -hydroxybutyryl)gentamicin B eller 1-N-(S- β -amino- α -hydroxypropionyl)gentamicin B eller 1-N-(S- δ -amino- α -hydroxyvaleryl)gentamicin B i udmærkede totale udbytter på ca. 50% af det teoretiske. Det foregående repræsenterer også en betydelig forbedring sammenlignet med de på området kendte fremgangsmåder til fremstilling af disse forbindelser, såsom den beskrevet af P.J.L. Daniels et al., i J. Antibiotics 27, 889 (1974), der frembringer 1-N-aminohydroxyalkanoylgentamicin C₁-derivater i udbytter på mindre end 15%.

Det skal også bemærkes, at udbyttet af 6'-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B er næsten kvantitativt og ikke kræver nogen chromatografisk rensning i modsætning til de på området kendte fremgangsmåder, der kun giver udbytter på ca. 46% og kræver chromatografisk isolering.

Når der anvendes 3,6'-di-N-acyl-gentamicin B-mellemprodukter, f.eks. 3,6'-di-N-benzyloxycarbonylgentamicin B, ved omdannelsen af gentamicin B til et 1-N-(aminohydroxyalkanoyl)-derivat deraf, f.eks. 1-N-(β -amino- α -hydroxypropionyl)gentamicin B, vil omsætning af 3,6'-di-N-acyl-derivatet med et racemisk reagens,

f.eks. N-(β -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxypropionyloxy)succinimid, give en diastereoisomer 3,6'-di-N-acyl-1-N-(R,S-aminohydroxyalkanoyl)gentamicin B-blanding (f.eks. 3,6'-di-N-(benzyloxycarbonyl)-1-N-(R,S- β -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxypropionyl)gentamicin B). Det har overraskende vist sig, at denne blanding let kan opdeles ved chromatografisk teknik i hver diastereoisomer, f.eks. i 3,6'-di-N-benzyloxycarbonyl-1-N-(R- β -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxypropionyl)gentamicin B og 3,6'-di-N-(benzyloxycarbonyl)-1-N-(S- β -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxypropionyl)gentamicin B, der efter fjernelse af 3,6'-di-N-blokeringsgrupperne giver det respektive diastereoisomere antibakterielle middel, f.eks. henholdsvis 1-N-(R- β -amino- α -hydroxypropionyl)gentamicin B og 1-N-(S- β -amino- α -hydroxypropionyl)gentamicin B. Alternativt giver fjernelse af beskyttelsesgrupperne fra 3,6'-di-N-(benzyloxycarbonyl)-1-N-(R,S- β -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxypropionyl)gentamicin 1-N-(R,S- β -amino- α -hydroxypropionyl)gentamicin B, der kan vindes fri for urenheder ved chromatografi på silicagel, men som ikke derved opdeles i de respektive diastereoisomere.

Under forløbet af fremgangsmåden ifølge opfindelsen optræder (aminocyclitolaminoglycosid)-overgangsmetalsalt-komplekser, hvor mindst én af aminogrupperne har en tilgængelig nabostillet hydroxygruppe, og nævnte salt er et salt af en divalent overgangsmetalkation valgt blandt kobber (II), nikkel (II), cobalt (II) og cadmium (II) eller er en blanding af nævnte salte, hvilket (aminocyclitolaminoglycosid)-overgangsmetalsalt-kompleks har komplekse funktioner mellem nævnte salt af divalent overgangsmetal og nævnte par af tilgængelige nabostillede amino- og hydroxygrupper, hvorhos antallet af komplekse funktioner ikke er større end antallet af nævnte par af tilgængelige nabostillede amino- og hydroxy-grupper.

Sådanne (aminocyclitolaminoglycosid)-overgangsmetalsalt-komplekser videre-reagerer hensigtsmæssigt in situ i det opløsningsmiddelmedium, hvori de er fremstillet, og der er derfor sædvanligvis intet behov for at isolere disse overgangsmetalsalt-komplekser. Overgangsmetalsalt-komplekserne kan imidlertid isoleres enten ved at fordampe opløsningsmiddelmediet i vakuum eller ved at udfælde komplekset ved at hælde opløsningen deraf i ether, hvorved der frembringes et (aminocyclitolaminoglycosid)-overgangsmetalsalt-kompleks som et amorft pulver, der er karakteristisk ved farver forskellige fra overgangsmetalsaltet og fra precursoren for aminocyclitolaminoglycosidet og som også karakteriseres ved infrarødt spektrum taget i den faste tilstand.

Blandt sådanne (aminocyclitolaminoglycosid)-overgangsmetalsalt-komplekser er sisomicin-dicupriacetat-kompleks, sisomicin-dicobalt(II)acetat-kompleks, sisomicin-dinikkel(II)acetat-kompleks og det blandede sisomicin-cupriacetat-nikkel(II)acetat-kompleks interessante, idet de kan optræde ved fremstilling af selektivt blokerede 3,2',6'-tri-N-acylsisomicin-forbindelser.

Andre interessante (aminocyclitolaminoglycosid)-overgangsmetalsalt-komplekser er gentamicin B-dicupriacetat-kompleks, gentamicin B-dicobalt(II)acetat-kompleks og kanamycin A-dinikkel(II)acetat-kompleks, der kan optræde ved fremstilling af 3,6'-di-N-acyl-derivaterne af gentamicin B og kanamycin A, f.eks. 3,6'-di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B og 3,6'-di-N-benzyloxycarbonylkanamycin A.

Opfindelsen skal beskrives nærmere gennem følgende eksempler og forsøg.

Eksempel 1

3,2',6'-Tri-N-acetylsisomicin.

A. Via Cupriacetatkompleks.

Cupriacetathydrat (9 g, 45 mmol) blev sat til en omrørt opløsning af sisomicin (1,3 g, 2,9 mmol) i vand (16 ml) og dimethylformamid (54 ml). Der blev omrørt ved stuetemperatur i 35 minutter, hvorefter der til det herved dannede cupriacetatkompleks dråbevis ved en hastighed på ca. 25 dråber pr. minut blev sat 9,3 ml af en 1 molær opløsning af eddikesyreanhydrid i dimethylformamid (9,3 mmol). Reaktionsblandingen blev omrørt i yderligere 30 minutter, hvorefter der blev tilsat 30 ml vand, og hydrogensulfid blev boblet gennem opløsningen i ca. 10 minutter, hvorefter blandingen blev omrørt i yderligere 30 minutter og derefter filtreret gennem en pude af Celite[®], og cuprisulfid-resten blev vasket med tre portioner vand på hver 20 ml. De samlede filtrater og vandvaskevasker blev koncentreret, og den resulterende inddampningsrest blev chromatograferet på silicagel (150 g, 60-200 mesh), idet der blev elueret med chloroform:methanol:ammoniumhydroxid (30:10:1). Ensartede fraktioner, bestemt ved tyndlagschromatografi på silicagel under anvendelse af opløsningsmiddelsystem bestående af chloroform:methanol:ammoniumhydroxid (2:1:0,34), blev samlet, og fraktionerne indeholdende hovedproduktet blev inddampet i vakuum, og den resulterende vandige blanding blev lyofiliseret til en rest omfattende 3,2',6'-tri-N-acetylsisomicin (1,29 g, udbytte 76%), $[\alpha]_D^{26} + 186,7^\circ$ (c, 4,4 i vand), pmr (ppm) (D_2O): δ 1,22 (4"-C-CH₃), 1,94, 1,98, 2,0 (N-Acetyler), 2,51 (3"-N-CH₃), 2,59 (H-3", $J_{2'',3''}=9,5$ Hz), 5,10 (H-1", $J_{1'',2''}=4,0$ Hz), 5,51 (H-1', $J_{1',2'}=2,5$ Hz), massespektrum: (M^{+}) m/e 573, også m/e 392, 374, 364, 346, 233, 215, 205, 187; 160; 443, 425, 415, 397; 169. Analyse beregnet for $C_{25}H_{43}O_{10}N_5$, H_2CO_3 : C: 49,13, H: 7,14, N: 11,02%. Fundet: C: 49,10, H: 7,02, N: 11,38%.

B. Via blanding af cupriacetat- og nikkel(II)acetat-komplekser.

(1) Cupriacetathydrat (8 g, 40 mmol) og nikkel(II)acetattetrahydrat (10 g, 40 mmol) blev sat til en omrørt opløsning af sisomicin (8,94 g, 20 mmol) i dimethylsulfoxid (400 ml). Efter 30 minutter ved stuetemperatur blev der dråbevis tilsat en opløsning af eddikesyreanhydrid (5,4 ml i 50 ml tetrahydrofuran, 60 mmol). Efter endt tilsætning blev reaktionsblandingen omrørt i yderligere 30 minutter. Reaktionsblandingen blev hældt i 1,5 liter ether, og indholdet blev blandet grundigt. Efter at blandingen havde fået lov at afsætte sig, blev etherlaget dekanteret. Ovennævnte operation blev gentaget tre gange under anvendelse hver gang af 500 ml ether. Den halvfaste rest blev opløst i 400 ml methanol, og hydrogensulfid blev boblet gennem opløsningen for at fjerne cupri- og nikkel(II)-ioner. De faste stoffer blev fjernet ved filtrering gennem Celite[®], og filterresten blev vasket med methanol. De samlede filtrater blev koncentreret i vakuum, og inddampningsresten blev opløst i vand (150 ml). Den vandige opløsning blev behandlet med Amberlite[®] IRA-401S-ionbytterharpiks i hydroxidcyclus, indtil pH var ca. 9. Harpiksen blev fjernet ved filtrering og vasket grundigt, og den vandige opløsning blev enten lyofiliseret, hvorved vandtes 3,2',6'-tri-N-acetylsisomicin i et udbytte på 90% (10,3 g), eller koncentreret til en tyk sirup, der blev opløst i en minimal mængde isopropanol, og produktet blev udfældet med overskud af ether.

(2) Alternativt blev, efter fjernelse af cupri- og nikkel(II)-ionerne ved behandling med hydrogensulfid og filtrering, filtratet koncentreret, og inddampningsresten blev opløst i en minimal mængde isopropanol, og produktet blev fældet med overskud af ether, hvorved vandtes 3,2',6'-tri-N-acetylsisomicin-eddikesyresalt i et udbytte på 90%.

C. Via cobalt(II)acetat-kompleks.

(1) Sisomicin (0,447 g, 1 mmol) blev omrørt i dimethylformamid (20 ml), og der blev tilsat cobalt(II)acetattetrahydrat (0,516 g, 2,07 mmol). Der blev omrørt i 20 minutter ved stuetemperatur, hvorefter der til det herved dannede cobalt(II)-acetat-kompleks dråbevis blev sat en 1 molær opløsning af eddikesyreanhydrid i tetrahydrofuran (3 ml). Omrøring blev fortsat i 1 time, hvorefter der blev tilsat vand (10 ml), og hydrogensulfid blev boblet gennem opløsningen, indtil alt cobalt(II) var udfældet. Cobalt(II)sulfidet blev fjernet ved filtrering gennem en pude af Celite[®], og filterresten blev vasket med vand. Filtratet blev inddampet i vakuum, og inddampningsresten blev opløst i en minimal mængde chloroform:methanol:ammoniumhydroxid (2:1:0,35). Opløsningen blev ledt gennem en søjle af silicagel (50 g, 60-200 mesh), og søjlen blev vasket med samme opløsningsmiddel. De ensartede fraktioner indeholdende 3,2',6'-tri-N-acetylsisomicin, bestemt ved tyndlagschromatografi, blev samlet, og de samlede fraktioner blev inddampet i vakuum, og inddampningsresten blev lyofiliseret, hvorved vandtes 3,2',6'-tri-N-acetylsisomicin (udbytte = 0,498 g, 88% af det teoretiske).

(2) Ved i ovennævnte fremgangsmåde at erstatte dimethylformamid med dimethylsulfoxid og isolere og rense det resulterende produkt på en måde svarende til den i eksempel 1B beskrevne, vandtes 3,2',6'-tri-N-acetylsisomicin i gode udbytter.

D. Ved anvendelse af acetyl-acetone som overgangsmetal-fældende reagens.

I fremgangsmåderne ifølge eksemplerne 1A, 1B og 1C blev der i stedet for hydrogensulfid anvendt acetyl-acetone som overgangsmetal-fældende reagens, og det resulterende bundfald af det tilsvarende overgangsmetal-acetyl-acetonat blev fraskilt ved filtrering, hvorefter hvert resulterende produkt blev isoleret og rensat på tilsvarende måde som beskrevet, hvorved vandtes 3,2',6'-tri-N-acetylsisomicin.

Eksempel 2

3,2',6'-Tri-N-acetylverdamicin via cupriacetat-kompleks.

Til en omrørt opløsning af verdamicin (4,61 g, 10 mmol) i dimethylformamid (300 ml) og vand (90 ml) blev der sat cupriacetat-monohydrat (14 g, 70 mmol), og reaktionsblandingen blev omrørt ved stuetemperatur i ca. 30 minutter, hvorefter der til det herved dannede cuprisaltkompleks dråbevis blev sat 33 ml af en 1 molær opløsning af eddikesyreanhydrid i dimethylformamid (3,3 ækvivalenter). Omrøring blev fortsat ved stuetemperatur i ca. 18-20 timer, hvorefter der blev tilsat vand, og hydrogensulfid blev boblet gennem opløsningen. Det herved dannede kobbersulfid blev frafiltreret gennem filterhjelpestof på en tragt af sintret glas, idet der blev skyllet med vand (50-200 ml). Filtratet blev inddampet i vakuum, inddampningsresten blev opløst i vand, og pH af den vandige opløsning blev indstillet på ca. 9 under anvendelse af Amberlite[®] IRA-401S-ionbytterharpiks i hydroxidform. Opløsningen blev frysetørret til en rest omfattende 3,2',6'-tri-N-acetylverdamicin (5,5 g). Der blev rensat ved chromatografering på 300 g silicagel (60-200 mesh), idet der blev elueret med chloroform:methanol:ammoniumhydroxid (28%) (30:10:1). Ensartede fraktioner, bestemt ved tyndlagschromatografi, blev samlet, og de samlede fraktioner blev inddampet i vakuum til en rest omfattende 3,2',6'-tri-N-acetylverdamicin, udbytte 1,68 g (2,8 mmol, 28% af det teoretiske), pmr (ppm) (D₂O): δ 1,25 (4''-C-CH₃), 1,36 (6'-C-CH₃, J_{6',7'} = 7Hz), 1,97, 2,04 (N-Acetyler), 2,56 (3''-N-CH₃), 4,91 (H-4''), 5,11 (H-1', J_{1',2'} = 4Hz), 5,60 (d, H-1'', J_{1'',2''} = 2,5 Hz), masse-spektrum: m/e 587 [M]⁺; 392, 374, 364, 346; 233, 215, 205, 187; 457, 439, 429, 411; 183.

Eksempel 3

3,2',6'-Tri-N-(2,2,3-trichlorethoxycarbonyl)-derivater af sisomicin og gentamicin C_{1a} via cupriacetat-kompleks.

A. 3,2',6'-Tri-N-(2,2,2-trichlorethoxycarbonyl)sisomicin.

Cupriacetathydrat (14 g, 70 mmol) blev sat til en omrørt opløsning af sisomicin (5,0 g, 11,1 mmol) i dimethylsulfoxid (300 ml), hvorefter der blev omrørt i

45 minutter og derefter til det således dannede cuprisaltkompleks portionsvis sat N-(2,2,2-trichlorethoxycarbonyloxy)succinimid (9,25 g, 32 mmol) over en periode på 2-3 minutter. Den resulterende grønne opløsning blev omrørt i 1 time, hvorefter reaktionsblandingen blev fortyndet med 2N ammoniumhydroxid (3 liter), og der blev ekstraheret med ethylacetat (to portioner på hver 600 ml). De organiske ekstrakter blev samlet, vasket med 2N ammoniumhydroxid (600 ml) indeholdende natriumchlorid (60 g), tørret over natriumsulfat og indampet i vakuum. Inddampningsresten blev chromatograferet på silicagel (300-350 g), idet der blev elueret med en chloroform:methanol:koncentreret ammoniumhydroxid-opløsningsmiddelblanding (7:2:0,1 efter volumen). De ensartede eluater indeholdende det ønskede produkt, bestemt ved tyndlagschromatografi, blev samlet, og de samlede eluater blev indampet i vakuum, hvorefter indampningsresten blev tørret ved 60°C og 0,1 mm, hvorved vandtes 3,2',6'-tri-N-(2,2,2-trichlorethoxycarbonyl)sisomicin, udbytte 7,52 g (77% af det teoretiske), smp. 124-127°C, $[\alpha]_D^{26} + 91,0^\circ$ (c, 0,5 i chloroform), pmr (ppm) (CDCl_3): δ 1,17 ($4''\text{-C-CH}_3$), 2,58 ($3''\text{-N-CH}_3$) og 4,77 ($-\text{CH}_2\text{CCl}_3$).

B. 3,2',6'-Tri-N-(2,2,2-trichlorethoxycarbonyl)gentamicin C_{1a} .

Cupriacetathydrat (2,8 g, 14 mmol) blev sat til en omrørt opløsning af gentamicin C_{1a} (1,0 g, 2,22 mmol) i dimethylsulfoxid (56 ml) ved 25°C. Omrøring blev fortsat i 1 time, hvorefter der til det herved dannede cuprisaltkompleks portionsvis blev sat N-(2,2,2-trichlorethoxycarbonyloxy)succinimid (1,8 g, 62 mmol) i løbet af 15 minutter. Omrøring blev fortsat i 2 timer, hvorefter reaktionsblandingen blev fortyndet med 2N ammoniumhydroxid (800 ml) og ekstraheret med ethylacetat (3 x 75 ml). De samlede ekstrakter blev indampet i vakuum, og indampningsresten blev chromatograferet på en silicagelsøjle (110 x 2,5 cm), idet der blev elueret først med chloroform (250 ml) og derefter med chloroform:methanol:koncentreret ammoniumhydroxid (7:2:0,1 efter volumen). De ensartede eluater indeholdende det ønskede produkt, bestemt ved tyndlagschromatografi, blev samlet og de samlede eluater blev indampet til en indampningsrest af 3,2',6'-tri-N-(2,2,2-trichlorethoxycarbonyl)gentamicin C_{1a} , udbytte 1,51 g (78% af det teoretiske), $[\alpha]_D^{26} + 80,0^\circ$ (c, 0,3 i chloroform), $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3330, 1730, 1520, 1040, 1025 cm^{-1} , pmr (ppm) (CDCl_3): δ 1,14 ($4''\text{-C-CH}_3$), 2,55 ($3''\text{-N-CH}_3$) og 4,64 ($-\text{CH}_2\text{CCl}_3$).

Eksempel 4

2',6'-Di-N-substitueret sisomicin.

A. 2',6'-Di-N-(2,2,2-trichlorethoxycarbonyl)sisomicin via nikkel(II)acetatkompleks.

Sisomicin (5 g, 11,1 mmol) og nikkel(II)acetathydrat (15 g, 75 mmol) blev sat til methanol (350 ml), og der blev omrørt indtil opløsning. Til den derved vundne opløsning af nikkel(II)saltkomplekser, afkølet i et isbad, blev der sat N-(2,2,2-trichlorethoxycarbonyloxy)succinimid (6,40 g, 22 mmol) i portioner over

en periode på 2-3 minutter, og reaktionsblandingen blev omrørt ved stuetemperatur i 1 time. Der blev til reaktionsblandingen sat koncentreret ammoniumhydroxid (5 ml) og derefter indampet i vakuum til et volumen på ca. 100 ml, tilsat 2N ammoniumhydroxid (500 ml) sammen med natriumchlorid (50 g) og ekstraheret med chloroform (tre portioner på hver 300 ml). De organiske faser blev samlet, tørret over natriumsulfat og indampet. Den vundne indampningsrest blev chromatograferet på 300g silicagel, idet der blev elueret med en chloroform:methanol-koncentreret ammoniumhydroxid-opløsningsmiddelblanding (3:1:0,1 efter volumen). Ensartede fraktioner indeholdende det ønskede produkt, bestemt ved tyndlagschromatografi, blev samlet, og de samlede fraktioner blev indampet i vakuum. Bundfaldet blev tørret ved 60°C ved 0,1 mm tryk til en rest af 2',6'-di-N-(2,2,2-trichlorethoxycarbonyl)sisomicin, udbytte 5,80 g (72% af det teoretiske), smt. 115-119°C, $[\alpha]_D^{26} + 94^\circ\text{C}$ (c, 0,4 i chloroform, pmr (ppm) (CDCl_3): 1,16 (4"-C- CH_3), 1,33 (H-2, $J_{2\text{ax},2\text{eq}}=J_{1,2\text{ax}}=J_{2\text{ax},3}=10\text{Hz}$), 2,60 (3"-N- CH_3), 4,73 ($-\text{CH}_2\text{CCl}_3$), 4,95 (H-1" og H-4'), 5,50 (H-1', $J_{1,2}=3\text{ Hz}$), 6,28 (2'-NH, $J=8\text{ Hz}$) og 7,45 (6'-NH).

B. 2',6'-Di-N-tert.butoxycarbonylsisomicin via cupriacetat-kompleks.

Cupriacetathydrat (0,6 g, 3 mmol) blev sat til en opløsning af sisomicin (447 mg, 1 mmol) i dimethylsulfoxid (10 ml), og der blev omrørt i 10 minutter ved stuetemperatur. Til det derved dannede cuprisalt-kompleks blev der dråbevis sat en opløsning af N-tert.butoxycarbonyloxypthalimid (576 mg, 2,2 mmol) i dimethylsulfoxid (3 ml). Der blev omrørt i 18 timer ved stuetemperatur, og derefter blev reaktionsopløsningen dråbevis sat til omrørt diethylether (75 ml). Det resulterende bundfald fik lov at afsætte sig, diethyletheropløsningen blev dekanteret, og bundfaldet blev revet to gange med hver gang 75 ml diethylether. Bundfaldet blev opløst i methanol, og hydrogensulfid blev boblet gennem methanolopløsningen, og det resulterende cuprisulfid-bundfald blev frafiltreret, hvorefter den methanoliske opløsning blev deioniseret med Amb. lite[®] IRA-401S (OH^-)-ionbytterharpiks (20 g), filtreret, filtratet blev koncentreret i vakuum, og indampningsresten blev chromatograferet på aluminiumoxid (75 g) i en søjle (2,4 x 30 cm), idet der blev elueret med chloroform:methanol:koncentreret ammoniumhydroxid (30:10:1 efter volumen). Ensartede fraktioner indeholdende det ønskede produkt, bestemt ved tyndlagschromatografi, blev samlet, og de samlede fraktioner blev indampet, og indampningsresten blev frysetørret, hvorved vandtes 2',6'-di-N-tert.butoxycarbonylsisomicin, udbytte 258 mg (40% af det teoretiske), massespektrum: (M^+) m/e 647, også m/e 547; 530; 517, 499, 489, 471; 462; 350, 332, 304; 191; 160.

C. 2',6'-Di-N-tert.butoxycarbonylsisomicin via cobalt(II)acetat-kompleks eller via nikkel(II)acetat-kompleks.

Ved anvendelse af fremgangsmåden ifølge eksempel 4B, men ved at anvende methanol som opløsningsmiddel (i stedet for dimethylsulfoxid) og enten nikkel(II)-acetat eller cobalt(II)acetat som overgangsmetalsalt (i stedet for cupriacetat),

vandtes 2',6'-di-N-tert.butoxycarbonylsisomicin i forbedrede udbytter.

Eksempel 5

1,3,2',6'-Tetra-N-acetylsisomicin via cupriacetat-kompleks.

Cupriacetathydrat (49 g, 24,5 mmol) blev sat til en omrørt opløsning af sisomicin (22 g, 49,2 mmol) i 91% vandig methanol. Omrøring af opløsningen blev fortsat i et isvandbad i 15 minutter, hvorefter der til det derved dannede cupri-salt-kompleks dråbevis i løbet af 10 minutter blev sat 21 ml eddikesyreanhydrid (226 mmol), idet temperaturen holdtes under 25°C. Reaktionsblandingen blev omrørt i 3 timer ved stuetemperatur, hvorefter hydrogensulfid blev boblet gennem opløsningen. Det resulterende bundfald af cuprisulfid blev fjernet ved filtrering gennem Celite[®], og filterresten blev vasket med methanol. Filtratet og vaskevæskerne blev samlet og koncentreret i vakuum. Inddampningsresten blev chromatograferet på 600 g silicagel (60-200 mesh), idet der blev elueret med en opløsningsmiddelblanding af chloroform:methanol:koncentreret ammoniumhydroxid (30:10:1). Ensartede fraktioner indeholdende det ønskede produkt, bestemt ved tyndlagschromatografi, blev samlet og indampet i vakuum, og inddampningsresten blev lyofiliseret, hvorved vandtes 1,3,2',6'-tetra-N-acetylsisomicin, udbytte 23,5 g (78% af det teoretiske), $[\alpha]_D^{26} + 191^\circ$ (c, 0,2 i vand), pmr (ppm) (D₂O): δ 1,18 (C-CH₃), 1,88-1,98 (N-acetyler), 2,48 (N-CH₃), 4,88 (H-4'), 5,07 (H-1'', J_{1'',2''} = 4 Hz), 5,48 (H-1', J_{1',2'} = 3 Hz), massespektrum: (M⁺) m/e 615, også m/e 592, 550; 485, 467, 457, 439; 434, 416, 406, 388; 274, 257, 247, 229; 211; 160.

Eksempel 6

1,3,2'-Tri-N-acetylsisomicin.

A. 6'-N-Trifluoracetylsisomicin via cupriacetat-kompleks.

Cupriacetathydrat (17,48 g, 87,3 mmol) blev sat til en omrørt opløsning af sisomicin (40 g, 89,5 mmol) i 95% vandig methanol (3,12 liter). Der blev omrørt i 5 minutter, hvorefter der til det derved dannede cuprisalt-kompleks dråbevis i løbet af 3 minutter blev sat ethyltrifluorthiolacetat (11,65 ml, 91,9 mmol). Omrøring blev fortsat i 1 time, hvorefter der blev tilsat en yderligere portion ethyltrifluorthiolacetat (1,6 ml, 12,45 mmol). Denne reaktionsopløsning indeholdende 6'-N-trifluoracetylsisomicin anvendtes som sådan ved fremgangsmåden i eksempel 6B.

B. 1,3,2'-Tri-N-acetylsisomicin.

Reaktionsblandingen fremstillet i eksempel 6A blev afkølet i et isvandbad, og der blev dråbevis tilsat eddikesyreanhydrid (28 g, 280 mmol) med en hastighed på 25 dråber pr. minut. Der blev omrørt i 18 timer ved stuetemperatur, og derefter blev hydrogensulfid boblet gennem opløsningen i 10 minutter. Det udfældede cuprisulfid blev fjernet ved filtrering gennem en pude af Celite[®]. Filtratet blev ind-

dampet i vakuum, indampningsresten blev opløst i koncentreret ammoniumhydroxid (1 liter), og der blev omrørt i 3 timer ved stuetemperatur. Opløsningen blev koncentreret i vakuum, og indampningsresten blev chromatograferet på 4,5 kg silica-gel (60-200 mesh), idet der blev elueret med et opløsningsmiddelsystem bestående af chloroform:methanol:koncentreret ammoniumhydroxid (30:10:1). Ensartede fraktioner indeholdende det ønskede produkt, bestemt ved tyndlagschromatografi, blev samlet, og de samlede fraktioner blev koncentreret i vakuum, og indampningsresten blev lyofiliseret, hvorved vandtes 1,3,2'-tri-N-acetylsisomicin, $[\alpha]_D^{26} + 191,5^\circ$ (c, 0,3 i vand), pmr (ppm) (D_2O): δ 1,31 (C- $\underline{CH_3}$), 1,92, 1,94, 1,96 (N-acetyler), 2,82 (N- $\underline{CH_3}$), 5,15 (H-1'', J_1'' , $2'' = 3,5$ Hz), 5,55 (H-1', $J_1', 2' = 2,5$ Hz), massespektrum: (M^{++}) 573 også m/e 443, 425, 415, 397; 275, 257, 247, 229; 434, 416, 406, 388; 169, 160.

Eksempel 7

6'-N-Hydroxycarbonyloxycarbonylaminoglycosider.

A. 6'-N-Benzoyloxycarbonylgentamicin B via cuprichlorid-kompleks.

Cuprichloriddihydrat (0,34 g, 2 mmol) blev sat til en omrørt opløsning af gentamicin B (0,964 g, 2 mmol) i vand (3 ml) og dimethylsulfoxid (30 ml). Der blev omrørt ved stuetemperatur i 20 minutter, og derefter blev der til det derved in situ dannede cuprisalt-kompleks dråbevis sat en opløsning af N-benzoyloxycarbonyloxypthalimid (1,105 g, 4 mmol) i dimethylsulfoxid (5 ml). Reaktionens forløb blev fulgt ved tyndlagschromatografi på silicagel under anvendelse af et opløsningsmiddelsystem bestående af chloroform:methanol:koncentreret ammoniumhydroxid (2:1:0,35). Efter endt reaktion, påvist ved tyndlagschromatografi (ca. 3 timer), blev der til reaktionsblandingen sat vand (10 ml), og hydrogensulfid blev boblet gennem opløsningen. Det resulterende bundfald af cuprisulfid blev fjernet ved filtrering gennem en pude af Celite[®], og filterresten blev vasket med methanol. Samlet filtrat og methanolvaskevæske blev omrørt med Amberlite[®] IRA-401S (OH⁻)-ionbytterharpiks. Harpiksen blev frafiltreret og vasket med methanol. Samlet filtrat og methanolvaskevæske blev indampet i vakuum under anvendelse af benzen som et co-opløsningsmiddel, indtil alt vandet var fjernet. Den resulterende koncentrerende reaktionsopløsning blev hældt i et stort volumen methylenchlorid under omrøring. Det resulterende bundfald blev fraskilt ved filtrering, og bundfaldet blev vasket med ether, hvorved vandtes 6'-N-benzoyloxycarbonylgentamicin B, udbytte 100%, pmr (ppm) (D_2O): δ 1,26 (4''-C- $\underline{CH_3}$), 2,65 (3''-N- $\underline{CH_3}$), 5,13 og 7,43 (O- $\underline{CH_2-C_6H_5}$).

B. Ved anvendelse af fremgangsmåden ifølge eksempel 7A, men ved at erstatte gentamicin B med et hvilket som helst antibakterielt aminoglycosid-middel med en primær carbinamin ved C-5', vandtes det tilsvarende 6'-N-benzoyloxycarbonylaminoglycosid, f.eks. sisomicin, gentamicin C_{1a}, gentamicin A, Antibioticum JI-20A,

Antibioticum 66-40B, Antibioticum 66-40D, de 5-epi-, 5-epi-azido-5-deoxy- og 5-epi-amino-5-deoxy-analoge af disse, Antibioticum Mu-1, Antibioticum Mu-2, Antibioticum Mu-4, Antibioticum Mu-5, tobramycin, kanamycin A, kanamycin B, Antibioticum BBK-8, Antibioticum XK-88-3 og Antibioticum XK-88-5.

C. Ved anvendelse af fremgangsmåderne ifølge eksemplerne 7A og 7B, men i stedet for N-benzyloxycarbonyloxyphtalimid anvende ækvivalente mængder af andre phtalimid-reagenser, f.eks. N-tert.butoxycarbonyloxyphtalimid eller N-(2,2,2-trichloroethoxycarbonyloxy)phtalimid, vandtes det tilsvarende 6'-N-hydroxycarbonyloxycarbonylaminoglycosid, f.eks. de tilsvarende 6'-N-tert.butoxycarbonylaminoglycosid- og 6'-N-(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl)-aminoglycosid-derivater.

D. 6'-N-Tert.butoxycarbonylgentamicin B via cupriacetat-kompleks.

Cupriacetathydrat (24 g, 120 mmol) blev sat til en omrørt opløsning af gentamicin B (19,28 g, 40 mmol) i dimethylsulfoxid (1 liter). Omrøring blev fortsat i 20 minutter, og til det derved in situ dannede cuprisalt-kompleks blev der sat en opløsning af N-tert.butoxycarbonyloxyphtalimid (16 g, 61 mmol) i dimethylsulfoxid (200 ml) over en periode på 20 minutter. Der blev omrørt i 18 timer ved stuetemperatur, og derefter blev hydrogensulfid boblet gennem opløsningen for at fælde cuprisulfid. De faste stoffer blev fjernet ved filtrering gennem en pude af Celite[®], og filterresten blev vasket med 200 ml vand. Samlet filtrat og vaskevæsker blev omrørt med 200 ml Amberlite[®] IRA-401S (OH⁻)-ionbytterharpiks i 1 time. Harpiksen blev fjernet ved filtrering, vasket med vand, og samlet filtrat og vaskevæsker blev koncentreret i vakuum, idet benzen anvendtes til azeotrop med vand. Inddampningsresten blev opløst i methanol, og methanoloopløsningen blev hældt i overskud af ether under omrøring. Det resulterende bundfald omfattende 6'-N-tert.-butoxycarbonylgentamicin B blev frafiltreret og tørret, udbytte 23 g (100% af det teoretiske), $[\alpha]_D^{26} + 124^\circ$ (c, 1 i methanol).

pmr (ppm) (D₂O): 1,21 (4"-C-CH₃), 1,42 (t-butyl), 2,55 (3"-N-CH₃), 5,06 (H-1", J_{1", 2"} = 4,0 Hz), 5,21 (H-1', J_{1', 2'} = 3,0 Hz). Analyse beregnet for C₂₄H₄₆N₄O₁₂, CO₂, H₂O: C: 46-57, H: 7,51, N: 8,68%. Fundet: C: 46,80, H: 7,82, N: 8,54%.

Eksempel 8

3,6'-Di-N-hydroxycarbonyloxycarbonyl-aminoglycosider.

A. 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonylgentamicin B via blanding af cupriacetat- og nikkel(II)acetat-komplekser.

Cupriacetathydrat (8 g, 40 mmol) og nikkel(II)acetattetrahydrat (9,92 g, 40 mmol) blev sat til en omrørt opløsning af gentamicin B (9,64 g, 20 mmol) i dimethylsulfoxid (400 ml). Der blev omrørt ved stuetemperatur i 30 minutter, hvorefter der til det herved dannede cupri-nikkel(II)salt-kompleks blev sat N-benzyloxycarbonyloxyphtalimid (14 g, 47,2 mmol) i dimethylsulfoxid (70 ml) dråbevis

over en periode på 10 minutter. Der blev omrørt 1 time ved stuetemperatur, og derefter blev reaktionsblandingen hældt i ether (4 liter) og rystet i 1 minut. Olien fik lov at afsætte sig, og overliggende ether blev dekanteret fra. Denne operation blev gentaget to yderligere gange under anvendelse af henholdsvis 1500 ml og 1000 ml diethylether. Den resulterende gummiagtige rest blev opløst i methanol (400 ml) og koncentreret ammoniumhydroxid (40 ml), og hydrogensulfid blev boblet gennem opløsningen, hvorefter det resulterende bundfald omfattende cuprisulfid og nikkelsulfid blev fraskilt ved filtrering gennem en pude af Celite[®]. Filterresten blev vasket med methanol, og derefter blev samlet filtrat og methanolvaskevæske omrørt med Amberlite[®] IRA-401S (OH⁻)-ionbytterharpiks (400 ml) for at fjerne N-hydroxyphthalimidet. Opløsningen blev filtreret, harpiksen blev vasket med methanol, og derefter blev samlet filtrat og methanolvaskevæske inddampet i vakuum, og inddampningsresten blev chromatograferet på silicagel (900 g), idet der blev elueret med chloroform:methanol:koncentreret ammoniumhydroxid (30:10:1). Ensartede fraktioner indeholdende det ønskede produkt, bestemt ved tyndlagschromatografi, blev samlet, og de samlede fraktioner blev inddampet i vakuum til en inddampningsrest omfattende 3,6'-di-N-benzyloxycarbonylgentamicin B, udbytte 10,86 g (75% af det teoretiske), $[\alpha]_D^{26} + 105,3^\circ$ (c, 4,07 i vand). Analyse beregnet for: $C_{35}H_{50}O_{14}N_4 \cdot CO_2 \cdot 2H_2O$: C: 52,04, H: 6,55, N: 6,74%. Fundet: C: 51,94, H: 6,33, N: 6,83%.

B. 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonylgentamicin B via cobalt(II)acetat-kompleks.

Gentamicin B (4,82 g, 10 mmol) blev opløst i dimethylsulfoxid (195 ml) og vand (5 ml). Der blev tilsat triethylamin (2 ml) og omrørt. Der blev tilsat cobalt(II)acetattetrahydrat (7,08 g, 28,5 mmol), og omrøring blev fortsat i 30 minutter, hvorefter der til det herved dannede gentamicin B-cobalt(II)acetat-kompleks dråbevis blev sat en opløsning af N-(benzyloxycarbonyloxy)phthalimid (6,5 g, 20 mmol) i dimethylsulfoxid (20 ml) og omrørt i 3 timer, hvorefter der blev hældt i ether og isoleret på den i eksempel 8A beskrevne måde. Den resulterende rest blev rensed ved opløsning i en lille mængde methanol og tilsætning af ethylacetat efterfulgt af overskud af diethylether. Det resulterende bundfald blev frafiltreret og lufttørret, hvorved vandtes rent 3,6'-di-N-benzyloxycarbonylgentamicin B, udbytte 90% af det teoretiske.

C. 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonylgentamicin B via cadmium(II)acetat-kompleks.

Gentamicin B (4,82 g, 10 mmol) blev opløst i dimethylsulfoxid (195 ml), og der blev tilsat cadmium(II)acetatdihydrat (7,98 g, 30 mmol). Der blev omrørt i 30 minutter, og derefter blev der til det derved dannede gentamicin B-cadmium(II)acetat-kompleks sat en opløsning af N-(benzyloxycarbonyloxy)phthalimid (6,5 g, 20 mmol) i dimethylsulfoxid (20 ml). Der blev omrørt i 3 timer ved stuetemperatur og derefter isoleret og rensed på den i eksempel 8A beskrevne måde, hvorved vandtes 3,6'-di-N-benzyloxycarbonylgentamicin B.

D. 3,6'-Di-N-benzyloxycarbonylkanamycin A via nikkel(II)acetat-kompleks.

Nikkel(II)acetattetrahydrat (24,8 g, 10 mmol) blev sat til en omrørt opløsning af kanamycin A (9,7 g, 20 mmol) i dimethylsulfoxid (400 ml). Der blev omrørt ved stuetemperatur i 30 minutter, og til det resulterende nikkel(II)salt-kompleks blev der sat N-benzyloxycarbonyloxypthalimid (13,0-15,6 g, 44-52 mmol) i dimethylsulfoxid (70 ml) over en periode på 10 minutter. Der blev omrørt ved stuetemperatur i 1 time, og derefter blev reaktionsblandingen hældt i ether (2500 ml) og rystet i 1 minut. Olien fik lov at afsætte sig, og den overliggende dimethylsulfoxidether blev dekanteret. Denne operation blev gentaget to yderligere gange under anvendelse af henholdsvis 1500 ml og 1000 ml ether. Den resulterende gummiagtige rest blev opløst i methanol (1000 ml) og koncentreret ammoniumhydroxid (50 ml). Hydrogensulfid blev boblet gennem opløsningen, og det resulterende bundfald af nikkel(II)sulfid blev fraskilt gennem en pude af Celite[®], og filterresten blev vasket med methanol. Samlet filtrat og methanolvaskevæske blev omrørt med Amberlite[®] IRA-401S (OH⁻)-ionbytterharpiks (300 g), harpiksen blev frafiltreret, og filtratet blev inddampet i vakuum. Den resulterende gummiagtige inddampningsrest blev revet med en 50:50-blanding af acetonitril:ether, og det resulterende hvide krystallinske faste stof, blev frafiltreret, hvorved vandtes 3,6'-di-N-benzyloxycarbonylkanamycin A, udbytte 12,5 g (83,5% af det teoretiske), $[\alpha]_D^{26} + 78^{\circ}$ (c, 4,84 i 50% vandig methanol). Analyse beregnet for: C₃₄H₄₈O₁₅N₄H₂O: C: 56,2, H: 6,75, N: 6,94%. Fundet: C: 51,02, H: 6,26, N: 6,85%.

E. Hvert af de følgende aminoglycosider blev behandlet med en blanding af cupriacetathydrat og nikkel(II)acetattetrahydrat eller med cobalt(II)acetattetrahydrat eller med cadmium(II)acetatdihydrat ved fremgangsmåderne ifølge henholdsvis eksemplerne 8A til 8D.

- 1) gentamicin B₁
- 2) gentamicin A₃
- 3) 6'-N-methylkanamycin A.

Hvert af de resulterende produkter blev isoleret og rensat, hvorved vandtes henholdsvis:

- 1) 3,6'-di-N-benzyloxycarbonylgentamicin B₁
- 2) 3,6'-di-N-benzyloxycarbonylgentamicin A₃
- 3) 3,6'-di-N-benzyloxycarbonyl-6'-N-methylkanamycin A.

F. Fremstilling af 3,6'-Di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B ud fra 6'-tert.-butoxycarbonylgentamicin B via cupriacetat-kompleks.

Til en opløsning af 6'-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B (10 g, 17,1 mmol) i dimethylsulfoxid (300 ml) blev der sat cupriacetatmonohydrat (6,9 g, 34,5 mmol), og der blev omrørt i 20 minutter. Til det herved in situ dannede cuprisaltkompleks blev der dråbevis sat en opløsning af N-tert.butoxycarbonyloxypthalimid (4,5 g,

17,1 mmol) i dimethylsulfoxid (20 ml). Omrøring blev fortsat i 2 timer, hvorefter der blev tilsat yderligere 2,4 g N-tert.butoxycarbonyloxyphtalimid, og omrøring af reaktionsblandingen blev fortsat i 10 timer. Reaktionsblandingen blev hældt i ether (1,5 liter) under omrøring. Det resulterende bundfald eller den resulterende olie fik lov at afsætte sig, og overliggende væske blev dekanteret forsigtigt. Resten blev vasket to gange med ether (300 ml). Den resulterende rest blev opløst i methanol (100 ml), og hydrogensulfid blev boblet gennem opløsningen for at udfælde cuprisulfid fuldstændigt. De faste stoffer blev fjernet ved filtrering gennem en pude af Celite[®] og vasket med methanol. Den methanoliske opløsning blev omrørt med netop nok Amberlite[®] IRA-401S (OH⁻)-ionbytterharpiks til at bringe pH til ca. 9, og N-hydroxyphtalimid blev fjernet. Harpiksen blev fjernet ved filtrering, vasket med methanol, og samlet filtrat og vaskevæsker blev koncentreret til et volumen på ca. 50 ml indeholdende 3,6'-di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B, der uden yderligere rensning kunne anvendes som udgangsforbindelse ved fremgangsmåden ifølge eksemplerne 15 og 16B. For at isolere forbindelsen blev der krystalliseret ved rivning af resten, efter inddampning, med ether, hvorved vandtes 3,6'-di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B (udbytte 90% af det teoretiske). Alternativt blev der rensat ved chromatografering på silicagel (forhold forbindelse:silicagel=1:40) under anvendelse af chloroform:methanol:ammoniumhydroxid (2 : 1:0,35) som fremkaldende opløsningsblanding. De ensartede fraktioner indeholdende 3,6'-di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B, bestemt ved tyndlagschromatografi, blev samlet og koncentreret og lyofiliseret, hvorved vandtes 3,6'-di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B, $[\alpha]_D^{26} + 113,3^\circ$ (c, 0,39 i vand), pmr (ppm) (D₂O): δ 1,17 (4"-C-CH₃), 1,38 (t-butyl), 2,5 (3"-N-CH₃), 2,54 (H-3", J₂" = 10 Hz), 4,02 (H-5" eq, J₅" ax,eq = 12 Hz), 5,04 (H-1", J₁"₂" = 3,5 Hz), 5,23 (H-1', J₁'₂' = 3,0 Hz). Analyse beregnet for C₂₉H₅₇O₁₅N₄·H₂O: C: 49,63, H: 8,19, N: 7,98%. Fundet: C: 49,83, H: 7,81, N: 7,68%.

G. 3,6'-Di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B ud fra gentamicin B via cupriacetat-kompleks.

Cupriacetatmonohydrat (5,0 g, 25 mmol) blev sat til en omrørt opløsning af gentamicin B (4,82 g, 10 mmol) i dimethylsulfoxid (250 ml). Der blev omrørt i 30 minutter, og derefter blev der til det derved in situ dannede cuprisaltkompleks dråbevis sat en opløsning af N-tert.butoxycarbonyloxyphtalimid (10,5 g, 40 mmol) i dimethylsulfoxid (20 ml). Der blev omrørt ved stuetemperatur i 2 timer, hvorefter der blev tilsat yderligere N-tert.butoxycarbonyloxyphtalimid (1,5 g, 5,7 mmol). Der blev omrørt i 16 timer, derefter igen tilsat yderligere N-tert.butoxycarbonyloxyphtalimid (0,35 g, 1,33 mmol). Omrøring blev fortsat i 6 timer, og derefter blev reaktionsblandingen hældt i 1,5 liter omrørt ether. Der blev omrørt i 30 minutter, reaktionsblandingen blev henstillet, overliggende opløsning blev dekanteret, der blev igen tilsat 500 ml ether til resten, henstillet, og overlig-

gende opløsning blev dekanteret. Den resulterende rest blev opløst i 100 ml methanol, og hydrogensulfid blev boblet gennem i 15 minutter. Det faste cuprisulfid blev fjernet ved filtrering gennem en pude af Celite[®], og filterresten blev vasket med methanol. Den methanoliske opløsning blev behandlet med Amberlite[®] IRA-401S (OH⁻)-ionbytterharpiks for at bringe pH af opløsningen til ca. 8,5-9,0, hvorefter de faste stoffer blev fjernet ved filtrering, og de faste stoffer blev vasket med methanol. Opløsningen blev indampet til næsten tørhed, og der blev lyofiliseret fra vand. 3,6'-Di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B blev krystalliseret ved rivning med ether. Alternativt kunne det rå koncentrat anvendes som udgangsmateriale ved fremgangsmåden ifølge eksemplerne 15 og 16B.

Eksempel 9

Andre 3,2',6'-tri-N-acylaminoglycosider.

A. 3,2',6'-Tri-N-benzyloxycarbonylgentamicin C₂ via blanding af cupriacetatkompleks og nikkel(II)acetatkompleks.

Cupriacetathydrat (0,6 g, 3 mmol) og nikkel(II)acetattetrahydrat (0,743 g, 3 mmol) blev sat til en omrørt opløsning af gentamicin C₂ (0,925 g, 2 mmol) i dimethylsulfoxid (40 ml). Der blev omrørt ved stuetemperatur i 30 minutter, og derefter blev der til det derved dannede blandede cupri- og nikkelsaltkompleks sat N-benzyloxycarbonyloxypthalimid (1,8 g, 6,5 mmol) i dimethylsulfoxid (7 ml) over en periode på 10 minutter. Omrøring blev fortsat i 1 time, og reaktionsblandingen blev derefter hældt i ether (400 ml) under omrøring. Den overliggende ether blev dekanteret, og den foregående operation blev gentaget under anvendelse af henholdsvis 200 ml og 100 ml ether. Den resulterende gummiagtige rest blev opløst i methanol (100 ml) og koncentreret ammoniumhydroxid (5 ml), og hydrogensulfid blev derefter boblet gennem opløsningen. Det resulterende bundfald af cuprisulfid og nikkel(II)sulfid blev fjernet ved filtrering gennem en pude af Celite[®], bundfaldet blev vasket med methanol, og derefter blev samlet filtrat og methanolvaskevæske omrørt med Amberlite[®] IRA-401S (OH⁻)-ionbytterharpiks. Harpiksen blev frafiltreret og vasket med methanol. Samlet filtrat og methanolvaskevæske blev indampet i vakuum, og den resulterende gummiagtige indampningsrest blev derefter chromatograferet på silicagel (50 g), idet der blev elueret med chloroform:methanol:koncentreret ammoniumhydroxid (30:10:1). De ensartede fraktioner indeholdende det ønskede produkt, bestemt ved tyndlagschromatografi, blev samlet, og de samlede eluater blev indampet til en rest omfattende 3,2',6'-tri-N-benzyloxycarbonylgentamicin C₂, udbytte 1,4 g (81% af det teoretiske), massespektrum: m/e 484, 411, 325, 160.

B. På tilsvarende måde som beskrevet i eksempel 9A blev gentamicin C₁ behandlet med cupriacetathydrat og nikkel(II)acetattetrahydrat i dimethylsulfoxid efterfulgt af behandling af det derved dannede saltkompleks med N-benzyloxycarbonyloxy-

phthalimid og påfølgende benhandling med hydrogensulfid og isolering og rensning af det resulterende produkt, hvorved vandtes 3,2',6'-tri-N-benzyloxycarbonylgentamicin C₁, udbytte 1,3 g, 72,5% af det teoretiske. Massespektrum: m/e 749; 615, 484, 466, 456; 425, 407; 325, 307, 297; 291; 160.

G. Blandede 3,2',6'-tri-N-acylaminoglycosider og omdannelse til 3,6'-di-N-acylaminoglycosid.

(1) 6'-N-Acetyl-2'-N-(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl)sisomicin via cupriacetat-kompleks.

På tilsvarende måde som beskrevet i eksempel 4A blev 6'-N-acetylsisomicin behandlet med ca. 7 ækvivalenter cupriacetathydrat i methanol, og derefter blev der til det herved dannede cuprisaltkompleks portionsvis sat ca. 1 ækvivalent N-(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl)succinimid. Reaktionsblandingen blev omrørt i 1 time og derefter behandlet med ammoniumhydroxid, og det resulterende produkt blev isoleret og rensset på tilsvarende måde som beskrevet i eksempel 4A, hvorved vandtes 2'-N-(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl)-6'-N-acetylsisomicin.

(2) 3,6'-Di-N-acetyl-2'-N-(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl)sisomicin via cupriacetat-kompleks.

Cupriacetathydrat (24 g, 120 mmol) blev sat til en omrørt opløsning af 2'-N-(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl)-6'-N-acetylsisomicin (26,5 g, 40 mmol) i dimethylsulfoxid (1 liter). Omrøring blev fortsat i 20 minutter, hvorefter der til det herved dannede cuprisalt-kompleks dråbevis med en hastighed på ca. 25 dråber pr. minut blev sat 40 ml af en 1 molær opløsning af eddikesyreanhydrid i tetrahydrofuran (40 mmol). Reaktionsblandingen blev omrørt i yderligere 30 minutter og derefter hældt i ether (8 liter). Der blev rystet godt og henstillet. Etherlaget blev dekanteret, og resten blev vasket to gange yderligere hver gang med 1 liter ether. Resten blev opløst i methanol (800 ml), og hydrogensulfid blev gennemboblet i 15 minutter. Blandingen blev omrørt i yderligere 30 minutter, hvorefter opløsningen blev filtreret gennem en pude af Celite[®], og cuprisulfatresten blev vasket med vand. Samlet filtrat og vandvaskevæsker blev koncentreret, og inddampningsresten blev chromatograferet på silicagel, idet der blev elueret med chloroform:methanol:ammoniumhydroxid (30:10:1). Ensartede fraktioner indeholdende det ønskede produkt, bestemt ved tyndlagschromatografi, blev samlet, og de samlede fraktioner blev inddampet i vakuum til en rest omfattende 3,6'-di-N-acetyl-2'-N-(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl)sisomicin.

(3) 3,6'-Di-N-acetylsisomicin.

3,9 Molære ækvivalenter zinkpulver blev sat til en opløsning af 3,6'-di-N-acetyl-2'-N-(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl)sisomicin i 10% eddikesyre i methanol. Opløsningen blev opvarmet ved tilbagesvalingstemperatur i to timer, idet reaktionen fulgtes ved tyndlagschromatografi på silicagel under anvendelse af chloroform:me-

thanol:ammoniumhydroxid (30:10:1) som opløsningsmiddelsystem. Efter endt reaktion, bestemt ved tyndlagschromatografi, blev opløsningen filtreret, der blev tilsat natriumcarbonat til filtratet, filtreret, og filtratet blev koncentreret i vakuum. Den resulterende rest blev rensat ved chromatografi på silicagel, idet der blev elueret med chloroform:methanol:ammoniumhydroxid (30:10:1). Ensartede fraktioner indeholdende det ønskede produkt, bestemt ved tyndlagschromatografi, blev samlet, og de samlede fraktioner blev derefter inddampet i vakuum, og den resulterende vandige blanding blev lyofiliseret til en rest omfattende 3,6'-di-N-acetylsisomicin.

Eksempel 10

1,3,2',3''-Tetra-N-acetylsisomicin via cupriacetat-kompleks.

A. 6'-N-trifluoracetylsisomicin via cupriacetat-kompleks.

Sisomicin (39,1 g, 87,5 mmol) blev opløst i methanol (2950 ml) og vand (200 ml). Under omrøring blev der tilsat cupriacetathydrat (8,92 g, 44,7 mmol). Der blev omrørt i 15 minutter og derefter dråbevis over en periode på tre minutter tilsat ethyltrifluororthiolacetat (11,55 ml, 14,2 g, 90 mmol) efterfulgt af yderligere 1,3 ml (1,6 g, 10 mmol) ethyltrifluororthiolacetat. Methanolen blev fjernet ved inddampning i vakuum, og derefter blev der tilsat vand, indtil reaktionsvolumenet var 300 ml. Hydrogensulfid blev ledt gennem reaktionsopløsningen, og derefter blev det resulterende cuprisulfidbundfald frafiltreret gennem en Celite®-pude, hvorved vandtes en opløsning indeholdende 6'-N-trifluoroacetylsisomicin, der anvendtes som sådant ved fremgangsmåden i eksempel 10B.

B. 1,3,2',3''-Tetra-N-acetyl-6'-N-trifluoracetylsisomicin.

Til opløsningen vundet i eksempel 10A blev der sat 300 ml methanol, og derefter blev der tilsat eddikesyreanhydrid (109 ml, 1,16 mol, 13,2 ækvivalenter), idet reaktionsblandingens pH blev indstillet på 8,5 med triethylamin forud for tilsætning af de sidste 10 ml eddikesyreanhydrid. Der blev omrørt i 18 timer ved stuetemperatur og derefter inddampet i vakuum til en rest omfattende 1,3,2',3''-tetra-N-acetyl-6'-N-trifluoracetylsisomicin.

C. 1,3,2',3''-Tetra-N-acetylsisomicin.

Det i eksempel 10B fremstillede 1,3,2',3''-tetra-N-acetyl-6'-N-trifluoracetylsisomicin blev opløst i 500 ml koncentreret ammoniumhydroxid. Der blev omrørt ved stuetemperatur natten over og inddampet i vakuum. Inddampningsresten blev opløst i vand, og opløsningen blev omrørt med Amberlite® IRA-401S (OH⁻)-ionbytterharpiks. Harpiksen blev fjernet ved filtrering, vasket med methanol, og derefter blev samlet filtrat og methanolvaskevæske inddampet i vakuum efterfulgt af chromatografi af inddampningsresten på en 1,7 kg silicagelsøjle (7,5 x 165 cm), idet der blev elueret med den nedre fase af et chloroform:methanol:ammoniumhydroxid

(28%) (2:1:1)-opløsningsmiddelsystem. Ensartede fraktioner indeholdende det ønskede produkt, bestemt ved tyndlagschromatografi, blev samlet, og de samlede eluater blev indampet til en rest omfattende 1,3,2',3''-tetra-N-acetylsisomicin, udbytte 29,9 g (55% af det teoretiske), $[\alpha]_D^{26} + 207,4^\circ$ (c, 0,3 i vand), pmr (ppm) (D_2O): δ 1,07, 1,17 ($4''\text{-C-CH}_3$), 1,95, 1,98, 2,03 (N-acetyler), 3,13, 3,00 ($3''\text{-N-CH}_3$), 5,29 (H-1'', $J_{1'',2''} = 4,0\text{Hz}$), 5,64 (H-1', $J_{1',2'} = 2,5\text{Hz}$), massespektrum: (M^{+}) m/e 615, også m/e 598; 592; 550; 443, 425, 415, 397; 453, 411; 275, 257, 247, 229; 202; 169. Analyse beregnet for: $C_{27}H_{45}O_{11}N_5 \cdot 1,5 H_2O$: C: 50,43, H: 7,52, N: 10,89%. Fundet: C: 50,61, H: 7,36, N: 10,79%.

Eksempel 11

Isolering og eventuel videreanvendelse af aminocyclitol-aminoglycosid-overgangsmetalsalt-komplekser.

A. Isolering af gentamicin B-dicupriacetat-kompleks.

Cupriacetathydrat (0,4 g, 2 mmol) blev sat til en opløsning af gentamicin B (0,482 g, 1 mmol) i methanol (25 ml), og der blev omrørt i 30 minutter ved stuetemperatur, og derefter blev opløsningsmidlet afdampet i vakuum, og indampningsresten blev tørret ved 60°C i vakuum, hvorved vandtes gentamicin B-dicupriacetat-kompleks som et dybblåfarvet fast stof (i modsætning til grønfarvet cupriacetatdihydrat), udbytte 0,8 g, $\lambda_{\text{max}}^{\text{nujol}}$ 6,42, 8,72, 13,90 μ .

B. Isolering af gentamicin B-dicobalt(II)acetat-kompleks.

(1) Gentamicin B (0,482 g, 1 mmol) blev opløst i dimethylsulfoxid (20 ml), og der blev tilsat cobalt(II)acetattetrahydrat (0,598 g, 2 mmol). Der blev omrørt i 30 minutter ved stuetemperatur og derefter hældt i ether (30 ml). Etherlaget blev dekanteret, og resten blev revet med frisk ether (20 ml). Denne proces blev gentaget endnu en gang, hvorefter der blev revet med ethylether. Det resulterende faste stof blev isoleret ved filtrering, vasket med ethylether og tørret, hvorved vandtes gentamicin B-dicobalt(II)acetat-kompleks som et lavendelfarvet fast stof (i modsætning til lyserødt cobalt(II)acetattetrahydrat), udbytte 0,8 g, $\lambda_{\text{max}}^{\text{nujol}}$ 5,88, 6,36, 10,59, 12,42, 12,92, 13,90 μ .

(2) Det ovenfor isolerede gentamicin B-dicobalt(II)acetat-kompleks blev opløst i dimethylsulfoxid og behandlet med N-(benzyloxycarbonyloxy)succinimid på tilsvarende måde som beskrevet i eksempel 8B efterfulgt af isolering og rensning på den beskrevne måde, hvorved vandtes 3,6'-di-N-benzyloxycarbonylgentamicin B.

C. På tilsvarende måde som beskrevet i eksempel 11A og 11B blev gentamicin B behandlet med nikkel(II)acetattetrahydrat og med cadmium(II)acetatdihydrat, og de derved dannede komplekser blev isoleret og rensset, hvorved vandtes gentamicin B-dinikkel(II)acetat-kompleks og gentamicin B-dicadmium(II)acetat-kompleks.

På tilsvarende måde kunne hvert af de i de foregående eksempler in situ fremstillede aminocyclitolaminoglycosid-overgangsmetalsalt-komplekser isoleres.

Omsætning af 1,3-di-de-N-amidinodihydrostreptomycin med N-benzyloxycarbonyloxyphtalimid med og uden cupriacetatkompleks.

A. 1,3-Di-de-N-amidinodihydrostreptomycin.

En opløsning af dihydrostreptomycinsulfat (25 g, 17,1 mmol) i vand (100 ml) blev sat til en opløsning af bariumhydroxid (54 g) opløst i vand (600 ml). Det herved dannede bariumsulfat blev fraskilt ved filtrering, og filtratet blev opvarmet ved tilbagesvalingstemperatur under en atmosfære af nitrogen i 62 timer. Til den afkølede reaktionsblanding blev der sat 4N svovlsyre dråbevis, indtil reaktionsblandingen nåede en pH på 7. Det derved dannede bariumsulfat blev fraskilt ved filtrering, og der blev sat Amberlite[®] IRA-401S (OH⁻)-harpiks til filtratet, og blandingen blev opvarmet, indtil filtratet nåede en pH på 10. Vandet blev fjernet ved destillation, og inddampningsresten blev chromatograferet på silicagel (600 g), idet der blev elueret med en opløsningsmiddelblanding af chloroform/methanol/28% ammoniumhydroxid (3:4:2). Ensartede fraktioner indeholdende 1,3-di-de-N-amidinodihydrostreptomycin, bestemt ved tyndlagschromatografi, blev samlet, og de samlede eluater blev inddampet til en rest af 1,3-di-de-N-amidinodihydrostreptomycin (udbytte 10,9 g).

B. Omsætning af 1,3-di-de-N-amidinodihydrostreptomycin via cupriacetat-kompleks med N-benzyloxycarbonyloxyphtalimid til dannelse af 2"-N-benzyloxycarbonyl-1,3-di-de-N-amidinodihydrostreptomycin.

Til en opløsning af 1,3-di-de-N-amidinodihydrostreptomycin (5 g, 10 mmol) i dimethylsulfoxid (200 ml) blev der sat cupriacetatmonohydrat (2 g, 10 mmol), og der blev omrørt ved stuetemperatur i 15 minutter, hvorefter der til det herved dannede cuprisaltkompleks dråbevis under stadig omrøring af reaktionsblandingen blev sat N-benzyloxycarbonyloxyphtalimid (5,5 g) i dimethylsulfoxid (20 ml). Omrøring blev fortsat i 2 timer, hvorefter reaktionsblandingen blev hældt i diethylether (2 liter). Den overliggende ether blev dekanteret, og den foregående operation blev gentaget under anvendelse af henholdsvis 1 liter og 500 ml diethylether. Den resulterende gummiagtige rest blev opløst i en opløsningsmiddelblanding omfattende methanol (150 ml) og 28% ammoniumhydroxid (10 ml). Hydrogensulfid blev boblet gennem opløsningen, og det resulterende bundfald af cuprisulfid blev fraskilt ved filtrering gennem en pude af Celite[®], og filtratet blev inddampet, og inddampningsresten blev chromatograferet på silicagel (400 g), idet der blev elueret med en opløsningsmiddelblanding af chloroform/methanol/28% ammoniumhydroxid (2:1:0,35). Ensartede eluater indeholdende den ønskede forbindelse, bestemt ved tyndlagschromatografi, blev samlet, og de samlede eluater blev koncentreret til en rest omfattende 2"-N-benzyloxycarbonyl-1,3-di-de-N-amidinodihydrostreptomycin, udbytte 6 g (98% af det teoretiske), $[\alpha]_D^{26} -96,5^\circ$ (c, 0,5 i vand). pmr (ppm) (D₂O): δ 1,21 (d, 4'-C-CH₃, J=6 Hz), 3,04 (s, 2"-N-CH₃), 5,13 (s, C₆H₅CH₂CONH),

7,41 (s, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CONH}$). Analyse beregnet for: $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{O}_{14}\text{N}_3\text{H}_2\text{O}$: C: 49,76, H: 6,96, N: 6,45. Fundet: C: 49,69, H: 6,78, N: 6,27%.

CD: $[\Theta]_{\text{TACu}}^{285} = +7.320$.

C. Omsætning af 1,3-di-de-N-amidinodihydrostreptomycin med N-benzyloxycarbonyloxyphthalimid uden cupriacetatkompleks, hvorved blev fremstillet 1-N-benzyloxycarbonyl-1,3-di-de-N-amidinodihydrostreptomycin.

Til en opløsning af 1,3-di-de-N-amidinohydrostreptomycin (1 g, 2,0 mmol) i N,N-dimethylformamid (40 ml) blev der sat en opløsning af N-benzyloxycarbonyloxyphthalimid (0,8 g, 2,7 mmol) i N,N-dimethylformamid (4 ml). Reaktionsblandingen blev omrørt i 1 time, hvorefter der blev tilsat vand (10 ml) og Amberlite[®] IRA-401S (OH^-)-harpiks, indtil pH af reaktionsblandingen nåede 8,5. Harpiksen blev fraskilt ved filtrering, opløsningsmidlerne blev fjernet ved destillation, og derefter blev inddampningsresten chromatograferet på silicagel (100 g), idet der blev elueret med en opløsningsmiddelblanding af chloroform/methanol/28% ammoniumhydroxid (2:1:0,35). Ensartede eluater indeholdende 1-N-benzyloxycarbonyl-1,3-di-de-N-amidinodihydrostreptomycin, bestemt ved tyndlagschromatografi, blev samlet, og de samlede eluater blev inddampet til en rest af 1-N-benzyloxycarbonyl-1,3-di-de-N-amidinodihydrostreptomycin, udbytte 0,417 g, (33% af det teoretiske), $[\alpha]_{\text{D}}^{26} -93,6^\circ$ (c, 0,55% i vand). pmr (ppm) (D_2O): δ 1,22 (d, 4'-C- CH_3 , J=6 Hz), 2,42 (s, 2''-N- CH_3), 5,12 (s, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CONH}$), 7,40 (s, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CONH}$). Analyse beregnet for: $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{O}_{14}\text{N}_3\text{H}_2\text{O}$: C: 49,76, H: 6,96, N: 6,45%. Fundet: C: 49,41, H: 6,55, N: 6,21%. CD: $[\Theta]_{\text{TACu}}^{282} = +11.100$.

Eksempel 13

Omdannelse af 3,2',6'-tri-N-acetylsisomicin til 1-N-ethylsisomicin.

A. 3,2',6'-Tri-N-acetyl-N-ethylsisomicin.

0,1N Saltsyre blev sat til en omrørt opløsning af 3,2',6'-tri-N-acetylsisomicin (1,146 g, 2 mmol) i 20 ml vand, således at opløsningens pH-værdi blev bragt til 2,7. Reaktionsblandingen blev afkølet til 3°C , og der blev tilsat 2,2 ml af en 1 molær opløsning af acetaldehyd i tetrahydrofuran (2,2 mmol), hvorefter der dråbevis blev tilsat en opløsning af natriumcyanoborhydrid (0,16 g, 2,6 mmol) i 2 ml vand. Reaktionsblandingen blev omrørt 1 time under opretholdelse af temperaturen under 5°C og pH ved ca. 2,7 ved tilsætning af 0,1N saltsyre, hvorefter der blev tilsat 0,44 ml af en 1 molær opløsning af acetaldehyd i tetrahydrofuran (0,44 mmol) efterfulgt af en opløsning af natriumcyanoborhydrid (35 mg, 0,56 mmol) i nogle få dråber vand, idet pH blev opretholdt ved 2,7 ved tilsætning af 0,1N saltsyre. Omrøring af reaktionsblandingen blev fortsat 1 time, og den foregående tilsætning af 0,22 ml acetaldehyd og 10 mg natriumcyanoborhydrid blev gentaget 2 gange. Omrøring blev fortsat ved stuetemperatur i 18 timer, hvorefter opløsningen blev bragt til pH 9 ved omrøring af opløsningen med Amberlite[®] IRA-401S-ion-

bytterharpiks i hydroxidform. Harpiksen blev fjernet ved filtrering, vasket med vand, og samlet filtrat og vaskevæsker blev koncentreret i vakuum, og indampningsresten blev chromatograferet på 100 g silicagel (60-200 mesh), idet der blev elueret med chloroform:methanol:ammoniumhydroxid (30:10:0,2). De ensartede fraktioner, bestemt ved tyndlagschromatografi på silicagel eller ved anvendelse af det samme opløsningsmiddelssystem som ovenfor, men i forholdet 30:10:1, blev samlet, og de samlede eluater indeholdende hovedproduktet blev koncentreret i vakuum, og den resulterende vandige blanding blev lyofiliseret til en rest omfattende 3,2',6'-tri-N-acetyl-1-N-ethylsisomicin, udbytte 0,84 g (70% af det teoretiske), $[\alpha]_D^{26} + 165^\circ$ (c, 0,8 i vand), pmr (ppm) (D_2O): δ 1,05 (CH_2CH_3 , $J=7,0$ Hz), 1,17 ($4''-C-CH_3$), 1,84, 1,9, 1,91 (N-acetyler), 2,52 ($3''-N-CH_3$), 4,80 (H-4'), 4,92 (H-1'', $J_{1'',2''} = 4,0$ Hz), 5,4 (H-1', $J_{1',2'} = 2,5$ Hz), massespektrum: (M^{+}) m/e 601, ($M + 1$) + m/e 602, også m/e 402, 392, 374, 160; 471, 453, 443, 425; 211; 261. Analyse beregnet for: $C_{27}H_{47}N_5O_{10} \cdot 1,5H_2O$: C: 51,58, H: 8,02, N: 11,14%. Fundet: C: 51,47, H: 8,89, N: 10,91%.

B. 1-N-Ethylsisomicin.

3,2',6'-Tri-N-acetyl-1-N-ethylsisomicin (0,1 g) blev sat til 10 ml 1N natriumhydroxid, og opløsningen blev opvarmet under en atmosfære af nitrogen ved tilbagesvalingstemperatur, indtil tyndlagschromatografisk analyse af en prøve på silicagel under anvendelse af en 2:1:0,35-blanding af chloroform:methanol:ammoniumhydroxid som fremkaldende system angav i det væsentlige fuldendelse af de-N-acetyleringen (ca. 48 timer). Reaktionsopløsningen blev afkølet, og vand blev tilsat, indtil volumenet var ca. 50 ml, hvorefter der blev omrørt med Amberlite IRC-50-ionbytterharpiks i proton-form (der var vasket med vand), indtil pH var ca. 5,5. Harpiksen blev fjernet ved filtrering og vasket med vand, og harpiksen blev omrørt med 100 ml 7% vandig ammoniumhydroxid i ca. 30 minutter, hvorefter overliggende opløsning blev dekanteret, og den foregående operation blev gentaget to gange under anvendelse hver gang af 50 ml 7% vandig ammoniumhydroxid, hvorefter harpiksen blev fjernet ved filtrering. Ammoniumhydroxid-filtratet og dekanteringerne blev samlet, koncentreret i vakuum, og indampningsresten blev ekstraheret med methanol. Methanolekstrakterne blev samlet og koncentreret i vakuum, og indampningsresten blev opløst i en opløsningsmiddelblanding bestående af chloroform:methanol:ammoniumhydroxid (2:1:0,35), og opløsningen blev ledt gennem en søjle af aluminiumoxid (8 g, 0,8 cm x 30 cm-søjle), idet der blev elueret med den samme chloroform:methanol:ammoniumhydroxid-opløsningsmiddelblanding. De ensartede eluater, bestemt ved tyndlagschromatografi, blev samlet, og de samlede eluater indeholdende 1-N-ethylsisomicin blev indampet, og den resulterende vandige blanding blev lyofiliseret til en rest omfattende 1-N-ethylsisomicin (71 mg) (90% udbytte).

G. Omdannelse af sisomicin til 1-N-ethylsisomicin uden rensning af mellemprodukterne.

(1) 3,2',6'-Tri-N-acetylsisomicin.

Cupriacetathydrat (3 g, 15 mmol) blev sat til en omrørt opløsning af sisomicin (0,447 g, 1 mmol) i vand (5,33 ml) og dimethylformamid (18 ml). Der blev omrørt ved stuetemperatur i 30 minutter, og derefter blev der dråbevis ved en hastighed på ca. en dråbe hver tre sekunder tilsat 3,1 ml af en 1 molær opløsning af eddikesyreanhydrid i dimethylformamid (3,1 mmol). Der blev omrørt i yderligere 30 minutter og derefter tilsat 10 ml vand, og hydrogensulfid blev boblet gennem opløsningen. Reaktionsblandingen blev omrørt i 30 minutter, hvorefter det udfældede cuprisulfid blev frafiltreret gennem en pude af Celite[®], og den resulterende cuprisulfidrest blev vasket med vand, og det samlede filtrat blev bragt til pH 9 ved omrøring med Amberlite[®] IRA-401S-ionbytterharpiks i hydroxidcyclus. Harpiksen blev fjernet ved filtrering, vasket med vand, og samlet filtrat og vaskevæsker blev koncentreret til en rest omfattende 3,2',6'-tri-N-acetylsisomicin.

(2) 3,2',6'-Tri-N-acetyl-1-N-ethylsisomicin.

Produktet fra eksempel 13C(1) blev opløst i 10 ml vand, og der blev tilsat 0,1N saltsyre, indtil opløsningen var ved en pH-værdi på ca. 2,7. Reaktionsblandingen blev afkølet til ca. 3°C, og der blev tilsat 0,73 ml af en 1 molær opløsning af acetaldehyd i tetrahydrofuran (0,73 mmol), hvorefter der dråbevis blev tilsat en opløsning af 0,55 g natriumcyanoborhydrid i 0,7 ml vand. Der blev omrørt i 1 time under opretholdelse af pH af opløsningen ved ca. 2,7 ved tilsætning af 0,1N saltsyre, hvorefter der blev tilsat 0,15 ml af en 1 molær opløsning af acetaldehyd i tetrahydrofuran (0,15 mmol) efterfulgt af en opløsning af 12 mg natriumcyanoborhydrid i nogle få dråber vand, idet pH igen blev opretholdt ved ca. 2,7. Den foregående operation blev gentaget 2 gange, idet der hver gang anvendtes 0,7 ml af en 1 molær opløsning af acetaldehyd i tetrahydrofuran og 3 mg natriumcyanoborhydrid. Der blev omrørt ved stuetemperatur natten over, hvorefter opløsningen blev bragt til en pH på ca. 9 med 1N natriumhydroxid. Opløsningen blev koncentreret i vakuum til en rest omfattende 3,2',6'-tri-N-acetyl-1-N-ethylsisomicin.

(3) 1-N-Ethylsisomicin.

3,2',6'-Tri-acetyl-1-N-ethylsisomicinet vundet i eksempel 13C(2) blev opløst i 60 ml 1N natriumhydroxid, og der blev opvarmet ved tilbagesvalingstemperatur under en atmosfære af nitrogen i 48 timer. Der blev afkølet, og reaktionsblandingen blev bragt til en pH på ca. 5,5 ved tilsætning af Amberlite[®] IRC-50-ionbytterharpiks i proton-form. Harpiksen blev fjernet ved filtrering og vasket med vand. Harpiksen blev omrørt med 100 ml 7% vandig ammoniumhydroxidopløsning i 30 minutter, hvorefter opløsningen blev dekanteret, og den foregående operation blev gentaget to gange under anvendelse hver gang af 100 ml 7% ammoniumhydroxid, hvorefter

der blev filtreret. Ammoniumhydroxidfiltratet blev samlet med dekanteringerne og inddampet i vakuum, og inddampningsresten blev chromatograferet på en søjle af silicagel (25 g), idet der blev elueret med en opløsningsmiddelblanding af chloroform:methanol:ammoniumhydroxid (2:1:0,34). De ensartede fraktioner, bestemt ved tyndlagschromatografi på silicagel under anvendelse af det samme opløsningsmiddel-system, blev samlet, og de samlede eluater indeholdende 1-N-ethylsisomicin blev koncentreret i vakuum, og den resulterende vandige blanding blev lyofiliseret til en rest af 1-N-ethylsisomicin, udbytte 0,233 g (49% af det teoretiske).

Forsøg A

Omdannelse af 3,2',6'-tri-N-acetylamino-glycosider til 1-N-ethylaminoglycosider.

A. 3,2',6'-Tri-N-acetyl-1-N-ethylverdamicin.

3,2',6'-Tri-N-acetylverdamicin (880 mg, 1,5 mmol) blev opløst i vand (15 ml), og pH blev indstillet til 2,7 under anvendelse af 0,1N saltsyre (ca. 28 ml). Der blev afkølet i et isbad til 8-10°C, hvorefter der under omrøring blev tilsat vandig acetaldehyd (4,1 ml 0,73 molær acetaldehyd) i vand (2 ækvivalenter). Der blev omrørt i 5 minutter ved 8°C, hvorefter der dråbevis blev tilsat en opløsning af natriumcyanoborhydrid (182 mg, 3 mmol, 2 ækvivalenter) i 2,5 ml vand, idet opløsningens pH blev indstillet på 2,7 med 0,1N saltsyre. Opløsningens pH blev stadig holdt ved ca. 2,7 ved tilsætning af 0,1N saltsyre, indtil reaktionen var fuldendt, bestemt ved tyndlagschromatografi. Reaktionsblandingen blev henstillet ved stuetemperatur i 18 timer, hvorefter reaktionsblandingen blev frysetørret, og den resulterende rest blev chromatograferet på silicagel (90 g) i en 1,5 x 126 cm søjle, idet der blev elueret med chloroform:methanol:ammoniumhydroxid (28%) (30:10:1). De ensartede fraktioner indeholdende 3,2',6'-tri-N-acetyl-1-N-ethylverdamicin, bestemt ved tyndlagschromatografi, blev samlet. De samlede eluater blev inddampet i vakuum til en rest af 3,2',6'-tri-N-acetyl-1-N-ethylverdamicin, udbytte 550 mg, (0,84 mmol, 56% af det teoretiske), massespektrum: m/e 485, 467, 457, 439; 420, 402, 392, 374; 261, 243, 233, 215, 183.

B. 1-N-Ethylverdamicin.

3,2',6'-Tri-N-acetyl-1-N-verdamicin (200 ml, 0,304 mmol) blev behandlet med 1N natriumhydroxid (20 ml) ved tilbagesvalingstemperatur under en atmosfære af nitrogen, hvorefter det resulterende produkt blev isoleret og rensat på tilsvarende måde som beskrevet i eksempel 13B, hvorved vandtes 1-N-ethylverdamicin, udbytte 88 mg (59% af det teoretiske).

Forsøg B

Omdannelse af 3,6'-Di-N-substituerede aminoglycosider til de tilsvarende 3,6'-di-N-usubstituerede-1-N-alkylaminoglycosider.

Omdannelse af 3,6'-di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B til 1-N-ethylgentamicin B.

Til en omrørt opløsning af 3,6'-di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B (1,36 g) i vand (15 ml) blev der sat en 1 molær opløsning af acetaldehyd i tetrahydrofuran (2 ml). Opløsningens pH blev indstillet på ca. 4,9 med 0,1N saltsyre. Der blev tilsat natriumcyanoborhydrid (0,2 g), og pH blev periodisk indstillet på ca. 4,9. Der blev omrørt i 5 timer ved stuetemperatur, hvorefter opløsningen blev inddampet til tørhed, og der blev tilsat trifluoreddikesyre (10 ml) til indampningsresten og henstillet i 5 minutter. Reaktionsopløsningen blev hældt i ether, og det resulterende bundfald blev isoleret ved filtrering og vasket med ether. Bundfaldet blev chromatograferet på 100 g silicagel, idet der anvendtes chloroform:methanol:ammoniumhydroxid (3:4:2) som opløsningsmiddelblanding. De ensartede fraktioner indeholdende 1-N-ethylgentamicin B, bestemt ved tyndlagschromatografi, blev samlet og inddampet i vakuum, og indampningsresten blev opløst i vand og lyofiliseret, udbytte 40% af det teoretiske, $[\alpha]_D^{26} + 126,2^\circ$ (c, 1 i vand), pmr (ppm) (D_2O): δ 5,55 (H-1', $J_{1',2'} = 3,0$ Hz), 5,05 (H-1'', $J_{1'',2''} = 4$ Hz), 2,9 (3''-N-CH₃), 1,05-1,5 (2 C-CH₃), massespektrum: $[M + 1]^+$ 511, også m/e 380, 352, 334; 378, 350, 332; 219, 191, 173. Analyse beregnet for: $C_{21}H_{42}O_{10}N_4 \cdot 2CO_2 \cdot 3H_2O$: C: 42,33, H: 7,41, N: 8,58%. Fundet: C: 42,37, H: 7,43, N: 8,81%.

Forsøg C

Omdannelse af 3,6'-di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B til 1-N-(γ -amino- α -hydroxybutyryl)gentamicin B.

A. 1-N-(S- γ -amino- α -hydroxybutyryl)gentamicin B.

(1) Til en opløsning af 68,2 g (0,1 mmol) 3,6'-di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B (renset produkt fra eksempel 8F) i vand (1 ml) blev der sat methanol (1 ml), hvorefter der dråbevis under omrøring blev tilsat en opløsning (0,25 ml) af N-(S- γ -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxybutyryloxy)succinimid (0,1 mmol) i dimethylformamid (0,4 molær opløsning). Der blev omrørt 1 time, og derefter blev der tilsat yderligere N-(S- γ -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxybutyryloxy)succinimid (0,125 ml). Omrøring af reaktionsblandingen blev fortsat ved stuetemperatur i 18 timer, hvorefter der blev koncentreret i vakuum, og indampningsresten blev opløst i methanol (4 ml) og vand (16 ml). Der blev tilsat 5% palladium-på-kul-katalysator (0,05 g) og hydrogenet ved 4 atmosfærer natten over. De faste stoffer blev fjernet ved filtrering gennem en pude af Celite[®], Celite[®]-puden blev vasket med vand, og de samlede filtrater og vaskevæsker blev koncentreret til et lille volumen og lyofiliseret. Den resulterende rest blev opløst i trifluoreddikesyre (0,5 ml) og henstillet 3 minutter. Opløsningen blev hældt i overskud af ether, bundfaldet blev opsamlet ved filtrering, vasket med ether og tørret, hvorved vandtes 1-N-(S- γ -amino- α -hydroxybutyryl)gentamicin B som trifluoracetatsalt. Den frie base vandtes ved at opløse det foregående salt i vand og omrøre opløsningen med Amberlite[®] IRA-401S (OH⁻)-ionbytterharpiks. Der blev filtreret, og filtratet blev lyofiliseret,

hvorved vandtes 1-N-(S- γ -amino- α -hydroxybutyryl)gentamicin B, udbytte 49,7 mg (83% af det teoretiske).

(2) Ud fra rå 3,6'-di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B.

Til de 50 ml opløsning omfattende 3,6'-di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B fremstillet i eksempel 8F blev der sat 50 ml methanol. Til denne opløsning blev der dråbevis under omrøring sat 10 ml af en 1 molær opløsning af 1-N-(S- γ -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxybutyryloxy)succinimid i dimethylformamid. Der blev omrørt i 1 time, og reaktionen fulgtes ved tyndlagschromatografi under anvendelse af chloroform:methanol:ammoniumhydroxid (2:1:0,35). Der blev tilsat yderligere 5 ml af den 1 molære opløsning af 1-N-(S- γ -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxybutyryloxy)succinimid, og reaktionsblandingen blev omrørt i 10 timer. Opløsningen blev koncentreret i vakuum, og indampningsresten blev chromatograferet på 300 g silicagel under anvendelse af chloroform:methanol:ammoniumhydroxid (30:10:0,5) som eluerende opløsningsmiddel. De ensartede fraktioner indeholdende 1-N-(S- γ -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxybutyryl)-3,6'-di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B blev samlet og indampet til en rest. Resten blev opløst i vand (50 ml) og methanol (18 ml) og hydrogenet i nærværelse af 5% palladium-på-kul (600 mg) ved 4 atmosfærer i 10 timer. Katalysatoren blev fjernet ved filtrering gennem en pude af Celite[®], og filterresten blev vasket med vand. Filtratet og vaskevæskerne blev samlet og indampet i vakuum for at fjerne methanolen. Det resulterende vandige lag blev vasket 3 gange med chloroform (25 ml), og den vandige opløsning blev koncentreret i vakuum, og indampningsresten blev tørret over phosphorpentoxid i vakuum. Indampningsresten blev opløst i den minimale mængde trifluoreddikesyre, og opløsningen blev henstillet i 3 minutter. Der blev tilsat ether, og det resulterende bundfald blev isoleret ved filtrering. Bundfaldet blev vasket med ether og tørret. Det faste stof blev opløst i 30 ml vand, og opløsningen blev bragt til ca. pH 8,5 ved omrøring med Amberlite[®] IRA-401S (OH⁻)-ionbytterharpiks. Det faste stof blev fjernet ved filtrering, vasket med vand, og filtratet og vaskevæskerne blev samlet og lyofiliseret, hvorved vandtes 1-N-(S- γ -amino- α -hydroxybutyryl)gentamicin B.

Alternativt blev der tilsat svovlsyre, for at bringe den foregående vandige opløsning til ca. pH 4,5, og lyofiliseret, hvorved vandtes sulfatsaltet af 1-N-(S- γ -amino- α -hydroxybutyryl)gentamicin B, pmr (ppm) (D₂O): δ 1,3 (4''-C-CH₃), 2,9 (3''-N-CH₃), 4,28 (H-2''', J=9 Hz og 4 Hz), 5,16 (H-1'', J_{1'',2''} = 3,5 Hz), 6,12 (H-1', J_{1',2'} = 3,0 Hz).

B. 1-N-(R- γ -amino- α -hydroxybutyryl)gentamicin B.

(1) Til en opløsning af 3,6'-di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B (3,41 g, 5 mmol) i methanol (25 ml) og vand (25 ml) blev der under omrøring sat en opløsning af N-(R- γ -N-benzyloxycarbonylamino- α -hydroxybutyryloxy)succinimid (1,8 g, 5 mmol) i dimethylformamid (10 ml). Reaktionsblandingen blev omrørt i 6 timer,

koncentreret i vakuum, og inddampningsresten blev chromatograferet på silicagel (60-200 mesh, 300 g) under anvendelse af et opløsningsmiddelsystem omfattende chloroform:methanol:ammoniumhydroxid (30:10:0,25). De ensartede fraktioner indeholdende det ønskede produkt, bestemt ved tyndlagschromatografi, blev samlet og koncentreret i vakuum, og inddampningsresten blev genchromatograferet på den samme søjle under anvendelse af det samme opløsningsmiddelsystem. De ensartede genchromatograferede fraktioner blev samlet og inddampet i vakuum til en rest omfattende 1-N-(R- γ -N-benzyloxycarbonylamino- α -hydroxybutyryloxy)-3,6'-di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B.

(2) Produktet fra eksempel 16B(1) blev opløst i 50% vandig methanol (20 ml) og hydrogeneret over 5% palladium-på-kul-katalysator (0,2 g) ved stuetemperatur og 4 atmosfærer i 24 timer. Katalysatoren blev fjernet ved filtrering gennem en pude af Celite, vasket med vand, og de samlede filtrater blev inddampet i vakuum. Inddampningsresten blev opløst i trifluoreddikesyre (25 ml) og henstillet i 3 minutter. Der blev tilsat ether, og det resulterende bundfald omfattende trifluoreddikesyre-additionssaltet af 1-N-(R- γ -amino- α -hydroxybutyryl)gentamicin B blev isoleret, vasket med ether og tørret. Det tørre bundfald blev opløst i vand (10 ml), og der blev omrørt med Amberlite[®] IRA-401S (OH⁻)-ionbytterharpiks, tilstrækkelig til at bringe pH til 9,5. Harpiksen blev fjernet ved filtrering, vasket med vand, og de samlede filtrater blev lyofiliseret til en rest omfattende rent 1-N-(R- γ -amino- α -hydroxybutyryl)gentamicin B, udbytte 0,6 g, $[\alpha]_D^{26} + 118,1^{\circ}$ (c, 1 i vand). pmr (ppm) (D₂O): δ 1,23 (4''-C-CH₃), 2,66 (3''-N-CH₃), 4,2 (H-2''', J=5Hz og 3Hz), 5,03 (H-1'', J=4 Hz), 5,4 (H-1', J=3,5 Hz).

Analyse beregnet for: C₂₃H₄₅O₁₂N₅·3CO₂·4H₂O: C: 39,64, H: 6,78, N: 8,89%.

Fundet: C: 39,88, H: 6,58, N: 9,28%.

Forsøg D

Omdannelse af 3,6'-di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B til 1-N-(S- β -amino- α -hydroxypropionyl)gentamicin B.

A. 1-N-(S- β -N-benzyloxycarbonylamino- α -hydroxypropionyl)-3,6'-di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B.

Til en omrørt opløsning af 3,6'-di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B (11,28 g, 16,4 mmol) i methanol (100 ml) og vand (100 ml) blev der sat en opløsning af N-(S- β -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxypropionyloxy)succinimid (10 g, 30 mmol) i 40 ml N,N-dimethylformamid i løbet af 15 minutter. Efter en periode på to timer blev opløsningsmidlerne afdampet i vakuum ved 50°C. Den resulterende inddampningsrest blev chromatograferet på 500 g silicagel under anvendelse af 30:10:0,5 chloroform:methanol:koncentreret ammoniumhydroxid, hvorved vandtes 13,22 g 1-N-(S- β -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxypropionyl)-3,6'-di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B.

B. 1-N-(S-β-amino-α-hydroxypropionyl)gentamicin B.

Produktet fra trin A blev hydrogeneret ved 4 atmosfærer ved stuetemperatur i en blanding af vand (730 ml) og methanol (240 ml) i nærværelse af 0,7 g 5% palladium-på-kul-katalysator i 24 timer. Katalysatoren blev fjernet ved filtrering gennem en pude af Celite[®] og vasket med vand. De samlede filtrater blev koncentreret, og inddampningsresten blev tørret omhyggeligt. Produktet blev opløst i trifluoreddikesyre (80 ml) og henstillet i 3 minutter. Opløsningen blev hældt i et overskud af ether (2 liter) til udfældning af trifluoreddikesyresaltet af rent 1-N-(S-β-amino-α-hydroxypropionyl)gentamicin B. Det blev isoleret ved filtrering, vasket med ether og tørret. Produktet blev behandlet med Amberlite[®] IRA-401S (OH⁻)-harpiks i vand til pH 9, hvorefter opløsningen blev filtreret, harpiksen blev vasket, og den samlede opløsning blev lyofiliseret, hvorved vandtes 1-N-(S-β-amino-α-hydroxypropionyl)gentamicin B, $[\alpha]_D^{26} + 112,5^\circ$ (c, 0,4 i vand), pmr (ppm) (D₂O): δ1,15 (4"-C-CH₃), 1,36 (H-2ax, J_{1,2} = J_{2,3} = J_{1ax,1eq} = 12,5 Hz), 1,90 (H-2eq), 2,45 (3"-N-CH₃), 4,06 (H-5"eq, J_{5"eq,ax} = 13,0 Hz), 4,13 (H-2"', J_{2"',3'''} = ~4,0 og 7,0 Hz), 5,05 (H-1'', J_{1'',2''} = 4,0 Hz), 5,32 (H-1', J_{1',2'} = 3,0 Hz). Udbytte = næsten kvantitativt.

C. Fremgangsmåderne ifølge eksemplerne 17A og 17B blev gennemført under anvendelse af N-(S-δ-benzyloxycarbonylamino-α-hydroxyvaleryloxy)succinimid i stedet for det i trin A specificerede succinimid-reagens, hvorved vandtes 1-N-(S-δ-amino-α-hydroxyvaleryl)gentamicin B.

Forsøg E

Omdannelse af 3,6'-di-N-benzyloxycarbonylaminoglycosider til 1-N-(S-γ-amino-α-hydroxybutyryl)aminoglycosider.

A. Fremstilling af 1-N-(S-γ-amino-α-hydroxybutyryl)kanamycin A.

(1) Til en omrørt opløsning af 3,6'-di-N-benzyloxycarbonylkanamycin A (1,54 g, 2 mmol) i tetrahydrofuran (20 ml) og vand (20 ml) blev der dråbevis sat en opløsning af N-(S-γ-benzyloxycarbonylamino-α-hydroxybutyryloxy)succinimid (1,163 g, 3 mmol) i 2 ml N,N-dimethylformamid. Der blev omrørt i to timer og derefter koncentreret i vakuum, og den sirupsagtige inddampningsrest blev chromatograferet på silicagel (150 g), idet der blev elueret med chloroform:methanol:koncentreret ammoniumhydroxid (2:1:0,35)-opløsningsmiddelblanding. De ensartede fraktioner indeholdende det ønskede produkt, bestemt ved tyndlagschromatografi, blev samlet, og de samlede eluater blev indampet i vakuum til en rest omfattende 1-N-(S-γ-benzyloxycarbonylamino-α-hydroxybutyryl)-3,6'-di-N-benzyloxycarbonylkanamycin A, udbytte 1,3 g.

(2) Produktet fra trin A(1) blev hydrogeneret i vandig methanol (1:1) (20 ml) i nærværelse af 5% palladium-på-trækul (0,10 g) i 3 timer. Katalysatoren

blev fraskilt ved filtrering, og det resulterende filtrat blev inddampet i vakuum til en rest omfattende 1-N-(S- γ -amino- α -hydroxybutyryl)kanamycin A i kvantitative udbytter.

B. Ved fremgangsmåden ifølge trin A blev N-(S- β -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxypropionyloxy)succinimid anvendt i stedet for N-(S- γ -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxybutyryloxy)succinimid, hvorved vandtes 1-N-(S- β -amino- α -hydroxypropionyl)kanamycin A i et totalt udbytte større end 50% af det teoretiske.

Forsøg F

Omdannelse af 3,6'-di-N-benzyloxycarbonylgentamicin B til 1-N-(S- β -amino- α -hydroxypropionyl)gentamicin B og til 1-N-(R- β -amino- α -hydroxypropionyl)gentamicin B.

A. 1-N-(S- β -amino- α -hydroxypropionyl)gentamicin B.

Til en opløsning af 3,6'-di-N-benzyloxycarbonylgentamicin B (3,75 g, 5 mmol) i methanol (25 ml) og vand (25 ml) blev der under omrøring sat en opløsning af N-(S- β -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxypropionyloxy)succinimid (2,18 g, 6,5 mmol) i dimethylformamid (12 ml). Reaktionsblandingen blev omrørt i 2 timer, koncentreret i vakuum, og inddampningsresten blev opløst i vand (75 ml) og methanol (75 ml). Der blev hydrogenet i nærværelse af 5% palladium-på-trækul (5 g) ved 4 atmosfærer i 24 timer. Katalysatoren blev fjernet ved filtrering gennem en pude af Celite[®] og vasket med vand. Samlet filtrat og vaskevæsker blev koncentreret, og inddampningsresten blev chromatograferet på Dowex-1 x 2-ionbytterharpiks (200 g, 200-400 mesh) i hydroxidform, idet der blev elueret med vand. De ensartede fraktioner indeholdende 1-N-(S- β -amino- α -hydroxypropionyl)gentamicin B, bestemt ved tyndlagschromatografi på silicagel under anvendelse af chloroform:methanol:ammoniumhydroxid (3:4:2) som opløsningsmiddelsystem, blev samlet. Der blev koncentreret til lille volumen, fortyndet med vand og lyofiliseret, hvorved vandtes 1-N-(S- β -amino- α -hydroxypropionyl)gentamicin B, udbytte 1,7 g (60% af det teoretiske).

B. 1-N-(R- β -amino- α -hydroxypropionyl)gentamicin B.

På tilsvarende måde som beskrevet i trin A blev 3,6'-di-N-benzyloxycarbonylgentamicin B behandlet med 1-N-(R- β -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxypropionyloxy)succinimid, og det resulterende produkt blev isoleret og rensat på tilsvarende måde som beskrevet, hvorved vandtes 1-N-(R- β -amino- α -hydroxypropionyl)gentamicin B.

C. Omdannelse af 3,6'-di-N-benzyloxycarbonylgentamicin B til 1-N-(S- β -amino- α -hydroxypropionyl)gentamicin B og 1-N-(R- β -amino- α -hydroxypropionyl)gentamicin B under anvendelse af racemisk β -N-benzyloxycarbonylamino- α -hydroxypropionsyre.

(1) Til en omrørt opløsning af 3,6'-di-N-benzyloxycarbonylgentamicin B (1 g, 1,33 mmol) i methanol (5 ml) og vand (5 ml) blev der sat en opløsning af racemisk

N-(β -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxypropionyloxy)succinimid (0,674 g, 0,2 mmol) i dimethylformamid (2 ml). Der blev omrørt i 2 timer, og derefter blev opløsningsmidlet afdampet i vakuum. Inddampningsresten blev chromatograferet på silicagel (60-100 mesh, 100 g), idet der blev elueret med en blanding af chloroform:methanol:ammoniumhydroxid (30:10:1). Fraktionerne fulgtes ved tyndlagschromatografi på silicagel under anvendelse af chloroform:methanol:ammoniumhydroxid (2:1:0,35) som opløsningsmiddelsystem. De ensartede fraktioner indeholdende 1-N-(S- β -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxypropionyl)-3,6'-di-N-benzyloxycarbonylgentamicin B blev samlet og indampet i vakuum, og der blev tilsat vand til indampningsresten og lyofiliseret fra vand, udbytte 0,42 g (65% af det teoretiske). Tilsvarende blev de ensartede fraktioner indeholdende 1-N-(R- β -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxypropionyl)gentamicin B samlet, opløsningsmidlerne blev afdampet i vakuum, der blev tilsat vand og lyofiliseret, udbytte 0,36 g (55,8% af det teoretiske).

(2) Hver af de to fraktioner blev hydrogenet separat i methanol (5 ml) og vand (5 ml) i nærværelse af 5% palladium-på-trækul-katalysator ved 4 atmosfærer i 24 timer. I begge tilfælde blev katalysatoren fjernet ved filtrering gennem Celite[®], vasket med vand, og de samlede filtrater blev indampet til en rest. Til indampningsresten blev der sat vand og lyofiliseret, hvorved vandtes henholdsvis rent 1-N-(S- β -amino- α -hydroxypropionyl)gentamicin B og 1-N-(R- β -amino- α -hydroxypropionyl)gentamicin B i næsten kvantitative udbytter.

Forsøg G

Omdannelse af 3,6'-di-N-benzyloxycarbonylgentamicin B til 1-N-(S- γ -amino- α -hydroxybutyryl)gentamicin B og 1-N-(R- γ -amino- α -hydroxybutyryl)gentamicin B under anvendelse af racemisk N- γ -benzyloxycarbonyl- α -hydroxysmørsyre.

På tilsvarende måde som beskrevet i forsøg F del C blev 3,6'-di-N-benzyloxycarbonylgentamicin B i vandig methanol behandlet med en opløsning af racemisk N-(γ -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxybutyryloxy)succinimid i dimethylformamid, hvorefter reaktionsblandingen blev indampet i vakuum til en rest omfattende 1-N-(R,S- γ -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxybutyryl)-3,6'-di-N-benzyloxycarbonylgentamicin B. Der blev chromatograferet på silicagel på tilsvarende måde som beskrevet i forsøg F del C, og de ensartede fraktioner, bestemt ved tyndlagschromatografi, blev samlet, og hver af de samlede fraktioner blev indampet i vakuum til en rest omfattende henholdsvis 1-N-(S- γ -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxybutyryl)-3,6'-di-N-benzyloxycarbonylgentamicin B og 1-N-(R- γ -benzyloxycarbonylamino- α -hydroxybutyryl)-3,6'-di-N-benzyloxycarbonylgentamicin B. Hver af de to fraktioner blev hydrogenet i nærværelse af 5% palladium-på-trækul-katalysator på tilsvarende måde som beskrevet i forsøg F del C(2), hvorved vandtes henholdsvis 1-N-(S- γ -amino- α -hydroxybutyryl)gentamicin B og 1-N-(R- γ -amino- α -hydroxybutyryl)gentamicin B.

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til selektiv blokering af aminogru $\bar{p}$ per med acyl-beskyttelsesgrupper Y i aminocyclitolaminoglycosider, hvori mindst én af aminogru $\bar{p}$ perne udviser en tilgængelig, nabostillet hydroxygruppe, og hvori mindst én af aminogru $\bar{p}$ perne ikke har nogen tilgængelig, nabostillet hydroxygruppe eller mindst en af aminogru $\bar{p}$ perne er sterisk mindre tilgængelig for en sådan, k e n d e t e g n e t ved, at en 4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol med hydroxygrupper, der er tilgængelige for og nabostillet til enhver aminogrupe bortset fra dem i stillingerne 3 og 6' eller i stillingerne 2' og 3 eller i stillingerne 2' og 6' eller i stillingerne 3, 2' og 6', i et aprotisk eller protisk, indifferent organisk opløsningsmiddel, der kan indeholde op til ca. 25 vol% vand, omsættes med mindst 2 molækvivalenter af et salt af en divalent kation af overgangsmetallerne kobber, nikkel, cobalt eller cadmium eller af blandinger af disse overgangsmetaller pr. molækvivalent 4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol, hvorefter det således dannede kompleks mellem overgangsmetalsaltet og mindst ét gruppepar bestående af aminogruppen og den for denne tilgængelige, nabostillede hydroxygruppe omsættes med omtrent så mange molækvivalenter af et aminoacyleringsmiddel, som svarer til antallet af aminogru $\bar{p}$ per, henholdsvis 3 og 6' eller 2' og 3 eller 2' og 6' eller 3, 2' og 6', der skal acyleres med Y, og at det således vundne, tilsvarende Y-acylerede kompleks ved hjælp af et fældningsmiddel for overgangsmetal-kationer eller med ammoniumhydroxid omsættes til den tilsvarende 3,6'-di-, 2',3-di-, 2',6'-di- eller 3,2',6'-tri-N-Y-4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at omsætningen af komplekset med amino-blokeringsmidlet foregår in situ.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at der som overgangsmetalsalt anvendes et salt af kobber(II), nikkel(II) og/eller cobalt(II), fortrinsvis et tilsvarende acetat.

4. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-3, k e n d e t e g n e t ved, at 4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitolen pr. molækvivalent omsættes med i almindelighed mindst to, navnlig ved anvendelse af nikkelsalte dog ofte også færre, molækvivalenter af overgangsmetalsaltet, idet der i tilfælde af et protisk opløsningsmiddel og/eller tilstedeværelse af vand fortrinsvis anvendes et overskud af overgangsmetalsaltet.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at der som 4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol anvendes en af følgende: gentamicin B, gentamicin B₁, gentamicin A₃, kanamycin A eller 6'-N-methylkanamycin A, og at der anvendes ca. to molækvivalenter af amino-blokeringsmidlet og således vindes den tilsvarende 3,6'-di-N-Y-4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at der som 4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol anvendes en af følgende: kanamycin C, Antibioticum G-418, gentamicin A, A₁ eller X₂, og at der benyttes ca. to molækvivalenter af amino-blokeringsmidlet og således vindes den tilsvarende 3,2'-di-N-Y-4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at der som 4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol anvendes en af følgende: sisomicin, verdamicin, tobramycin, gentamicin C₁, gentamicin C_{1a}, gentamicin C₂, gentamicin C_{2a}, gentamicin C_{2b}, Antibioticum 66-40B, Antibioticum 66-40D, Antibioticum JI-20A, Antibioticum JI-20B, Antibioticum G-52 eller deres 5-epi- og 5-epi-azido-5-deoxy-analoge, eller anvendes en af følgende: kanamycin B, 3',4'-dideoxykanamycin B, nebramycin-faktor 4, nebramycin-faktor 5', 3',4'-dideoxy-3',4'-dihydro-kanamycin B, 3',4'-dideoxy-6'-N-methylkanamycin B eller 5-deoxysisomicin, og at der anvendes ca. to molækvivalenter af amino-blokeringsmidlet og således vindes den tilsvarende 2',6'-di-N-Y-4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at der som 4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol anvendes en af følgende: sisomicin, verdamicin, tobramycin, gentamicin C₁, gentamicin C_{1a}, gentamicin C₂, gentamicin C_{2a}, gentamicin C_{2b}, Antibioticum 66-40B, Antibioticum 66-40D, Antibioticum JI-20A, Antibioticum JI-20B, Antibioticum G-52, en af de 5-epi- og 5-epi-azido-5-deoxy-analoge deraf, eller en af følgende: kanamycin B, 3',4'-dideoxykanamycin B, nebramycin-faktor 4, nebramycin-faktor 5', 3',4'-dideoxy-3',4'-dehydrokanamycin B, 3',4'-dideoxy-6'-N-methylkanamycin B og 5-deoxysisomicin, og at der anvendes ca. tre molækvivalenter af amino-blokeringsmidlet og således vindes den tilsvarende 3,2',6'-tri-N-Y-4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol.

9. 4,6-Di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol, der er selektivt blokeret i stillingerne 3,2',6' og kan fremstilles ved fremgangsmåden ifølge krav 1, til anvendelse som mellemprodukt ved fremstilling af 1-N-substituerede derivater af 4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler, k e n d e t e g n e t ved, at den er valgt blandt:

3,2',6'-tri-N-Y-sisomicin, 3,2',6'-tri-N-Y-verdamicin,
 3,2',6'-tri-N-Y-tobramycin, 3,2',6'-tri-N-Y-gentamicin C₁,
 3,2',6'-tri-N-Y-gentamicin C_{1a}, 3,2',6'-tri-N-Y-gentamicin C₂,
 3,2',6'-tri-N-Y-gentamicin C_{2a}, 3,2',6'-tri-N-Y-gentamicin C_{2b},
 3,2',6'-tri-N-Y-Antibioticum 66-40B,
 3,2',6'-tri-N-Y-Antibioticum 66-40D,
 3,2',6'-tri-N-Y-Antibioticum JI-20A,
 3,2',6'-tri-N-Y-Antibioticum JI-20B,

3,2',6'-tri-N-Y-Antibioticum G-52,
 de 5-epi- og 5-epi-azido-5-deoxy-analoge af de foregående,
 3,2',6'-tri-N-Y-kanamycin B,
 3,2',6'-tri-N-Y-3',4'-dideoxykanamycin B,
 3,2',6'-tri-N-Y-nebramycin-faktor 4,
 3,2',6'-tri-N-Y-nebramycin-faktor 5',
 3,2',6'-tri-N-Y-3',4'-dideoxy-3',4'-dehydrokanamycin B,
 3,2',6'-tri-N-Y-3',4'-dideoxy-6'-N-methylkanamycin B og
 3,2',6'-tri-N-Y-5-deoxysisomicin,
 hvor Y er en acyl-gruppe.

10. Forbindelse ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t ved, at Y er acetyl,
 2,2,2-trichlorethoxycarbonyl eller benzyloxycarbonyl.

11. Forbindelse ifølge krav 9 og 10, k e n d e t e g n e t ved, at den er
 3,2',6'-tri-N-acetylsisomicin.

12. 4,6-Di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol, der er selektivt blokeret
 i stillingerne 3,6' og kan fremstilles ved fremgangsmåden ifølge krav 1,
 til anvendelse som mellemprodukt ved fremstilling af 1-N-substituerede derivater
 af 4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler, k e n d e t e g n e t ved, at
 den er valgt blandt:

3,6'-di-N-Y-gentamicin B, 3,6'-di-N-Y-gentamicin B₁,
 3,6'-di-N-Y-gentamicin A₃, 3,6'-di-N-Y-kanamycin A,
 3,6'-di-N-Y-6'-N-methylkanamycin A,
 hvor Y er en acylgruppe.

13. Forbindelse ifølge krav 12, k e n d e t e g n e t ved, at Y er valgt
 blandt acetyl, tert.butoxycarbonyl, benzyloxycarbonyl og 2,2,2-trichlorethoxycar-
 bonyl.

14. Forbindelse ifølge krav 12 og 13, k e n d e t e g n e t ved, at den er
 3,6'-di-N-tert.butoxycarbonylkanamycin A eller 3,6'-di-N-benzyloxycarbonylkanamy-
 cin A.

15. Forbindelse ifølge krav 12 og 13, k e n d e t e g n e t ved, at den er
 3,6'-di-N-tert.butoxycarbonylgentamicin B eller 3,6'-di-N-benzyloxycarbonylgenta-
 micin B.

16. 4,6-Di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol, der er selektivt blokeret
 i stillingerne 2',6' og kan fremstilles ved fremgangsmåden ifølge krav 1,
 til anvendelse som mellemprodukt ved fremstilling af 1-N-substituerede derivater
 af 4,6-di-O-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler, k e n d e t e g n e t ved, at
 den er valgt blandt:

2',6'-di-N-Y-sisomicin, 2',6'-di-N-Y-verdamycin,
 2',6'-di-N-Y-tobramycin, 2',6'-di-N-Y-gentamicin C₁,
 2',6'-di-N-Y-gentamicin C_{1a}, 2',6'-di-N-Y-gentamicin C₂,
 2',6'-di-N-Y-gentamicin C_{2a}, 2',6'-di-N-Y-gentamicin C_{2b},
 2',6'-di-N-Y-Antibioticum 66-40B, 2',6'-di-N-Y-Antibioticum 66-40D,
 2',6'-di-N-Y-Antibioticum JI-20A, 2',6'-di-N-Y-Antibioticum JI-20B,
 2',6'-di-N-Y-Antibioticum G-52,
 de 5-epi- og 5-epi-azido-5-deoxy-analoge af de foregående,
 2',6'-di-N-Y-kanamycin B, 2',6'-di-N-Y-3',4'-dideoxykanamycin B,
 2',6'-di-N-Y-nebramycin-faktor 4,
 2',6'-di-N-Y-nebramycin-faktor 5',
 2',6'-di-N-Y-3',4'-dideoxy-3',4'-dehydrokanamycin B,
 2',6'-di-N-Y-3',4'-dideoxy-6'-N-methylkanamycin B og
 2',6'-di-N-Y-5-deoxysisomicin,

hvor Y er en acylgruppe.

17. Forbindelse ifølge krav 16, kendet ved, at Y er valgt fra gruppen bestående af 2,2,2-trichlorethoxycarbonyl, tert.butoxycarbonyl og benzyloxycarbonyl.