



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 22 871 T2 2005.03.03**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 032 581 B1**

(51) Int Cl.⁷: **C07H 17/08**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 22 871.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/24539**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 958 048.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/025723**

(86) PCT-Anmeldetag: **17.11.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **27.05.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.09.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **31.03.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **03.03.2005**

(30) Unionspriorität:
972155 17.11.1997 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:
Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill., US

(72) Erfinder:
PATEL, H., Hemantkumar, Gurnee, US

(74) Vertreter:
Schieber und Kollegen, 80469 München

(54) Bezeichnung: **CHEMISCHE SYNTHESE VON 6-O-ALKYL ERYTHROMYCIN A**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

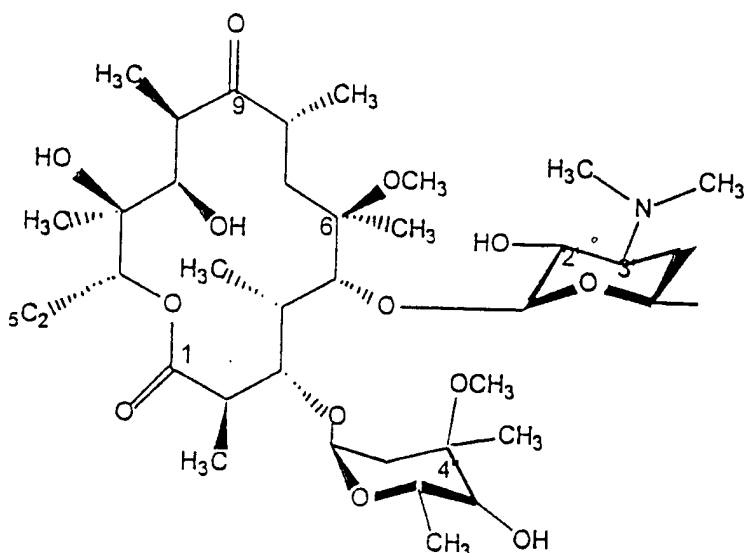
Beschreibung

Technischer Bereich der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Erythromycin-Derivate. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur chemischen Synthese von 6-O-Methylethromycin-A.

Hintergrund der Erfindung

[0002] 6-O-Methylethromycin-A (Clarithromycin), das unten gezeigt wird, ist ein potentes Makrolid-Antibiotikum (U.S. Patent Nr. 4,331,803).



[0003] Es wurde eine Vielzahl an Mitteln zur Herstellung von 6-O-Methylethromycin-A beschrieben. Das 6-O-Methylethromycin-A kann hergestellt werden durch Methylierung eines 2'-O-3'-N-dibenzyloxycarbonyl-des-N-methyl-Derivats von Erythromycin-A (U.S. Patent Nr. 4,331,803). 6-O-Methylethromycin-A kann auch aus 9-Oxim-Erythromycin-A-Derivaten hergestellt werden (siehe zum Beispiel U.S.-Patent Nummern 5,274,085; 4,680,386; 4,668,776; 4,670,549 und 4,672,109 und Europäische Patentanmeldung 0260938 A2).

[0004] In diesen Verfahren, die 9-Oxim-Erythromycin-A-Derivate verwenden, wird das Oxim während der Methylierung mit einer 2-Alkenyl-Gruppe (U.S.-Patent Nummern 4,670,549 und 4,668,776), mit einer Benzyl- oder substituierten Benzylgruppe (U.S.-Patent Nummern 4,680,386 und 4,670,549) oder mit einer Komponente geschützt, die gewählt ist aus der Gruppe, die aus Niederalkyl, substituiertem Alkyl, Niederalkenyl, Aryl- substituiertem Methyl, substituiertem Oxalkyl und substituiertem Thiomethyl (U.S.-Patent Nummer 4,672,109) besteht. Das U.S.-Patent 4,990,602 offenbart die Derivatisierung der 9-Oxim-Hydroxylgruppe vor der Alkylierung der 6-OH-Gruppe. Dies ist das kommerzielle Verfahren, das zurzeit bei der Herstellung von Clarithromycin eingesetzt wird.

[0005] Bei den vorhandenen Verfahren zur Herstellung von 6-O-Methylethromycin-A gibt es Nachteile. Beispielsweise führt ein Unterlassen des Schützens der 2'-OH-Gruppe zu einer unerwünschten Methylierung dieser Gruppe. Vorhandene Verfahren zum Schützen der 2'-OH-Gruppe sind unbefriedigend, weil diese Verfahren auch das Schützen des 3'-Stickstoffs erfordern. Das U.S.-Patent Nummer 4,680,386 offenbart das Schützen der 2'-OH-Gruppe mit einer Benzyloxycarbonyl-Komponente. Unter solchen Umständen unterzieht man jedoch den 3'-Stickstoff auch einer N-Demethylierung, gefolgt von der Bildung von N-Benzyloxycarbonyl. Der Schutz dieser 3'-N-Benzyloxycarbonylgruppe muss im Anschluss an die 6-O-Methylierung aufgehoben werden. Die 3'-Dimethylaminogruppe wird im Anschluss an die 6-O-Methylierung durch N-Methylierung regeneriert. Das U.S.-Patent Nummer 4,670,549 offenbart den Schutz der 2'-OH-Gruppe als ein Benzyl oder ein ähnlicher Substituent. Unter diesen Umständen muss die 3'-Stickstoffgruppe auch als quaternäres Salz geschützt werden. Dieses quaternäre Salz muss im Anschluss an die 6-O-Methylierung entfernt werden, um die 3'-Dimethylaminogruppe zu regenerieren. Aufhebung des Schutzes der 9-Oxim-Derivate, geschützt mit Oxyalkylgruppen, muss unter harten Bedingungen durchgeführt werden, die zur Bildung von unerwünschten Nebenprodukten führen. Als weiteres Beispiel erfordert die Verwendung von Benzyloxycarbonylgruppen zum Schutz der 2'-Hydroxygruppe (U.S.-Patent Nummer 4,311,803) große Mengen von Benzyl-Chlorameisensäureester, das

ernsthaft reizend und toxisch ist. Als weiteres Beispiel gibt es die Probleme beim Schutz des Oxims mit Benzoyloxycarbonyl. Die Gruppe ist zu instabil während der Methylierung unter basischen Bedingungen.

[0006] Es besteht weiterhin Bedarf, ein schnelles, wirksames Verfahren zur Herstellung von 6-O-Methylerythromycin-A bereitzustellen, das milde, neutrale Synthese-Bedingungen nutzt.

Kurze Beschreibung der Erfindung

[0007] Die vorliegende Erfindung liefert ein wirksames und praktisches Verfahren zur Synthese von 6-O-Methylerythromycin-A, im Fach bekannt als Clarithromycin. Das Synthese-Verfahren verwendet 1) Benzoyl-Schutzgruppen zum Schutz der 9-Oxim-Funktionalität und 2) O-Schutzgruppen für die 2'- oder 2"- und 4"-Hydroxylgruppen während der selektiven Alkylierung des 6-Hydroxyl-Derivates von Erythromycin-A.

[0008] Das Synthese-Verfahren beginnt mit Erythromycin-A-Oxim, erhalten durch ein beliebiges Verfahren. Die 9-Oximgruppe von Erythromycin-A wird durch eine Benzoylschutzgruppe geschützt. Der Schutz wird durch Reaktion des Erythromycin-A-Oxims mit einem benzoylierenden Reagens der Formel RCOX erzielt, wobei X ein Halogenid ist und R ein disubstituiertes Benzen ist, in dem die Substituenten-Gruppen Cl, Br, I oder Alkoxy sind.

[0009] Vor der Alkylierung der 6-Hydroxylgruppe werden die 2'-Hydroxylgruppen oder die 2'- und 4"-Hydroxylgruppen O-geschützt. Wenn sowohl die 2'- als auch die 4"-Hydroxylgruppen geschützt sind, ist die bevorzugte Schutzgruppe eine Trimethylsilylgruppe. Hexamethyldisilazan wird als bevorzugtes Silylierungsreagens benutzt. Die Verwendung von Nicht-Trimethylsilylschutzgruppen beseitigt die Notwendigkeit, die 4"-Hydroxylgruppe zu schützen. Schützen des Oxims und O-Schutz der 2'- und 4"-Hydroxylgruppen kann in jeder beliebigen Reihenfolge stattfinden. Vorzugsweise findet der Schutz des Oxims nach dem O-Schutz der 2'- und 4"-Hydroxylgruppen statt.

[0010] Das Oxim-geschützte, 2'-geschützte oder 2',4"-zweifach-geschützte Erythromycin-A-Derivat wird dann alkyliert mit im Fach gut bekannten Alkylierungsreagenzien. Bevorzugte Alkylierungsreagenzien sind Alkylhalogenide. Die Schutzgruppen werden entfernt unter Verwendung alkoholischer Alkalimetallcarbonate. Deoximierung wird mit Hilfe von Standardverfahren durchgeführt, die im Fach gut bekannt sind, um 6-O-Alkyl-Erythromycin-A zu liefern.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0011] Hierin werden eine Vielzahl an definierten Ausdrücken verwendet, um bestimmte Elemente der vorliegenden Erfindung zu bezeichnen. Wenn sie so benutzt werden, sind folgende Bedeutungen gemeint:

[0012] Der Begriff „Alkyl“ bezeichnet gesättigte, gerad- oder verzweigt-kettige Kohlenwasserstoffradikale, die zwischen einem und zehn Kohlenstoffatome enthalten, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, n-Butyl, tert-Butyl und Neopentyl. Vorzugsweise ist das Alkyl auf 1–4 Kohlenstoffe begrenzt.

[0013] Der Begriff „Alkylierungsmittel“ bezeichnet ein Reagens, das die Fähigkeit hat, eine Alkylgruppe an einer nukleophilen Stelle zu platzieren, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Alkylhalogenide wie Methylbromid, Ethylbromid, n-Propylbromid, Methyljodid, Ethyljodid und n-Propylbromid; Dialkylsulfate wie Dimethylsulfat, Diethylsulfat und di-n-Propylsulfat; und Alkyl- oder Arylsulfonate wie Methyl-p-toluensulfonat, Ethylmethansulfonat, n-Propylmethansulfonat.

[0014] Der Begriff „Aryl(Niederalkyl)“ bezeichnet ein niedriges Alkylradikal, dem 1–3 aromatische Kohlenwasserstoffgruppen beigefügt sind, wie zum Beispiel Benzyl, Diphenylbenzyl, Trityl und Phenylethyl.

[0015] Der Begriff „Aryloxy“ bezeichnet ein aromatisches Kohlenwasserstoffradikal, das mittels einer Etherbindung (d. h. durch ein Sauerstoffatom) an den Rest des Moleküls gebunden ist, wie zum Beispiel Phenoxy.

[0016] Der Begriff „Cycloalkyl“ bezeichnet ein gesättigtes monozyklisches Kohlenwasserstoffradikal, das von 3–8 Kohlenstoffatome im Ring hat und wahlweise substituiert ist mit zwischen 1 und 3 zusätzlichen Radikalen, ausgewählt aus Niederalkyl, Halogen(Niederalkyl), Niederalkoxy und Halogen. Beispiele für Cycloalkylradikale schließen folgende ein, sind aber nicht darauf beschränkt: Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Cycloheptyl, 1-Fluor-cyclopropyl und 2-Fluorcyclopropyl.

[0017] Der Begriff „Niederalkenyl“ bezeichnet ein gerad- oder verzweigt-kettiges Kohlenwasserstoffradikal, das zwischen 2 und 6 Kohlenstoffatome enthält und das mindestens eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung besitzt. Beispiele für Niederalkenylradikale schließen Vinyl, Allyl, 2- oder 3-Butenyl, 2-, 3- oder 4-Pentenyl, 2-, 3-, 4- oder 5-Hexenyl und isomerische Formen davon ein.

[0018] Der Begriff „Niederalkoxy“ bezeichnet ein niedriges Alkylradikal, das an den Rest des Moleküls mittels einer Etherbindung (d. h. durch ein Sauerstoffatom) gebunden ist. Beispiele für Niederalkoxyradikale schließen Methoxy und Ethoxy ein, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0019] Der Begriff „Niederalkyl“ bezeichnet ein Alkylradikal, das 1–6 Kohlenstoffatome enthält, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, n-Butyl, tert-Butyl und Neopentyl.

[0020] Der Begriff „polares aprotisches Lösungsmittel“ bezeichnet polare organische Lösungsmittel, denen ein leicht entfernbares Proton fehlt, einschließlich, aber nicht beschränkt auf N,N-Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, N-Methyl-2-pyrrolidon, Hexamethylphosphorsäuretriamid, Tetrahydrofuran, 1,2-Dimethoxyethan, Acetonitril oder Ethylacetat.

[0021] Der Begriff „Silyl“ bezeichnet eine Gruppe der Formel $\text{Si}(\text{R}^1)(\text{R}^2)(\text{R}^3)$, in der jedes von R^1 , R^2 und R^3 unabhängig voneinander Wasserstoff, Niederalkyl, Aryl, Phenyl, Phenyl-substituiertes Niederalkyl, Cycloalkyl oder Alkenyl ist.

[0022] Der Begriff „starke Alkalimetallbase“ bezeichnet eine Alkalimetallbase, die eine schwache korrespondierende Säure hat, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Natriumhydrid, Kaliumhydrid, Kalium-t-butoxid.

[0023] Der Begriff „substituiertes Aryl(Niederalkyl)“ bezeichnet einen Aryl(Niederalkyl)rest, wie oben definiert, der zwischen 1 und 3 Nicht-Wasserstoff-Ringsubstituenten hat, jeder unabhängig ausgewählt aus Halogen, Niederalkoxy, Niederalkyl, Hydroxy-substituiertem Niederalkyl und (Niederalkyl)amino. Beispiele für substituierte Aryl(Niederalkyl)-Radikale schließen 2-Fluorphenylmethyl, 4-Fluorphenylethyl und 2,4-Difluorphenylpropyl ein.

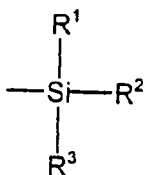
[0024] Der Begriff „schwache organische Aminbase“ bezeichnet eine organische Aminbase, die eine starke korrespondierende Säure hat, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Trimethylamin, Triethylamin, Tripropylamin, Pyridin, 2-Methoxypyridin, 1-Methylpyrrolidin, 1-Methylpiperidin und 1-Ethylpiperidin.

[0025] Die vorliegende Erfindung liefert ein Verfahren zur Herstellung von 6-O-Alkyl-Erythromycin-A. Das Verfahren beginnt mit 9-Oxim-Erythromycin-A. 9-Oxim-Erythromycin-A kann aus jedem Ausgangsstoff erhalten werden. Vorzugsweise wird 9-Oxim-Erythromycin-A durch Oximierung von Erythromycin-A hergestellt, unter Verwendung von Standardverfahren, die im Fach bekannt sind (siehe zum Beispiel U.S.-Patent Nummer 5,274,085). Zum Beispiel kann Erythromycin A, erhalten aus der Fermentation, mit entweder Hydroxylaminhydrochlorid und einer Base, freiem Hydroxylamin in Methanol oder Hydroxylamin und einer organischen Säure reagiert werden. Vorzugsweise wird die Oximierung von Erythromycin-A durch Verwendung von Hydroxylamin und Ameisensäure erzielt.

[0026] Vor der selektiven Alkylierung der 6-Hydroxylgruppe des 9-Oxim-Erythromycin-A ist es notwendig, andere Hydroxylgruppen in der Verbindung zu schützen. Diese anderen Hydroxylgruppen sind das Oxim-Hydroxyl (N-OH), das 2'-Hydroxyl und wahlweise das 4"-Hydroxyl. Der Schutz dieser Hydroxylgruppen kann in jeder Reihenfolge stattfinden, vorausgesetzt, dass alle Gruppen vor der Alkylierung des 6-Hydroxyls geschützt werden.

[0027] In einer Ausführungsform wird das 9-Oxim-Erythromycin-A zunächst an dem Oxim-Hydroxyl geschützt, und zwar durch Reaktion des Oxims mit einem Benzoylierungsreagens. Ein geeignetes Reagens hat die Formel RCOX , wobei X ein Halogenid ist und R ein disubstituiertes Benzen ist. Vorzugsweise ist X Chlorid. Die zwei Substitutionen in Benzen befinden sich vorzugsweise an dem 2. und 4. oder an dem 2. und 6. Kohlenstoffatom. Es kann jede Substituentengruppe benutzt werden, die nicht die nachfolgenden Reaktionsschritte stört. Vorzugsweise ist die Substituentengruppe ein Alkoxy, ein Chlorid, Bromid oder Jodid. Bevorzugte Alkoxygruppen sind Ethoxy und Methoxy. Beispielhafte und bevorzugte Benzoylierungsreagenzien sind somit Verbindungen der Formel RCOX , worin X Chlorid ist und R 2,6-Dichlorbenzen, 2,6-Dibrombenzen, 2,6-Dijodbenzen, 2,6-Dimethoxybenzen, 2,6-Diethoxybenzen, 2,4-Dichlorbenzen, 2,4-Dibrombenzen, 2,4-Dijodbenzen, 2,4-Dimethoxybenzen oder 2,4-Diethoxybenzen.

[0028] In einer Ausführungsform sind sowohl die 2'- als auch die 4''-Hydroxylgruppe geschützt. Der Schutz dieser Hydroxylgruppen wird durch eine Silylgruppe erzielt. Beispielhafte und bevorzugte Silylgruppen haben die Formel:



worin R^1 , R^2 und R^3 unabhängig voneinander Wasserstoff, Niederalkyl, Aryl, Phenyl, Phenyl-substituiertes Niederalkyl, Cycloalkyl oder Alkenyl sind. Vorzugsweise sind alle von R^1 , R^2 und R^3 Methyl. Silylgruppen können an den 2'- und an den 4''-Hydroxylgruppen angebracht werden durch Standardverfahren, die im Fach gut bekannt sind. Beispielsweise kann eine Trimethylsilylgruppe an den 2'- und 4''-Stellen angebracht werden durch Reaktion eines 9-Oxim-Erythromycin-A-Derivates (Oxim-geschützt oder -ungeschützt) mit dem Silylierungsmittel Hexamethyldisilazan (HMDS) in Anwesenheit von einer Säure (zum Beispiel HCO_2H). Dieselbe Umwandlung kann durchgeführt werden mit anderen Silylierungsmitteln, wie Trimethylsilylchlorid (TMSchlorid) in Anwesenheit einer organischen Base, wie Et_3N , Pyridin oder Imidazol. Es können auch andere Silylierungsbedingungen verwendet werden. Solche Bedingungen schließen typischerweise den Gebrauch eines geeigneten Lösungsmittels, wie Acetonitril (CH_3CN) ein.

[0029] In einer anderen Ausführungsform ist es nur notwendig, die 2'-Hydroxylgruppe zu schützen (siehe United States Patent, U.S. 5719272, eingereicht am 02.04.1996). Ein solcher Schutz kann erzielt werden durch Gebrauch von herkömmlichen O-Schutzgruppen, die im Fach gut bekannt sind. Exemplarische und bevorzugte O-Schutzgruppen sind Alkoxy-carbonyl (zum Beispiel Methoxy-carbonyl, Ethoxy-carbonyl, Isopropoxy-carbonyl, n-Isopropoxy-carbonyl, n-Butyloxy-carbonyl, Isobutyloxy-carbonyl, sec-Butyloxy-carbonyl, t-Butyloxy-carbonyl, 2-Ethylhexyloxy-carbonyl, Cyclohexyloxy-carbonyl, Methyloxy-carbonyl; Alkoxyalkoxy-carbonyl (zum Beispiel Methoxymethoxy-carbonyl, Ethoxymethoxy-carbonyl, 2-Methoxyethoxy-carbonyl, 2-Ethoxyethoxy-carbonyl, 2-Butoxyethoxy-carbonyl, 2-Methoxyethoxymethoxy-carbonyl; Haloalkoxy-carbonyl (zum Beispiel 2-Chlorethoxy-carbonyl, 2-Chlorethoxy-carbonyl, 2,2,2-tri-Chlor-Ethoxy-carbonyl); ungesättigte Alkoxy-carbonyl (zum Beispiel Allyloxy-carbonyl, pro-Pargyloxy-carbonyl, 2-Butenoxycarbonyl, 3-Methyl-2-butenoxycarbonyl); substituierte Benzyloxy-carbonyl (zum Beispiel Benzyloxy-carbonyl, p-Methylbenzyloxy-carbonyl, p-Methoxybenzyloxy-carbonyl, p-Nitro-benzyloxy-carbonyl, 2,4-Dinitrobenzyloxy-carbonyl, 3,5-di-Methylbenzyloxy-carbonyl, p-Chlorbenzyloxy-carbonyl, p-Brom-benzyloxy-carbonyl) und substituierte Phenoxy-carbonyl (zum Beispiel Phenoxy-carbonyl, p-Nitrophenoxy-carbonyl, o-Nitrophenoxy-carbonyl, 2,4-di-Nitrophenoxy-carbonyl, p-Methylphenoxy-carbonyl, m-Methylphenoxy-carbonyl, o-Bromphenoxy-carbonyl, 3,5-Dimethylphenoxy-carbonyl, p-Chlorphenoxy-carbonyl, 2-Chlor-4-nitrophenoxy-carbonyl) (siehe zum Beispiel Greene und Wuts' Protective Groups in Organic Synthesis, 2d. Ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1991).

[0030] Exemplarische und bevorzugte Niederalkylmonocarbonylgruppen sind Acetyl, Propionyl, Butyryl, Isobutyryl. Exemplarische und bevorzugte Niederalkenylmonocarbonylgruppen schließen Acryloyl, Methacryloyl ein. Exemplarische und bevorzugte Niederalkoxy-carbonyl-Alkylcarbonylgruppen schließen Methoxy-carbonyl-methylcarbonyl, Ethoxy-carbonylmethylcarbonyl, Ethoxy-carbonyl-ethylcarbonyl ein. Exemplarische und bevorzugte Arylcarbonylgruppen schließen Benzoyl, p-Methoxybenzoyl, 3,4,5-Trimethoxybenzoyl, p-Chlorbenzoyl, 2,4-Dichlorbenzoyl, 3,5-Dichlorbenzoyl, Diphenylacetyl, 1-Naphthalenacetyl, 2-Naphthalenacetyl ein.

[0031] Der Gebrauch von O-Schutzgruppen bei der Herstellung von Erythromycin-Derivaten ist beschrieben worden (siehe zum Beispiel U.S.-Patent Nummer 4,672,109 und Europäische Patentanmeldung 0260938A2). Herkömmliche O-Schutzgruppen, wie oben ausgeführt, werden durch Standardverfahren, die im Fach gut bekannt sind, angebracht. Beispielsweise kann eine Acetylgruppe an der 2'-Stelle angebracht werden durch Reaktion eines Erythromycin-A-Derivates (9-Oxim oder 9-Oximsilyl) mit einem Acetylierungsmittel und einer Base. Geeignete Acetylierungsmittel, die benutzt werden können, schließen Anhydrid und Säure-Halogenid-Verbindungen der Formel $(\text{R}^4\text{CO})_2\text{O}$ oder R^4COCl ein, worin R^4 Wasserstoff oder eine Substituentengruppe ist, wie z. B. ein Niederalkyl (zum Beispiel Methyl, Ethyl, n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, sec-Butyl, t-Butyl) oder Aryl (zum Beispiel Phenyl, p-Methoxyphenyl, p-Chlorphenyl, m-Chlorphenyl, o-Chlorphenyl, 2,4-Dichlorphenyl, p-Bromphenyl, m-Nitrophenyl, p-Nitrophenyl, Benzhydryl, 1-Naphthyl). Geeignete Basen sind organische Basen, wie Triethylamin, Pyridin und Diethylamin.

[0032] Ein Fachmann wird leicht erkennen, dass es vorteilhaft sein kann, auch die Methylgruppe der Dimethylaminokomponente an der 3'-Stelle von Erythromycin-A mit Hilfe einer herkömmlichen N-Schutzgruppe zu substituieren. Exemplarische und bevorzugte N-Schutzgruppen sind Alkoxy-carbonylgruppen (zum Beispiel

eine Methoxycarbonylgruppe, eine Ethoxycarbonylgruppe, eine Isopropoxycarbonylgruppe, eine n-Propoxycarbonylgruppe, eine n-Butoxycarbonylgruppe, eine Isobutyloxycarbonylgruppe, eine sec-Butyloxycarbonylgruppe, eine t-Butyloxycarbonylgruppe, eine 2-Ethylhexyloxycarbonylgruppe, eine Cyclohexyloxycarbonylgruppe, eine Methyloxycarbonylgruppe); Alkoxyalkoxycarbonylgruppen (zum Beispiel eine Methoxymethoxycarbonylgruppe, eine Ethoxymethoxycarbonylgruppe, eine 2-Methoxyethoxycarbonylgruppe, eine 2-Ethoxyethylcarbonylgruppe, eine 2-Ethoxyethoxycarbonylgruppe, eine 2-Butoxyethoxycarbonylgruppe, eine 2-Methoxyethoxy-methoxycarbonylgruppe); Haloalkoxycarbonylgruppen (zum Beispiel eine 2-Chlorethoxycarbonylgruppe, eine 2-Chlorethoxycarbonylgruppe, eine 2,2,2-Trichlorethoxycarbonylgruppe); ungesättigte Alkoxy-carbonylgruppen (zum Beispiel eine Allyloxycarbonylgruppe, eine Propargyloxycarbonylgruppe, eine 2-Butenoxycarbonylgruppe, eine 3-Methyl-2-butenoxycarbonylgruppe), substituierte Benzyloxycarbonylgruppen (zum Beispiel eine Benzyloxycarbonylgruppe, eine p-Methylbenzyloxycarbonylgruppe, eine p-Methoxybenzyloxycarbonylgruppe, eine p-Nitrobenzyloxycarbonylgruppe, eine 2,4-Dinitrobenzyloxycarbonylgruppe, eine 3,5-Dimethylbenzyloxycarbonylgruppe, eine p-Chlorbenzyloxycarbonylgruppe, eine p-Brombenzyloxycarbonylgruppe) und substituierte Phenoxy-carbonylgruppen [zum Beispiel eine Phenoxy-carbonylgruppe, eine p-Nitrophenoxy-carbonylgruppe, eine o-Nitrophenoxy-carbonylgruppe, eine 2,4-Dinitrophenoxy-carbonylgruppe, eine p-Methylphenoxy-carbonylgruppe, eine m-Methylphenoxy-carbonylgruppe, eine o-Bromphenoxy-carbonylgruppe, eine 3,5-Dimethylphenoxy-carbonylgruppe, eine p-Chlorphenoxy-carbonylgruppe, eine 2-Chlor-4-nitrophenoxy-carbonylgruppe (U.S.-Patent Nummer 4,672,109)].

[0033] Wie hier zuvor ausgeführt, können entweder die Oxim-Hydroxylgruppe oder die 2'- und 4''-Hydroxylgruppen als erste geschützt werden. Die Ausbeute und die Reinheit der Produktbildung wird jedoch erhöht, wenn die Oxim-Hydroxylgruppe nach den 2'- und 4''-Hydroxylgruppen geschützt wird.

[0034] Das 2',4''-Disilyl-9-oximbenzoyl-Erythromycin-A oder 2'-geschützte 9-Benzoyl-Erythromycin-A wird dann an der 6-Hydroxylgruppe selektiv alkyliert. Verfahren und Reagenzien zur Alkylierung der 6-Hydroxylgruppe von Erythromycin-Derivaten sind im Fach gut bekannt (siehe zum Beispiel U.S.-Patent Nummern 4,672,109 und 4,670,549). Das geschützte 9-Oximbenzoyl-Erythromycin-A wird kurz mit einem geeigneten Alkylierungsmittel in Anwesenheit einer Base reagiert. Exemplarische und bevorzugte Alkylierungsmittel sind Alkylhalogenide oder Alkylsulfate. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die 6-Hydroxylgruppe methyliert. Exemplarische und bevorzugte Methylierungsreagenzien sind Methylbromid, Methyljodid, Dimethylsulfat und Methyl-p-toluolsulfonat.

[0035] Exemplarische und bevorzugte Basen sind eine starke Alkalimetallbase, vorzugsweise gewählt aus der Gruppe, die aus einem Alkalimetallhydrid, Alkalimetallhydroxid oder Alkalimetallalkoxid besteht, und eine schwache organische Aminbase, vorzugsweise gewählt aus der Gruppe, die aus Trimethylamin, Triethylamin, Tripropylamin, Pyridin, 2-Methoxypyridin, 1-Methylpyrrolidin, 1-Methylpiperidin und 1-Ethylpiperidin besteht. Erhöhte Reinheit der selektiven Methylierung wird festgestellt, wenn weniger als circa 1,5 Äquivalente der Base benutzt werden.

[0036] Der Alkylierungsschritt wird in einem geeigneten Lösungsmittel durchgeführt. Exemplarische und bevorzugte Lösungsmittel sind polare aprotische Lösungsmittel, wie N,N-Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, N-Methyl-2-pyrrolidon, Hexamethylphosphorsäuretriamid, Tetrahydrofuran, 1,2-Dimethoxyethan, Acetonitril-methyl-t-butyl oder Ethylacetat oder eine Mischung aus solchen polaren aprotischen Lösungsmitteln, die bei einer Reaktionstemperatur und für einen Zeitraum gehalten werden, die ausreichen, um eine Alkylierung zu bewirken, vorzugsweise von -15°C bis zur Raumtemperatur für eine Zeitdauer von 1 bis 8 Stunden.

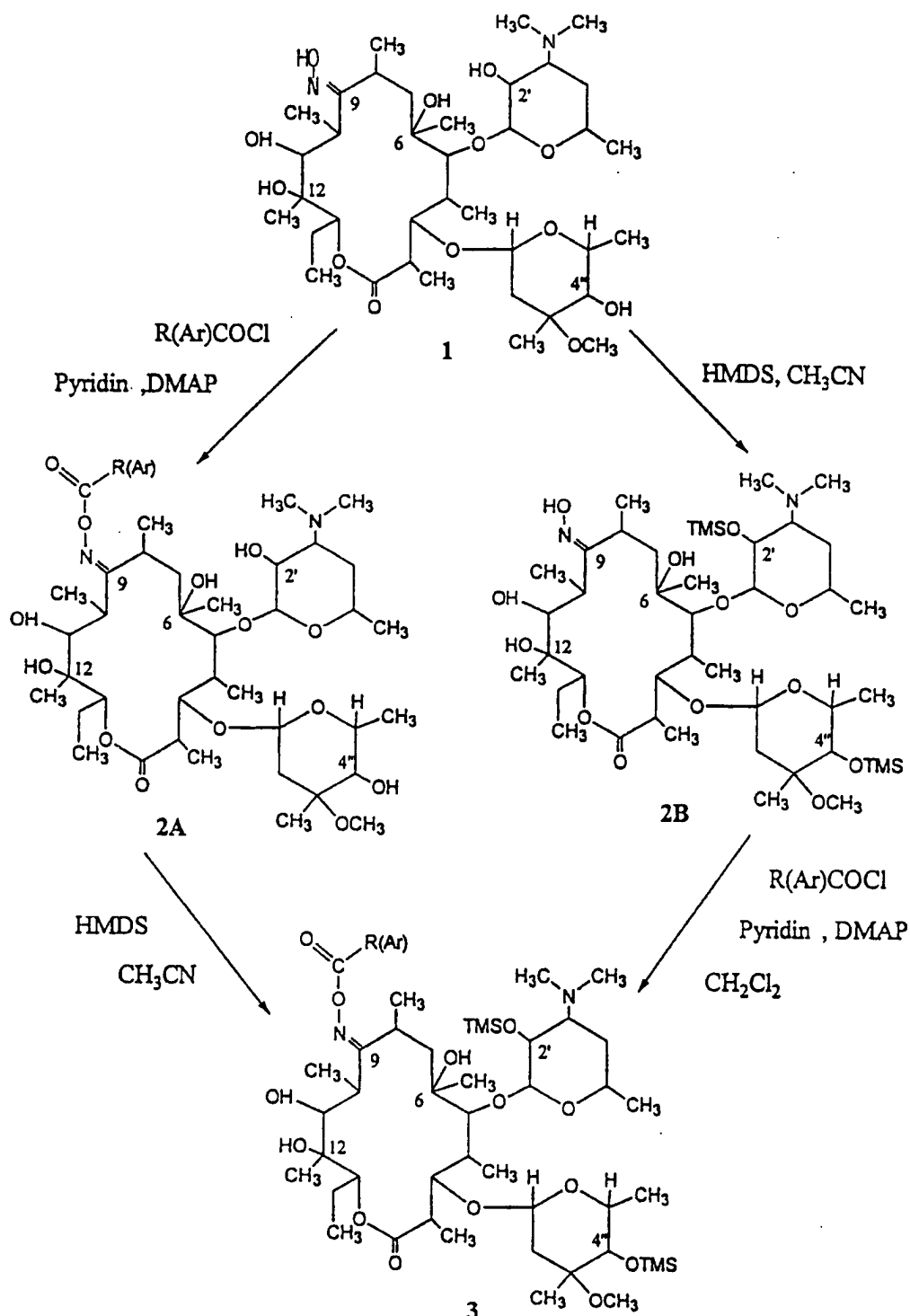
[0037] Die Herstellung von 6-O-Alkyl-Erythromycin A geht weiter mit der Entfernung der O-Schutzgruppen von den 2'- und 4''-Stellen und der Benzoylgruppe von der 9-Oximbenzoylgruppe und dann durch Deoximierung des 9-Oxims. Mittel zum Entfernen der O-Schutzgruppen an den 2'- und 4''-Stellen sind im Fach gut bekannt. Beispielsweise können die Silylgruppen entfernt werden durch Reaktion des silylierten Derivates mit einem alkoholischen Carbonat wie z. B. methanolischem Kaliumcarbonat. Ein Vorteil der Verwendung eines solchen Carbonates ist, dass die Benzoylschutzgruppe gleichzeitig aus der 9-Oximbenzoylgruppe entfernt wird. Wie im Fach bekannt, kann Entfernung der Silylgruppe auch erreicht werden durch Verwendung von (a) t-Bu₄NF in THF, (b) HOAc/THF/H₂O, (c) Zitronensäure/MeOH, (d) Dowex Harz/MeOH, K₂CO₃/MeOH, (e) n-Bu₄NCl/KF oder (f) HF/CH₃CN.

[0038] Ein letzter Schritt bei der Herstellung von 6-O-Alkyl-Erythromycin-A ist die Deoximierung. Deoximierung wird durchgeführt in Übereinstimmung mit Standardverfahren, die im Fach bekannt sind (siehe zum Beispiel U.S.-Patent Nummer 4,672,109). Das 9-Oxim-Derivat wird kurz mit Natriumhydrogensulfid in Alkohol (zum Beispiel Ethanol) zur Reaktion gebracht und unter Rückfluss gekocht. Die Lösung wird gekühlt, alkalisiert und

mit wässrigem Natriumbicarbonat gefällt. Der in der obigen Reaktion gebildete Niederschlag wird durch Filtern gesammelt, gewaschen und mit Alkohol umkristallisiert.

[0039] Eine detaillierte Beschreibung der Synthese des 6-O-Methyl-Erythromycin A unter Verwendung eines Verfahrens der vorliegenden Erfindung wird im Folgenden in den Beispielen gegeben. Eine schematische Abbildung von zwei Ausführungsformen eines Synthese-Schemas in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung ist unten in Schema 1 enthalten.

Schema 1

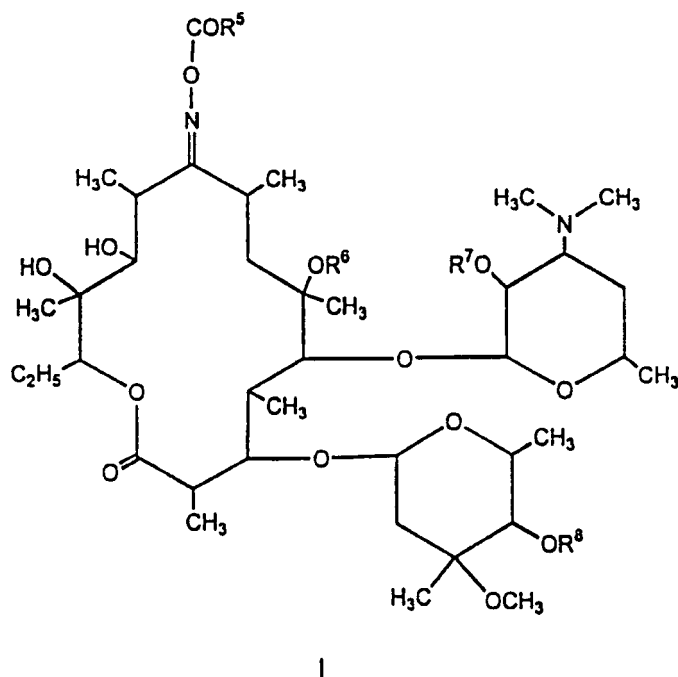


[0040] In Bezug auf Schema 1 wird das 9-Oxim-Erythromycin-A (Verbindung 1) mit entweder einem Benzoylierungs-Reagens $[RCOCl]$ in Anwesenheit von Pyridin und DMAP oder mit HMDS in Acetonitril zur Reaktion gebracht, um jeweils Verbindung 2A (das Oxim-geschützte Derivat) oder Verbindung 2B (das 2',4''-geschützte Derivat) zu bilden.

[0041] Verbindung 2A wird dann mit HMDS in Acetonitril zur Reaktion gebracht, um Verbindung 3 zu bilden. Alternativ wird die Verbindung 2B mit dem Benzylierungs-Reagens [RCOCl] in Pyridin und DMAP zur Reaktion gebracht, um Verbindung 3 zu bilden.

[0042] Verbindung 3 wird dann methyliert, entschützt und desoximiert, um 6-O-Methyl-Erythromycin-A zu liefern.

[0043] In einem anderen Aspekt liefert die vorliegende Erfindung bestimmte Zwischenprodukte, die während des Vorganges dieser Erfindung gebildet wurden. Solche Zwischenprodukte entsprechen der Struktur I, wie sie unten zu sehen ist,



worin R^5 ein disubstituiertes Benzen ist, R^6 ein Wasserstoff oder ein Alkyl ist und R^7 und R^8 jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff, Trimethylsilyl oder eine O-Schutzgruppe sind. In einer bevorzugten Ausführungsform ist R^6 Methyl und sowohl R^7 als auch R^8 sind Trimethylsilyl. In einer anderen Ausführungsform ist R^7 eine O-Schutzgruppe und R^8 ist Wasserstoff. Exemplarische und O-Schutzgruppen sind wie oben festgelegt. In einer bevorzugten Ausführungsform ist R^5 2,6-Dichlorbenzen, 2,6-Dibrombenzen, 2,6-Dijodbenzen, 2,6-Dimethoxybenzen, 2,6-Diethoxybenzen, 2,4-Dichlorbenzen, 2,4-Dibrombenzen, 2,4-Dijodbenzen, 2,4-Dimethoxybenzen oder 2,4-Diethoxybenzen.

[0044] Die folgenden Beispiele stellen bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar und sind in keiner Weise einschränkend für die Patentbeschreibung und die Ansprüche.

Beispiel 1: 2',4''-Bistrimethylsilyl-9-oxim-Erythromycin-A

[0045] 9-Oxim-Erythromycin-A (7,5 g) wurde in 70 ml Acetonitril und Hexamethyldisilazan (4,8 g) suspendiert. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur 16 Stunden gerührt. Das Gemisch wurde konzentriert, bis die Kristallisation begann. Das Gemisch wurde zusätzlich 30 Minuten gerührt und gefiltert, um 6,8 g des Titelproduktes als weißen kristallinen Feststoff zu liefern.

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 0.8 ($-\text{SiMe}_3$), 0.9 ($-\text{SiMe}_3$), 40.9 ($-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 49.7 ($3''\text{-OCH}_3$), 170.6 (C=O), 176.1 (C=N) MS (CIMS): 892 (MH^+).

Beispiel 2: 2',4''-Bistrimethylsilyl-9-[O-(2,6-dichlorbenzoyl)oxim]-Erythromycin-A

[0046] Einer Lösung des Produktes aus Beispiel 1 (25 g) in CH_2Cl_2 (125 ml) und Triethylamin (10 ml) wurden Dimethylaminopyridin (200 mg) und 2,6-Dichlorbenzoylchlorid (8 g) hinzugefügt. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur 5 Stunden gerührt. Wasser (100 ml) wurde hinzugefügt und das Gemisch wurde mit Methyl-t-butylether verdünnt. Die wässrige Phase wurde entfernt und die organische Phase wurde mit einer verdünnten NaOH-Lösung, gefolgt von einer gesättigten NaCl-Lösung, gewaschen. Die organische Schicht wurde getrocknet (MgSO_4) und verdampft, bis zur Trockenheit. Der Rückstand wurde in 25%igem Ethylacetat/Heptan gelöst

und auf einen kleinen Silikagelfilter geladen. Elution mit 10% Ethylacetat/Heptan mit 1% Triethylamin ergab Fraktionen, die das reine Produkt enthielten. Die Fraktionen wurden vereinigt und verdampft, um 11,4 g des Titelproduktes als weißen Feststoff zu liefern.

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 0.8 (2X-SiMe₃), 40.8 (-N(CH₃)₂), 49.5 (3''-OCH₃), 163.0 (C=O), 176.0 (C=O), and 179.6 (C=N). MS (CIMS): 1065 (MH⁺).

Beispiel 3: 2',4''-Bistrimethylsilyl-9-[O-2,6-(dimethoxybenzoyl)oxim]-Erythromycin-A

[0047] Einer Lösung von 2',6''-Bistrimethylsilyl-9-oxim-Erythromycin-A aus Beispiel 1 (10 g) in CH₂Cl₂ (50 ml) und Pyridin (5 ml) wurden Dimethylaminopyridin (200 mg) und 2,6-Dimethoxybenzoylchlorid (3,0 g) hinzugefügt. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 1 Stunde gerührt. Methylenchlorid wurde unter Vakuum entfernt und der Rückstand wurde in Methyl-t-butylether (200 ml) gelöst. Es wurde Wasser (100 ml) hinzugefügt und der pH der Lösung wurde mit 50%-igem wässrigem NaOH auf 13 eingestellt. Die organische Schicht wurde abgetrennt, mit Wasser gewaschen (3 × 150 ml), getrocknet (MgSO₄) und verdampft bis zur Trockenheit, um die Titelverbindung (10,5 g) als weißen Feststoff zu liefern.

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 0.7 and 0.8 (2X-SiMe₃), 40.8 (-N(CH₃)₂), 49.5 (3''-OCH₃), 55.4 and 55.9 (2X-OCH₃), 164.3 (C=O), 175.8 (C=O), and 178.2 (C=N). MS (CIMS): 1057 (MH⁺).

Beispiel 4: 2',4''-Bistrimethylsilyl-9-[O-(2,6-dichlorbenzoyl)oxim]-6-O-methyl-Erythromycin-A

[0048] Eine Lösung von 2',4''-Bistrimethylsilyl-9-[O-(2,6-dichlorbenzoyl)oxim]-Erythromycin-A aus Beispiel 2 (1,0 g) in Dimethylsulfoxid (5 ml) und Tetrahydrofuran (5 ml) wurde auf 7°C abgekühlt. Diesem Gemisch wurden Methyljodid (0,15 ml) und 85% Kaliumhydroxidpulver (120 mg) hinzugefügt. Das Gemisch wurde bei 5°C–15°C für 1,5 Stunden gerührt. Dem entstandenen Gemisch wurden eine 40%-ige wässrige Methylaminlösung (1 ml) und Wasser (10 ml) hinzugefügt. Das Gemisch wurde extrahiert mit Methyl-t-butylether (2 × 50 ml). Die organische Phase wurde mit Wasser (2 × 30 ml) gewaschen und getrocknet (MgSO₄). Das Lösungsmittel wurde in vacuo zur Trockenheit verdampft, um die Titelverbindung (850 mg) als weißen Feststoff zu liefern. Das rohe Titelprodukt wurde durch Silikagel-Säulenchromatographie unter Verwendung von Heptan/Ethylacetat/Triethylamin (6/4/0,5) gereinigt. MS: (MH⁺).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 0.8 and 0.9 (2X-SiMe₃), 40.8 (-N(CH₃)₂), 49.5 (3''-OCH₃), 51.0 (6-OMe), 164.5 (C=O), 175.6 (C=O), and 179.5 (C=N). MS (CIMS): 1117 (MK⁺).

Beispiel 5: 2',4''-Bistrimethylsilyl-9-[O-(2,6-dimethoxybenzoyl)oxim]-6-O-methyl-Erythromycin A

[0049] Eine Lösung von 2',4''-Bistrimethylsilyl-9-[O-(2,6-dimethoxybenzoyl)oxim]-Erythromycin A aus Beispiel 3 (3,0 g) in Dimethylsulfoxid (15 ml) und Tetrahydrofuran (15 ml) wurde auf 7°C abgekühlt. Diesem Gemisch wurde eine 2 M-Lösung von Methylbromid in t-Butyl-methylether (15 ml) und 85% Kaliumhydroxidpulver (350 mg) hinzugefügt. Das Gemisch wurde bei 5°C–7°C für 4,5 Stunden gerührt. Dem entstandenen Gemisch wurden 40%-ige wässrige Methylaminlösung (2 ml) und Wasser (120 ml) hinzugefügt. Das Gemisch wurde mit Methyl-t-butylether (2 × 150 ml) extrahiert. Die organische Schicht wurde mit Wasser (3 × 100 ml) gewaschen und getrocknet (MgSO₄). Das Lösungsmittel wurde in vacuo bis zur Trockenheit verdampft, um die Titelverbindung (2,3 g) als weißen Feststoff zu liefern.

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 0.8 and 1.0 (2X-SiMe₃), 40.9 (-N(CH₃)₂), 49.6 (3''-OCH₃), 50.3 (6-OMe), 55.6 (2X-OCH₃), 157.3 (C=O), 175.6 (C=O), and 176.0 (C=N).

Beispiele 6 und 7: 6-O-Methyl-9-oxim-Erythromycin A

[0050] Einer Lösung von 2',4''-Bistrimethylsilyl-9-[O-(2,6-dichlorbenzoyl)-oxim]-6-O-Methylerythromycin A aus Beispiel 4 (250 mg) in MeOH (8 ml) wurde eine Lösung aus Kaliumcarbonat (200 mg) in Wasser (1 ml) hinzugefügt. Das Gemisch wurde für 21 Stunden auf 45°C–50°C erhitzt. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur gekühlt und das kristalline feste 6-O-Methylerythromycin A (35 mg) wurde filtriert. Die Mutterlauge wurde konzentriert, um zusätzliches (65 mg) Produkt zu liefern, wie durch NMR ermittelt. (Siehe untere Tabelle).

[0051] Einer Lösung von A 2',4''-Bistrimethylsilyl-9-[O-(2,6-dimethoxybenzoyl)-oxim]-6-O-Methylerythromycin A aus Beispiel 5 (2 g) in MeOH (25 ml) wurde eine Lösung aus Kaliumcarbonat (1 g) in Wasser (2 ml) hinzugefügt. Das Gemisch wurde bei 55°C für 62 Stunden erhitzt. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und feste organische Unreinheiten wurden durch Filtrieren entfernt. Das Filtrat wurde verdampft, um 6-O-Methyl-9-oxim-Erythromycin A zu liefern, wie durch NMR ermittelt (siehe untere Tabelle).

Position	^{13}C (ppm) ^a	^1H (ppm) ^b
Erythronolid		
1	175.8	-
2	44.9	2.93
2-Me	16.0	1.19
3	78.9	3.78
4	38.7	2.05
4-Me	9.2	1.09
5	80.4	3.70
6	79.0	-
6-Me	20.1	1.47
7	37.1	1.59, 1.51
8	25.3	3.81
8-Me	19.0	0.98
9	169.9	-
10	32.9	2.50
10-Me	12.1	1.00
11	70.5	3.70
12	40.2	1.62
12-Me	9.1	0.84
13	75.0	5.45
14	25.8	1.70, 1.47
15	10.5	0.88
OMe	51.2	3.13
Desosamin		
1'	102.7	4.46
2'	71.1	3.21
3'	65.4	2.43
4'	28.8	1.66, 1.22
5'	68.6	3.50
6'	21.5	1.23
NMe2	40.3	2.29
Cladinose		
1''	96.1	4.95
2''	35.0	2.37, 1.59
3''	72.7	-
3'-Me	21.5	1.24
4''	78.0	3.03
5''	65.7	4.04
6''	18.7	1.30
OMe	49.5	3.33

^abezogen auf CDCl_3 , das als 77,0 ppm festgelegt ist

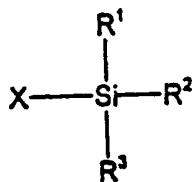
^bbezogen auf TMS.

Patentansprüche

- Ein Verfahren zur Herstellung von 6-O-Methyl-Erythromycin A, das folgende Schritte umfasst:
 - Benzoylieren von 9-Oxim-Erythromycin A zur Bildung eines 9-Oximbenzoyl-Erythromycin A-Derivats;
 - Schützen der 2'-Hydroxylgruppe des 9-Oximbenzoyl-Erythromycin A-Derivats zur Bildung eines 2'-geschützten-9-Oximbenzoyl-Erythromycin A-Derivats;
 - Methylieren des 2'-geschützten-9-Oximbenzoyl-Erythromycin A-Derivats zur Bildung eines 2'-geschützten-6-O-Methyl-9-Oximbenzoyl-Erythromycin A-Derivats;
 - Entfernen der Benzoyl- und O-Schutzgruppen von dem 2'-geschützten-6-O-Methyl-9-Oximbenzoyl-Erythromycin A-Derivat zur Bildung von 6-O-Methyl-9-Oxim-Erythromycin A; und
 - Desoximieren des 6-O-Methyl-9-Oxim-Erythromycins A zur Bildung von 6-O-Methyl-Erythromycin A.
- Das Verfahren von Anspruch 1, worin das 9-Oxim-Erythromycin A mit einem benzoylierenden Reagens der Formel RCOX zur Reaktion gebracht wird, worin X Halogenid und R ein disubstituiertes Benzen ist.
- Das Verfahren von Anspruch 2, worin R 2,6-Dichlorbenzol, 2,6-Dibrombenzol, 2,6-Diodbenzol, 2,6-Dimethoxybenzol oder 2,6-Diethoxybenzol ist.

4. Das Verfahren von Anspruch 1, das weiterhin den Schritt O-Schützen der 4"-Hydroxylgruppe des 9-Oximbenzoyl-Erythromycin A-Derivats vor Schritt (c) umfaßt.

5. Das Verfahren von Anspruch 4, worin das 9-Oximbenzoyl-Erythromycin A-Derivat mit einem silylierenden Reagens der Formel



zur Reaktion gebracht wird, worin X Halogenid ist und R¹, R² und R³ jeweils unabhängig Wasserstoff, Alkyl enthaltend 1–6 Kohlenstoffatome, Aryl, Phenyl, Phenyl-substituiertes Alkyl enthaltend 1–6 Kohlenstoffatome, Cycloalkyl oder Alkenyl sind.

6. Das Verfahren von Anspruch 5, worin sowohl R¹ als auch R² und R³ Methyl sind.

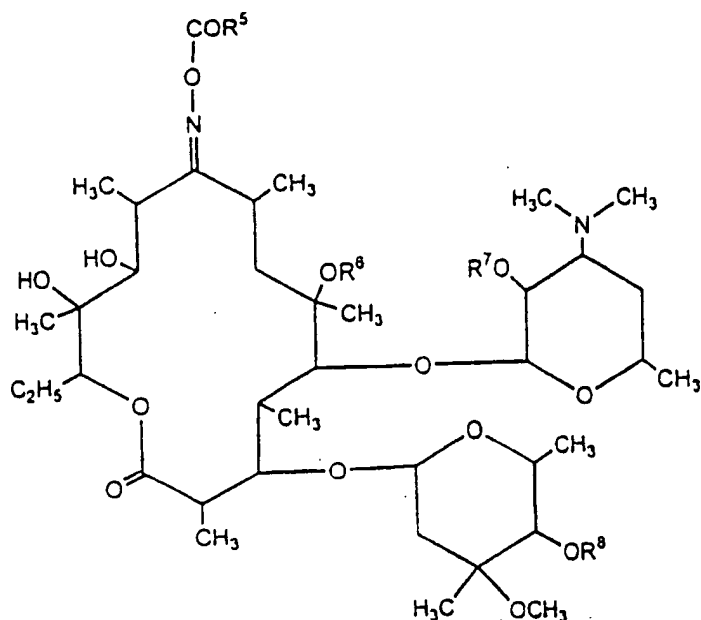
7. Das Verfahren von Anspruch 4, worin das 9-Oximbenzoyl-Erythromycin A-Derivat mit Hexamethyldisilazan zur Reaktion gebracht wird.

8. Das Verfahren von Anspruch 1, worin das 2'-geschützte-9-Oximbenzoyl-Erythromycin A-Derivat mit einem Methylhalogenid oder Methylsulfat in der Anwesenheit einer Base zur Reaktion gebracht wird.

9. Das Verfahren von Anspruch 8, worin das Methylhalogenid Methylbromid oder Methyljodid und das Methylsulfat Dimethylsulfat oder Methyl-p-Toluensulfonat ist.

10. Das Verfahren von Anspruch 1, worin das 2'-geschützte-6-O-Methyl-9-Oximbenzoyl-Erythromycin A-Derivat mit wässrigem methanolischen Kaliumcarbonat zur Reaktion gebracht wird.

11. Eine Verbindung der Struktur I, unten,



I

worin R⁵ ein disubstituiertes Benzen ist, R⁶ Wasserstoff oder Alkyl ist, und R⁷ und R⁸ jeweils unabhängig Wasserstoff, Trimethylsilyl oder eine O-Schutzgruppe sind.

12. Die Verbindung von Anspruch 11, worin R⁶ Methyl ist.

13. Die Verbindung von Anspruch 11, worin R⁵ 2,6-Dichlorbenzol, 2,6-Dibrombenzol, 2,6-Diodbenzol, 2,6-Dimethoxybenzol oder 2,6-Diethoxybenzol ist.

14. Die Verbindung von Anspruch 11, worin sowohl R^7 als auch R^8 Trimethylsilyl sind.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen