

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESKRIFT (11) 146298 B



DIREKTORATET FOR  
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 4124/74

(51) Int.Cl.<sup>3</sup>: C 07 H 15/22

(22) Indleveringsdag: 01 aug 1974

(41) Alm. tilgængelig: 07 feb 1975

(44) Fremlagt: 29 aug 1983

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 06 aug 1973 US 385751      19 mar 1974 US 452586      19 mar 1974 US 452600

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

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

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af 1-N-substituerede derivater af 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler eller syreadditionssalte deraf

DK 146298 B

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte 1-N-substituerede derivater af 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitolerne gentamicin B, gentamicin B<sub>1</sub>,  
 5 gentamicin C<sub>1</sub>, gentamicin C<sub>1a</sub>, gentamicin C<sub>2</sub>, gentamicin C<sub>2a</sub>, gentamicin C<sub>2b</sub>, sisomicin, verdamicin,  
 Antibiotikum G-418, Antibiotikum 66-40B, Antibiotikum 66-40D, Antibiotikum JI-20A, Antibiotikum JI-20B, Antibiotikum G-52, mutamicin 1, mutamicin 2, mutamicin 4, mutamicin 5 og mutamicin 6, hvor substituenten er



hvor X er hydrogen, alkyl, alkenyl, hydroxyalkyl, aminoalkyl, N-alkylaminoalkyl, aminohydroxyalkyl, N-alkylaminohydroxyalkyl, phenyl eller benzyl, hvilke aliphatiske grupper har op til 7 C-atomer og, hvis de er substitueret med både amino og hydroxy, bærer substituenterne på forskellige carbonatomer, eller farmaceutisk acceptable syreadditionssalte deraf, og fremgangsmåden er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del anførte.

Der kendes bredspektede antibakterielle midler, der kemisk kan klassificeres som 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler. Værdifulde antibakterielle midler fra denne gruppe er sådanne, hvori aminocyclitolen er 2-deoxystreptamin eller et derivat deraf med aminofunktioner i stilling 1 og 3. Særligt værdifulde antibakterielle forbindelser blandt 4,6-di-(aminoglycosyl)-2-deoxystreptaminerne er de, hvori aminoglycosylgruppen i stilling 6 er en garosaminylgruppe. Inden for klassen af 4-aminoglycosyl-6-garosaminyl-2-deoxystreptaminer findes antibioti-

ka, såsom gentamiciner B, B<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>1a</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>2a</sub>, C<sub>2b</sub> og X<sub>2</sub>, sisomicin, verdamicin, Antibiotikum G-418, Antibiotikum G-52, Antibiotikum JI-20A og Antibiotikum JI-20B.

De ved den foreliggende analogifremgangsmåde frem-  
 5 stillede hidtil ukendte 1-N-substituerede derivater af  
 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler eller syre-  
 additionssalte deraf har vist sig at være bredspektrede  
 antibakterielle midler, der udviser fordelagtig aktivi-  
 tet over for mange organismer, i særdeleshed gram-negati-  
 10 ve organismer, og udmærker sig i denne henseende sammenlignet med  
 kendte antibakterielle midler, således som nærmere dokumenteret  
 nedenfor, hvor de omhandlede forbindelser er sammenlignet med kend-  
 te 1-N-substituerede 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler,  
 hvor 1-N-substituenten er en acylgruppe. Derivaterne udmærker sig  
 15 navnlig ved at være aktive over for gram-negative organismer, der  
 er resistente over for de tilsvarende kendte 1-N-substituerede  
 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler.

Indbefattet blandt de substituentter, der kan udgøres  
 af gruppen CH<sub>2</sub>X i de hidtil ukendte forbindelser, er li-  
 20 gekædede og forgrenede alkylgrupper, såsom ethyl, n-propyl,  
 n-butyl, β-methylpropyl, n-pentyl, β-methylbutyl, γ-  
 methylbutyl og β,β-dimethylpropyl, n-hexyl, δ-methyl-  
 pentyl, β-ethylbutyl, γ-ethylbutyl, n-heptyl, ε-methyl-  
 heptyl, β-ethylpentyl, γ-ethylpentyl, δ-ethylpentyl, γ-  
 25 propylbutyl, n-octyl, iso-octyl, β-ethylhexyl, δ-ethyl-  
 hexyl, ε-ethylhexyl, β-propylpentyl og γ-propylpentyl,  
 alkenylgrupper, såsom β-propenyl, β-methylpropenyl, β-  
 butenyl, β-methyl-β-butenyl og β-ethyl-β-hexenyl,  
 hydroxysubstituerede ligekædede og forgrenede alkylgrupper, såsom  
 30 ε-hydroxypentyl, β-hydroxy-γ-methylbutyl, β-hydroxy-β-methylpro-  
 pyl, δ-hydroxybutyl, β-hydroxypropyl, γ-hydroxypropyl og ω-hydroxy-  
 octyl, aminosubstituerede ligekædede og forgrenede al-  
 kylgrupper, såsom ε-aminopentyl, β-aminopropyl, γ-amino-  
 propyl, δ-aminobutyl, β-amino-γ-methylbutyl og ω-amino-  
 35 octyl og mono-N-alkylerede derivater deraf, såsom N-me-  
 thyl-, N-ethyl- og N-propylderivater, f.eks. ε-methyl-  
 aminopentyl, β-methyl-aminopropyl, β-ethylaminopro-

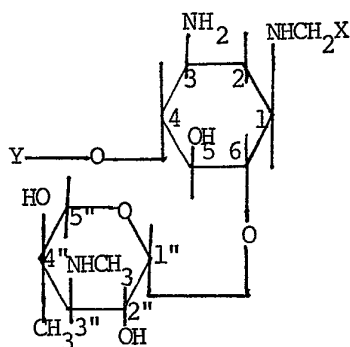
pyl,  $\delta$ -methylaminobutyl,  $\beta$ -methylamino- $\gamma$ -methylbutyl og  $\omega$ -methylaminobutyl, amino- og hydroxydisubstituerede li-  
gekædede og forgrenede alkylgrupper, såsom  $\beta$ -hydroxy- $\epsilon$ -  
aminopentyl,  $\gamma$ -hydroxy- $\gamma$ -methyl- $\delta$ -aminobutyl,  $\beta$ -hydroxy-  
5  $\delta$ -aminobutyl,  $\beta$ -hydroxy- $\gamma$ -aminopropyl og  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -  
methyl- $\gamma$ -aminopropyl, og mono-N-alkylerede derivater der-  
af, såsom  $\beta$ -hydroxy- $\epsilon$ -methylaminopentyl,  $\gamma$ -hydroxy- $\gamma$ -me-  
thyl- $\delta$ -methylaminobutyl,  $\beta$ -hydroxy- $\delta$ -methylaminobutyl,  $\beta$ -  
hydroxy- $\gamma$ -ethylaminopropyl og  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methyl- $\gamma$ -methyl-  
10 aminopropyl.

Forbindelserne er fortrinsvis 1-N-CH<sub>2</sub>X-derivater in-  
deholdende garosaminyl som 6-aminoglycosidgruppe og  
navnlig indeholdende 2-deoxystreptamin som 1,3-diamino-  
cyclitol.

15 2-Deoxystreptamin forefindes i alle de i det fore-  
gående anførte forbindelser, der fremstilles ved frem-  
gangsmåden ifølge opfindelsen, undtagen mutamicinerne.  
1,3-Diaminocyclitolkernen i hver af 1-N-CH<sub>2</sub>X-mutamici-  
nerne 1, 2, 4, 5 og 6 er henholdsvis streptamin, 2,5-  
20 dideoxystreptamin, 2-epi-streptamin, 5-amino-2,5-dideoxy-  
streptamin og 5-epi-2-deoxystreptamin.

1-N-CH<sub>2</sub>X-4-Aminoglycosyl-6-garosaminyl-2-deoxystrep-  
taminerne, der fremstilles ved den foreliggende frem-  
gangsmåde, er derivaterne af gentamicin B, gentamicin B<sub>1</sub>,  
25 gentamicin C<sub>1</sub>, gentamicin C<sub>1a</sub>, gentamicin C<sub>2</sub>, gentamicin  
C<sub>2a</sub>, gentamicin C<sub>2b</sub>, sisomisin, verdami-  
cin, Antibiotikum G-418, Antibiotikum JI-20A, Antibioti-  
kum JI-20B og Antibiotikum G-52, hvilke forbindelser er  
defineret ved følgende strukturformel I:

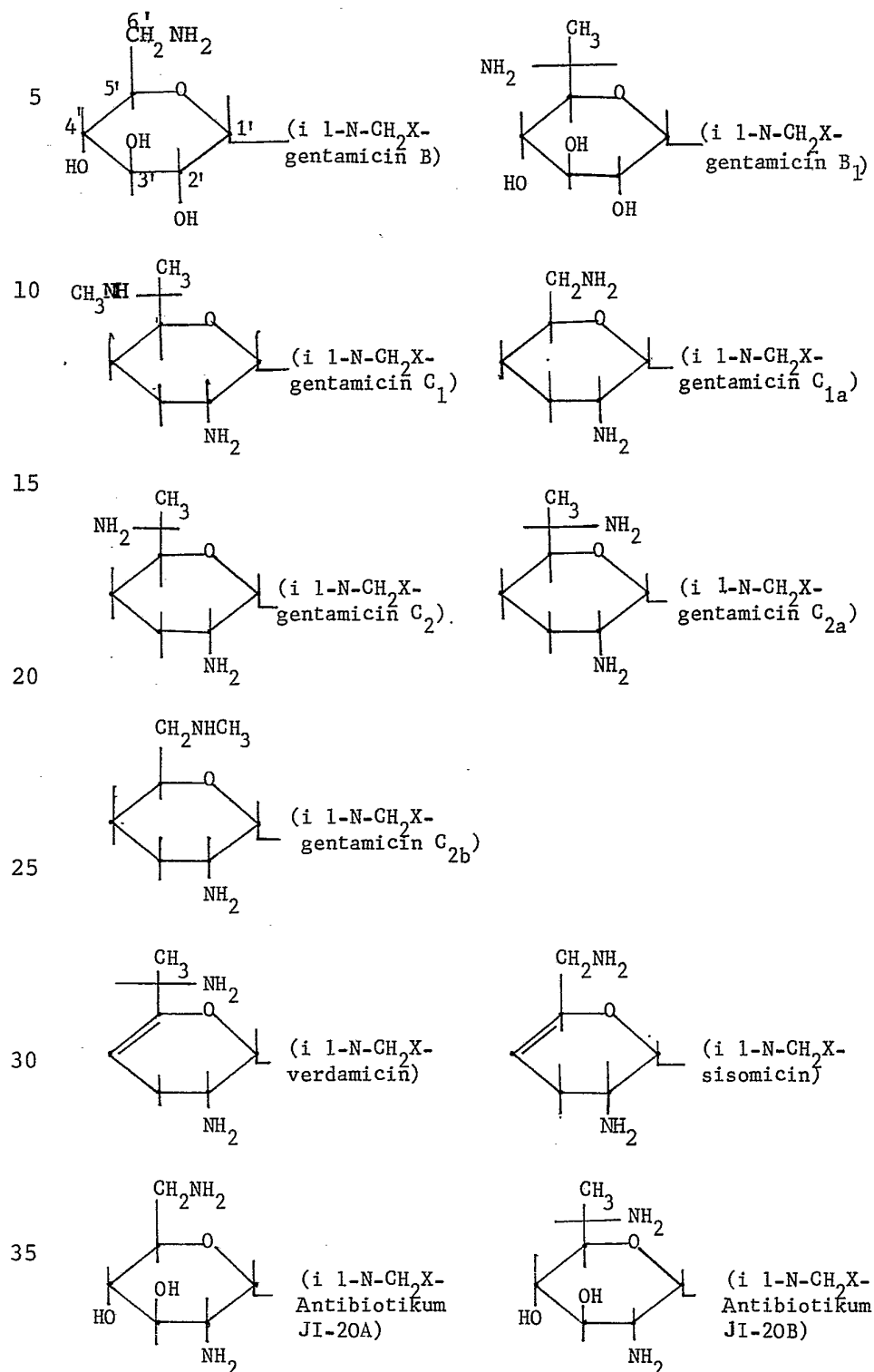
30

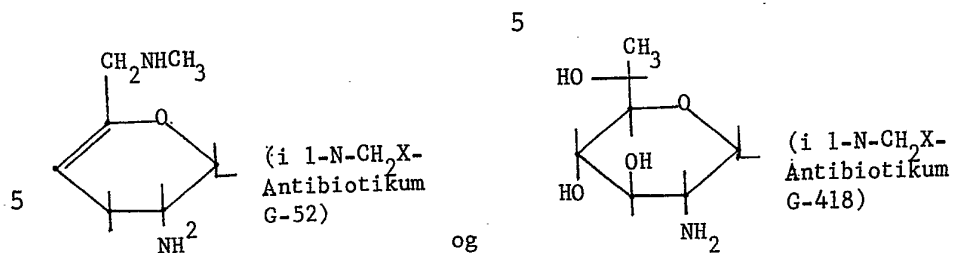


I

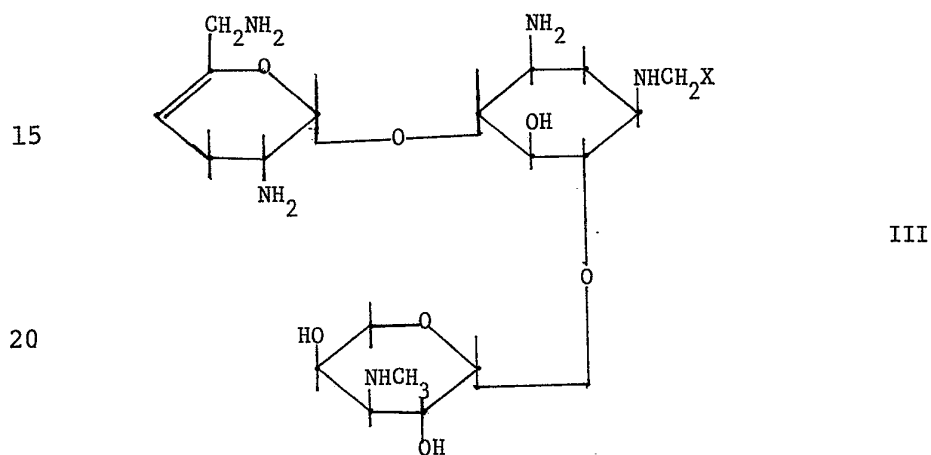
35

hvori X har den tidligere betydning, og hvori Y er en aminoglycosylgruppe valgt fra gruppen bestående af:

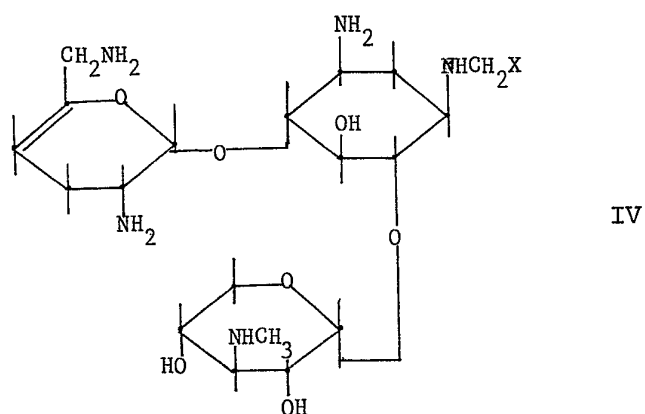




Andre nyttige 1-N-CH<sub>2</sub>X-4,6-di-(aminoglycosyl)-2-deoxystreptaminer, der fremstilles ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, omfatter 1-N-CH<sub>2</sub>X-Antibiotikum 66-40D 10 med følgende formel III (som er blandt de foretrukne forbindelser):

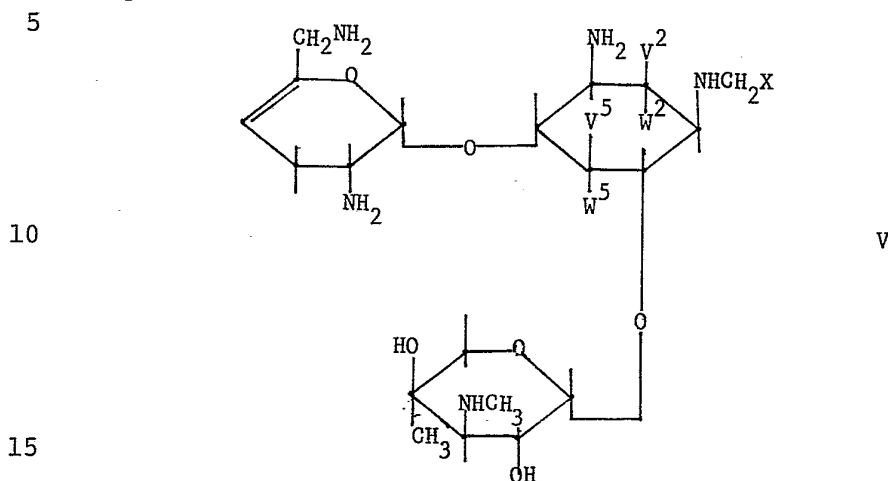


25 hvori X har den tidligere angivne betydning, og 1-N-CH<sub>2</sub>X-Antibiotikum 66-40B med følgende formel IV:



hvori X har den tidligere angivne betydning.

1-N-CH<sub>2</sub>X-mutamicinerne, der fremstilles ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, indbefatter 1-N-CH<sub>2</sub>X-4-amino-glycosyl-6-garosaminyl-1,3-diaminocyclitoler med følgende formel V:



hvor i X har den tidligere angivne betydning, og

i 1-N-CH<sub>2</sub>X-mutamicin 1 betegner V<sup>2</sup> og W<sup>5</sup> hydrogen og W<sup>2</sup> og V<sup>5</sup> hydroxy,

20 i 1-N-CH<sub>2</sub>X-mutamicin 2 betegner W<sup>2</sup>, V<sup>2</sup>, W<sup>5</sup> og V<sup>5</sup> hydrogen,

i 1-N-CH<sub>2</sub>X-mutamicin 4 betegner W<sup>2</sup> og W<sup>5</sup> hydrogen og V<sup>2</sup> og V<sup>5</sup> hydroxy,

25 i 1-N-CH<sub>2</sub>X-mutamicin 5 betegner W<sup>2</sup>, V<sup>2</sup> og W<sup>5</sup> hydrogen og V<sup>5</sup> amino, og

i 1-N-CH<sub>2</sub>X-mutamicin 6 betegner W<sup>2</sup>, V<sup>2</sup> og V<sup>5</sup> hydrogen, medens W<sup>5</sup> betegner hydroxy.

I de her anførte strukturformler betegner bindingsafslutninger uden anførte substituent hydrogen-  
30 atomer.

De farmaceutisk acceptable syreadditionssalte af 1-N-CH<sub>2</sub>X-4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitolerne med formlerne I, II, III, IV og V fremstilles på i og for sig kendt måde, såsom ved neutralisering af den frie  
35 base med den pågældende syre, sædvanligvis til pH ca. 5. Hensigtsmæssige syrer til dette formål indbefatter syrer, såsom saltsyre, svovlsyre, phosphorsyre, salpetersyre, hydrogenbromidsyre, eddikesyre, propionsyre, ma-

leinsyre, ascorbinsyre og citronsyre. Syreadditionssalte  
 ne af 1-N-CH<sub>2</sub>X-4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclito-  
 lerne kan karakteriseres som hvide faste stoffer, som er  
 opløselige i vand, sparsomt opløselige i de fleste andre  
 5 polære opløsningsmidler og uopløselige i ikke-polære or-  
 ganiske opløsningsmidler.

1-N-CH<sub>2</sub>X-4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocycli-  
 tolerne som defineret ved formlerne I, III, IV og V  
 samt deres ikke-toksiske farmaceutisk acceptable syre-  
 10 additionssalte udviser som nævnt i almindelighed en bred-  
 spektret antibakteriel virkning. Specielt 1-N-alkyl-  
 -derivaterne har forbedrede antibakterielle virkninger  
 sammenlignet med de tilsvarende 1-N-usubstituerede anti-  
 biotika, hvilket specielt manifesterer sig i en forøget  
 15 aktivitet af forbindelserne over for organismer, der er  
 resistente over for den 1-N-usubstituerede forbindelse.  
 Forbindelserne er således f.eks. mere aktive over for  
 organismer, som inaktiverer de tilsvarende 1-N-usubsti-  
 tuerede antibiotika ved acetylering af 3-aminogruppen  
 20 og/eller adenylylering af 2"-hydroxyl-gruppen. Af disse  
 forbindelser udviser nogle også anti-protozoale, anti-  
 amøbiske og anthelmintiske egenskaber.

En foretrukken gruppe forbindelser er de 1-N-sub-  
 stituerede derivater af 4-aminoglycosyl-6-garosaminy-2-  
 25 deoxystreptaminerne gentamicin B, gentamicin B<sub>1</sub>, genta-  
 micin C<sub>1</sub>, gentamicin C<sub>1a</sub>, gentamicin C<sub>2</sub>,  
 sisomicin, verdamicin, Antibiotikum JI-20A, Antibiotikum  
 JI-20B, Antibiotikum G-52 og Antibiotikum G-418, af hvil-  
 ke derivaterne af gentamicin C<sub>1</sub>, gentamicin C<sub>1a</sub>, sisomi-  
 30 cin, verdamicin og Antibiotikum G-52 er de mest fore-  
 trukne. Andre særligt nyttige forbindelser er de 1-N-  
 substituerede derivater af Antibiotikum 66-40B.

I 1-N-substituenten er X fortrinsvis valgt blandt  
 hydrogen, alkyl, hydroxyalkyl, aminoalkyl, aminohydroxy-  
 35 alkyl, phenyl eller benzyl, hvilke alifatiske grupper  
 har op til 7 carbonatomer og, hvis de er substitueret med  
 både amino og hydroxy, bærer substituenterne på forskel-  
 lige carbonatomer. Af disse er de foretrukne grupper



hydrogen, alkyl, aminoalkyl og hydroxyalkyl med op til 7 carbonatomer og aminohydroxyalkyl med op til 3 carbonatomer og bærende substituenterne på forskellige carbonatomer.

5 Særligt nyttige forbindelser er sådanne, hvor X betegner hydrogen, methyl, ethyl og propyl, og fortrinsvis methyl og ethyl. En særlig værdifuld gruppe er de 1-N-CH<sub>2</sub>X-4-aminoglycosyl-6-garosaminy-2-deoxystreptaminer med formlen I, hvori X betegner en alkylgruppe

10 med 1-3 carbonatomer, specielt 1-N-(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> alkyl)-derivater af gentamicin C<sub>1</sub>, gentamicin C<sub>1a</sub>, gentamicin C<sub>2</sub>, gentamicin C<sub>2a</sub>, gentamicin C<sub>2b</sub>, sisomicin, verdamicin og Antibiotikum G-52, såvel som 1-N-(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> alkyl)-Antibiotikum 66-40D med formlen III, hvilke derivater er

15 bredspektrede antibakterielle midler, der er aktive over for gram-positive bakterier (f.eks. Staphylococcus aureus) og gram-negative bakterier (f.eks. Escherichia coli og Pseudomonas aeruginosa), som påvist ved standfortyndingsforsøg, indbefattende bakterier, der er resistente

20 over for de 1-N-usubstituerede forstadier. Særligt nyttige er 1-N-ethylverdamicin (fysiske data for denne og følgende specielt anførte forbindelser, se nedenstående eksempler) og 1-N-alkyl-sisomiciner, f.eks. 1-N-methylsisomicin, 1-N-(n-propyl)sisomicin, 1-N-(n-butyl)sisomicin og fortrinsvis 1-N-ethyl-sisomicin, der udviser akti-

25 vitet over for gram-negative organismer, som er resistente over for forbindelsernes 1-N-usubstituerede forstadier. Andre særligt nyttige forbindelser er 1-N-ethyl-gentamicin C<sub>1a</sub>, 1-N-ethyl-gentamicin C<sub>1</sub>, 1-N-ethyl-Antibiotikum G-52, 1-N-(n-propyl)-verdamicin, 1-N-(δ-aminobutyl)-sisomicin, 1-N-(n-butyl)-verdamicin og 1-N-(S-2-hydroxy-4-aminobutyl)-gentamicin C<sub>1</sub>.

30

De fleste af de ovennævnte 1-N-usubstituerede 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol-antibiotika, ud

35 fra hvilke de omhandlede 1-N-substituerede derivater kan fremstilles, er kendte. De udgangsforbindelser, der heri betegnes gentamicin C<sub>2a</sub> og C<sub>2b</sub>, isoleres og karakteriseres, som angivet i det følgende under Fremstilling 1 og 2.

Isoleringen af, egenskaberne af og plankonfigurationen for gentamicin C<sub>2</sub> fremgår af beskrivelsen til U.S. patent nr. 3.651.042.

Antibiotikum 66-40B og Antibiotikum 66-40D, deres fremstilling, isolering, egenskaber og konfiguration fremgår af beskrivelsen til belgisk patent nr. 811.370.

Disse antibiotika fremstilles sammen med sisomicin, der er hovedproduktet ved fermenteringen af *Micromonospora inyoensis* (omtalt i beskrivelsen til britisk patent nr. 1.274.518), og kan skilles fra fermenteringsmediet ved anvendelse af specielt chromatografisk separationsteknik.

Mutamicin 1, 2, 4, 5 og 6, hvis konfiguration er vist i det foregående, kan fremstilles ved dyrkning af en mutantstamme af *Micromonospora inyoensis* heri betegnet *Micromonospora inyoensis* stamme 1550F-1G i et vandigt næringsmedium. Denne mutantstamme er ude af stand til at danne et antibiotikum, når den dyrkes under submerse aerobe betingelser i et vandigt næringsmedium uden 1,3-diaminocyclitol-byggeblokken. Når imidlertid visse sådanne forbindelser sættes til fermenteringsmediet, dannes mutamicinerne. Når 2-deoxystreptamin sættes til fermenteringen, dannes det kendte antibiotikum sisomicin.

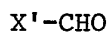
De fornødne 1,3-diaminocyclitoler, som skal være til stede under fermenteringen for at opnå mutamicinerne, er følgende:

- streptamin til mutamicin 1
- 2,5-dideoxystreptamin til mutamicin 2
- 2-epistreptamin til mutamicin 4
- 2,5-dideoxy-5-aminostreptamin til mutamicin 5
- 5-epi-2-deoxystreptamin til mutamicin 6.

Fremstillingen af mutamicinerne er beskrevet i den alment tilgængelige svenske patentansøgning nr. 7409945-8.

Af de anvendte fremstillingsmetoder a) til f) for de omhandlede 1-N-substituerede derivater bliver ved fremgangsmåden a) en tilsvarende 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol, der kan have amino-beskyttelsesgrup-

per ved en hvilken som helst anden aminogruppe end den i 1-stillingen, behandlet med et aldehyd med formlen



hvor X' er en gruppe som defineret for X ovenfor, hvori  
5 enhver tilstedeværende amino- eller hydroxygrupper kan  
være beskyttet, i nærværelse af et hydrid-donor-redukti-  
onsmiddel, hvorpå, om påkrævet, alle i molekylet tilste-  
deværende beskyttelsesgrupper fjernes på i og for sig  
kendt måde, hvilket sidste procestrin efterfølges af iso-  
10 lering af derivatet som sådant eller som et farmaceutisk  
acceptabelt syreadditionssalt.

Denne fremgangsmåde, hvorved 1-aminogruppen i en  
1-N-usubstitueret 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyc-  
litol selektivt kondenseres med et aldehyd og samtidig  
15 reduceres in situ til dannelse af en antibakterielt  
virksom 1-N-alkyl-4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyc-  
litol, udføres sædvanligvis ved stuetemperatur i nærvæ-  
relse af atmosfærisk luft, men den kan med fordel udfø-  
res under en indifferent atmosfære, f.eks. argon eller  
20 nitrogen. Reaktionen fuldføres med fordel i løbet af  
kort tid, sædvanligvis mindre end 30 minutter, bestemt  
ved tyndtlagschromatografi.

Hydrid-donor-reduktionsmidler, der kan anvendes  
ved denne fremgangsmåde, indbefatter dialkylaminoboraner  
25 (f.eks. dimethylaminoboran, diethylaminoboran og for-  
trinsvis morpholinoboran), tetraalkylammoniumcyanobor-  
hydrider (f.eks. tetrabutylammoniumcyanoborhydrid), al-  
kalimetalborhydrider (f.eks. natriumborhydrid) og for-  
trinsvis alkalimetalcyanoborhydrider (f.eks. lithiumcy-  
30 anoborhydrid og natriumcyanoborhydrid).

Fremgangsmåden udføres hensigtsmæssigt i et in-  
different opløsningsmiddel. Ved "indifferent opløsnings-  
middel" menes et vilkårligt organisk eller uorganisk op-  
løsningsmiddel, hvori 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diami-  
35 nocyclitol-udgangsmaterialerne og reagenserne er opløse-  
lige, og som ikke vil gribe ind i processen under reak-

tionsbetingelserne for denne, således at der forekommer et minimum af konkurrerende sidereaktioner. Selvom vandfri aprotiske opløsningsmidler undertiden kan anvendes med fordel ved fremgangsmåden (såsom tetrahydrofuran, 5 når der anvendes morpholinoboran som hydriddonor-reduktionsmiddel), udføres fremgangsmåden sædvanligvis i protiske opløsningsmidler, f.eks. i en lavere alkanol eller, fortrinsvis, i vand eller i en vandig lavere alkanol (f.eks. vandig methanol, vandig ethanol), men der kan 10 også anvendes andre med vand blandbare co-opløsningsmiddele-systemer, såsom vandig dimethylformamid, vandig hexamethylphosphoramid, vandig tetrahydrofuran og vandig ethylenglycoldimethylether.

Fremgangsmåden udføres hensigtsmæssigt ved et pH 15 i området 1-11, fortrinsvis 2-5, og forløber bedst i området 2,5 til 3,5. Det sure medium, som foretrækkes, kan opnås ved tilsætning af en organisk eller uorganisk syre til 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitolen. Derved dannes syreadditionssalte af forbindelserne. Der 20 kan anvendes en vilkårlig organisk syre, såsom eddikesyre, trifluoreddikesyre eller p-toluensulfonsyre, eller uorganisk syre, såsom saltsyre, svovlsyre, phosphorsyre eller salpetersyre. Det er mest hensigtsmæssigt at anvende svovlsyre. Ifølge en foretrukken udførelsesform 25 for fremgangsmåden er det også hensigtsmæssigt at fremstille syreadditionssalt-udgangsforbindelsen in situ ved tilsætning af den ønskede syre (f.eks. svovlsyre) til en opløsning eller suspension af 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitolen (f.eks. sisomicin) i et protisk 30 opløsningsmiddel (f.eks. vand), indtil opløsningens pH er indstillet på det ønskede pH.

Typiske aldehyder med formlen X'CHO, hvori X' har den tidligere angivne betydning, som kan anvendes ved fremgangsmåden, indbefatter ligekædede eller forgrenede 35 alkylaldehyder, såsom formaldehyd, acetaldehyd, n-propanal, n-butanal, 2-methylpropanal, n-pentanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, 2,2-dimethylpropanal, n-hexanal, 2-ethylbutanal, n-heptanal og n-octanal, alkenylal-

dehyder, såsom propenal, 2-methylpropenal, 2-butenal, 2-methyl-2-butenal og 2-ethyl-2-hexenal, benzaldehyd og phenylacetaldehyd, hydroxysubstituerede, ligekædede eller forgrenede alkylaldehyder, såsom 5-hydroxypentanal, 2-hydroxy-3-methylbutanal, 2-hydroxy-2-methylpropanal, 4-hydroxybutanal, 2-hydroxypropanal og 8-hydroxyoctanal, aminosubstituerede ligekædede eller forgrenede alkylaldehyder, såsom 5-aminopentanal, 2-aminopropanal, 3-aminopropanal, 4-aminobutanal, 2-amino-3-methylbutanal og 8-aminooctanal, og mono-N-alkylderivater deraf, og amino- og hydroxydisubstituerede ligekædede eller forgrenede alkylaldehyder, såsom 2-hydroxy-5-aminopentanal, 3-hydroxy-3-methyl-4-aminobutanal, 2-hydroxy-4-aminobutanal, 2-hydroxy-3-aminopropanal, 2-hydroxy-2-methyl-3-aminopropanal og 2-amino-3-hydroxyoctanal, og mono-N-alkyl-derivater deraf.

Hvis aldehydet har et chiralt center, kan man ved denne fremgangsmåde anvende de enkelte enantiomere separat eller sammen som et racemat, og der vil blive vundet tilsvarende diastereoisomere eller en blanding deraf.

De aldehydreagenser, der kan anvendes ved fremgangsmåden, er enten kendte forbindelser, eller de kan let fremstilles ud fra kendte forbindelser under anvendelse af på området velkendte fremgangsmåder. Således kan f.eks. alkylaldehyder substitueret med både hydroxy- og aminogrupper (f.eks. 2-hydroxy-5-aminopentanal) fremstilles ud fra et aminoaldehydacetal (f.eks. 4-aminobutanaldiethylacetal) ved beskyttelse af aminogruppen deri som en acetamido- eller phthalimidogruppe under anvendelse af kendte metoder efterfulgt af fjernelse af acetalfunktionen ved sur hydrolyse, hvorved der vindes et N-beskyttet aminoaldehyd (f.eks. ved overføring af 4-aminobutanaldiethylacetal i det tilsvarende N-phthalimido-derivat, som ved sur hydrolyse giver 4-phthalimidobutanal). Behandling af det N-beskyttede aminoaldehyd med hydrogencyanid giver den tilsvarende N-beskyttede aminoalkylhydroxynitril (f.eks. 2-hydroxy-5-phthalimido-

valeronitril), som ved katalytisk reduktion (f.eks. med hydrogen i nærværelse af palladium) eller ved hydridreduktion (f.eks. med diisobutyl-aluminiumhydrid) giver et N-beskyttet aminohydroxyaldehyd (f.eks. 2-hydroxy-5-phthalimidopentanal), som er et aldehydreagens, der anvendes ved denne fremgangsmåde.

Ved udøvelse af fremgangsmåden på den måde, hvor en 1-N-usubstitueret 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol behandles med en hydriddonor og et aldehyd til opnåelse af det tilsvarende 1-N-substituerede derivat af en 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol, er det for at begrænse konkurrerende sidereaktioner til et minimum, når et aminoaldehyd anvendes som reagens, foretrukket at beskytte aminogruppen i aldehydet, f.eks. med en acylblokeringsgruppe, såsom acetamido eller phthalimido, før udøvelse af fremgangsmåden, og derpå fjerne den N-beskyttende gruppe i den derved dannede forbindelse. Det kan også være fordelagtigt at beskytte hydroxygruppen i hydroxyholdige aldehyder ved udøvelse af fremgangsmåden. Dette er imidlertid almindeligvis ikke nødvendigt.

Det er også muligt at anvende acetalen eller hemiacetalen af aldehydreagenset i surt medium, hvilket bevirker dannelse in situ af det fornødne aldehyd.

En hensigtsmæssig måde til udøvelse af fremgangsmåden omfatter fremstilling af en opløsning af en antibakterielt virksom 1-N-usubstitueret 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol (f.eks. sisomicin eller verdamycin) i et protisk opløsningsmiddel (fortrinsvis vand) og indstilling af opløsningens pH til fra ca. pH 2 til ca. pH 5 med en syre (sædvanligvis fortyndet svovlsyre), hvorved der dannes det fornødne syreadditionssalt af udgangsforbindelsen. Når opløsningens pH er ca. 5, indeholder det derved fremstillede syreadditionssalt sædvanligvis ét ækvivalent syre for hver aminofunktion af 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitolen (f.eks. er der pr. mol sisomicin 2,5 mol svovlsyre til stede). Efter fremstillingen af syreadditionssaltopløsningen tilsættes

der mindst ét molækvivalent og fortrinsvis et stort molært overskud af det ønskede aldehyd (f.eks. acetaldehyd, propanal eller butanal) efterfulgt i løbet af kort tid (sædvanligvis ca. 5 minutter) af tilsætningen af ca. 1 molækvivalent (baseret på udgangs-4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitolen) af et hydriddonor-reduktionsmiddel, fortrinsvis et alkalimetalcyanoborhydrid, sædvanligvis natriumcyanoborhydrid. Reaktionen er ofte afsluttet på mindre end 30 minutter, som påvist ved tyndtlangschromatografi, og der opnås det tilsvarende 1-N-substituerede derivat af en 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol (f.eks. 1-N-ethylsisomicin eller 1-N-ethylverdamicin). Isolering og rensning af det derved fremstillede derivat udføres under anvendelse af kendt teknik, såsom fældning, ekstraktion og fortrinsvis chromatografisk teknik.

Nævnte fremgangsmåde tilvejebringer således en hensigtsmæssig én-beholderproces, hvorved et aminoglycosid omsættes in situ med et aldehyd (fortrinsvis i overskudsmængder) og med et hydriddonor-reduktionsmiddel til fremstilling af, som hovedproduktet, et mono-N-substitueret derivat (f.eks. 1-N-ethylsisomicin), ved hvilken fremgangsmåde 1-aminogruppen bundet til et sekundært carbonatom sædvanligvis alkyleres fortrinsvist sammenlignet med andre aminogrupper knyttet til primære og andre sekundære carbonatomer i 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol-udgangsmaterialet.

Det er også muligt at anvende delvist N-beskyttede 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler som udgangsmaterialer ved nævnte fremgangsmåde. I almindelighed kan de 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler, der har en gruppe  $-CH_2NH_2$  som 6'-delen, være N-beskyttet ved denne stilling, da denne gruppe ved blokeringsproceduren er den mest reaktive. Sisomicin kan være beskyttet i stilling 6' eller i stillingerne 2' og 6' eller i stillingerne 2', 3 og 6'. Andre aminobeskyttende grupper kan være brodannende grupper i stillingerne 3", 4", såsom

carbonyl, i de 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler, der har 3"-amino- og 4"-hydroxygruppen i indbyrdes cis-stilling. Man kan således f.eks. som udgangsforbindelse anvende en 1-N-usubstitueret 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol, hvori aminogruppen ved 6'-carbonatomet er N-beskyttet (f.eks. 6'-N-t-butoxycarbonylsisomicin) eller en 1-N-usubstitueret 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol, hvori aminogrupperne ved C-2' og C-3 er N-beskyttede (f.eks. 2', 3-di-N-trifluoracetylgentamicin C<sub>1</sub>), og der vil dannes det tilsvarende delvist N-beskyttede 1-N-substituerede derivat (f.eks. 1-N-ethyl-6'-N-t-butoxycarbonylsisomicin og 1-N-ethyl-2', 3-di-N-trifluoracetylgentamicin C<sub>1</sub>), som efter fjernelse af de N-beskyttende grupper, på i og for sig kendt måde, giver 1-N-CH<sub>2</sub>X-forbindelserne, f.eks. 1-N-ethylsisomicin og 1-N-ethylgentamicin C<sub>1</sub>.

De nødvendige udgangsforbindelser, hvori aminogrupper er beskyttede, kan fremstilles ved fremgangsmåder svarende til eller identiske med de i det følgende under Fremstilling 3 anførte. Anvendt her betegner udtrykkene "blokeringsgruppe" eller "beskyttende gruppe" grupper, som gør de blokerede eller beskyttede aminogrupper indifferente over for efterfølgende kemisk manipulation, men som let kan fjernes efter udførelse af den kemiske manipulation. Eksempler på sådanne aminobeskyttende grupper er benzyl, 4-nitrobenzyl, triphenylmethyl, 2,4-dinitrophenyl, acylgrupper, såsom acetyl, propionyl og benzoyl, alkoxy-carbonylgrupper, såsom methoxycarbonyl, ethoxycarbonyl, 2,2,2-trichlorethoxycarbonyl, t-butoxycarbonyl og 2-iodethoxycarbonyl, og arylalkoxy-carbonylgrupper, såsom carbobenzyloxy- og 4-methoxybenzyloxy-carbonylgrupper.

Ved blokeringsprocessen benyttes den beskyttende gruppe sædvanligvis i form af et surt imidazolderivat og surt azid eller som aktive estere, såsom ethylthiol-trifluoracetat, N-benzyloxycarbonyloxysuccinimid eller p-nitrophenyltrichlorethylcarbonat. Blokeringsgrupper kan således beskrives som værende afledt af en forbin-



delse BgLg, hvor Bg bliver blokeringsgruppen, såsom syredelen af en aktiv ester, og Lg er en bortgående gruppe, såsom imidazol.

Alternativt kan den i det foregående beskrevne proces udføres på en måde, der tillader dannelse af et 1-N- (Schiffsk base)-derivat, hvorefter den således opnåede Schiffske base reduceres. Fremgangsmåden b) til fremstilling af de omhandlede 1-N-substituerede derivater af de ovennævnte 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler går ud på, at N,C-dobbeltbindingen i et 1-N=CH<sub>2</sub>X'-substitueret derivat af en tilsvarende 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol, hvor alle grupper NH<sub>2</sub> er beskyttet, og grupper NHCH<sub>3</sub> kan være beskyttet, hvorhos X' er en gruppe som defineret for X ovenfor, hvori enhver tilstedeværende amino- eller hydroxygruppe kan være beskyttet, reduceres, hvorpå alle i molekylet tilstedeværende beskyttelsesgrupper fjernes på i og for sig kendt måde, hvorefter det ønskede derivat isoleres som sådant eller i form af et farmaceutisk acceptabelt syreadditionssalt.

De 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler, hvori 6-aminoglycosylgruppen er garosaminyl, har sædvanligvis en 3"-N-4"-O-beskyttende gruppe, som er identisk med 1-N-substituenten i udgangsmaterialet, fordi oxazolidinringen dannes samtidigt med 1-N-(Schiffsk base)-gruppen. Således omdannes f.eks. 2',3-di-N-trifluoracetyl-gentamicin C<sub>1</sub> ved omsætning med et aldehyd (f.eks. benzaldehyd, phenylacetaldehyd eller acetaldehyd) til det tilsvarende 3", 4"-oxazolidin-1-yliden-(Schiffsk base)-udgangsmateriale for denne fremgangsmåde (f.eks. 1-N,3", 4"-N,O-dibenzyliden-2',3-di-N-trifluoracetylgentamicin C<sub>1</sub>, 1-N,3",4"-N,O-diphenethyliden-2',3-di-N-trifluoracetyl-gentamicin C<sub>1</sub>, og 1-N,3",4"-N,O-diethyliden-2',3-di-N-trifluoracetylgentamicin C<sub>1</sub>), som ved reduktion med natriumborhydrid og methanolisk natriummethoxid giver den tilsvarende 1-N-CH<sub>2</sub>X-3",4"-oxazolidin (f.eks. 1-N-benzyl-3", 4"-N,O-benzylidengentamicin C<sub>1</sub>, 1-N-phenethyl-3",4"-N,O-phenethyliden-gentamicin C<sub>1</sub> og 1-N-ethyl-3",4"-N,O-ethylidengentamicin C<sub>1</sub>), som ved behandling med syre giver et

af de omhandlede 1-N-CH<sub>2</sub>X-derivater (f.eks. 1-N-benzylgentamicin C<sub>1</sub>, 1-N-phenethylgentamicin C<sub>1</sub> og 1-N-ethylgentamicin C<sub>1</sub>).

De hidtil ukendte 1-N-substituerede derivater af  
 5 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitolerne som defineret ved formlerne I, III, IV og V, kan også fremstilles ved en fremgangsmåde (den foreliggende fremgangsmåde c), som er ejendommelig ved, at et 1-N-substitueret derivat af en tilsvarende 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diamino-  
 10 cyclitol, hvor én eller flere aminogrupper kan være be-

skyttet, og 1-N-substituenten er  $\overset{\text{O}}{\parallel}\text{-C-X}$ ", hvor X" betegner hydrogen, alkyl, alkenyl, hydroxyalkyl, aminoalkyl, N-alkylaminoalkyl, aminohydroxyalkyl, N-alkylamino-hydroxy-  
 15 alkyl, phenyl, benzyl eller hydrocarbyloxy, hvilke alifatiske grupper har op til 7 carbonatomer og, hvis de er substitueret med både amino og hydroxy, bærer substituenterne på forskellige carbonatomer, og hvori enhver tilstedeværende amino- eller hydroxygruppe kan være beskyt-  
 20 tet, behandles med et amidreducerende hydridreagens, hvorpå alle i molekylet tilstedeværende beskyttelsesgrupper fjernes på i og for sig kendt måde, hvorefter det ønskede derivat isoleres som sådant eller i form af et farmaceutisk acceptabelt syreadditionssalt.

25 Fremgangsmåden udføres sædvanligvis i et ikke-reaktivt organisk opløsningsmiddel, hvorved der tænkes på et opløsningsmiddel, hvori udgangsforbindelserne og det amidreducerende reagens er opløselige, og som ikke reagerer med nævnte reagens, således at der forekommer  
 30 et minimum af konkurrerende sidereaktioner. Ikke-reaktive organiske opløsningsmidler, som er meget velegnede ved reduktionsprocessen, er for eksempel ethere, såsom dioxan, tetrahydrofuran og diethylenglycoldimethylether.

Foretrukne amidreducerende hydridreagenser er  
 35 aluminiumhydrid og borhydrid, herunder lithialuminiumhydrid, lithiumtrimethoxyaluminiumhydrid, aluminiumhydrid, diboran, diisoamylboran og 9-borabicyclo-[3,3,1]nonan.

Det foretrakkes i almindelighed at anvende di-  
boran som det amidreducerende middel, undtagen når ud-  
gangsforbindelsen har en dobbeltbinding, som f.eks. i 1-  
N-acyl-sisomicin, 1-N-acyl-verdamicin, 1-N-acyl-Antibio-  
5. tikum 66-40B, 1-N-acyl-Antibiotikum 66-40D og 1-N-acyl-  
Antibiotikum G-52, hvilke forbindelser hensigtsmæssigt  
reduceres ved hjælp af lithiualuminiumhydrid.

Når "X" betegner hydrocarbyloxy, såsom t-butoxy,  
og amidet underkastes reduktion, dannes den tilsvarende  
10 1-N-methylforbindelse.

Ved denne fremgangsmåde, hvor en 1-N-C<sup>0</sup>-X"-4,6-di-  
(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol reduceres til det  
tilsvarende 1-N-CH<sub>2</sub>X-derivat, kan der, hvis acylsidekæ-  
den i 1-N-acylmellemproduktet har et chiralt center, an-  
15 vendes de enkelte stereoisomere hver for sig eller en  
blanding deraf, og der vil vindes de tilsvarende dias-  
tereoisomere eller en blanding deraf.

En fremgangsmåde (den foreliggende fremgangsmåde  
20 end) til fremstilling af de ovennævnte 1-N-substituerede  
derivater af 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclito-  
ler, hvori substituenten er ligekædet alkyl med op til  
5 C-atomer, består i, at en tilsvarende 4,6-di-(aminogly-  
cosyl)-1,3-diaminocyclitol, der har amino-beskyttelses-  
grupper ved enhver anden aminogruppe end den i 1-stillin-  
25 gen, og hvori 1-aminogruppen kan være aktiveret på i og  
for sig kendt måde, omsættes med et alkyleringsmiddel in-  
deholdende den ligekædede alkylgruppe med op til 5 C-ato-  
mer og en bortgående gruppe, hvorpå i molekylet tilstede-  
værende beskyttelsesgrupper og, om påkrævet, tilstedevæ-  
30 rende aktiverende gruppe eller grupper fjernes på i og  
for sig kendt måde, hvorefter derivatet isoleres som så-  
dant eller i form af et farmaceutisk acceptabelt syread-  
ditionssalt.

Eksempler på alkyleringsmidler, der med fordel  
35 kan anvendes ved denne fremgangsmåde, er alkyliodid, al-  
kylbromid, dialkylsulfat, alkylfluorsulfonat og alkyl-  
p-toluensulfonat, hvori alkylgruppen er den fornødne li-  
gekædede alkylgruppe med op til 5 carbonatomer. Andre

alkyleringsmidler, hvori alkylgruppen fortrinsvis har 1 eller 2 carbonatomer, er trialkylaniliniumhydroxid, trialkyloxoniumfluorborat, trialkylsulfoniumfluorborat eller trialkylsulfoxoniumfluorborat. Alle disse alkyleringsmidler indeholder en gruppe, der let fjernes, såsom  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{OSO}_2\text{F}^-$ , dialkylanilin eller dialkylether.

Aminogruppen i stilling 1 i 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitolen kan være fri eller aktiveret på i og for sig kendt måde. Et eksempel på en aktiverende gruppe er trifluormethylsulfonyl. Disse aktiverende grupper kan indføres i molekylet ved omsætning af en 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol, som har aminobeskyttende grupper ved enhver anden stilling end 1-stillingen, f.eks. 3",4"-N,O-carbonyl-2',3,6'-tri-N-t-butoxycarbonylsisomicin, med en forbindelse, der giver den aktiverende gruppe, såsom trifluormethylsulfonylchlorid.

1-Aminogruppen kan også alkyleres via det tilsvarende di-(2-cyanoethyl)-derivat, som er afledt ved at behandle 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol, som har aminobeskyttende grupper ved enhver anden aminogruppe end den i 1-stillingen, med acrylonitril. Det således fremstillede 1-N-di-(2-cyanoethyl)-derivat alkyleres derpå med et af de i det foregående anførte alkyleringsmidler efterfulgt af fjernelse af cyanoethylgrupperne.

Nævnte fremgangsmåde ifølge opfindelsen udøves under lignende betingelser som de, der anvendes i de velkendte direktealkyleringsmetoder for aminer.

Endnu en fremgangsmåde (den foreliggende fremgangsmåde e) til fremstilling af de ovennævnte 1-N-substituerede derivater af 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler, hvori substituenten er methyl, består i, at en tilsvarende 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol, der har amino-beskyttelsesgrupper ved enhver anden aminogruppe end den i 1-stillingen, omsættes med formaldehyd og et cyclisk imid, fortrinsvis succinimid, og den herved vundne forbindelse behandles med et hydrid-donor-reduktionsmiddel, fortrinsvis natriumborhydrid, og

alle i molekylet tilstedeværende beskyttelsesgrupper fjernes på i og for sig kendt måde, hvorefter derivatet isoleres som sådant eller i form af et farmaceutisk acceptabelt syreadditionssalt.

5           Endnu en fremgangsmåde (den foreliggende fremgangsmåde f) til fremstilling af de ovennævnte l-N-substituerede derivater af 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol, hvori substituenten er methyl, består i, at en tilsvarende 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol,  
10 der har amino-beskyttelsesgrupper ved enhver anden aminogruppe end den i l-stillingen, omsættes med formaldehyd i nærværelse af myresyre, og alle i molekylet tilstedeværende beskyttelsesgrupper fjernes på i og for sig kendt måde, hvorefter derivatet isoleres som sådant eller i  
15 form af et farmaceutisk acceptabelt syreadditionssalt.

Dannelsen af l-N-methylsubstituenten med formaldehyd og myresyre er velkendt som Eschweiler-Clarke-reaktionen.

Af de ovennævnte fremgangsmåder er fremgangsmåden a), der er anvendelig til fremstilling af samtlige omhandlede forbindelser, særligt velegnet, da den benytter  
20 let tilgængelige udgangsmaterialer, forløber let og giver gode udbytter. Det foretrækkes derfor ifølge opfindelsen, at der anvendes fremgangsmåde a).

Endvidere foretrækkes det ifølge opfindelsen, at  
25 der fremstilles det særligt aktive l-N-ethylisomicin, der isoleres som sådant eller som et farmaceutisk acceptabelt syreadditionssalt.

I almindelighed afhænger den indgivne dosis af de omhandlede forbindelser af alderen og vægten af de dyrearter, der behandles, indgiftsmåden og af typen og styrken af den bakterieinfektion, der skal undgås eller reduceres. I almindelighed vil dosis af de omhandlede derivater af 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitolerne  
30 svare til dosiskravene for de tilsvarende l-N-usubstituerede 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol.  
35

De omhandlede forbindelser kan indgives oralt. De kan også anvendes lokalt i form af salver, såvel hydrofile som hydrofobe, i form af lotioner, som kan være

vandige, ikke-vandige eller af emulsionstypen eller i form af cremer. Farmaceutiske bærere, der er nyttige ved fremstillingen af sådanne kompositioner, vil indbefatte f.eks. sådanne stoffer som vand, olier, fedtstoffer, polyestere og polyoler.

Til oral indgift kan de omhandlede forbindelser foreligge i form af f.eks. tabletter, kapsler eller eliksirer, eller de kan blandes med dyrefoder. Det er i disse doseringsformer, at de antibakterielle stoffer er mest effektivt til behandling af bakterieinfektioner i mave-tarmkanalen, hvilke infektioner forårsager diarré.

I almindelighed indeholder præparaterne til lokal anvendelse fra ca. 0,1 til ca. 3,0 g af de omhandlede forbindelser pr. 100 g salve, creme eller lotion. Præparaterne til lokal anvendelse påføres sædvanligvis forsigtigt på læsioner ca. 2 til ca. 5 gange om dagen.

De omhandlede antibakterielle stoffer kan anvendes i væskeform såsom opløsninger eller suspensioner, til brug i ører og øjne og kan også administreres parenteralt ved intramuskulær injektion. Den injicerbare opløsning eller suspension vil sædvanligvis blive indgivet med fra ca. 1 mg til ca. 15 mg antibakterielt stof pr. kg. legemsvægt pr. dag opdelt i ca. 2 til ca. 4 doser. Den præcise dosis afhænger af stadiet og styrken af infektionen, den inficerede organismes følsomhed over for det antibakterielle stof og de individuelle egenskaber hos de dyrearter, der behandles.

De efterfølgende fremstillinger eksemplificerer fremstilling af mange af de fornødne udgangsmaterialer, og de efterfølgende eksempler beskriver fremgangsmåden ifølge opfindelsen nærmere.

#### Fremstilling 1

#### Gentamicin C<sub>2a</sub>

Fraskillelse af gentamicin C<sub>2a</sub> fra samtidigt fremstillede antibiotika.

96 g Gentamicinbase (fremstillet ud fra det sulfatsalt, der opnås ved fremgangsmåden ifølge eksempel 4 i U.S. patentskrift nr. 3.091.572) opløses i 400 ml af den øvre fase, som dannes, når methanol, chloroform og 17%'s ammoniumhydroxid blandes i volumenforholdet 1:2:1. En tiendedel af opløsningen sættes til hver af de første ti rør i en 500x80 ml rør-modstrømsektraktor. Alle rørene, også de første ti, fyldes til deres kapacitet med den nedre fase af den ovenfor beskrevne opløsningsmiddel-

10 blanding. Opløsningsmiddelreservoiret sættes til at give 40 ml af den øvre fase til rør nr. 1 for hver overførsel. Apparatet indstilles til 500 overførsler. Når overførslerne er gennemført, afprøves hver ottende rør chromatografisk (dobbelbestemmelse) på Schleicher og Schuell

15 papir nr. 589 under anvendelse af den nedre fase af den i det foregående beskrevne opløsningsmiddelblanding. Chromatogrammerne får lov at udvikles i ca. 16 timer, hvorpå papirerne tørres. Det ene stykke papir anbringes på en agarplade podet med Staphylococcus aureus (A.T. C.C. 6538P), det andet papir sprøjtes med sædvanlig ninhydrinopløsning og opvarmes til fremkaldelse. Agarpladen inkuberes natten over ved 37°C, og man kombinerer opløsningen fra rør indeholdende det materiale, der vandrer ligesom gentamicin C<sub>1</sub>, dvs. rør nr. 290-360.

25 Rør nr. 290-360 erstattes med friske rør indeholdende 40 ml af den øvre fase og 40 ml af den nedre fase. Apparatet indstilles på yderligere 2800 overførsler, og den i det foregående beskrevne chromatografiske fremgangsmåde gentages. Indholdet af rør nr. 1-16 kombineres og koncentrerer i vacuum til opnåelse af 1,3 g gentamicin C<sub>2a</sub> med følgende egenskaber:

30

(a) En molekylvægt på 463 som bestemt ved massepektrometri, hvilket er overensstemmende med en empirisk formel C<sub>20</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>,

35 (b) en specifik optisk drejning målt ved D-linien for natrium ved 26°C på +114° ± 5° i vand ved en koncentration på 0,3%, og

(c) et protonmagnetisk resonansspektrum (pmr)

som følger: pmr (ppm) ( $D_2O$ ):  $\delta 0,99$  (3H, d,  $J = 6,5$  Hz,  $CH-CH_3$ ),  $CH-CH_3$ ),  $1,17$  (3H, s,  $C-CH_3$ ),  $2,47$  (3H, s,  $N-CH_3$ ),  $2,51$  (1H, d,  $J = 10,5$  Hz, H-3"),  $3,75$  (1H, q,  $J = 10,5, 4$  Hz, H-2"),  $4,00$  (1H, d,  $J = 12$  Hz, H-5" ækv.),  $5,04$  (1H, d,  $J = 4$  Hz, H-1"),  $5,13$  (1H, d,  $J = 3,5$  Hz, H-1').

Bestrålning af den sekundære methylgruppe ved  $\delta 0,99$  ppm viser H-6' som en dublet ( $J = 6,5$  Hz) ved  $\delta 2,81$  ppm.

10

## Fremstilling 2

Gentamicin  $C_{2b}$ 

Fraskillelse af gentamicin  $C_{2b}$  fra samtidigt fremstillede antibiotika.

15 Hovedkomponenterne af gentamicin C ( $C_1$ ,  $C_2$  og  $C_{1a}$ ) fraskilles, som beskrevet i U.S. patentskrift nr. 3.651.042, eksempel 2, og de fraktioner, der hovedsageligt indeholder overlapninger af gentamiciner  $C_1$  og  $C_2$  på fri baseform (500 g gentamicin C-blanding giver 53,4 g  
20 overlapninger) samles. 1,5 g af denne gentamicin  $C_1$ - og  $C_2$ -blanding tilføres til en søjle indeholdende 50 g silicagel frembragt i et opløsningsmiddelsystem omfattende chloroform: methanol: 15%'s ammoniumhydroxid (1:2:1). Søjlen elueres med samme opløsningsmiddelsystem, og de  
25 eluerede fraktioner undersøges ved tyndtlagschromatografi på silicagelplader under anvendelse af opløsningsmiddelsystemet chloroform: methanol: 22%'s ammoniumhydroxid (1:2:1) som fremkalder. De fraktioner, der indeholder en blanding af gentamiciner  $C_1$  og  $C_2$  sammen med gentamicin  
30  $C_{2b}$  (fraktioner 39-57 [410 mg]), kombineres. Fraktionerne 39-57 chromatograferes igen over silicagel under anvendelse af opløsningsmiddelsystemet chloroform: methanol: 7%'s ammoniumhydroxid (1:2:1), og fraktioner (98-130) indeholdende rent gentamicin  $C_{2b}$ , som bestemt ved  
35 tyndtlagschromatografi, kombineres (udbytte 45 mg) og har følgende konstanter  $[\alpha]_D^{26} + 165,5^\circ$  ( $c = 0,3\%$ ,  $H_2O$ ), massespektrum  $m/e$  463 (M+1)<sup>+</sup>, 446, 445, 433, 350, 332, 322, 304, 333, 305, 287, 191, 173, 163, 145, 160, 142,



118, 143, pmr (ppm) ( $D_2O$ ):  $\delta$ 1,25 (3H, s, C- $\underline{C}H_3$ ), 2,40 (3H, s, N- $\underline{C}H_3$ ), 2,55 (3H, s, N- $\underline{C}H_3$ ), 5,12 (1H, d,  $J=4$  Hz, H-1"), 5,22 (1H, d,  $J = 3$  Hz, H-1').

Rent gentamicin  $C_{2b}$  kan skelnes fra gentamicin  $C_1$  og  $C_2$  ved dets bevægelighed ved tyndtlagschromatografi under anvendelse af silicagelplader og et opløsningsmiddelssystem af chloroform: methanol: 22%'s ammoniumhydroxid (1:2:1) som fremkalder. De omtrentlige  $R_F$ -værdier i dette system er som følger:

10	gentamicin $C_1$	0,47
	gentamicin $C_2$	0,47
	gentamicin $C_{2b}$	0,35

### Fremstilling 3

15 Selektivt blokerede 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler.

A. 2',3,6'-Tri-N-t-butoxycarbonyl-3",4"-N,O-carbonyl-sisomicin

1. Penta-N-carbobenzoxysisomicin.

20 25 g Sisomicin og 13 g natriumcarbonat opløses i 625 ml destilleret vand. Der tilsættes 100 ml carbobenzoxychlorid til den omrørte opløsning ved  $25^{\circ}C$ , og blandingen omrøres i 16 timer. Det faste stof frafiltreres, vaskes omhyggeligt med vand, tørres i vacuum og vaskes  
25 derpå med hexan til opnåelse af penta-N-carbobenzoxysisomicin (62 g) som et farveløst amorft fast stof. Smp.:  $165-173^{\circ}C$ ,  $[\alpha]_D^{26}$ :  $+96,2^{\circ}$  ( $CH_3OH$ ). IR:  $\nu_{max}$  ( $CHCl_3$ ) 3400, 1720, 1515, 1215, 1050,  $695\text{ cm}^{-1}$ .

30 NMR:  $\delta(CDCl_3)$  1,03 (3H, bred singlet, 4"-C- $\underline{C}H_3$ ), 3,02 (3H, bred singlet, 3"-N- $\underline{C}H_3$ ), 5,02 (10H, bred singlet,  $CH_2C_6H_5$ ), 3,28, 3,30 ppm (25H, brede singletter,  $-CH_2C_6H_5$ ).

2. Tetra-N-carbobenzoxy-3",4"-N,O-carbonyl-sisomicin.

35 5 g Penta-N-carbobenzoxy-sisomicin opløses i 50 ml dimethylformamid, 250 mg natriumhydrid sættes til den omrørte opløsning, og reaktionsblandingen omrøres under argon ved stuetemperatur i 2 timer. Der filtreres, og til

filtratet sættes iseddikesyre (2 ml), og derpå koncentreret i vacuum. Resten ekstraheres med chloroform (200 ml), der i forvejen har passeret gennem basisk aluminiumoxid, ekstrakten vaskes med vand og tørres over natriumsulfat. Opløsningen inddampes, hvilket giver tetra-N-carbobenzoxy-3",4"-N,0-carbonyl-sisomicin som et amorft pulver (3,5 g).

Smp.: 210-213°C,  $[\alpha]_D^{26}$  : + 68,8 (c = 0,22)

IR:  $\nu_{\max}$  (nujol) 3550, 1840, 1760, 1580  $\text{cm}^{-1}$

10 NMR:  $\delta(\text{CDCl}_3)$  1,34 (3H, singlet, 4"-CH<sub>3</sub>), 2,68 (3H, singlet, 3"-N-Me), 5,04 (8H, bred singlet, -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

3. 3",4"-N,0-carbonyl-sisomicin.

Til en opløsning af 1,3,2',6'-tetra-N-benzyloxy-carbonyl-3",4"-N,0-carbonyl-sisomicin (10,1 g) i tetrahydrofuran (200 ml) sættes 1 liter væskeformig ammoniak (redestilleret fra natrium). Til den omrørte opløsning sættes 6 g natrium i små stykker. Efter 3 timers omrøring destrueres overskuddet af natrium ved tilsætning af ammoniumchlorid. Opløsningsmidlerne får lov at afdampe under en strøm af nitrogen. Resten opløses i vand og passeret gennem et medium af "Amberlite"® IRC-50-harpiks (H<sup>+</sup>-form), og harpiksen vaskes godt med vand, hvorpå produktet elueres med 2N ammoniumhydroxidopløsning.

Ammoniumeluatet inddampes i vacuum, hvilket giver titel-25 forbindelsen (3",4"-N,0-carbonyl-sisomicin). Udbytte ca. 4 g. IR:  $\nu_{\max}$  (nujol) 1745  $\text{cm}^{-1}$ . Produktet blev anvendt i det efterfølgende trin uden yderligere rensning. En meget ren prøve kan imidlertid opnås ved chromatografering af produktet over silicagel under anvendelse af den nedre fase af et chloroform:methanol:koncentreret ammoniumhydroxid-opløsningsmiddelsystem (1:1:1) som elueringsmiddel.

4. 2',3,6'-Tri-N-t-butoxycarbonyl-3",4"-N,0-carbonyl-sisomicin.

35 3",4"-N,0-carbonyl-sisomicin (1,4 g, 3 mmol) opløses i 10 ml 50%'s vandig methanol indeholdende triethylamin (3,5 mmol). t-Butoxycarbonylazid (3,5 mmol)

tilsættes dråbevis under omrøring. Blandingen omrøres i 2 dage ved stuetemperatur. Der tilsættes 5 ml "Amberlite" <sup>®</sup> IRA-401S (OH<sup>-</sup>)-ionbytterharpiks sammen med 5 ml methanol, og der omrøres i ½ time. Harpiksen fjernes ved 5 filtrering, og der vaskes med methanol. Filtratet koncentrerer, og resten chromatograferes på en søjle af silicagel (60-100 mesh, 20,0 g) under anvendelse af chloroform: methanol: ammoniumhydroxid (30:10: 0,4) som opløsningsmiddelsystemet. De homogene fraktioner indehol- 10 dende titelforbindelsen samles, og opløsningsmidlet fjernes ved inddampning i vacuum. Resten opløses i methanol, og der fældes med overskud af ether. Det faste produkt isoleres ved filtrering og tørres.

B. 2',3-Di-N-trifluoroacetyl-gentamicin C<sub>1</sub>.

15 1. 2'-N-trifluoroacetyl-gentamicin C<sub>1</sub>

1,7 g Gentamicin C<sub>1</sub> opløses i 20 ml methanol, 20 blandingen afkøles til 4°C, og der tilsættes 0,46 ml (0,563 g) ethylthioltrifluoroacetat under omrøring. Reak- tionen får lov at fortsætte i 2 timer, og opløsningen 25 koncentrerer til en rest i vacuum. Produktet chromato- graferes på 80 g silicagel under anvendelse af den nedre fase af en blanding af chloroform: methanol: vand: ammoniumhydroxid i volumenforholdet 10:5:4:1 som elu- eringsmiddel. De fraktioner, der indeholder hovedkompo- 25 nenten, kombineres og koncentrerer til opnåelse af 1,4 g af titelforbindelsen, smp.: 108-111°C,  $[\alpha]_D^{26}$  : + 128°C (c = 0,3%, H<sub>2</sub>O). Analyse for C<sub>23</sub>H<sub>42</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>F<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O:  
Beregnet: C = 46,69%, H = 7,50%, N = 11,84%, F = 9,63%.  
Fundet : C = 46,66%, H = 7,65%, N = 11,60%, F = 9,24%.

30 2. 2',3-Di-N-trifluoroacetyl-gentamicin C<sub>1</sub>.

0,66 g Af produktet fra trin 1 opløses i 10 ml 35 methanol, blandingen afkøles til 4°C, og der tilsættes 0,148 ml (0,182 g) ethylthioltrifluoroacetat opløst i 3 ml methanol. Reaktionsblandingen omrøres i ca. 16 ti- mer, og der koncentrerer til en rest i vacuum. Produktet chromatograferes på 30 g silicagel, som beskrevet under trin 1. Søjlen undersøges ved tyndtlagschromatografi, de

hensigtsmæssige fraktioner kombineres, og der koncentrerer til opnåelse af 0,32 g af titelforbindelsen, smp.: 121-129°C,  $[\alpha]_D^{26}$ : 121° (c = 0,3%, H<sub>2</sub>O). Analyse for C<sub>25</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>F<sub>6</sub>:

- 5 Beregnet: C = 44,84%, H = 6,17%, N = 10,46%.  
Fundet : C = 44,94%, H = 6,35%, N = 10,17%.

#### Eksempel 1

1-N-substitueret sisomicin.

##### 10 A. 1-N-ethylsisomicin.

Til en opløsning af 5 g sisomicin i 250 ml vand sættes 1N svovlsyre, indtil opløsningens pH er indstillet på ca. 5. Til den derved dannede opløsning af sisomicin-svovlsyreadditionssalt sættes 2 ml acetaldehyd, 15 der omrøres i 10 minutter, hvorpå der tilsættes 0,85 g natriumcyanoborhydrid. Omrøringen fortsættes ved stuetemperatur i 15 minutter, hvorpå opløsningen koncentrerer i vacuum til et volumen på ca. 100 ml, opløsningen behandles med en basisk ionbytterharpiks (f.eks. "Amberlite" <sup>®</sup> IRA 401S (OH<sup>-</sup>)), hvorpå der lyofiliseres til en rest omfattende 1-N-ethyl-sisomicin. 20

Der renses ved chromatografering på 200 g silica-gel, idet der elueres med den nedre fase af et chloroform: methanol: 7%'s vandig ammoniumhydroxid (2:1:1)-system. Ensartede eluater, som bestemt ved tyndtlagschromatografi, kombineres, og de kombinerede eluater af hovedkomponenten koncentrerer i vacuum til en rest omfattende 1-N-ethylsisomicin (udbytte 1,25 g). Der renses yderligere ved igen at chromatografere på 100 g silica-gel under eluering med et chloroform: methanol: 3,5%'s ammoniumhydroxid (1:2:1)-system. De kombinerede, ensartede eluater (som bestemt ved tyndtlagschromatografi) passerer gennem en søjle af basisk ionbytterharpiks, og eluatet lyofiliseres til opnåelse af 1-N-ethylsisomicin 30 (udbytte 0,54 g),  $[\alpha]_D^{26}$  + 164° (0,3%, H<sub>2</sub>O), pmr (ppm) (D<sub>2</sub>O): δ1,05 (3H, t, J = 7 Hz, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,19 (3H, s, -C-CH<sub>3</sub>), 2,5 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 4,85 (1H, m, =CH-), 4,95 35

(1H, d, J = 4Hz, H<sub>1</sub>" ), 5,33 (1H, d, J = 2,5 Hz, H<sub>1</sub>' ).

Massespektrum: (M + 1)<sup>+</sup> m/e 476

også m/e 127, 154, 160, 173, 191,  
201, 219, 256, 299, 317, 332, 345, 350, 360, 378, 390,  
5 400.

#### B. l-N-methylsisomicin.

Til en opløsning af 4,64 g sisomicin i 180 ml vand sættes 1N svovlsyre, indtil opløsningen har et pH på ca. 5. Der tilsættes 1,2 ml 37%'s vandig formaldehyd, 10 omrøres i 10 minutter, hvorpå der tilsættes 460 mg natriumcyanoborhydrid. Reaktionsopløsningen passerer gennem en søjle af en basisk ionbytterharpiks (f.eks. "Amberlite" <sup>®</sup> IRA 401S (OH<sup>-</sup> form)) og lyofiliseres. Den resulterende rest chromatograferes på silicagel i den nedre 15 fase af en chloroform: methanol: 7%'s vandig ammoniumhydroxid (2:1:1)-opløsningsmiddelblanding. Ensartede eluater indeholdende i det væsentlige l-N-methylsisomicin som bestemt ved tyndtlagschromatografi kombineres. Der inddampes i vacuum til en rest af l-N-methylsisomicin. 20 cin.

$[\alpha]_D^{26} + 153^{\circ}$  (0,3%, H<sub>2</sub>O).

Massespektrum: (M + 1)<sup>+</sup> m/e 462

også m/e 127, 140, 159, 160, 177,  
25 187, 205, 256, 285, 303, 318, 331, 336 (w), 346, 376, 386.

#### C. l-N-(n-propyl)-sisomicin.

På lignende måde som den i eksempel 1A beskrevne behandles svovlsyreadditionssaltet af sisomicin i vand 30 med propanal og natriumcyanoborhydrid. Det resulterende produkt isoleres og renses på en måde svarende til den beskrevne til opnåelse af l-N-(n-propyl)sisomicin.

$[\alpha]_D^{26} + 140^{\circ}$  (0,3%, H<sub>2</sub>O),

pmr (ppm) (D<sub>2</sub>O): δ0,83 (3H, t, J = 7 Hz,

35 -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,14 (3H, s, -C-CH<sub>3</sub>), 2,45 (3H, s, -N-CH<sub>3</sub>), 4,82 (1H, m, =CH-), 4,90 (1H, d, J = 4 Hz, H<sub>1</sub>" ), 5,78 (1H, d, J = 2 Hz, H<sub>1</sub>' ).

Massespektrum: (M + 1)<sup>+</sup> m/e 490

også 127, 160, 168, 187, 205,  
215, 233, 256, 313, 331, 346, 359, 364, 374, 404, 414.

D. 1-N-(n-butyl)sisomicin.

Til en opløsning af 3 g sisomicin i 200 ml vand  
5 sættes 1N svovlsyre, indtil opløsningen har et pH på ca.  
3,5. Der tilsættes 1,5 ml n-butanal, omrøres i 10 minuter,  
hvorpå der tilsættes 450 mg natriumcyanoborhydrid.  
Omrøringen fortsættes i 1 time, hvorpå opløsningen kon-  
centreres i vacuum til et volumen på ca. 100 ml. Denne  
10 opløsning passerer gennem en søjle af en basisk ionbyt-  
terharpiks (f.eks. "Amberlite" <sup>®</sup> IRA 401S (OH<sup>-</sup>)) og lyo-  
filiseres. Den resulterende rest chromatograferes på  
140 g silicagel i den nedre fase af en chloroform:  
methanol: 7%'s vandig ammoniumhydroxid (2:1:1)-opløs-  
15 ningsmiddelblanding. Ensartede fraktioner indeholdende  
1-N-(n-butyl)sisomicin som bestemt ved tyndtlagschroma-  
tografi kombineres, og de kombinerede eluater inddampes  
i vacuum til en rest omfattende 1-N-(n-butyl)sisomicin.  
20  $[\alpha]_D^{26} + 129^{\circ}$  (0,3%, H<sub>2</sub>O), pmr (ppm) (D<sub>2</sub>O)  $\delta$ 0,82 (3H, t,  
J = 7 Hz, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,15 (3H, s, C-CH<sub>3</sub>), 2,46 (3H, s,  
-N-CH<sub>3</sub>), 4,82 (1H, m, =CH-), 4,92 (1H, d, J = 4 Hz, H<sub>1</sub>" ),  
5,29 (1H, d, J = 2 Hz, H<sub>1</sub>' ).

Massespektrum: (M + 1)<sup>+</sup> m/e 504,

25 også m/e 127, 160, 182, 201, 219,  
229, 247, 256, 327, 345, 360, 373, 388, 418, 428.

E. Andre 1-N-alkyl- og 1-N-alkenyl-sisomiciner.

Ved fremgangsmåden ifølge eksempel 1A erstattes  
acetaldehyd med ækvivalente mængder af hver af følgende  
30 aldehyder:

1. 2-ethylbutanal,
2. propenal.

I hvert tilfælde udføres reaktionen på en måde  
svarende til den i eksempel 1A beskrevne, og de resulter-  
35 ende produkter isoleres og renses på en måde svarende  
til den beskrevne, hvorved man opnår:

1. 1-N-( $\beta$ -ethylbutyl)sisomicin,  $[\alpha]_D^{26} + 121^{\circ}$   
(c = 0,4%, H<sub>2</sub>O), pmr (ppm) (D<sub>2</sub>O):  $\delta$ 0,75 (6H,

t, 6,5 Hz,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 2,4 (3H, s,  $\text{N-CH}_3$ ),  
 4,78 (1H, m,  $=\text{CH-}$ ), 4,88 (1H, d, 4,0 Hz,  $\text{H}_1''$ ),  
 5,22 (1H, d, 2,0 Hz,  $\text{H}_1'$ ).

Massespektrum:  $(\text{M} + 1)^+$  m/e 532

5 også m/e 127, 160, 210, 229,  
 256, 275, 355, 373, 388, 401, 406, 416, 446,  
 456,

10 2. 1-N-( $\beta$ -propenyl)sisomicin,  $[\alpha]_D^{26} + 147^\circ$  (0,4,  
 $\text{CH}_3\text{OH}$ ), nmr ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ 1,18 (s, 3H,  $\text{C-CH}_3$ ), 2,48  
 (s, 3H,  $\text{N-CH}_3$ ), 3,75 (1H, dd,  $J = 4,11$  Hz,  
 $\text{H-2''}$ ), 3,95 (1H, d,  $J = 13$  Hz,  $\text{H-5e}$ ), 4,84  
 (1H, m,  $\text{H-4'}$ ), 4,94 (1H, d,  $J = 4$  Hz,  $\text{H-1''}$ ),  
 5,30-5,0 (3H, m,  $\text{H-1'}$ ,  $=\text{CH}_2$ ), 5,8 (1H, m,  
 $-\text{CN}=\text{CH}_2$ ), MS m/e 488 ( $\text{M}^+$ ).

15 F. 1-N-( $\delta$ -Aminobutyl)sisomicin.

Til en opløsning af 3 g sisomicin i 120 ml vand  
 sættes dråbevis 1N svovlsyre, indtil opløsningens pH er  
 indstillet på ca. 5. Til den vandige opløsning af det  
 20 derved dannede svovlsyreadditionssalt af sisomicin sæt-  
 tes 60 ml dimethylformamid efterfulgt af en opløsning af  
 2 g 4-phthalimidobutanal i 10 ml dimethylformamid. Om-  
 rørningen fortsættes i 10 minutter, hvorpå der tilsættes  
 420 mg natriumcyanoborhydrid. Efter ca. 20 minutters  
 25 forløb sættes reaktionsopløsningen til 1 liter vandfri  
 methanol under omrøring, og ved filtrering samles det  
 resulterende bundfald omfattende svovlsyreadditionssal-  
 tet af 1-N-( $\delta$ -phthalimidobutyl)sisomicin.

Der renses ved opløsning af bundfaldet i vand og  
 30 passage af den vandige opløsning gennem en basisk ion-  
 bytterharpiks. Der indampes i vacuum til en rest, res-  
 ten chromatograferes over silicagel ved eluering med den  
 nedre fase af en chloroform: methanol: 7%'s vandig ammo-  
 niumhydroxid (2:1:1)-opløsningsmiddelblanding, og de  
 35 kombinerede, ensartede eluater indampes til en rest om-  
 fattende 1-N-( $\delta$ -phthalimidobutyl)sisomicin.

Til 0,5 g 1-N-( $\delta$ -phthalimidobutyl)sisomicin sæt-  
 tes 5 ml 5%'s ethanolisk hydrazinhydrat, og der opvarmes

under tilbagesvaling i 3 timer. Reaktionsopløsningen udhældes i et stort volumen tetrahydrofuran, og det resulterende bundfald omfattende 1-N-( $\delta$ -aminobutyl)sisomicin samles ved filtrering.

5 Forbindelsen ifølge dette eksempel kan alternativt fremstilles som følger:

(1) 4-Acetamidobutyraldehyd.

5 g 4-Acetamidobutyraldehyd-diethylacetal opløses i 75 ml destilleret vand og 5 ml 1N svovlsyre. Opløsningen får lov at henstå ved stuetemperatur, indtil hydrolysen er fuldstændig bestemt ved tyndtlagschromatografi. Opløsningen neutraliseres med natriumbicarbonat, hvorpå opløsningen mættes med natriumchlorid og ekstraheres med chloroform. De kombinerede chloroformekstrakter destil-  
10 leres til en rest omfattende 4-acetamidobutyraldehyd, som kan anvendes uden yderligere rensning i den efterfølgende procedure.

(2) 1-N-( $\delta$ -Acetamidobutyl)sisomicin.

Til 3 g sisomicin i 120 ml destilleret vand sættes 0,1N svovlsyre, indtil opløsningen har pH ca. 5. Der tilsættes 6 g  $\delta$ -acetamidobutyraldehyd, fremstillet som beskrevet i det foregående, efter 10 minutters forløb fulgt af 600 g fast natriumcyanoborhydrid. Efter 2 timers forløb koncentrerer opløsningen til et lille volumen og udhældes i methanol. Det resulterende bundfald  
25 samles ved filtrering, opløses i vand, og den vandige opløsning passerer gennem en søjle af "Amberlite"® IRA 401-S (OH<sup>-</sup>)-ionbytterharpiks. Elueringsmidlet afdampes, og den resulterende rest chromatograferes på silicagel, idet man eluerer med den nedre fase af en chloroform:  
30 methanol: 7%'s ammoniumhydroxid-opløsningsmiddelblanding. Elueringsmidlet afdampes til opnåelse af en rest omfattende 1-N-( $\delta$ -acetamidobutyl)sisomicin.

35 (3) 1-N-( $\delta$ -Aminobutyl)sisomicin.

Det i det foregående eksempel opnåede 1-N-( $\delta$ -acetamidobutyl)sisomicin behandles med 10%'s vandig natriumhydroxid ved 100°C i 3 timer, hvorpå der neutraliseres med "Amberlite"® IRC-50-ionbytterharpiks og elu-



eres med 2N vandig ammoniumhydroxid. Det eluerede koncentrerer, og den resulterende rest opløses i vand og lyofiliseres til opnåelse af 1-N-( $\delta$ -aminobutyl)sisomicin.

5  $[\alpha]_D^{26} + 109^\circ$  ( $c = 0,3\%$ ,  $H_2O$ ).

Massespektrum:  $(M + 1)^+$  m/e 519

også 127, 160, 197, 216, 234, 244, 256, 262, 342, 360, 375, 388, 393, 403, 443.

10 G. 1-N-( $\beta$ -Aminoethyl)sisomicin og 1-N-( $\gamma$ -aminopropyl)sisomicin.

På en lignende måde, som den i eksempel 1F beskrevne alternative procedure, behandles en vandig opløsning af sisomicin, hvortil der er sat 0,1N svovlsyre, indtil opløsningens pH er ca. 5, med  $\beta$ -acetamidoacetaldehyd efterfulgt af fast natriumcyanoborhydrid. Det resulterende produkt isoleres og renses på en lignende måde, som den beskrevne, til opnåelse af 1-N-( $\beta$ -acetamidoethyl)sisomicin.

20 1-N-( $\beta$ -acetamidoethyl)sisomicin hydrolyseres med 10%'s vandig kaliumhydroxid, og det resulterende produkt isoleres og renses på en lignende måde, som den i afsnit (3) af den alternative procedure i eksempel 1F beskrevne, til opnåelse af 1-N-( $\beta$ -aminoethyl)sisomicin.

25 Massespektrum:  $(M + 1)^+$  m/e 491,

også 160, 169, 187, 206, 216, 234, 256, 283, 314, 325, 334, 347, 360, 370, 375, 405, 415.

30 Ved den ovennævnte metode dannes der ved at erstatte  $\beta$ -acetamidoaldehyd med  $\gamma$ -acetamidopropanal 1-N-( $\gamma$ -acetamidopropyl)sisomicin, som, når det hydrolyseres med 10%'s vandig kaliumhydroxid og isoleres og renses på den beskrevne måde, giver 1-N-( $\gamma$ -aminopropyl)sisomicin.

$[\alpha]_D^{26} + 127^\circ$  ( $H_2O$ ),

35 nmr ( $D_2O$ ):  $\delta$  1,2 (3H, s, -C-CH<sub>3</sub>), 2,5 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 3,8 (1H, dd,  $J = 4, 10,5$  Hz,  $H_2$ "), 4,0 (1H, d,  $J = 12,5$  Hz,  $H_5$ "e), 4,85 (1H, m, -C=CH-), 4,95 (1H, d,  $J = 4$  Hz,  $H_1$ "), 5,34 (1H, d,  $J = 2,5$  Hz,

$H_1'$ ).

Massespektrum:  $M^+$  + 1 m/e 504, ,

også 160, 202, 220, 230, 248, 256,  
328, 346, 361, 374, 379, 389, 407, 419 og 429.

5

## Eksempel 2

l-N-ethylgentamicin  $C_{1a}$ .

Til 5 g gentamicin  $C_{1a}$  i 125 ml vand sættes 1N  
svovlsyre, indtil opløsningens pH er ca. 5,2. Derpå til-  
sættes 2 ml acetaldehyd. Opløsningen omrøres i 5 minut-  
10 ter, hvorpå der tilsættes 1 g natriumcyanoborhydrid. Om-  
røringen fortsættes ved stuetemperatur i 30 minutter,  
opløsningen koncentrerer i vacuum til et volumen på ca.  
75 ml, opløsningen passerer gennem en søjle af en basisk  
ionbytterharpiks (f.eks. "Amberlite" <sup>®</sup> IRA 401S (OH<sup>-</sup>)),  
15 hvorpå der lyofiliseres til en rest omfattende l-N-ethyl-  
gentamicin  $C_{1a}$ .

Der renses ved chromatografering på 200 g sili-  
cagel og eluering med den nedre fase af et chloroform:  
methanol: 7%'s vandig ammoniumhydroxid (2:1:1)-system.  
20 Ensartede eluater som bestemt ved tyndtlagschromatografi  
kombineres, og de kombinerede eluater af hovedkomponen-  
ten koncentrerer i vacuum til en rest omfattende l-N-  
ethylgentamicin  $C_{1a}$  (udbytte 0,95 g). Yderligere rens-  
ning ved gentagen chromatografering af l-N-ethylgentami-  
25 cin  $C_{1a}$  på 100 g silicagel og eluering med chloroform:  
methanol: 3,5%'s ammoniumhydroxid (1:2:1)-system. De  
kombinerede ensartede eluater (som bestemt ved tyndt-  
lagschromatografi) behandles med en basisk ionbytterhar-  
piks, og eluatet lyofiliseres til opnåelse af l-N-ethyl-  
30 gentamicin  $C_{1a}$  (0,42 g),  $[\alpha]_D^{26} + 118^{\circ}$  (c = 0,3%, H<sub>2</sub>O),  
pmr (ppm) (D<sub>2</sub>O):  $\delta$  1,06 (3H, t, J = 7Hz, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,19  
(3H, s, -C-CH<sub>3</sub>), 2,51 (3H, s, -N-CH<sub>3</sub>), 4,97 (1H, d,  
J = 4Hz, H<sub>1</sub>" ), 5,16 (1H, d, J = 3,5Hz, H<sub>1</sub>' ).

Massespektrum: (M + 1)<sup>+</sup> m/e 478,

35

også m/e 129, 154, 160, 173, 191,  
201, 219, 258, 301, 317, 319, 329, 332, 347, 350, 360,  
378 og 402.

## Eksempel 3

l-N-substitueret verdamicin.

## A. l-N-ethylverdamicin.

Til 0,5 g verdamicin i 65 ml vand sættes lN svovl-  
 5 syre, indtil opløsningens pH er indstillet på ca. 4,9,  
 hvorpå der tilsættes 0,2 ml acetaldehyd. Opløsningen om-  
 røres i 5 minutter, der tilsættes 65 mg natriumcyanobor-  
 hydrid, opløsningen koncentrerer i vacuum til et volumen  
 på ca. 10 ml, og opløsningen udhældes i 50 ml methanol  
 10 under omrøring. Ved filtrering samles det resulterende  
 bundfald omfattende l-N-ethylverdamicin. Der renses ved  
 chromatografering på 100 g silicagel ved eluering med et  
 chloroform: methanol: 3,5%'s ammoniumhydroxid (1:2:1)-  
 system. Ensartede fraktioner som bestemt ved tyndtlags-  
 15 chromatografi samles, og de kombinerede fraktioner inde-  
 holdende hovedkomponenten inddampes i vacuum til en rest  
 omfattende l-N-ethylverdamicin. Der renses yderligere  
 ved gentagen chromatografering på 7 g silicagel ved elu-  
 ering med den nedre fase af et chloroform: methanol:  
 20 7%'s ammoniumhydroxid (2:1:1)-system. De ensartede elu-  
 ater kombineres og inddampes i vacuum til en rest af l-  
 N-ethylverdamicin (udbytte 50 mg).

Massespektrum:  $(M + 1)^+$  m/e 490,

også m/e 141, 154, 160, 173, 191,  
 25 201, 219, 270, 313, 317 (w), 331, 332, 341, 350 (w), 357,  
 359, 360, 378, 390, 414.

B. I proceduren ifølge eksempel 3A erstattes acetal-  
 dehyd med propanal og butanal. Hvert af de resulterende pro-  
 dukter isoleres og renses på en lignende måde til opnåel-  
 30 se af henholdsvis l-N-(n-propyl)verdamicin,  $[\alpha]_D^{26} + 122^\circ$   
 (c = 0,3%, H<sub>2</sub>O), pmr (ppm) (D<sub>2</sub>O):  $\delta$  0,88 (3H, t, J = 7Hz,  
 CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,19 (3H, s, C-CH<sub>3</sub>), 1,16 (3H, d, J = 6Hz,  
 CH-CH<sub>3</sub>), 4,81 (1H, m, = CH-), 4,97 (1H, d, J = 4,0Hz,  
 H<sub>1</sub>"'), 5,30 (1H, d, J = 2,0Hz, = H<sub>1</sub>'').

35 Massespektrum:  $(M + 1)^+$  m/e 528,

også m/e 141, 160, 168, 187, 205,

35

215, 233, 270, 346, 355, 373, 504, og  
 1-N-(n-butyl)verdamicin,  $[\alpha]_D^{26} + 121^\circ$  ( $c = 0,3\%$ ,  $H_2O$ ),  
 pmr (ppm) ( $D_2O$ ):  $\delta$  0,8 (3H, t,  $J = 6,5\text{Hz}$ ,  $CH_2-CH_3$ ), 2,45  
 (3H, s,  $NCH_3$ ), 4,8 (1H, m,  $C=CH-$ ), 4,92 (1H, d,  $J = 4,0$   
 5 Hz,  $H_1''$ ), 5,25 (1H, d,  $J = 2,0\text{Hz}$ ,  $H_1'$ ).

Massespektrum:  $(M + 1)^+$  m/e 518

også m/e 141, 160, 182, 201, 219,  
 229, 247, 270, 341, 360, 378, 387, 388, 418, 442.

10 Eksempel 4

1-N-substitueret gentamicin  $C_1$

A. 1-N-ethylgentamicin  $C_1$ .

På lignende måde som den i eksempel 1A beskrevne  
 behandles 5 g gentamicin  $C_1$  i 250 ml vand med 1N svovl-  
 15 syre, indtil pH for opløsningen er ca. 5. Derpå behandles  
 den syrnede opløsning med acetaldehyd og natriumcyanobor-  
 hydrid på lignende måde som den beskrevne, og det resul-  
 terende produkt isoleres og renses til opnåelse af 1-N-  
 ethylgentamicin  $C_1$ ,  $[\alpha]_D^{26} + 114^\circ$  ( $c = 0,3\%$ ,  $H_2O$ ) pmr  
 20 (ppm) ( $D_2O$ ):  $\delta$  1,03 (3H, t, 7Hz,  $-CH_2CH_3$ ), 1,03 (3H, d,  
 $J = 6,5\text{Hz}$ ,  $-CH-CH_3$ ), 1,17 (3H, s,  $C-CH_3$ ), 2,32 (3H, s,  
 $6'N-CH_3$ ), 2,49 (3H, s,  $3''-NHCH_3$ ), 4,94 (1H, d,  $J = 4\text{Hz}$ ,  
 $H_1''$ ), 5,13 (1H, d,  $J = 3,5\text{Hz}$ ,  $H_1'$ ).

Massespektrum:  $(M + 1)^+$  m/e 506,

25 også m/e 154, 157, 160, 173, 191,  
 201, 219, 286, 317, 329 (w), 347, 350, 360, 375, 430.

B. I proceduren ifølge eksempel 4A anvendes i stedet  
 for acetaldehyd et andet tilsvarende aldehydreagens. Hvert af de re-  
 sultierende produkter isoleres og renses på en lignende  
 30 måde til opnåelse af henholdsvis 1-N-methylgentamicin

$C_1$ ,  $\delta$  ( $D_2O$ ) 1,04 (3H, d,  $J = 6,5\text{Hz}$ ,  $6'-CH_3$ ), 1,18 (3H,  
 s,  $4''-CH_3$ ), 2,29 (3H, s,  $1-HCH_3$ ), 2,32 (3H, s,  $6'-HCH_3$ ),  
 2,49 (3H, s,  $3''-HCH_3$ ), 4,95 (1H, d,  $J_{1''}, 2'' = 4\text{Hz}$ ,  $H_1''$ ),  
 og 5,13 ppm (1H, d,  $J_{1'}, 2' = 3,5\text{Hz}$ ,  $H_1'$ ),  $M^+$  m/e 491,

35 også 416, 384, 364, 361, 346,

343, 336, 333, 318, 315, 303, 286, 205, 187, 177, 160,  
 159, 157, 1-N-( $\beta$ -hydroxyethyl)gentamicin  $C_1$ ,  $[\alpha]_D^{26} + 98,0^\circ$   
 ( $c = 0,3\%$ ,  $H_2O$ ), pmr (ppm) ( $D_2O$ ):  $\delta$  0,99 (3H, d,  $J = 6,5$

36

Hz, 6'-CH<sub>3</sub>), 1,13 (3H, s, 4"-CH<sub>3</sub>), 2,28 (3H, s, 6'-NCH<sub>3</sub>),  
2,45 (3H, s, 3"-NCH<sub>3</sub>), 4,97 (1H, d, J = 4Hz, H<sub>1</sub>" ) og  
5,11 (1H, d, J = 3,5Hz, H<sub>1</sub>" ).

Massespektrum: (M + 1)<sup>+</sup> m/e 522,

5 også m/e 446, 404, 394, 391, 376,  
373, 366, 363, 348, 345, 333, 286, 235, 217, 207, 189,  
160, 157,  $\nu_{\max}$  (KBr) 3300, 1060 cm<sup>-1</sup>, og 1-N-(phenyl-  
ethyl)gentamicin C<sub>1</sub>,  $[\alpha]_D^{26} + 99,4^{\circ}$  (c = 0,3%, H<sub>2</sub>O), pmr  
(ppm) (D<sub>2</sub>O):  $\delta$  0,99 (3H, d, J = 6,5Hz, 6'-CH<sub>3</sub>), 1,10  
10 (3H, s, 4"-CH<sub>3</sub>), 2,28 (3H, s, 6'-NCH<sub>3</sub>), 2,43 (3H, s, 3"-  
NCH<sub>3</sub>), 4,88 (1H, d, J = 4Hz, H<sub>1</sub>" ), 5,08 (1H, d, J=3,5Hz,  
H<sub>1</sub>' ) og 7,33 (5H, s, -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>).

Massespektrum: (M + 1)<sup>+</sup> m/e 582,

15 også m/e 506, 464, 454, 451, 436,  
433, 426, 423, 408, 405 (w), 393, 295, 286, 277, 267,  
249, 160, 156,  $\nu_{\max}$  (KBr) 3300, 1050, 1030 cm<sup>-1</sup>.

#### Eksempel 5

1-N-Ethyl-Antibiotikum G-52.

875 mg Antibiotikum G-52 opløses i 40 ml destil-  
20 leret vand, og der tilsættes 1N svovlsyre, indtil opløs-  
ningens pH er indstillet på ca. 3,5. Der tilsættes 0,7ml  
acetaldehyd, reaktionsblandingen omrøres i 10 minutter,  
hvorpå der tilsættes 100 mg natriumcyanoborhydrid. Reak-  
tionsopløsningen undersøges ved tyndtlagschromatografi,  
25 og når det som udgangsmateriale anvendte Antibiotikum  
G-52 viser sig at være fuldstændigt omsat (dvs. ca. 10  
minutter), koncentrerer opløsningen i vacuum ved ca. 35-  
40°C til et volumen på ca. 10 ml. Den koncentrerede op-  
løsning passerer gennem en basisk ionbytterharpiks, hvor-  
30 på der lyofiliseres til en rest omfattende 1-N-ethyl-  
Antibiotikum G-52. Der renses ved chromatografering på  
en silicagelsøjle ved eluering med den nedre fase af et  
chloroform: methanol: 7%'s vandig ammoniumhydroxid (2:1:  
1)-system. Ensartede eluater som bestemt ved tyndtlags-  
35 chromatografi kombineres, og de kombinerede eluater af  
hovedkomponenten koncentrerer i vacuum til en rest om-  
fattende 1-N-ethyl-Antibiotikum G-52 (udbytte 60 mg). De

overlappende eluater fra den foregående chromatografering renses yderligere ved chromatografering på silica-gel under eluering med den nedre fase af et chloroform: methanol: 7%'s vandig ammoniumhydroxid (1:2:1)-system

5 til opnåelse af en yderligere rest på 35 mg omfattende 1-N-ethyl-Antibiotikum G-52. De kombinerede rester af 1-N-ethyl-Antibiotikum G-52 passerer gennem en søjle af basisk ionbytterharpiks (f.eks. "Amberlite" <sup>®</sup> IRA 401S), og eluatet lyofiliseres til opnåelse af 1-N-ethyl-Anti-

10 biotikum G-52 (udbytte 90 mg),  $[\alpha]_D^{26} + 122,1^\circ$  (c = 0,3%, H<sub>2</sub>O), pmr (ppm) (D<sub>2</sub>O):  $\delta$  1,06 (3H, t, J = 6,5Hz, 1N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1,21 (3H, s, 4"-C-CH<sub>3</sub>), 2,30 (3H, s, 3"-N-CH<sub>3</sub>), 2,50 (3H, s, 6'-N-CH<sub>3</sub>), 4,94 (1H, m, H<sub>4</sub>'), 4,97 (1H, d, J = 4,0Hz, H<sub>1</sub>"'), 5,34 (1H, d, J = 2,5Hz, H<sub>1</sub>'').

15 Massespektrum: (M + 1)<sup>+</sup> m/e 490, også m/e 141, 154, 160, 173, 191, 201, 219, 270, 313, 317 (w), 331, 332, 341, 350, 359, 360, 378, 390, 414.

#### Eksempel 6

20 På lignende måde, som den i eksempel 1A beskrevne, behandles hver af følgende 4,6-diaminoglycosyl-1,3-diaminocyclitoler i vand med svovlsyre efterfulgt af acetaldehyd og natriumcyanoborhydrid:

1. gentamicin B,
- 25 2. antibiotikum JI-20B,
3. mutamicin 2,
4. mutamicin 6.

Hvert af de resulterende produkter isoleres og renses på en lignende måde, som den i eksempel 1A beskrevne, til opnåelse af den tilsvarende 1-N-ethylfor-

30 bindelse, dvs.:

1. 1-N-ethylgentamicin B,  
 $[\alpha]_D^{26} + 119,7^\circ$  (c, 1 i vand)  
 Massespektrum: m/e [MH]<sup>+</sup> 380, 352, 334, 378, 350,  
 332, 219, 191, nmr (60 MHz D<sub>2</sub>O):  $\delta$  5,55 (H-1',  
 35 J<sub>1',2'</sub> = 3,0Hz), 5,05 (H-1'', J<sub>1'',2''</sub> = 4Hz),  
 2,9 (N-CH<sub>3</sub>), 1,05-1,5 (2C-CH<sub>3</sub>).

2. 1-N-ethyl-Antibiotikum JI-20B,  
 $[\alpha]_D^{26} + 112,5^\circ$  (H<sub>2</sub>O)  
 nmr (D<sub>2</sub>O):  $\delta$  1,1 (3H, t, J = 7Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>),  
 1,22 (3H, s, C-CH<sub>3</sub>), 1,3 (3H, d, -CH-CH<sub>3</sub>),  
 5 4,95 (1H, d, J = 4Hz, H<sub>1</sub>" ), 5,35 (1H, J = 3,5Hz,  
 H<sub>1</sub>' ).  
 Massespektrum: M<sup>+</sup> + 1 m/e 524, også 154, 160, 173,  
 175, 191, 201, 219, 304, 317, 332, 333, 350, 360.
3. 1-N-ethylmutamicin 2,  
 10 smp. 80-84°C  
 pmr (D<sub>2</sub>O):  $\delta$  1,06 (t, J = 7Hz, 3, 1-N-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>),  
 1,19 (s, 3, 4"-CH<sub>3</sub>), 2,50 (s, 3, 3"-N-CH<sub>3</sub>),  
 2,53 (d, J<sub>2",3"</sub> = 10,5Hz, 1, H<sub>3</sub>" ), 3,75  
 (dd, J<sub>1",2"</sub> = 4Hz, J<sub>2",3"</sub> = 10,5Hz, 1, H<sub>2</sub>" ),  
 15 3,83 (d, H<sub>5</sub>" eq 5" 2x 12Hz, 1, H<sub>5</sub>" ), 4,86  
 (m, 1, H<sub>4</sub>' ), 4,98 (d, H<sub>2</sub>" , 1" = 4Hz, 1, H<sub>1</sub>" ) og  
 5,10 (d, J<sub>1',2'</sub> = 2,5Hz, 1, H<sub>1</sub>' ).  
 Massespektrum: m/e 459, 384, 329, 316, 311, 301,  
 282, 203, 185, 175, 160, 142, 127.
4. 1-N-ethylmutamicin 6,  
 20 smp. 118-122°C (dek.)  
 Massespektrum: (M)<sup>+</sup> m/e 475, (M + 1)<sup>+</sup> m/e 476,  
 Monosaccharider: m/e 160, 127  
 2-deoxystreptaminer: m/e 219, 201, 191, 171  
 25 Disaccharider: m/e 355, 317, 299,  
 m/e 378, 350, 322
- pmr ( $\delta$ ) D<sub>2</sub>O
- |              |               |                      |
|--------------|---------------|----------------------|
| 5,14         | d, J = 2,5Hz  | 1'-H                 |
| 5,00         | d, J = 4,1Hz  | 1"-H                 |
| 30 4,9       | bred singlet  | 4'-H                 |
| 4,38         | bred singlet  | 5-H                  |
| 3,93         | d, J = 12,5Hz | 5"-e-H               |
| 3,78         | q.            | 2"-H                 |
| 3,38         | d, J = 12,5Hz | 5"a-H                |
| 35 3,21 (1H) | bred singlet  | 6'-H                 |
| 2,65         | d, J = 11,0Hz | 3"-H                 |
| 2,52         | singlet       | 3"-N-CH <sub>3</sub> |
| 1,22         | singlet       | 4'-C-CH <sub>3</sub> |

39

1,07 triplet 1-N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>  
 cmr (D<sub>2</sub>O):  
 ppm: δ 149,8, 102,9, 97,4, 97,0, 83,9, 80,5,  
 73,2, 70,1, 69,6, 68, 63,9 54,5, 47,1, 47,0,  
 5 43,1, 40,8, 37,5, 33,0, 25,6, 22,4, 14,6.

## Eksempel 7

Fremstilling af 1-N-substituerede 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler via selektivt blokerede mellemprodukter.

- 10 A. 1-N-ethylgentamicin C<sub>1</sub> via et 2',3-di-N-substitueret mellemprodukt.

240 mg 2',3-di-N-trifluoracetylgentamicin C<sub>1</sub> opløses i 10 ml vand/methanol (2:1), og opløsningens pH indstilles til ca. 3,5 ved tilsætning af 1N svovlsyre.

- 15 Der tilsættes 0,19 ml acetaldehyd, omrøres i 10 minutter, hvorpå der tilsættes 27 mg natriumcyanoborhydrid, og reaktionsblandingen omrøres i yderligere 10 minutter. Reaktionsblandingen indampes i vacuum til en rest omfattende 1-N-ethyl-2',3-di-N-trifluoracetylgentamicin C<sub>1</sub>.

- 20 Resten opløses i 50 ml koncentreret ammoniumhydroxid, og opløsningen får lov at henstå ved stuetemperatur i 24 timer. Blandingen indampes i vacuum, og den resulterende rest chromatograferes over silicagel (12 g) ved eluering med den nedre fase af en blanding af chloroform:

- 25 methanol: 10%'s vandig ammoniumhydroxid (2:1:1). Ensartede fraktioner (som bestemt ved tyndtlagschromatografi) kombineres, og de kombinerede eluater indampes i vacuum til en rest omfattende 1-N-ethylgentamicin C<sub>1</sub> (udbytte 80 mg) med samme karakteristika som angivet i eksempel

- 30 4A.

B. 1-N-Ethylsisomicin via et 6'-N-substitueret mellemprodukt.

- På lignende måde som den i eksempel 7A beskrevne behandles 6'-N-t-butoxycarbonyl-  
 35 sisomicin i vandig methanol med svovlsyre og derpå med acetaldehyd og natriumcyanoborhydrid. Reaktionsblandingen får lov at henstå ved



stuetemperatur i 30 minutter, hvorpå den inddampes i vacuum til opnåelse af l-N-ethyl-6'-N-t-butoxycarbonylsisomicin. Resten opløses i trifluoreddikesyre, og opløsningen får lov at henstå i 10 minutter. Derpå tilsættes 5 der vandfri methanol til et overskud, det resulterende bundfald af trifluoreddikesyresaltet af l-N-ethylsisomicin filtreres og chromatograferes over silicagel under anvendelse af den nedre fase af et chloroform: methanol: ammoniumhydroxid-opløsningsmiddelsystem på en lignende 10 måde, som den i eksempel 7A beskrevne, til opnåelse af l-N-ethylsisomicin med samme karakteristika som angivet i eksempel 1A.

C. l-N-Methylsisomicin ud fra 3",4"-N,O-carbonyl-sisomicin.

15 3",4"-N,O-carbonyl-sisomicin (5 g) i destilleret vand (300 ml) behandles med 1N svovlsyre, indtil opløsningens pH er 2,5. Der tilsættes vandig formaldehyd (37%'s) (2 ml), og efter 10 minutters forløb tilsættes en opløsning af natriumcyanoborhydrid (500 mg) i vand 20 (5 ml) dråbevis. Efter 1 times forløb reduceres opløsningens volumen til halvdelen ved inddampning i vacuum, den koncentrerede opløsnings pH indstilles til 11 ved tilsætning af 1N natriumhydroxidopløsning, og opløsningen inddampes til tørhed. Resten ekstraheres med methanol 25 (3 x 100 ml), og de kombinerede methanolekstrakter fortyndes med et lige så stort volumen chloroform, filtreres og inddampes til tørhed til dannelse af rå l-N-methyl-3",4"-N,O-carbonylsisomicin.

30 Det rå produkt behandles med 10%'s vandig kaliumhydroxid ved 100°C i 5 timer. Den afkølede opløsning passerer ned gennem en "Amberlite" (R) IRC-50 (H<sup>+</sup>)-ionbytterharpiks og elueres med 2N vandig ammoniumhydroxid, og det eluerede koncentrerer og lyofiliseres til opnåelse af rå l-N-methylsisomicin.

35 Chromatografi af det rå materiale på silicagel (300 g) i chloroform: methanol: 7%'s ammoniumhydroxid (2:1:1) giver l-N-methylsisomicin.  $[\alpha]_D^{26} + 153^{\circ}$  (0,3%,

H<sub>2</sub>O).

Massespektrum: (M + 1)<sup>+</sup> m/e 462,

også m/e 127, 140, 159, 160, 177,

187, 205, 256, 285, 303, 318, 331, 336 (w), 346, 376,

5 386.

#### Eksempel 8

l-N-Benzylgentamicin C<sub>1</sub> via et tri-N-beskyttet l-N-Schiff'sk base-mellemprodukt.

- 10 (1) 0,3 g 2',3-di-N-trifluoracetylgentamicin C<sub>1</sub> opløses i 12 ml ethanol, og der tilsættes 0,9 ml benzaldehyd. Reaktionsblandingen omrøres i 3 timer, hvorpå den ind-
- dampes i vacuum. Resten opløses i 0,8 ml chloroform, og opløsningen sættes dråbevis til 25 ml hexan/ether (3:1).
- 15 Det resulterende bundfald fraskilles ved filtrering og tørres i vacuum til opnåelse af l-N,3",4"-N<sub>7</sub>O-bis-benzylidin-2',3-di-N-trifluoracetylgentamicin C<sub>1</sub>, (udbytte 0,38 g), smp. 128-134°C, [α]<sub>D</sub><sup>26</sup>: + 74,6° (c = 0,26%, ethanol).
- 20 (2) 1,37 g af det i eksempel 8(1) opnåede produkt opløses i 100 ml ethanol og sættes til en omrørt blanding af 1,37 g natriummethoxid og 1,94 g natriumborhydrid i 100 ml ethanol. Der omrøres i 3 timer, blandingen syrnes til et pH på ca. 3 med saltsyre, hvorpå der omrøres i
- 25 yderligere 16 timer. Opløsningen ekstraheres med ether, etherlaget fraskilles og bortkastes. Til den vandige fase sættes ammoniumhydroxid, indtil den er basisk, hvorpå den inddampes i vacuum til en rest. Resten ekstraheres med 35 ml varm ethanol. Ekstrakterne kombineres og ind-
- 30 dampes i vacuum. Den resulterende rest chromatograferes over 75 g silicagel ved eluering med den nedre fase af et chloroform: methanol: ammoniumhydroxid: vand (2:1:0,2:0,8)-opløsningsmiddel-system. Ensartede fraktioner som bestemt ved tyndtlagschromatografi kombineres og
- 35 inddampes til en rest omfattende l-N-benzylgentamicin C<sub>1</sub>, smp.: 83-88°C, [α]<sub>D</sub><sup>26</sup> + 90° (c = 0,3%, H<sub>2</sub>O), pmr (ppm) (D<sub>2</sub>O): δ 1,03 (3H, d, J = 7Hz, HC-CH<sub>3</sub>), 1,16 (3H,

42

s, C-CH<sub>3</sub>), 2,27 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 2,50 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 4,7 (D<sub>2</sub>O + PhCH<sub>2</sub>N-), 4,92 (1H, d, J = 4Hz, H-1"), 5,08 (1H, d, J = 3,5Hz, H-1'), 7,43 (5H, s, aromatisk H).

Massespektrum: (M + 1)<sup>+</sup> m/e 568,

5 også m/e 440, 437, 412, 394, 379,  
281, 263, 253, 235, 160, 157.

## Eksempel 9

1-N-substituerede 4,6-diaminoglycosyl-1,3-diaminocyclitoler fremstillet ved hydrid-reduktion af de tilsvarende

10 1-N-acylderivater.

1-N-(S-δ-amino-β-hydroxybutyl)gentamicin C<sub>1</sub>.

98 mg 1-N-(S-δ-amino-β-hydroxybutyryl)gentamicin C<sub>1</sub> suspenderes i 8 ml tetrahydrofuran. Der tilsættes 14 ml 1N diboran i tetrahydrofuran og koges under tilbagesvaling i 6 timer under en atmosfære af nitrogen. Der tilsættes forsigtigt 2 ml vand til dekomponering af eventuelt overskud af diboran og inddampes. Den resulterende

15 svaling i 6 timer under en atmosfære af nitrogen. Der tilsættes forsigtigt 2 ml vand til dekomponering af eventuelt overskud af diboran og inddampes. Den resulterende rest opløses i hydrazinhydrat, og der koges under tilbagesvaling under en atmosfære af nitrogen i 16 timer.

20 Opløsningen inddampes, og resten ekstraheres med varm vandig ethanol. De kombinerede ethanolekstrakter inddampes, og den resulterende rest chromatograferes over 10 ml silicagel ved eluering med den nedre fase af et chloroform: methanol: koncentreret ammoniumhydroxid

25 (2:1:1)-opløsningsmiddelsystem. Ensartede fraktioner som bestemt ved tyndtlagschromatografi kombineres og inddampes til opnåelse af 1-N-(S-δ-amino-β-hydroxybutyl)gentamicin C<sub>1</sub> (udbytte 14,5 mg), smp.: 93-98°C, [α]<sub>D</sub><sup>26</sup>: +72,4° (c = 0,35%, H<sub>2</sub>O), pmr (ppm) (D<sub>2</sub>O) δ 1,18

30 (3H, d, J = 7Hz, CH-CH<sub>3</sub>), 1,24 (3H, s, C-CH<sub>3</sub>), 2,49 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 2,54 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 5,07 (1H, d, J = 3,5Hz, H-1"), 5,24 (1H, d, J = 3,5Hz, H-1').

Massespektrum: (M + 1)<sup>+</sup> m/e 565,

35 også m/e 528, 516, 490, 437, 434, 410,  
397, 278, 250, 232, 160, 157.

På analog måde fremstilles 1-N-(S-γ-methylamino-β-hydroxypropyl)-gentamicin B, pmr: D<sub>2</sub>O: δ 1,21 (3H, s,

43

C-CH<sub>3</sub>), 2,33 (3H, s, 3"-N-CH<sub>3</sub>), 2,62 (3H, s, 3"-N-CH<sub>3</sub>), 5,02 (1H, d, J = 4,5Hz, H-1"), 5,12 (1H, d, J = 3,0Hz, H-1').

## Eksempel 10

5 1-N-Methylsisomicin ud fra 3",4"-N,0-carbonyl-2',3,6'-tri-N-t-butoxycarbonyl-sisomicin.

3",4"-N,0-carbonyl-2',3,6'-tri-N-t-butoxycarbonyl-sisomicin (0,77 g) opløses i tetrahydrofuran (20ml), og opløsningen afkøles i et isbad. Der tilsættes methylfluorsulfonat (0,12 g), og opløsningen får lov at opvarme til stuetemperatur. Opløsningsmidlet fjernes, og resten opløses i trifluoreddikesyre. Efter 5 minutters forløb ved stuetemperatur fjernes trifluoreddikesyren i vacuum, og resten behandles med 10%'s kaliumhydroxidopløsning ved 100°C i 5 timer.

Den afkølede opløsning passerer ned gennem en søjle af "Amberlite"® IRC-50 (H<sup>+</sup>)-ionbytterharpiks og elueres med 2N vandig ammoniumhydroxid. Det eluerede koncentrerer og lyofiliseres til opnåelse af det rå titelprodukt.

Det rå materiale chromatograferes på silicagel med den nedre fase af en chloroform: methanol: 7%'s ammoniumhydroxid (2:1:1)-opløsningsmiddelblanding til opnåelse af 1-N-methylsisomicin.  $[\alpha]_D^{26}$ : + 153° (0,3%, H<sub>2</sub>O).

Massespektrum (M + 1)<sup>+</sup> m/e 462, også m/e 127, 140, 159, 160, 177, 187, 205, 256, 285, 303, 318, 331, 336 (w), 346, 376, 386.

30

## Eksempel 11

1-N-Methylsisomicin.

2',3,6'-Tri-N-t-butoxycarbonyl-3",4"-N,0-carbonyl-sisomicin (5 g) i ethanol (100 ml) behandles med 37%'s vandig formaldehyd (1 ml) og ammoniumformiat (5 g), og opløsningen koges under tilbagesvaling i 24 timer. Opløsningen fortyndes med vand (200 ml) og ekstraheres med

chloroform (3 x 100 ml). De kombinerede ekstrakter ind-  
 dampes til tørhed, og resten indeholdende 2',3,6'-tri-  
 N-t-butoxycarbonyl-3",4"-N,0-carbonyl-1-N-methyl-siso-  
 micin opløses i trifluoreddikesyre, og efter 5 minutters  
 5 forløb ved stuetemperatur fjernes opløsningsmidlet i va-  
 cuum. Resten behandles med 10%'s kaliumhydroxid (25 ml)  
 ved 100°C i 5 timer. Den afkølede opløsning passerer  
 ned gennem en søjle af "Amberlite"® IRC 50 (H<sup>+</sup>)-ion-  
 bytterharpiks, og det rå produkt elueres med 2N vandig  
 10 ammoniumhydroxid. De kombinerede eluerede fraktioner  
 inddampes til tørhed i vacuum, og resten chromatografe-  
 res på silicagel (200 g) i den nedre fase af et chloro-  
 form: methanol: 7%'s ammoniumhydroxid (2:1:1)-opløsnings-  
 middelsystem til opnåelse af 1-N-methylsisomicin.  $[\alpha]_D^{26}$ :  
 15 +153° (0,3%, H<sub>2</sub>O).

Massespektrum: (M + 1)<sup>+</sup> m/e 462,  
 også m/e 122, 140, 159, 160, 177,  
 187, 205, 256, 285, 303, 318, 331, 336(w), 346, 376,  
 386.

#### 20 Eksempel 12

1-N-Methylsisomicin.

2',3,6'-Tri-N-t-butoxycarbonyl-3",4"-N,0-carbo-  
 nyl-sisomicin (0,77 g) behandles i tetrahydrofuran (25  
 ml) med methylamin (101 mg) og trifluormethylsulfonsyre-  
 25 anhydrid (290 mg) ved 0°C i 18 timer. Opløsningen ind-  
 dampes til tørhed, og resten opløses i dimethylformamid  
 (10 ml), og der omrøres med methyliodid (300 mg) og ka-  
 liumcarbonat (130 mg) i yderligere 18 timer. Opløsnings-  
 midlet fjernes ved inddampning, og resten behandles med  
 30 10%'s vandig kaliumhydroxid ved 100°C i 12 timer. Den  
 afkølede opløsning passerer gennem en søjle af "Amber-  
 lite"® IRC 50 (H<sup>+</sup>)-ionbytterharpiks. Det rå produkt  
 elueres med 2N vandig ammoniumhydroxid. Det kombinerede  
 eluat inddampes til tørhed i vacuum, og resten chromato-  
 35 graferes på silicagel (200 g) i den nedre fase af et  
 chloroform: methanol: 7%'s ammoniumhydroxid (2:1:1)-op-  
 løsningsmiddelsystem til opnåelse af 1-N-methylsisomi-

45

cin.  $[\alpha]_D^{26}$ : +153° (0,3%, H<sub>2</sub>O).

Massespektrum: (M + 1)<sup>+</sup> m/e 462,

også m/e 127, 140, 159, 160, 177,

187, 205, 256, 285, 303, 318, 331, 336(w), 346, 376,

5 386.

#### Eksempel 13

1-N-Methylsisomicin.

2',3,6'-Tri-N-t-butoxycarbonyl-3",4"-N,0-carbo-  
nyl-sisomicin (0,77 g) i tetrahydrofuran (20 ml) be-  
10 handles med 37%'s vandig formaldehyd (3 ml) og succini-  
mid (170 mg) ved stuetemperatur i 18 timer. Opløsningen  
dryppes i en blanding af diethylether/hexan (1:1), og  
bundfaldet samles ved filtrering. Dette materiale be-  
handles med natriumborhydrid (200 mg) i ethanol (20 ml)  
15 ved stuetemperatur i 5 timer. Ethanolen fjernes i vacu-  
um, og resten behandles med 10%'s vandig kaliumhydroxid  
i 12 timer ved 100°C. Den afkølede opløsning passerer  
gennem en søjle af "Amberlite"® IRC 50 (H<sup>+</sup>)-ionbytter-  
harpiks, og det rå produkt elueres med 2N vandig ammo-  
20 niumhydroxid. Det kombinerede eluat inddampes til tørhed  
i vacuum, og resten chromatograferes på silicagel (200g)  
i den nedre fase af et chloroform: methanol: 7%'s ammo-  
niumhydroxid (2:1:1)-opløsningsmiddelsystem til opnåelse  
af 1-N-methylsisomicin.  $[\alpha]_D^{26}$ : +153° (0,3%, H<sub>2</sub>O).

25 Massespektrum: (M + 1)<sup>+</sup> m/e 462,

også m/e 127, 140, 159, 160, 177,

187, 205, 256, 285, 303, 318, 331, 336(w), 346, 376,

386.

#### Eksempel 14

30 1-N-Methylsisomicin.

2',3,6'-Tri-N-t-butoxycarbonyl-3",4"-N,0-carbo-  
nyl-sisomicin (0,77 g) opløses i dichlormethan (100 ml)  
med acrylonitril (0,25 g) og efterlades ved stuetempera-  
tur i 24 timer. Opløsningsmidlet fjernes i vacuum og  
35 efterlader en rest, som opløses i dimethylformamid og  
behandles med methyliodid (180 mg) ved 50°C i 12 timer.

Opløsningsmidlet fjernes, og resten behandles med 10%'s vandig kaliumhydroxid ved 100°C i 8 timer. Den afkølede opløsning passerer gennem en søjle af "Amberlite"® IRC 50 (H<sup>+</sup>)-ionbytterharpiks, og det rå produkt elueres med 2N vandig ammoniumhydroxid. Det kombinerede eluat ind-

5 dampes til tørhed i vacuum, og resten chromatograferes på silicagel (200 g) i den nedre fase af et chloroform:methanol: 7%'s ammoniumhydroxid (2:1:1)-opløsningsmid-

delsystem til opnåelse af 1-N-methylsisomicin.  $[\alpha]_D^{26}$ :

10 +153° (0,3%, H<sub>2</sub>O).

Massespektrum: (M + 1)<sup>+</sup> m/e 462,

også m/e 127, 140, 159, 160, 177,

187, 205, 256, 285, 303, 318, 331, 336(w), 346, 376,

386.

Den efterfølgende tabel angiver den minimale hæm-

15 mende koncentration (MIC) for nogle af de omhandlede forbindelser. Forsøgene blev udført i Mueller-Hinton Broth (pH 7,2) under anvendelse af standmetoder.

Den in vitro minimale hæmmende koncentration (MIC)

Betegnelse af forbindelser i tabellen:

- 20 a) Hidtil ukendte forbindelser fremstillet ifølge opfindelsen:
- Forbindelse 1: 1-N-ethylgentamicin C<sub>1a</sub>
- Forbindelse 2: 1-N-ethylgentamicin C<sub>1</sub>
- Forbindelse 3: 1-N-ethyl-Antibiotikum G-52
- 25 Forbindelse 4: 1-N-(4-amino-2(S)-hydroxybutan)-gentamicin C<sub>1</sub>
- Forbindelse 5: 1-N-hydroxyethylgentamicin C<sub>1</sub>
- Forbindelse 6: 1-N-phenethylgentamicin C<sub>1</sub>
- Forbindelse 7: 1-N-ethylverdamicin
- 30 Forbindelse 8: 1-N-ethylsisomicin
- Forbindelse 9: 1-N-(2-ethylbutyl)-sisomicin
- Forbindelse 10: 1-N-(4-aminobutyl)-sisomicin
- Forbindelse 11: 1-N-ethylgentamicin B
- Forbindelse 12: 1-N-ethyl-Antibiotikum JI-20B
- 35 Forbindelse 13: 1-N-ethylmutamicin 2
- Forbindelse 14: 1-N-ethylmutamicin 6

b) Forbindelser ifølge kendt teknik:

Forbindelse 15: 1-N-(S-4-amino-2-hydroxybutyryl)-  
gentamicin C<sub>1a</sub> (US-patentskrift nr.  
3.796.699)

5 Forbindelse 16: 1-N-(S-4-amino-2-hydroxybutyryl)-  
gentamicin C<sub>1</sub> (US-patentskrift nr.  
3.780.018)

#### Forsøgsmetode

- Fremstil og steriliser 2000 ml Mueller-Hinton-  
10 næringsvæske indstillet til pH 7,2. Overfør 5 ml af det  
sterile medium til hvert af 120 sterile 16 x 150 mm for-  
søgsrør med bomuldspropper. Arranger rørene i 10 grupper  
hver på 12 rør. Tilføj til hver gruppe et kontrolrør. Tilsæt til  
hvert rør 10<sup>4</sup> celler af en af de bakteriestammer, som skal testes.  
15 Tilsæt til hver gruppe en vandig opløsning af det antibiotikum,  
som skal testes, under dannelse af følgende slutkoncentrationer  
pr. rør: 50 mcg/ml, 25 mcg/ml, 10 mcg/ml, 5 mcg/ml,  
2 mcg/ml, 1 mcg/ml, 0,5 mcg/ml, 0,2 mcg/ml, 0,1 mcg/ml,  
0,05 mcg/ml, 0,01 mcg/ml, 0,005 mcg/ml og 0,0 mcg/ml  
20 (kontrol). Inkuber rørene i 24 timer ved 37°C. Bestem  
visuelt for hver gruppe af rør den laveste koncentration  
af antibiotikum, som hæmmer bakterievækst, og den højes-  
te koncentration af antibiotikum, som tillader bakterie-  
vækst.  
25 Bestem den minimale hæmmende koncentration af de  
anvendte forsøgs-antibiotika over for hver af testbakte-  
rierne ved beregning af middelværdien mellem de to oven-  
for fundne værdier.

Tabel

	<u>Forb. 1</u>	<u>Forb. 2</u>	<u>Forb. 3</u>	<u>Forb. 4</u>
30 <u>Escherichia coli</u>				
W677/R55	-	3,0	0,3	0,03
JR 66	3,0	3,0	0,3	3,0
JR 88	3,0	7,5	3,0	3,0
JR 90	0,75	17,5	7,5	3,0
35 LA290 R55	0,3	0,75	0,3	3,0
R5/W677	-	0,3	17,5	0,75
HL97/W677	-	3,0	0,75	3,0
Swidinsky 4195	0,75	3,0	3,0	7,5



Tabel (forts.)

	<u>Escherichia coli</u>	<u>Forb. 1</u>	<u>Forb. 2</u>	<u>Forb. 3</u>	<u>Forb. 4</u>
	St. Michael 589	0,3	0,75	0,75	3,0
	Baker 2	0,3	0,3	0,3	3,0
5	Fl4-BK	0,075	0,3	0,3	3,0
	1574-1	0,075	0,3	3,0	3,0
	ATCC 10536	0,075	0,3	0,3	0,75
	<u>Pseudomonas</u>				
	Travers 1	3,0	7,5	3,0	17,5
10	Stone 130	3,0	-	7,5	17,5
	Stone 138	7,5	17,5	7,5	7,5
	Capetown 18	3,0	17,5	7,5	3,0
	Shreveport 3796	>25	17,5	>25	>25
	Stone 20	0,05	0,3	0,03	0,3
15	Stone 39	0,3	3,0	3,0	3,0
	St. Michael 762	0,3	3,0	3,0	3,0
	1395	0,75	17,5	3,0	17,5
	NRRL 3223	0,3	3,0	3,0	3,0
	GN 315	-	3,0	17,5	3,0
20	<u>Klebsiella</u>				
	Georgetown 3694	3,0	0,75	3,0	7,5
	3020	3,0	0,075	0,3	0,3
	Oklahoma 6	-	3,0	0,75	3,0
	AD 17	0,075	0,75	3,0	3,0
25	Ad 18	0,075	0,3	3,0	3,0
	<u>Providencia</u>				
	164	17,5	>25	>25	>25
	<u>Proteus mirabilis</u>				
	Harding	0,3	3,0	7,5	3,0
30	rettgeri Membel	0,75	3,0	17,5	17,5
	rettgeri Anderson	-	>25	>25	>25
	<u>Serratia</u>				
	Dalton	0,75	0,3	0,3	3,0
	<u>Salmonella</u>				
35	Group B typhim	0,3	3,0	3,0	3,0

Tabel (forts.)

	<u>Escherichia coli</u>	<u>Forb. 5</u>	<u>Forb. 6</u>	<u>Forb. 7</u>	<u>Forb. 8</u>
	W677/R55	3,0	0,75	0,3	0,3
	JR 66	3,0	0,75	0,3	0,3
5	JR 88	3,0	0,75	3,0	0,8
	JR 90	3,0	0,75	3,0	0,3
	LA290 R55	3,0	0,75	0,3	0,3
	R5/W677	3,0	7,5	3,0	17,5
	HL97/W677	0,01	-	>25	>25
10	Swidinsky 4195	3,0	17,5	3,0	3,0
	St. Michael 589	3,0	7,5	0,8	0,3
	Baker 2	3,0	17,5	0,3	0,3
	F14-BK	3,0	0,75	0,3	0,3
	1574-1	3,0	7,5	0,3	0,3
15	ATCC 10536	0,75	0,75	0,1	0,08
	<u>Pseudomonas</u>				
	Travers 1	7,5	-	3,0	0,8
	Stone 130	17,5	-	3,0	0,8
	Stone 138	17,5	-	3,0	0,8
20	Capetown 18	7,5	-	3,0	0,3
	Shreveport 3796	17,5	-	3,0	>25
	Stone 20	0,3	-	0,03	0,03
	Stone 39	3,0	-	0,8	0,3
	St. Michael 762	3,0	-	3,0	0,3
25	1395	17,5	-	3,0	0,3
	NRRL 3223	3,0	-	0,8	0,3
	GN 315	3,0	-	-	-
	<u>Klebsiella</u>				
	Georgetown 3694	3,0	-	0,3	0,3
30	3020	0,75	-	0,3	0,3
	Oklahoma 6	7,5	-	0,3	0,3
	AD 17	3,0	-	0,3	0,1
	AD 18	3,0	-	0,3	0,1
	<u>Providencia</u>				
35	164	>25	-	17,5	17,5

Tabel (forts.)

	<u>Forb. 5</u>	<u>Forb. 6</u>	<u>Forb. 7</u>	<u>Forb. 8</u>
<u>Proteus</u>				
<u>mirabilis</u>				
	3,0	-	0,8	0,3
5	rettgeri Membel 17,5	-	0,8	0,3
	rettgeri Anderson >25	-	>25	>25
<u>Serratia</u>				
	Dalton 3,0	-	0,3	0,9
<u>Salmonella</u>				
10	Group B typhim 3,0	-	0,8	3,0
<u>Escherichia coli</u>				
	<u>Forb. 9</u>	<u>Forb. 10</u>	<u>Forb. 11</u>	<u>Forb. 12</u>
	W677/R55 -	0,3	3,0	3,0
	JR 66 0,075	0,3	3,0	7,5
	JR 88 -	0,3	3,0	17,5
15	JR 90 0,75	0,3	3,0	-
	LA290 R55 0,3	0,3	3,0	7,5
	R5/W677 17,5	3,0	>25	17,5
	HL97/W677 17,5	-	-	-
	Swidinsky 4195 0,75	3,0	>25	>25
20	St. Michael 589 0,3	0,75	7,5	17,5
	Baker 2 0,3	0,3	3,0	17,5
	F14-BK 0,3	0,3	3,0	0,75
	1574-1 0,3	0,3	3,0	0,75
	ATCC 10536 0,3	0,03	0,3	0,3
25	<u>Pseudomonas</u>			
	Travers 1 17,5	0,3	3,0	3,0
	Stone 130 17,5	0,3	7,5	-
	Stone 138 17,5	0,3	7,5	-
	Capetown 18 7,5	0,3	3,0	-
30	Shreveport 3796 >25	>25	>25	17,5
	Stone 20 0,03	0,03	0,3	0,075
	Stone 39 3,0	0,3	3,0	3,0
	St. Michael 762 7,5	0,3	3,0	3,0
	1395 17,5	0,3	3,0	7,5
35	NRRL 3223 3,0	0,03	3,0	3,0
	GN 315 >25	>25	>25	>25

Tabel (forts.)

	<u>Klebsiella</u>	<u>Forb. 9</u>	<u>Forb. 10</u>	<u>Forb. 11</u>	<u>Forb. 12</u>
	Georgetown 3694	7,5	0,03	3,0	7,5
5	3020	0,3	0,03	3,0	0,75
	Oklahoma 6	0,75	0,03	3,0	7,5
	AD 17	7,5	0,3	-	0,75
	AD 18	7,5	0,3	-	0,75
	<u>Providencia</u>				
10	164	-	>25	7,5	>25
	<u>Proteus mirabilis</u>				
	Harding	3,0	0,75	17,5	17,5
	rettgeri Membel	-	3,0	3,0	17,5
	rettgeri Anderson	-	>25	>25	>25
15	<u>Serratia</u>				
	Dalton	17,5	3,0	7,5	17,5
	<u>Salmonella</u>				
	Group B typhim	3,0	0,75	3,0	3,0
	<u>Escherichia coli</u>	<u>Forb. 13</u>	<u>Forb. 14</u>	<u>Forb. 15</u>	<u>Forb. 16</u>
20	W677/R55	0,075	0,125	17,5	7,5
	JR 66	0,075	1	7,5	7,5
	JR 88	0,075	0,25	17,5	17,5
	JR 90	0,3	0,5	17,5	7,5
	LA290 R55	0,075	0,25	7,5	7,5
25	R5/W677	17,5	>16	-	-
	HL97/W677	-	8	-	-
	Swidinsky 4195	0,3	1	-	7,5
	St. Michael 589	0,3	2	7,5	7,5
	Baker 2	0,3	1	7,5	17,5
30	F14-BK	0,075	0,125	3,0	7,5
	1574-1	0,075	0,25	-	7,5
	ATCC 10536	0,03	0,125	3,0	17,5
	<u>Pseudomonas</u>				
	Travers 1	0,3	0,125	17,5	7,5
35	Stone 130	0,3	0,5	>25	17,5
	Stone 138	0,3	0,5	>25	17,5
	Capetown 18	0,3	0,25	>25	17,5
	Shreveport 3796	7,5	4	-	>25

Tabel (forts.)

	<u>Pseudomonas</u>	<u>Forb. 13</u>	<u>Forb. 14</u>	<u>Forb. 15</u>	<u>Forb. 16</u>
	Stone 20	<0,01	0,06	3,0	7,5
	Stone 39	0,03	0,25	17,5	17,5
5	St. Michael 762	0,3	0,25	>25	7,5
	1395	0,3	0,25	>25	7,5
	NRRL 3223	0,075	0,25	>25	17,5
	GN 315	>25	>16	-	-
	<u>Klebsiella</u>				
10	Georgetown 3694	0,3	0,125	3,0	7,5
	3020	0,3	0,06	3,0	7,5
	Oklahoma 6	0,3	0,25	-	-
	AD 17	0,075	0,25	3,0	7,5
	AD 18	0,075	0,06	3,0	7,5
15	<u>Providencia</u>				
	164	3,0	8	-	-
	<u>Proteus mirabilis</u>				
	Harding	3,0	0,5	-	17,5
	rettgeri Membel	0,3	0,5	>25	>25
20	rettgeri Anderson	>25	16	-	-
	<u>Serratia</u>				
	Dalton	0,75	0,5	3,0	7,5
	<u>Salmonella</u>				
	Group B typhim	0,3	0,25	3,0	7,5
25					

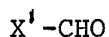
## P A T E N T K R A V

1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af 1-N-substituerede derivater af 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitolerne gentamicin B, gentamicin B<sub>1</sub>, gentamicin C<sub>1</sub>, gentamicin C<sub>1a</sub>, gentamicin C<sub>2</sub>, gentamicin C<sub>2a</sub>, gentamicin C<sub>2b</sub>, sisomicin, verdamicin, Antibiotikum G-418, Antibiotikum 66-40B, Antibiotikum 66-40D, Antibiotikum JI-20A, Antibiotikum JI-20B, Antibiotikum G-52, mutamicin 1, mutamicin 2, mutamicin 4, mutamicin 5 og mutamicin 6, hvor substituenten er



hvor X er hydrogen, alkyl, alkenyl, hydroxyalkyl, amino-alkyl, N-alkylaminoalkyl, aminohydroxyalkyl, N-alkylaminohydroxyalkyl, phenyl eller benzyl, hvilke aliphatiske grupper har op til 7 C-atomer og, hvis de er substitueret med både amino og hydroxy, bærer substituenterne på forskellige carbonatomer, eller farmaceutisk acceptable syreadditionssalte deraf, k e n d e t e g n e t ved, at

a) en tilsvarende 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol, der kan have amino-beskyttelsesgrupper ved en hvilken som helst anden aminogruppe end den i 1-stillingen, behandles med et aldehyd med formlen:



hvor X' er en gruppe som defineret for X ovenfor, hvori enhver tilstedeværende amino- eller hydroxygruppe kan være beskyttet, i nærværelse af et hydriddonor-reduktionsmiddel, hvorpå, om påkrævet, alle i molekylet tilstedeværende beskyttelsesgrupper fjernes på i og for sig kendt måde,

b) N,C-dobbeltbindingen i et 1-N=CHX'-substitueret derivat af en tilsvarende 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol, hvori alle grupper NH<sub>2</sub> er beskyttet, og grupper NHCH<sub>3</sub> kan være beskyttet, hvorhos X' er en gruppe som defineret for X ovenfor, hvori enhver tilstedeværende amino- eller hydroxygruppe kan være beskyttet, reduceres, hvorpå alle i molekylet tilstedeværende beskyttelsesgrupper fjernes på i og for sig kendt måde,

c) et 1-N-substitueret derivat af en tilsvarende 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol, hvori én eller flere aminogruupper kan være beskyttet, og 1-N-substi-

tuenten er  $\overset{\text{O}}{\parallel}\text{-C-X}''$ , hvor X'' er hydrogen, alkyl, alkenyl, hydroxyalkyl, aminoalkyl, N-alkylaminoalkyl, aminohydroxyalkyl, N-alkylaminohydroxyalkyl, phenyl, benzyl eller hydrocarbyloxy, hvilke aliphatiske grupper har op til 7 C-atomer og, hvis de er substitueret med både amino og hydroxy, bærer substituenterne på forskellige carbonatomer, og hvori enhver tilstedeværende amino- eller hydro-

xygruppe kan være beskyttet, behandles med et amid-reducerende hydridreagens, hvorpå alle i molekylet tilstedeværende beskyttelsesgrupper fjernes på i og for sig kendt måde,

5 d) til fremstilling af de ovennævnte l-N-substituerede derivater af 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler, hvori substituenten er ligekædet alkyl med op til 5 C-atomer, en tilsvarende 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol, der har amino-beskyttelsesgrupper ved  
10 enhver anden aminogruppe end den i l-stillingen, og hvori l-aminogruppen kan være aktiveret på i og for sig kendt måde, omsættes med et alkyleringsmiddel indeholdende den ligekædede alkylgruppe med op til 5 C-atomer og en bortgående gruppe, hvorpå i molekylet tilstedeværende beskyttelsesgrupper og, om påkrævet, tilstedeværende aktiverende gruppe eller grupper fjernes på i og for sig kendt måde,  
15 de,

e) til fremstilling af de ovennævnte l-N-substituerede derivater af 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler, hvori substituenten er methyl, en tilsvarende 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol, der har amino-beskyttelsesgrupper ved enhver anden aminogruppe end den i l-stillingen, omsættes med formaldehyd og et cyklisk imid, og den herved vundne forbindelse behandles med  
25 et hydriddonor-reduktionsmiddel, og alle i molekylet tilstedeværende beskyttelsesgrupper fjernes på i og for sig kendt måde, eller

f) til fremstilling af de ovennævnte l-N-substituerede derivater af 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitoler, hvori substituenten er methyl, en tilsvarende 4,6-di-(aminoglycosyl)-1,3-diaminocyclitol, der har amino-beskyttelsesgrupper ved enhver anden aminogruppe end den i l-stillingen, omsættes med formaldehyd i nærværelse af myresyre, og alle i molekylet tilstedeværende beskyttelsesgrupper fjernes på i og for sig kendt måde,  
35 og at der efter nævnte fremgangsmåder a) til f) foretages isolering af derivatet som sådant eller som et farmaceutisk acceptabelt syreadditionssalt.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g -  
n e t ved, at der anvendes fremgangsmåde a).

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e -  
t e g n e t ved, at der fremstilles 1-N-ethylsisonicin,  
5 der isoleres som sådant eller som et farmaceutisk accep-  
tabelt syreadditionssalt.

Fremdragne publikationer:

---