



NORGE

[NO]

**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

[B] (II) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 146472

(51) Int. Cl.³ C 07 H 17/08

(21) Patentsøknad nr. 780389

(22) Inngitt 03.02.78

(24) Løpedag 03.02.78

(41) Alment tilgjengelig fra 07.08.78

(44) Søknaden utlagt, utlegningsskrift utgitt 28.06.82

(30) Prioritet begjært 04.02.77, 01.12.77, USA, nr. 765480, 856479

(54) Oppfinnelsens benevnelse Analogifremgangsmåte for fremstilling av erytromycin-derivater.

(71)(73) Søker/Patenthaver PFIZER INC.,
235 East 42nd Street,
New York, NY,
USA.

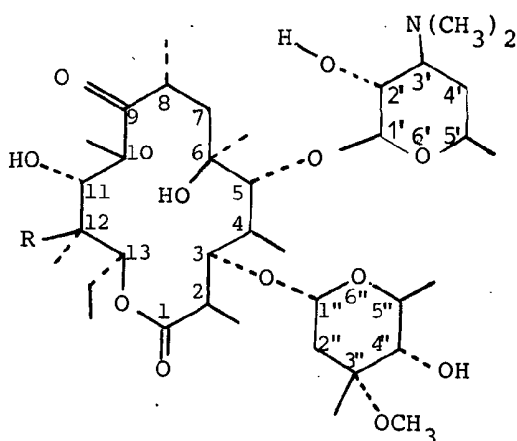
(72) Oppfinner FRANK CHRISTIAN SCIAVOLINO, Town of East
Lyme, New London, CT,
USA.

(74) Fullmektig Cand.mag. Johan H. Gørbitz,
Bryn & Aarflot A/S, Oslo.

(56) Anførte publikasjoner USA (US) patent nr. 3842069, 3884903

Denne oppfinnelse angår fremstilling av 4"-deoksy-4"-aminoerytromycin A derivater.

Erytromycin er et antibiotikum som dannes ved dyrkning av en stamme av *Streptomyces erythreus* i et egnet medium slik som angitt i US-patent 2.653.899. Erytromycin, som dannes i to former, A og B, representeres ved følgende struktur:



<u>Erytromycin</u>	<u>R</u>
A	-OH
B	-H

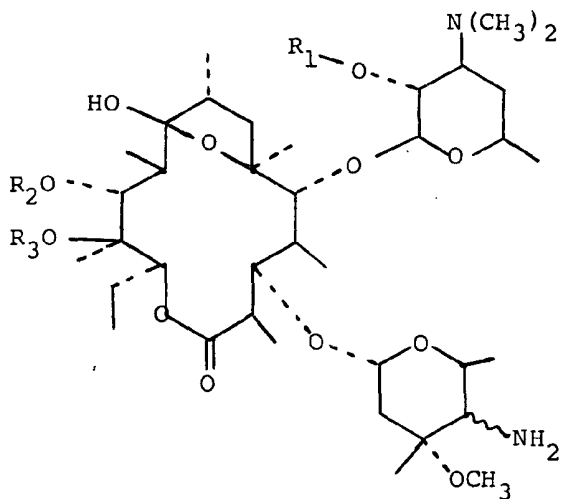
Strukturen viser at antibiotikumet omfatter tre hoveddeler: et sukkerfragment kjent som cladinose, en annen sukkerdel inneholdende en basisk aminosubstituent kjent som desosamin, og en 14-leddet laktonring betegnet som erytronolid A eller B, eller som her, makrolid-ringen. Mens nummereringssystemet for makrolid-ringen er umerkede tall, er det i desosamin benyttet merkede tall, og i cladinose dobbeltmerkede tall.

Tallrike derivater av erytromycin er fremstilt i forsøk på å modifisere dets biologiske eller farmakodynamiske egenskaper.

US-patent 3.417.077 beskriver reaksjonsproduktet av erytromycin og etylenkarbonat som et meget aktivt antibakterielt middel. US-patent 3.884.903 angir at 4"-deoksy-4"-erytromycin A og B derivater er nyttige antibiotika.

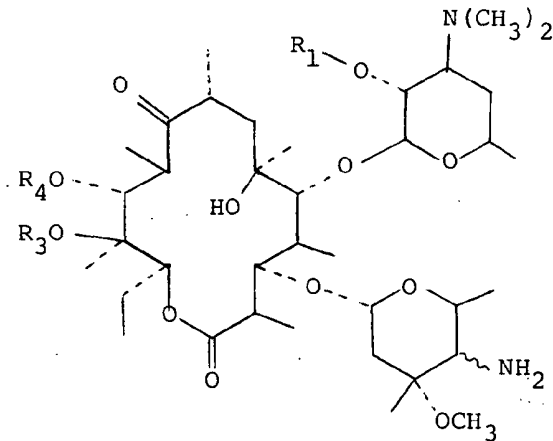
Erytromycylamin, 9-amino-derivatet av erytromycin A, har vært gjenstand for betydelig forskning (britisk patent 1.100.504, Tetrahedron Letters, 1645 (1967) og Croatica Chemica Acta, 39, 273 (1967)) og en viss uenighet eksisterer med hensyn til dets kjemiske struktur (Tetrahedron Letters, 157 (1970) og britisk patent 1.341.022). Sulfonamid-derivater av erytromycylamin er beskrevet i US-patent 3.983.103 som nyttige antibakterielle midler. Andre derivater er også beskrevet (Ryden, et al., J. Med. Chem., 16, 1059 (1973) og Massey, et al., J. Med. Chem., 17, 105 (1974)) som stoffer med in vitro og in vivo antibakteriell virkning.

Det er nu funnet at visse nye 4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A derivater har utmerkede antibakterielle egenskaper. Disse forbindelser representeres ved formlene:



III

og



IV

og farmasøytisk godtagbare syreaddisjonsalter derav, hvor R_1 er hydrogen eller alkanoyl med 2 til 3 karbonatomer; R_2 er alkanoyl med 2 til 3 karbonatomer; R_3 er hydrogen; R_4 er hydrogen; eller R_2 og R_3 sammen er -C- ; og R_3 og R_4 sammen er -C- .

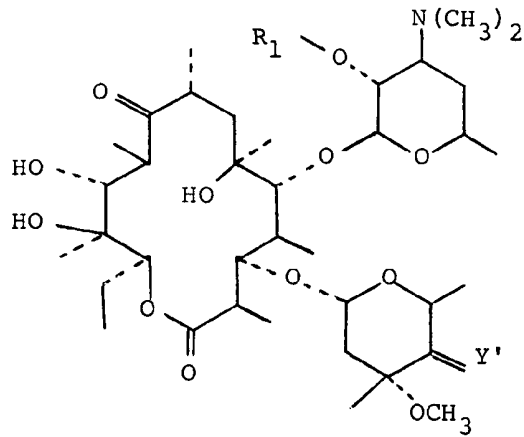
En foretrukket gruppe forbindelser innen denne klasse av kjemoterapeutiske forbindelser er de som har formel III, hvor R_1 er hydrogen og R_2 og R_3 sammen er -C- .

En annen foretrukket gruppe forbindelser i denne klasse antibakterielle forbindelser er de som har formel IV, hvor R_1 , R_3 og R_4 hver er hydrogen, eller hvor R_1 er hydrogen og R_3 og R_4 sammen er -C- .

146472

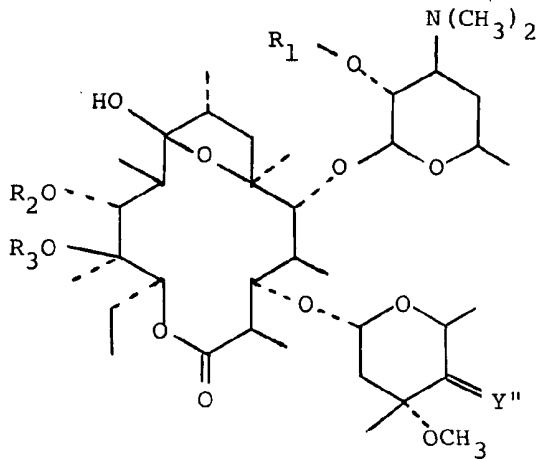
4

De nye forbindelser fremstilles fra mellomprodukter med formlene:



IV'

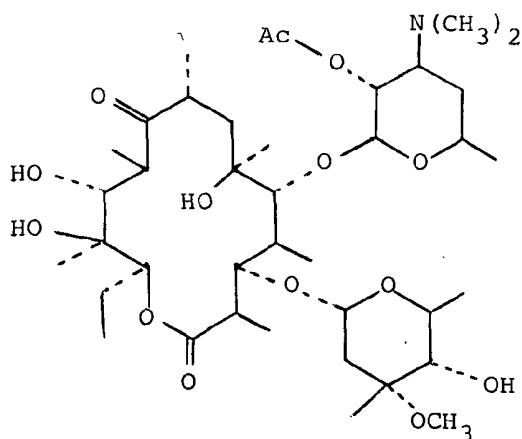
og



III'

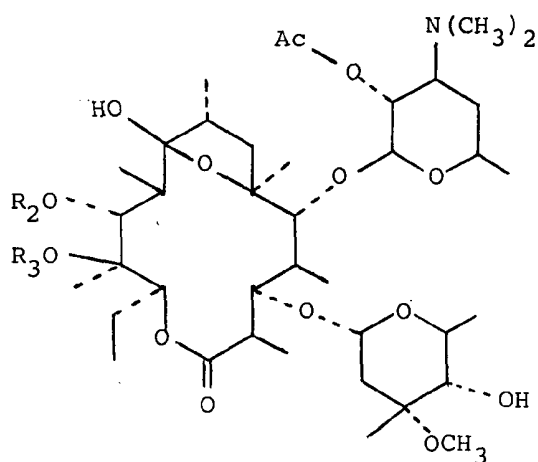
hvor R_1 , R_2 og R_3 er som foran angitt og Y' og Y'' er hver 0.
Disse mellomprodukter fremstilles ved at en forbindelse

med henholdsvis formlene:



I'

og



II'

hvor Ac er alkanoyl med 2 til 3 karbonatomer,

omsettes med 1 mol av hver av dimetylsulfoksyd og trifluor-eddiksyreanhydrid i et reaksjonsinert oppløsningsmiddel ved ca. -30 til $-65^{\circ}C$, fulgt av at reaksjonsblandingen bringes i kontakt med minst 1 mol trietylamin.

Fjernelse av alkanoyl-delen i 2'-stillingen i mellomproduktketonene IV' ($Y'=O$) og III' ($Y''=O$) foretas ved en solvolyse-reaksjon hvor den 2'-alkanoyl-4"-deoksy-4"-okso-erytromycin A-beslektede forbindelse omrøres med et overskudd av metanol natten over ved romtemperatur. Fjernelse av metanolen og påfølgende rensning, når nødvendig, av det gjenværende produkt gir forbindelser med formel IV' ($Y'=O$) og III' ($Y''=O$) hvor R_1 er hydrogen.

Flere synteseveier kan anvendes ved fremstilling av forbindelsene med formlene III og IV fra de nødvendige ketoner IV' ($Y' = O$) og III' ($Y'' = O$).

Fremstilling av 4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A-forbindelsene med formel III foretas ved kondensasjon av ketonene II med ammoniumsaltet av en lavere alkansyre og påfølgende reduksjon av det in situ dannede imin ($Y''=NH$). Betegnelsen "lavere alkansyre" betegner her en syre med 2 til 4 karbonatomer.

I praksis behandles en oppløsning av ketonet II i en lavere alkanol, så som metanol eller isopropanol, med ammoniumsaltet av en lavere alkansyre, så som eddiksyre, og den avkjølte reaksjonsblanding behandles med reduksjonsmidlet natriumcyanoborhydrid. Reaksjonen får finne sted ved romtemperatur i flere timer før reaksjonsblandingen hydrolyseres og produktet isoleres.

Selv om ett mol av ammoniumalkanoatet er nødvendig pr. mol keton, foretrekkes at et overskudd, så høyt som 10 ganger, anvendes for å sikre fullstendig og hurtig dannelselse av iminet. Slike overskuddsmengder synes å ha liten skadelig virkning på produktets kvalitet.

Med hensyn til mengden av reduksjonsmiddel som anvendes pr. mol keton, foretrekkes at ca. 2 mol natriumcyanoborhydrid anvendes pr. mol keton.

Reaksjonstiden vil variere med konsentrasjonen, reaksjonstemperaturen og reagensenes iboende reaktivitet. Ved romtemperatur, den foretrukne reaksjonstemperatur, er omsetningen tilnærmet fullstendig etter 2-3 timer.

Når det lavere alkanol-oppløsningsmiddel er metanol, finner det, som tidligere angitt, sted en vesentlig solvolyse av en alkanoylgruppe i 2'-stillingen. For å unngå fjernelse av en slik gruppe, foretrekkes at isopropanol anvendes som oppløsningsmiddel ved omsetningen.

Det foretrukne ammoniumalkanoat, som nevnt tidligere, for denne omsetning er ammoniumacetat.

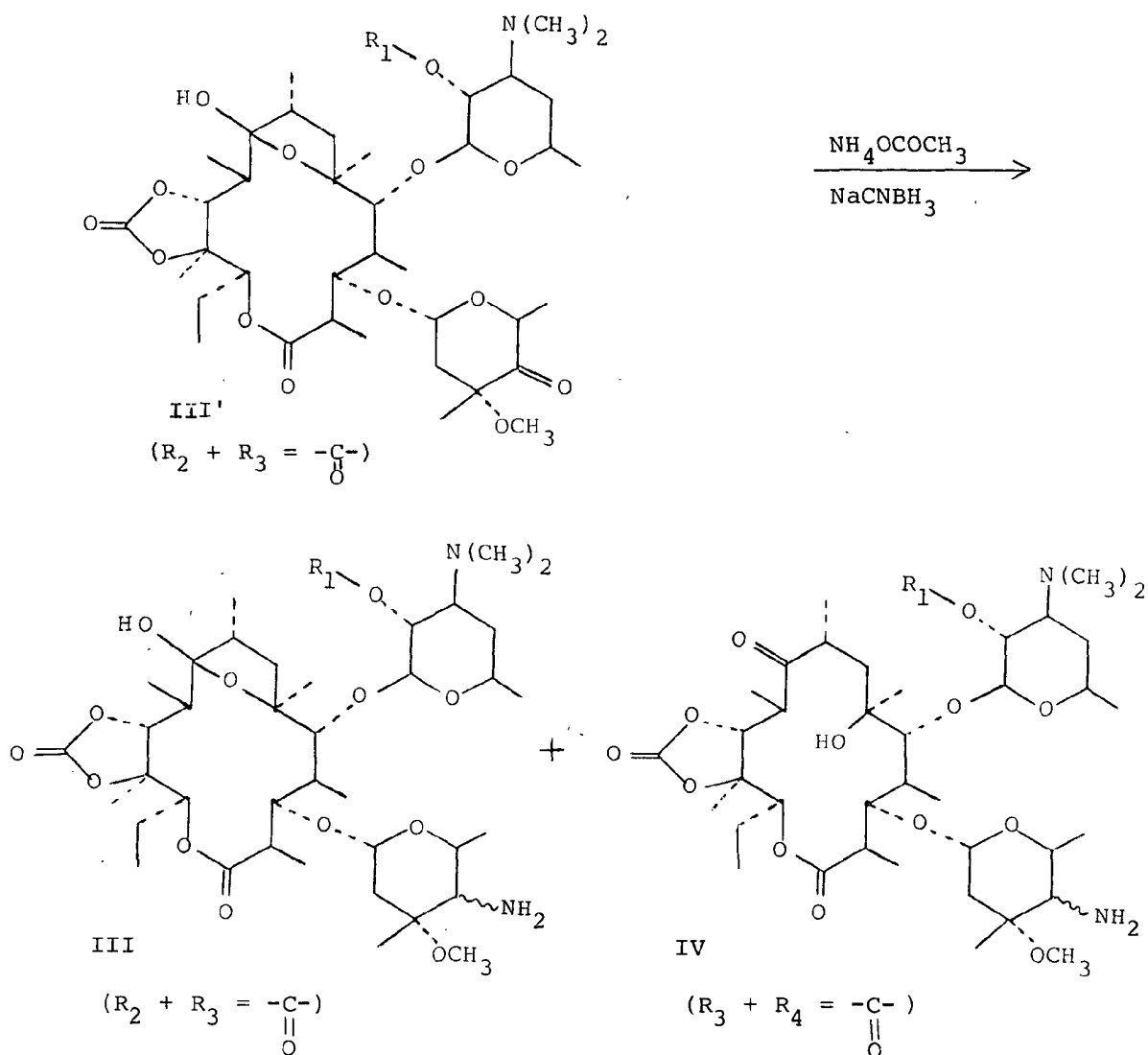
Ved isolering av de ønskede 4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A-derivater fra eventuelle ikke-basiske biprodukter eller utgangsmateriale, utnyttes sluttproduktets basiske natur. Således ekstraheres en vandig oppløsning av produktet over et område med gradvis økende pH slik at nøytrale eller ikke-basiske materialer ekstraheres ved lavere pH-verdier, og produktet ved pH over 5. De ekstraherende oppløsningsmidler, enten etylacetat eller dietyleter,

vaskes tilbake med saltoppløsning og vann, tørres over natrium-sulfat, og produktet erholdes ved fjernelse av oppløsningsmidlet. Ytterligere rensning, hvis dette er nødvendig, kan foretas ved kolonnekromatografi på silikagel i henhold til kjente metoder.

Som angitt tidligere kan solvolyse av 2'-alkanoylgruppen fra det passende 2'-alkanoyl-4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A-derivat foretas ved å la en metanoloppløsning av nevnte forbindelse stå natten over ved omgivelsestemperatur.

Ved den reductive aminering av ketonene med formel II hvor R_2 og R_3 sammen er $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$ og R_1 er alkanoyl med 2 til 3 karbonatomer

eller hydrogen, sees det at man får aminer med både formlene III og IV. Dette fremgår av det følgende skjema:



Aminproduktene III og IV som angitt ovenfor separeres hensiktsmessig ved selektiv krystallisasjon fra dietyleter. Omkrystallisering av blandingen av III og IV som angitt ovenfor, fra aceton-vann fremkaller hemiketal-dannelse i aminet med formel IV, hvilket resulterer i isolering av III som det eneste produkt.

Den første direkte syntesevei til aminforbindelsene med formel IV er den samme vei som er omtalt ovenfor og omfatter kondensering av ketonet IV' med et ammoniumalkanoat fulgt av reduksjon av det in situ dannede imin ($\text{Y}'=\text{NH}$) med natriumcyanoborhydrid.

Forbindelser med formel IV hvor R_1 , R_3 og R_4 er som tidligere angitt, fremstilles også ved reduksjon av det ovennevnte imin under anvendelse av hydrogen og en passende hydrogeneringskatalysator. Eksperimentelt behandles det passende keton (IV') i en lavere alkanol, så som metanol eller isopropanol, med ammoniumsaltet av en lavere alkansyre, så som eddiksyre, og hydrogeneringskatalysatoren, og blandingen ristes i en hydrogenatmosfære inntil omsetningen er tilnærmet fullstendig.

Selv om ett mol av ammoniumalkanoatet er nødvendig pr. mol keton, foretrekkes at et overskudd, så mye som 10 ganger, anvendes for å sikre fullstendig og hurtig dannelse av iminet. Slike overskuddsmengder synes å ha liten skadelig virkning på produktets kvalitet.

Hydrogeneringskatalysatoren kan velges fra en rekke forskjellige midler. Raney-nikkel og 5-10% palladium-på-trekull er imidlertid foretrukne katalysatorer. Disse kan anvendes i varierende mengder avhengig av hvor raskt omsetningen skal fullføres. Mengder fra 10-200% basert på vekten av IV' kan hensiktsmessig anvendes.

Trykket av hydrogengass i hydrogeneringskaret påvirker også reaksjonshastigheten. Det foretrekkes, for å oppnå en gunstig reaksjonstid, at et opprinnelig trykk på $3,5 \text{ kg/cm}^2$ anvendes. Av praktiske grunner foretrekkes også at reduksjonen utføres ved omgivelsestemperatur.

Reaksjonstiden er avhengig av en rekke faktorer, innbefattet temperatur, trykk, konsentrasjon av reaksjonskomponentene og den iboende reaktivitet hos reagensene. Under de ovennevnte reaksjonsbetingelser er omsetningen fullstendig i løpet av 12 til 24 timer.

Produktet isoleres ved filtrering av den brukte katalysator og fjernelse av oppløsningsmidlet i vakuum. Det gjenværende materiale behandles derefter med vann, og produktet isoleres fra ikke-basiske materialer ved ekstraksjon av det basiske produkt fra vann ved varierende pH-verdier som beskrevet ovenfor.

Når det lavere alkanol-oppløsningsmiddel er metanol, skjer det som nevnt ovenfor, en vesentlig solvolyse av en eventuell alkanoylgruppe i 2'-stillingen. For å unngå fjernelse av en slik gruppe foretrekkes at isopropanol anvendes som oppløsningsmiddel for omsetningen.

En annen syntesevei til 4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A-antibakterielle midler med formel IV omfatter først omdannelse av ketonene med formel IV' ($Y' = O$) til et oksim eller oksimderivat, dvs. $Y' = N-OH$ og $N-O-C\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}H_3$, fulgt av reduksjon av oksimet eller derivatet derav.

Reduksjon av ketonderivatene ($Y' = N-OH$ eller $N-O-C\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}H_3$) foretas ved katalytisk hydrogenering ved hvilken en oppløsning av oksimet eller et derivat derav i lavere alkanol, så som isopropanol, og Raney-nikkel-katalysator ristes i en hydrogenatmosfære ved et begynnelsestrykk på 70 kg/cm^2 ved romtemperatur natten over. Filtrering av den brukte katalysator fulgt av fjernelse av oppløsningsmidlet fra filtratet fører til isolering av det ønskede 4"-deoksy-4"-amino-antibakterielle middel med formel IV. Hvis metanol anvendes som oppløsningsmiddel ved denne reduksjon, er solvolyse av en 2'-alkanoylgruppe sannsynlig. For å unngå denne bireaksjon anvendes isopropanol.

Ved utnyttelse av den kjemoterapeutiske virkning av de forbindelser med formelene III og IV som danner salter, foretrekkes det selvsagt å anvende farmasøytisk godtagbare salter. Selv om vannoppløselighet, høy toksisitet eller mangel på krystallinsk natur kan gjøre enkelte salter uegnet eller mindre ønskelige for anvendelse som sådanne for et gitt farmasøytisk formål, kan de vannoppløselige eller toksiske salter omdannes til de tilsvarende farmasøytisk godtagbare baser ved spaltning av saltet som beskrevet ovenfor, eller alternativt kan de omdannes til et hvilket som helst ønsket farmasøytisk godtagbart syreaddisjonssalt.

Eksempler på syrer som har farmasøytisk godtagbare anioner er saltsyre, bromhydrogensyre, jodhydrogensyre, salpetersyre, svovelsyre, svovelsyrling, føsforsyre, eddiksyre, melkesyre, sitronsyre, vinsyre, ravsyre, maleinsyre, glukonsyre og asparaginsyre.

Som tidligere angitt er stereokjemien hos utgangsmaterialene som fører til de antibakterielle midler, slik som i det naturlige materiale. Oksydasjonen av 4"-hydroksylgruppen til et keton og den påfølgende omdannelse av ketonet til 4"-aminene gjør det mulig for stereokjemien for 4"-substituenten å forandre seg fra hva den var hos det naturlige produkt. Når forbindelsene IV' ($Y'=O$) og III' ($Y''=O$) omdannes til aminer ved en av de ovenfor beskrevne fremgangsmåter, er det således mulig at to epimere aminer dannes. Eksperimentelt er det iaktatt at begge epimere aminer er til stede i sluttproduktet i varierende forhold avhengig av valg av syntesemetode. Hvis det isolerte produkt består overveiende av en av epimerene, kan denne epimer renses ved gjentatt omkrystallisering fra et egnet oppløsningsmiddel til et konstant smeltepunkt. Den annen epimer, den som er til stede i mindre mengder i det opprinnelig isolerte, faste materiale, er det overveiende produkt i moderluten. Den kan utvinnes fra denne ved metoder som er kjent for fagfolk, f.eks. ved inndampning av moderluten og gjentatt omkrystallisering av residuet til et produkt med konstant smeltepunkt.

Selv om blandingen av epimerer kan separeres ved i og for seg kjente metoder, er det av praktiske grunner hensiktsmessig å anvende blandingen slik som den isoleres fra reaksjonsblandingen. Det er imidlertid ofte hensiktsmessig å rense blandingen av epimerer ved minst én omkrystallisering fra et passende oppløsningsmiddel, ved å underkaste den kolonne- eller høytrykk-væskrokromatografi eller oppløsningsmiddel-fordeling eller ved utgning i et passende oppløsningsmiddel. Denne rensning som ikke nødvendigvis adskiller epimerene, fører til fjernelse av slike fremmede materialer som utgangsmaterialer og uønskede biprodukter.

Den absolutte stereokjemiske fastleggelse av epimerene er ikke fullført. Begge epimerer av en gitt forbindelse oppviser imidlertid den samme type aktivitet, f.eks. som antibakterielle midler.

De nye 4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A derivater oppviser in vitro aktivitet mot forskjellige Gram-positive mikroorganismer, f.eks. *Staphylococcus aureus* og *Streptococcus pyogenes*, og mot

visse Gram-negative mikroorganismer slik som de som har sfærisk eller ellipsoid form (cocci). Deres aktivitet påvises lett ved in vitro forsøk mot forskjellige mikroorganismer i et hjerne-hjerte-infusjonsmedium ved den vanlige dobbelte seriefortynnings-teknikk. Deres in vitro aktivitet gjør dem nyttige for lokal anvendelse i form av salver, kremer o.l., for steriliseringsformål, f.eks. sykeromsutstyr, og som industrielle antimikrobielle midler, f.eks. for vannbehandling, slimkontroll, maling- og trekonservering.

For in vitro bruk, f.eks. for lokal administrering, vil det ofte være hensiktsmessig å blande det utvalgte produkt med et farmasøytisk godtagbart bæremiddel så som en vegetabilsk olje eller mineralolje eller en bløtgjørende krem. Likeledes kan produktene oppløses eller dispergeres i flytende bæremidler eller oppløsningsmidler så som vann, alkohol, glykoler eller blandinger derav eller andre farmasøytisk godtagbare inerte medier, dvs. medier som ikke har noen skadelig virkning på den aktive bestanddel. For slike formål vil det vanligvis være godtagbart å anvende konsentrasjoner av de aktive bestanddeler på fra ca. 0,01 til ca. 10 vekt%, basert på det totale preparat.

Dessuten er mange av de nye forbindelser og deres syre-addisjonssalter aktive mot Gram-positive og visse Gram-negative mikroorganismer, f.eks. Pasteurella multocida og Meisseria sicca, in vivo ved oral og/eller parenteral administrering på dyr, innbefattet mennesker. Deres in vivo aktivitet er mer begrenset med hensyn til organismer som påvirkes, og bestemmes ved den vanlige metode som omfatter at mus med tilnærmet jevn vekt infiseres med prøveorganismen og derefter behandles oralt eller subkutan med prøveforbindelsen. I praksis gis musene, f.eks. 10, en intraperitoneal innpodning av egnede fortynnede kulturer inneholdende omtrentlig 1 til 10 ganger LD_{100} (den laveste konsentrasjon av organismer som er nødvendig for å frembringe 100% dødsfall). Kontrollforsøk foretas samtidig med mus som mottar podestoff i lavere fortynninger som en kontroll på mulige variasjoner i styrken av prøveorganismen. Prøveforbindelsen administreres 0,5 time etter innpodning, og gjentas 4, 24 og 48 timer senere. Overlevende mus holdes i 4 dager etter den siste behandling, og antall overlevende nedtegnes.

Når de anvendes in vivo, kan disse nye forbindelser administreres oralt eller parenteralt, f.eks. ved subkutan eller

intramuskulær injeksjon, i en dose fra ca. 1 til ca. 200 mg/kg kroppsvekt pr. dag. Det foretrukne doseområde er fra ca. 5 til ca. 100 mg/kg kroppsvekt pr. dag, og et særlig foretrukket område er fra ca. 5 til ca. 50 mg/kg kroppsvekt pr. dag.

Bæremidler som er egnet for parenteral injeksjon, kan enten være vandig, så som vann, isotonisk saltvann, isotonisk dekstrose eller Ringers oppløsning, eller ikke-vandige, så som fete oljer av vegetabilsk opprinnelse (bomullsfrø, jordnøttolje, mais, sesam), dimetylsulfoksyd eller andre ikke-vandige bæremidler som ikke vil påvirke preparatets terapeutiske virkning og er ugiftige i den anvendte mengde (glycerol, propylenglykol, sorbitol). Preparater som er egnet for fremstilling av oppløsninger på stedet før administrering, kan dessuten hensiktsmessig fremstilles. Slike preparater kan inneholde flytende fortynningsmidler, f.eks. propylenglykol, dietylkarbonat, glycerol, sorbitol osv.; buffermidler, hyaluronidase, lokalbedøvelsesmidler og uorganiske salter for å gi ønskede farmakologiske egenskaper. Disse forbindelser kan også dannes med forskjellige farmasøytisk godtagbare inerte bæremidler innbefattet faste fortynningsmidler, vandige bæremidler og ugiftige organiske oppløsningsmidler, for fremstilling av kapsler, tabletter, piller, pastiller, tørrblandinger, suspensjoner, oppløsninger, eliksirer og parenterale oppløsninger eller suspensjoner. Generelt anvendes forbindelsene i forskjellige doseformer i konsentrasjoner varierende fra ca. 0,5 til ca. 90 vekt% av det totale preparat.

De følgende eksempler skal tjene til å illustrere oppfinnelsen ytterligere.

Eksempel 1

2'-acetyl-4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A

En blanding av 14,0 g 2'-acetyl-4"-deoksy-4"-okso-erytromycin A-O-acetyloksim og 60 g isopropanol-vasket Raney-nikkel i 400 ml isopropanol omrøres i en hydrogenatmosfære ved et opprinnelig trykk på 70 kg/cm^2 ved romtemperatur. Katalysatoren frafiltreres, og filtratet konsentreres til et hvitt skum. Residuet oppløses påny i 400 ml isopropanol og blandes med 50 g frisk isopropanol-vasket Raney-nikkel. Hydrogeneringen fortsettes natten over ved romtemperatur og et opprinnelig hydrogentrykk på 70 kg/cm^2 . Katalysatoren frafiltreres, og filtratet konsentreres i vakuum

til tørrhet for å gi 8,1 g av det ønskede produkt.

Eksempel 24"-deoksy-4"-amino-erytromycin A

En oppløsning av 2,17 g 2'-acetyl-4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A i 50 ml metanol omrøres ved romtemperatur natten over. Oppløsningsmidlet fjernes under redusert trykk, og det gjenværende skum behandles med en blanding av 50 ml kloroform og 50 ml vann. pH i det vandige lag reguleres til 9,5, og det organiske lag fra-skilles. Kloroformlaget behandles med friskt vann, og pH reguleres til 4,0. pH i det sure, vandige lag inneholdende produktet reguleres gradvis til 5, 6, 7, 8 og 9 ved tilsetning av base, idet ekstraksjon foretas ved hver pH med frisk kloroform. Ekstraktene

146472

14

ved pH 6 og 7 inneholder hovedmengden av produktet, og disse samles og behandles med frisk vann ved pH 4. Det vandige lag reguleres igjen gjennom pH 5, 6 og 7 og ekstraheres ved hver pH med frisk kloroform. Kloroformekstrakten ved pH 6 tørres over natriumsulfat og konsentreres for å gi 249 mg av produktet som en epimer blanding. NMR (δ , CDCl_3): 3,30 (1H) s, 3,26 (2H) s, 2,30 (6H) s og 1,46 (3H) s.

På tilsvarende måte fremstilles 4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A ved metanol-solvolyse av 2'-propionyl-4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A.

Eksempel 3

4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A

Til en omrørt oppløsning av 3,0 g 4"-deoksy-4"-okso-erytromycin A i 30 ml metanol under en nitrogenatmosfære settes 3,16 g tørt ammoniumacetat. Etter 5 minutter vaskes 188 mg natriumcyanoborhydrid inn i reaksjonsblandingen med 5 ml metanol, og reaksjonsblandingen omrøres ved romtemperatur natten over. Den lysegule oppløsning helles i 300 ml vann, og pH reguleres til 6,0. Den vandige oppløsning ekstraheres ved pH 6, 7, 7,5, 8, 9 og 10 under anvendelse av 125 ml dietyleter for hver ekstraksjon. Ekstraktene ved pH 8, 9 og 10 samles og vaskes med 125 ml friskt vann. Det fraskilte vandige lag ekstraheres med eter (1 x 100 ml) ved pH 7, etylacetat (1 x 100 ml) ved pH 7, eter (1 x 100 ml) ved pH 7,5, etylacetat (1 x 100 ml) ved pH 7,5 og etylacetat (1 x 100 ml) ved pH 8, 9 og 10. Etylacetatekstraktene ved pH 9 og 10 samles, vaskes med en mettett saltoppløsning og tørres over natriumsulfat. Fjernelse av oppløsningsmidlet i vakuum gir 30 mg av en epimer blanding av det ønskede produkt som et elfenbensfarvet skum.

Eksempel 4

4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A (enkel epimer)

En oppløsning av 10,0 g av den epimere blanding av 2'-acetyl-4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A i 150 ml metanol omrøres ved romtemperatur under nitrogen i 72 timer. Oppløsningsmidlet fjernes i vakuum, og residuet oppløses i en omrørt blanding av 150 ml vann og 200 ml kloroform. Det vandige lag kastes, og 150 ml frisk vann tilsettes. pH i det vandige lag reguleres til 5,

og kloroformlaget fraskilles. pH i den vandige fase reguleres derefter til 5,5, 6, 7, 8 og 9, idet ekstraksjon foretas etter hver regulering med 100 ml frisk kloroform. Kloroformekstraktene fra pH 6, 7 og 8 samles, vaskes suksessivt med vann og en mettett saltoppløsning og tørres over natriumsulfat. Fjernelse av oppløsningsmidlet under redusert trykk gir 2,9 g av en epimer blanding av 4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A. En 1,9 g prøve av blandingen utgns med dietyleter som medfører at noe av de uoppløste skum krystalliserer. Det faste stoff filtreres og tørres for å gi 67 mg av en enkel epimer av 4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A, sm.p. 140-147°C.

Eksempel 5

11-acetyl-4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A-6,9-hemiketal

Til en omrørt oppløsning av 4,4 g 11-acetyl-4"-deoksy-4"-okso-erytromycin A-6,9-hemiketal og 4,38 g ammoniumacetat i 75 ml metanol settes 305 mg 85%ig natriumcyanoborhydrid. Etter omrøring ved romtemperatur natten over helles reaksjonsblandingen i 300 ml vann hvortil derefter settes 250 ml kloroform. Det vandige lags pH reguleres til 9,8, og kloroformlaget fraskilles. Det vandige lag ekstraheres igjen med kloroform, og kloroformekstraktene samles, tørres over natriumsulfat og konsentreres til et hvitt skum. Det gjenværende skum oppløses i en omrørt blanding av 125 ml vann og 125 ml frisk kloroform, og pH reguleres til 4,9. Kloroformen fraskilles og kastes, og det vandige lag reguleres til pH 5, 6, 7 og 8, idet det etter hver regulering ekstraheres med frisk kloroform. Ekstraktene fra det vandige lag ved pH 6 og 7 samles, vaskes med en mettett saltoppløsning og tørres over natriumsulfat. Fjernelse av oppløsningsmidlet gir 1,72 g av det ønskede produkt som et hvitt skum. Produktet oppløses i en minimal mengde dietyleter og behandles derefter med heksan til uklarhet. Det dannede krystallinske produkt filtreres og tørres, 1,33 g, sm.p. 204,5-206,5°C. NMR (δ , CDCl_3): 3,31 (2H) s, 3,28 (1H) s, 2,31 (6H) s, 2,11 (3H) s og 1,5 (3H) s.

Eksempel 6

4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A-6,9-hemiketal-11,12-karbonateter

Til 189 g 4"-deoksy-4"-okso-erytromycin A-6,9-hemiketal-11,12-karbonateter i 1200 ml metanol ved romtemperatur settes under omrøring 193 g ammoniumacetat. Etter 5 minutter avkjøles den

resulterende oppløsning til ca. -5°C og behandles derefter med 13,4 g 85%ig natriumcyanoborhydrid i 200 ml metanol over en tilsetningsperiode på 45 minutter. Kjølebadet fjernes, og reaksjonsblandingen omrøres ved romtemperatur natten over. Reaksjonsblandingen reduseres i volum til 800 ml i vakuum og settes til en omrørt blanding av 1800 ml vann og 900 ml kloroform. pH reguleres fra 6,2 til 4,3 med 6N saltsyre, og kloroformlaget fraskilles. Kloroformen blandes med 1 liter vann, og pH reguleres til 9,5. Den organiske fase fraskilles, tørres over natriumsulfat og konsentreres under redusert trykk for å gi 174 g av et hvitt skum. Det gjenværende materiale oppløses i en blanding av 1 liter vann og 500 ml etylacetat, og pH reguleres til 5,5. Etylacetatlaget fraskilles, og det vandige lag reguleres til pH 5,7 og 9,5 suksessivt, idet det ekstraheres etter hver pH-regulering med 500 ml frisk etylacetat. Etylacetatekstrakten ved pH 9,5 tørres over natriumsulfat og konsentreres i vakuum til tørrhet, 130 g. 120 g av det gjenværende skum oppløses i en blanding av 1 liter vann og 1 liter metylenklorid. Det vandige lags pH reguleres suksessivt til 4,4, 4,9 og 9,4, idet det ekstraheres med 1 liter frisk metylenklorid etter hver regulering. Metylenkloridekstrakten ved pH 9,4 tørres over natriumsulfat og konsentreres under redusert trykk for å gi 32 g av produktet som et hvitt skum. Krystallisering fra 250 ml aceton-vann (1:1, volum:volum) gir 28,5 g av de krystallinske epimerer.

NMR 100 Mz (δ , CDCl_3): 5,20 (1H) m, 3,37 (1,5H) s, 3,34 (1,5H) s, 2,36 (6H) s, 1,66 (3H) s og 1,41 (3H) s.

Eksempel 7

Separering av epimerene av 4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A-6,9-hemiketal-11,12-karbonatester

På en høytrykk-væskekromatografi-kolonne (1,3 cm x 9 cm) pakket med Gf 254 silikagel som er impregnert med formamid og elueres med kloroform, tilføres 200 mg av en blanding av epimerene. Et trykk på $16,8 \text{ kg/cm}^2$ ved en hastighet på 4,76 ml pr. min., og en fraksjonsstørrelse på 10 ml anvendes. Fraksjonene 14 til 21 og 24 til 36 oppsamles.

Fraksjonene 14 til 21 samles og konsentreres til ca. 50 ml. Vann (50 ml) tilsettes, og pH reguleres til 9,0. Kloroformlaget fraskilles, tørres over natriumsulfat og konsentreres for å gi 106 mg

av et hvitt skum. Utgning med dietyleter bevirker at skummet krystalliserer. Etter omrøring ved romtemperatur i 1 time blir det krystallinske produkt filtrert og tørret, 31,7 mg, sm.p. 194-196°C.

NMR 100 Mz (δ , CDCl_3): 5,24 (1H) d, 5,00 (1H) t, 3,40 (3H) s, 2,40 (6H) s, 1,66 (3H) s og 1,40 (3H) s.

Fraksjonene 24 til 36 samles og opparbeides som beskrevet ovenfor for å gi 47,1 mg produkt som et hvitt skum, som er identisk med materialet fra eksempel 12.

Eksempel 8

Til en suspensjon av 11,1 g 2'-acetyl-4"-deoksy-4"-oksoerytromycin A-6,9-hemiketal-11,12-karbonateter i 300 ml isopropanol ved romtemperatur settes under omrøring 10,7 g ammoniumacetat. Etter 5 minutter tilsettes 747 mg natriumcyanoborhydrid i 130 ml isopropanol over en periode på 30 minutter, og den resulterende reaksjonsblanding omrøres ved romtemperatur natten over. Den blekgule oppløsning helles i 1100 ml vann hvortil det derefter settes 400 ml dietyleter. pH reguleres til 4,5, og eterlaget fraskilles. Det vandige lag gjøres basisk til pH 9,5 og ekstraheres (2 x 500 ml) med kloroform. Kloroformekstraktene samles, tørres over natriumsulfat og konsentreres for å gi 7,5 g av et gult skum. Omkrystallisering av det gjenværende materiale fra dietyleter gir 1,69 g som beholdes sammen med moderluten.

Moderluten behandles med 75 ml vann, og pH reguleres til 5,0. Eterlaget erstattes med 75 ml frisk eter, og pH reguleres til 5,4. Eterlaget erstattes med etylacetat, og pH heves til 10. Det basiske, vandige lag ekstraheres med etylacetat (2 x 75 ml), og den første etylacetatekstrakt tørres over natriumsulfat og konsentreres til tørrhet. Det gjenværende skum (1,96 g) settes til en blanding av 75 ml vann og 50 ml dietyleter, og pH reguleres til 5,05. Eteren fraskilles, og det vandige lag reguleres suksessivt til pH 5,4, 6,0, 7,05 og 8,0, idet ekstraksjon foretas etter hver pH-regulering med 50 ml frisk dietyleter. pH reguleres til slutt til 9,7, og det vandige lag ekstraheres med 50 ml etylacetat. Eterekstrakten fra pH 6,0 blandes med 75 ml vann, og pH reguleres til 9,7. Eterlaget fraskilles, tørres og konsentreres i vakuum for å gi 460 mg av et hvitt skum.

NMR 100 Mz (δ , CDCl_3): 5,20 (1H) t, 3,43 (2H) s, 3,40 (1H) s, 2,38 (6H) s, 2,16 (3H) s, 1,70 (3H) s og 1,54 (3H).

NMR-dataene viser at produktet er epimerer av 2'-acetyl-4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A-6,9-hemiketal-11,12-karbonat-ester.

Den ovenfor angitte mengde på 1,69 g restprodukt oppløses i en blanding av 75 ml vann og 75 ml dietyleter, og pH reguleres til 4,7. Eteren fraskilles, og det vandige lag ekstraheres videre med frisk eter (75 ml) ved pH 5,05 og 5,4, og med etylacetat (2 x 75 ml) ved pH 9,7. De samlede etylacetatekstrakter tørres over natriumsulfat og konsentreres under redusert trykk for å gi 1,26 g hvitt skum. Krystallisering av dette gjenværende materiale gir 411 mg produkt, sm.p. 193-196°C (spaltning). Moderluten konsentreres til tørrhet, og residuet oppløses i varm etylacetat. Oppløsningen får stå natten over ved romtemperatur. De krystallinske, faste stoffer som utfelles, filtreres og tørres, 182 mg, sm.p. 198-202°C (spaltning) for å gi ytterligere produkt. NMR 100 Mz (δ , CDCl₃): 5,10 (1H) t, 3,34 (2H) s, 3,30 (1H) s, 2,30 (6H) s, 2,08 (3H) s, 1,62 (3H) s og 1,48 (3H) s.

NMR-dataene viser at produktet er epimerene av 2'-acetyl-4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A-11,12-karbonat-ester.

På tilsvarende måte, når eksempel 8 gjentas, ved å starte med 2'-propionyl-4"-deoksy-4"-okso-erytromycin A-6,9-hemiketal-11,12-karbonat-ester, oppnår man 2'-propionyl-4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A-6,9-hemiketal-11,12-karbonat-ester og 2'-propionyl-4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A-11,12-karbonat-ester.

Eksempel 9

En oppløsning av 400 mg 2'-acetyl-4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A-6,9-hemiketal-11,12-karbonat-ester i 20 ml metanol omrøres natten over ved romtemperatur. Reaksjonsoppløsningen nelles i 100 ml vann, fulgt av tilsetning av 50 ml etylacetat. pH reguleres til 9,5, og den organiske fase fraskilles. Ekstraksjonen gjentas igjen med 50 ml frisk etylacetat. De samlede etylacetatekstrakter tørres over natriumsulfat og konsentreres for å gi 392 mg av et hvitt skum. Utgnidning med dietyleter og skrapning med en glasstav medfører krystallisasjon. Etter henstand ved romtemperatur i 30 minutter filtreres de krystallinske, faste stoffer og tørres, 123 mg, og moderluten beholdes. Produktet er identisk ved NMR med materialet fremstilt i eksempel 11.

NMR 100 Mz (δ , CDCl₃): 3,26 (3H) s, 2,32 (6H) s, 1,61 (3H) s og 1,44 (3H) s.

NMR-dataene viser at det krystallinske produkt er en enkel epimer av 4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A-11,12-karbonateter.

Den oppbevarte moderlut konsentreres i vakuum for å gi 244 mg av et hvitt skum.

Produktet er identisk med materialet fra eksempel 6.

NMR-dataene viser at dette produkt er en blanding av epimerene av 4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A-6,9-hemiketal-11,12-karbonateter og er identisk med produktet ifølge eksempel 6.

Eksempel 10

Ved en fremgangsmåte lik den som er beskrevet i eksempel 9 gir metanolyse av 2'-propionyl-4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A-6,9-hemiketal-11,12-karbonateter, 4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A-11,12-karbonateter og 4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A-6,9-hemiketal-11,12-karbonateter.

Eksempel 11

8 g av den epimere blanding av 4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A-11,12-karbonateter fra det ikke-krystallinske produkt fra eksempel 19 oppløses i 50 ml dietyleter. Produktet bringes til å krystallisere ved skrapning med en glasstav. Etter 20 minutters omrøring blir det krystallinske produkt filtrert og tørret, 1,91 g, sm.p. 198,5-200°C.

NMR 100 Mz (δ , CDCl₃): 3,26 (3H) s, 2,30 (6H) s, 1,61 (3H) s og 1,45 (3H) s.

NMR-dataene viser at det krystallinske produkt er en enkel epimer av 4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A-11,12-karbonateter og er identisk med ketonproduktet fra eksempel 9.

Eksempel 12

1 g av epimeren fra eksempel 11 oppløses i 20 ml aceton og oppvarmes ved dampbad-temperaturer inntil kokepunktet nås. Vann (25 ml) tilsettes, og den resulterende oppløsning omrøres ved romtemperatur. Etter 1 times omrøring blir det dannede bunnfall filtrert og tørret for å gi 581 mg, sm.p. 147-149°C.

NMR 100 Mz (δ , CDCl₃): 5,12 (1H) d, 3,30 (3H) s, 2,30 (6H) s, 1,62 (3H) s og 1,36 (3H) s.

NMR-dataene viser at produktet er en enkel epimer av 4"-deoksy-4"-amino-erytromycin A-6,9-hemiketal-11,12-karbonateter og er identisk med epimeren i fraksjonene 24-36 i eksempel 7.

Eksempel 134"-deoksy-4"-amino-erytromycin A

20 g 4"-deoksy-4"-okso-erytromycin A, 31,6 g ammoniumacetat og 10 g 10% palladium-på-trekull i 200 ml metanol ristes ved omgivelsestemperatur i en hydrogenatmosfære med et opprinnelig trykk på $3,5 \text{ kg/cm}^2$ natten over. Den brukte katalysator filtreres, og filtratet konsentreres til tørrhet i vakuum. Residuet fordeles mellom vann-kloroform ved pH 5,5. Det vandige lag fraskilles, pH reguleres til 9,6, og kloroform tilsettes. Det organiske lag fraskilles, tørres over natriumsulfat og konsentreres under redusert trykk til tørrhet. Det gjenværende, hvite skum (19 g) utgnes med 150 ml dietyleter ved romtemperatur i 30 minutter. De resulterende faste stoffer filtreres og tørres for å gi 9,45 g av en enkel epimer som ikke kan skjernes fra den som ble fremstilt i eksempel 4.

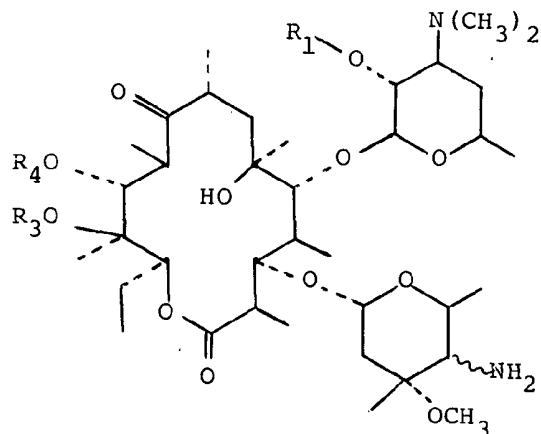
Dietyleter-filtratet konsentreres til tørrhet for å gi 6,89 g produkt bestående av den annen epimer pluss noen forurensninger.

Eksempel 144"-deoksy-4"-amino-erytromycin A

2 g 4"-deoksy-4"-okso-erytromycin A, 3,1 g ammoniumacetat og 2,0 g Raney-nikkel i 50 ml metanol ristes ved romtemperatur i en hydrogenatmosfære ved et opprinnelig trykk på $3,5 \text{ kg/cm}^2$ natten over. Ytterligere 3,16 g ammoniumacetat og 2,0 g Raney-nikkel tilsettes, og hydrogeneringen fortsettes i ytterligere 5 timer. De faste stoffer frafiltreres, og filtratet konsentreres til tørrhet i vakuum. Residuet settes under omrøring til en blanding av vann og kloroform, og pH reguleres fra 6,4 til 5,5. Den vandige fase fraskilles, pH reguleres til 9,6, og frisk kloroform tilsettes. Kloroformekstrakten fraskilles, tørres over natriumsulfat og konsentreres under redusert trykk for å gi 1,02 g av produktet som et gult skum. Den dominerende isomer har den motsatte konfigurasjon ved 4" i forhold til forbindelsen ifølge eksempel 4 .

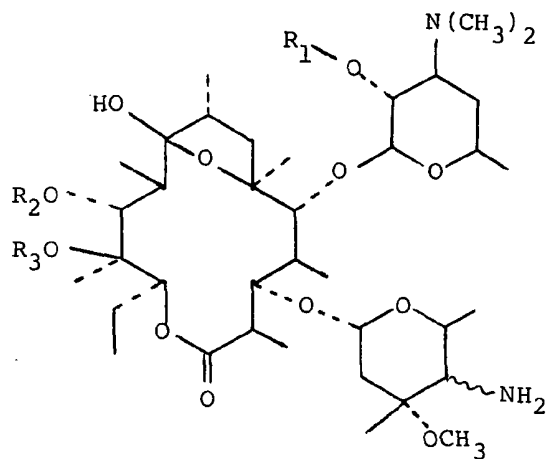
Patentkrav

1. Analogifremgangsmåte for fremstilling av antibakterielle 4"-amino-epimere forbindelser med formelen:



IV

eller formelen



III

og farmasøytisk godtagbare syreaddisjonssalter derav, hvor

R_1 er hydrogen eller alkanoyl med fra 2 til 3 karbonatomer;

R_2 er alkanoyl med fra 2 til 3 karbonatomer;

R_3 er hydrogen; R_4 er hydrogen; eller R_2 og R_3 sammen er -C- ,

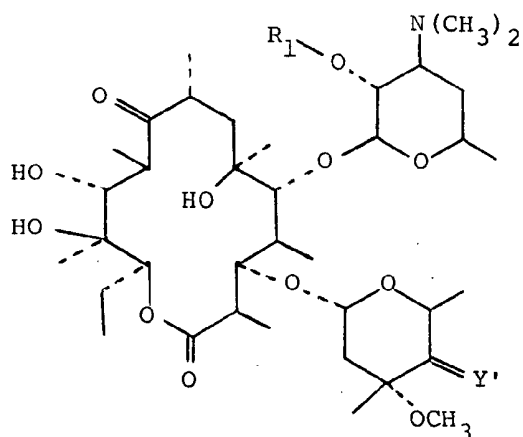


og R_3 og R_4 sammen er -C- , karakterisert ved at



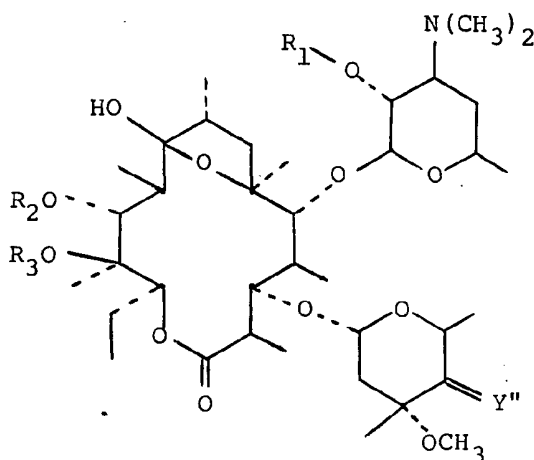
en forbindelse med formelen:

145472



IV'

eller formelen



III'

hvor R_1 , R_2 og R_3 er som foran angitt,

og Y' er NH, N-OH eller N-OCOCH₃; og Y'' er NH reduseres, og hvor

(a) når Y'' er NH og Y' er NH, N-OH eller N-OCOCH₃, foretas reduksjonen ved katalytisk hydrogenering, og

(b) når Y' eller Y'' er NH, dannet in situ fra ketonene svarende til forbindelsene med formlene III' og IV' hvor henholdsvis Y'' og Y' er O, ved kondensasjon av ketonet med et ammoniums salt av en alkansyre, foretas reduksjonen ved en hydridreduksjon, og eventuelt,

(c) når R_1 er hydrogen, omdannes den til alkanoyl eller når R_1 er alkanoyl, omdannes den til hydrogen;

(d) idet en fremstilt forbindelse med formel III hvor R_2 og R_3 sammen er $-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-$ eventuelt omdannes til en forbindelse

med formel IV hvor R_3 og R_4 sammen er $-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-$;

(e) de farmasøytisk godtagbare syreaddisjonssalter dannes.

2. Fremgangsmåte som angitt i krav 1 for fremstilling av 4"- α - og - β -epimerene med formel III hvor R_1 er hydrogen, og R_2 og R_3 sammen er $-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-$, k a r a k t e r i s e r t v e d

at det anvendes et utgangsmateriale med formel III' hvor R_1 , R_2 og R_3 har de i ingressen angitte betydninger, eller R_1 betyr alkanoyl som omdannes til hydrogen.

3. Fremgangsmåte som angitt i krav 1 for fremstilling av 4"- α - og - β -epimerene med formel IV hvor R_1 , R_3 og R_4 hver er hydrogen, k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes utgangsmaterialer med formel IV' hvor R_1 er hydrogen, eller R_1 er alkanoyl som omdannes til hydrogen.

4. Fremgangsmåte som angitt i krav 1 for fremstilling av 4"- α - og - β -epimerene med formel IV hvor R_1 er hydrogen, og R_3 og R_4 sammen er $-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-$, k a r a k t e r i s e r t v e d

omdannelse av en forbindelse med formel III hvor R_1 er hydrogen eller betyr alkanoyl som omdannes til hydrogen, og R_2 og R_3 sammen er $-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-$.