

CHEMISCHE BERICHTE

FORTSETZUNG DER
BERICHTE DER DEUTSCHEN CHEMISCHEN GESELLSCHAFT

HERAUSGEGEBEN VON DER
GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

114. JAHRGANG · HEFT 3 · SEITE 837–1216

Bausteine von Oligosacchariden, XXV¹⁾

Selektiver Abbau von Sisomicin zu Sisamin

*Hans Paulsen**, *Rolf Jansen* und *Peter Stadler*^{a)}

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Hamburg,
Martin-Luther-King-Platz 6, D-2000 Hamburg 13

Eingegangen am 23. Juni 1980

Periodatoxidation von 1,2',3,6'-Tetra-*N*-acetylsisomicin (**2**) liefert in hohen Ausbeuten direkt Tetra-*N*-acetylsisamin (**16**). Bei der Periodatspaltung von **1** und **3** zu **14** und **17** ist ein zusätzlicher *Barry*-Abbau zweckmäßig.

Building Units for Oligosaccharides, XXV¹⁾

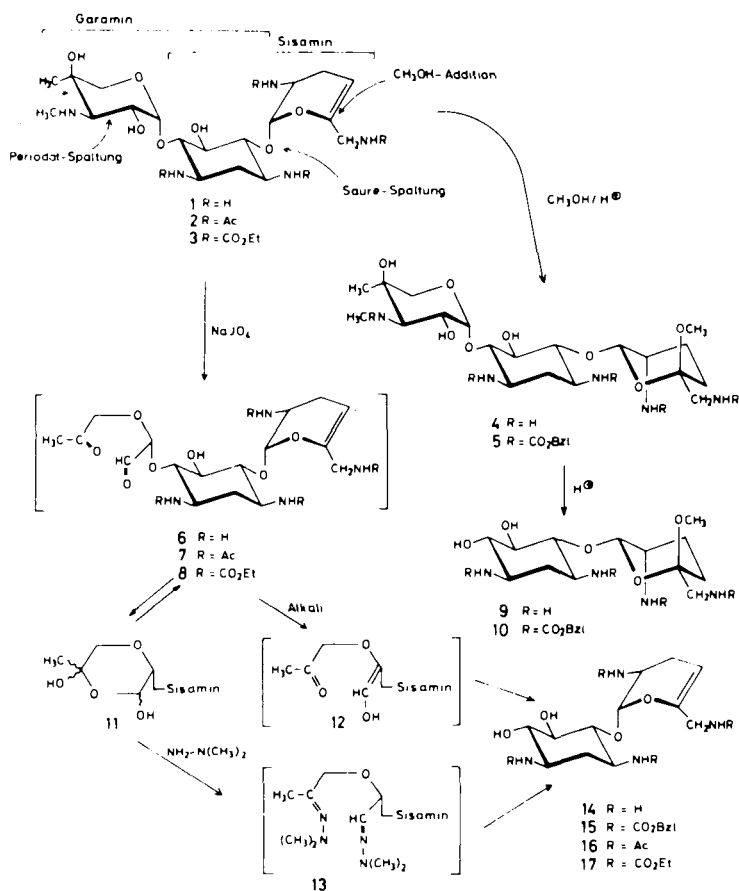
Selective Degradation of Sisomicin to Sisamine

Periodate oxidation of 1,2',3,6'-tetra-*N*-acetylsisomicin (**2**) directly leads in high yield to tetra-*N*-acetylsisamine (**16**). At periodate splitting of **1** and **3** to **14** and **17** additional *Barry*-degradation seems to be favourable.

Sisomicin²⁾ ist neben den Kanamycinen³⁾ und Gentamicinen⁴⁾ eines der wirksamsten Aminoglycosid-Antibiotika, das wegen seiner breiten antimikrobiellen Aktivität Anwendung findet. Untersuchungen zur chemischen Modifizierung dieser Antibiotika sind in vielfältiger Form vorgenommen worden, um das Wirkungsspektrum noch zu erweitern und die Toxizität zu vermindern³⁾. Zur Modifizierung des Sisomicins (**1**) wäre es sehr wünschenswert, Garosamin selektiv von **1** abzuspalten, um so zum Sisamin (**14**) zu gelangen. Bei der sauren Hydrolyse von Sisomicin (**1**) oder dessen Derivaten wird jedoch primär die labile Glycosidbindung zum ungesättigten Saccharidbaustein gespalten. Das Produkt der sauren Hydrolyse von **1** bzw. dessen *N*-substituierten Verbindun-

^{a)} Neue Anschrift: Wissenschaftliches Hauptlaboratorium, Bayer AG, D-5090 Leverkusen-Bayerwerk.

gen ergibt somit stets Garamin bzw. dessen Derivate⁵⁾. Das Sisamin (**14**) ist auf diesem Wege nicht zu gewinnen. Wir geben jetzt eine Methode an, nach der Sisamin durch selektiven Periodat-Abbau des Sisomicins (**1**) in guten Ausbeuten erhalten werden kann.



Zunächst hatten wir die Methanolyse von unblockiertem Sisomicin (**1**) mit Methanol/Salzsäure untersucht, um zu prüfen, ob die Spaltungssequenz des protonierten Sisomicins unter diesen Bedingungen einen anderen Verlauf nimmt. Mit konzentrierter methanolischer Salzsäure bildet sich jedoch bei Raumtemperatur zu 85% das Methanol-Addukt **4**. Methanol wird stereoselektiv von oben an die Doppelbindung der ungesättigten 2,6-Diamino-Zucker-Einheit angelagert. Ein sorgfältiger Vergleich der ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektren zeigt, daß **4** übereinstimmt mit der Substanz, die *Kugelman et al.*⁶⁾ bereits bei ihren Hydrolyse-Versuchen als Nebenprodukt isoliert hatten. Das Addukt **4** ließ sich in eine Pentakis-*N*-benzyloxycarbonyl-Verbindung **5** überführen, deren Daten mit der angegebenen Struktur übereinstimmen. Die glycosidische Bindung der 2,6-Diamino-Zucker-Einheit ist in **4** gegenüber **1** stabilisiert. Dieses zeigt

die weitere saure Methanolyse von **4**. Hierbei wird ein Gemisch erhalten, aus dem sich 24% des Methanol-Adduktes **9** von Sisamin neben 19% 2-Desoxystreptamin, 2% Garamin und 31% des Ausgangsproduktes **4** isolieren ließen. Die Struktur von **9** ließ sich durch Vergleich des ^{13}C -NMR-Spektrums mit dem von **4** sicherstellen. Ferner bildet **9** eine Tetrakis-*N*-benzyloxycarbonyl-Verbindung **10**.

Sehr viel günstiger als die Methanolyse verläuft die Periodatspaltung⁷⁾ des Sisomicins. Wie an Formel **1** gezeigt wird, kann Periodat nur zwei Bindungen des Garosamin-Teiles im Sisomicin angreifen. Die Periodatspaltung von **1** führt zu Dicarbonylverbindungen vom Typ **6**, die mit verschiedenen Hemialdal-Formen⁸⁾ im Gleichgewicht stehen. Eine dieser Gleichgewichtsformen ist in **11** wiedergegeben. Da die vollständige Abspaltung des Garosamin-Fragmentes von **6** unter sauren und alkalischen Bedingungen unübersichtlich verlief, wurde ein *Barry*-Abbau⁹⁾ des Oxidationsproduktes durchgeführt. Dazu wurde **6** mit *N,N*-Dimethylhydrazin¹⁰⁾ in verdünnter Essigsäure umgesetzt. Das Zwischenprodukt **13** zerfällt dann unter Osazon-Bildung und Freisetzung von Sisamin **14**. Zur weiteren Charakterisierung wurde **14** in die Tetrakis-*N*-benzyloxycarbonyl-Verbindung **15** übergeführt.

Mit hoher Ausbeute von 71–78% lassen sich Derivate des Sisomicins, wie die Tetra-*N*-acetyl- und die Tetrakis-*N*-ethoxycarbonyl-Verbindungen¹¹⁾ **2** und **3** durch Periodat-Oxidation abbauen. Beim Acetat **2** ist das Produkt **7** sehr labil und zerfällt unter den schwach alkalischen Bedingungen, vermutlich über das Enolat **12**⁸⁾, unmittelbar unter Freisetzung des Sisamin-Derivates **16**. Dies ist der einfachste Weg, um in hohen Ausbeuten zum Sisamin zu gelangen. Beim Derivat **3** zerfällt das Oxidations-Produkt **8** nur teilweise. Zur vollständigen Reaktion ist auch hier der *Barry*-Abbau⁹⁾ über **13** notwendig, der das Sisamin-Derivat **17** liefert. Damit stehen jetzt Sisamin-Derivate zur Darstellung modifizierter Sisomicine durch Resynthese zur Verfügung. Das freie Sisamin **14** selbst ist am günstigsten durch Entblockierung des *N*-Acetats **16** mit 50proz. $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung zu gewinnen.

Der Firma *Bayer AG*, Leverkusen, danken wir sehr für die Hilfe bei den Untersuchungen. Der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* sind wir für die Förderung des Projektes zu Dank verpflichtet.

Experimenteller Teil

Alle Reaktionen wurden dünn-schichtchromatographisch auf Kieselgel-Fertigfolien GF₂₅₄ (Merck) verfolgt. Anfärbung mit 2proz. ethanolischer Naphthoresorcinlösung/2*N* H_2SO_4 (1:1) oder ethanolischer Ninhydrinlösung. – Säulenchromatographie: Kieselgel Hermann (0.15 bis 0.3 mesh). – Optische Drehungen: Perkin-Elmer-Polarimeter 241, 1-dm-Küvetten. – Schmelzpunkte: Leitz-Heiztischmikroskop (unkorrigiert). – NMR-Spektren: Perkin-Elmer R 32, Bruker WP 60, WH 270 und WP 80.

2-Desoxy-6-*O*-(3-desoxy-4-*C*-methyl-3-methylamino- β -*L*-arabinopyranosyl)-4-*O*-(2,6-diamino-2,3,4,6-tetradesoxy-5-methoxy- β -*L*-threo-hexopyranosyl)-*D*-streptamin · 5 *HCl* (4-*HCl*): 200 mg Sisomicin (**1**) werden in 2 ml absol. Methanol langsam mit methanol. Salzsäure (hergestellt aus Acetylchlorid/Methanol (1:2)) versetzt. Nach 4h bei Raumtemp. wird zur Trockene eingedampft. Das Rohprodukt wird aus Methanol mit Ether gefällt und i. Vak. bei 0.1 Torr getrocknet. Ausb. 295 mg (85%). $[\alpha]_{\text{D}} = +107.2^\circ$ ($c = 1$ in Methanol); Schmp. 148°C (Zers.).

¹H-NMR (90 MHz, D₂O): 1'-H δ = 5.44 d, 1''-H 5.14 d, 5'-O-CH₃ 3.42 s, 3''-N-CH₃ 2.96 s, 4''-CH₃ 1.38 s; $J_{1',2'} = 2.0$, $J_{1'',2''} = 3.7$ Hz.

C₂₀H₄₁N₅O₈ · 5 HCl · H₂O · CH₃OH (711.9) Ber. C 35.43 H 7.36 Cl 24.89 N 9.83
Gef. C 35.30 H 7.40 Cl 24.87 N 9.85

Das Hydrochlorid **4** gibt bei Behandlung mit Ionenaustauscher die von *Kugelmann*⁶⁾ beschriebene freie Base. Ferner wurde **4** nach Lit.⁶⁾ mit Chlorameisensäure-benzylester/Na₂CO₃ in die Pentakis-*N*-benzyloxycarbonyl-Verbindung **5** übergeführt. $[\alpha]_D^{23} = +77.1^\circ$ ($c = 1$ in Ethanol), Lit.⁶⁾: $[\alpha]_D = +77.2^\circ$ ($c = 1$ in Ethanol). Das ¹H-NMR-Spektrum stimmt mit dem in Lit.⁶⁾ beschriebenen überein.

2-Desoxy-4-O-(2,6-diamino-2,3,4,6-tetradesoxy-5-methoxy-β-D-threo-hexopyranosyl)-D-streptamin · 4 HCl (9-HCl): 3 g Sisomicin (**1**) als Sulfat werden in Wasser gelöst, mit konz. Bariumhydroxid-Lösung auf pH 9 eingestellt und zentrifugiert. Die klare Lösung wird mit verd. Salzsäure auf pH 6 eingestellt, eingedampft und wiederholt mit Toluol abgezogen. Der trockene Rückstand wird mit 1.5N methanol. HCl aufgenommen und 20h in einem fest geschlossenen Gefäß bei 55 °C aufbewahrt. Die gelbliche Lösung wird zur Trockene eingedampft, der Rückstand aus Methanol mit Chloroform umgefällt. Die ausgefallenen, polaren Produkte werden über eine Kieselgelsäule mit Chloroform/Methanol/Ammoniak (3:3:1) getrennt. Die Fraktionen werden entsprechend ihrer Zusammensetzung vereinigt, eingedampft und getrocknet. Die Rückstände werden in wasserfreiem Methanol aufgenommen, filtriert, mit methanol. Salzsäure angesäuert und erneut zur Trockene eingedampft. Ausb. 24% **9**, 31% **4**, 2% Caramin, 19% Desoxystreptamin (jeweils als Hydrochloride).

9: $[\alpha]_D = +28.8^\circ$ ($c = 1$ in Wasser). - ¹H-NMR (90 MHz, D₂O): 1'-H δ = 5.32, 5'-OCH₃ 3.42 s; $J_{1',2'} = 2$ Hz. - ¹³C-NMR (60 MHz, D₂O, innerer Standard Dioxan δ = 67.4): C-1 δ = 49.9, C-2 27.7, C-3 49.9, C-4 78.9, C-5 und C-6 71.9 und 74.5, C-1' 94.4, C-2' 46.9, C-3' 20.4, C-4' 23.2, C-5' 99.3, C-6' 41.6, 5'-OCH₃ 48.5.

9 wurde wie bei **4** angegeben mit Chlorameisensäure-benzylester in die Tetrakis-*N*-benzyloxycarbonyl-Verbindung **10** übergeführt. $[\alpha]_D = +39.8^\circ$ ($c = 1$ in Ethanol); Schmp. 81 - 83 °C. - ¹H-NMR (90 MHz, CDCl₃ + D₂O): Ph δ = 7.7 - 7.2 m, Ph - CH₂ 5.04 m, 5'-O-CH₃ 3.21 s.

C₄₅H₅₂N₄O₁₁ (856.9) Ber. C 63.07 H 6.11 N 6.53 Gef. C 62.79 H 6.08 N 6.33

2-Desoxy-4-O-(2,6-diamino-2,3,4,6-tetradesoxy-α-D-glycero-hex-4-enopyranosyl)streptamin = Sisamin (14)

a) 2.0 g (4.47 mmol) Sisomicin (**1**) in 20 ml Wasser werden nach Zugabe von 1 ml konz. Ammoniak bei 0°C unter Rühren langsam mit einer Lösung von 2.88 g (13.4 mmol) NaIO₄ in 40 ml Wasser versetzt. Nach 2h wird überschüssiges Periodat mit Ethanolamin vernichtet. Das Reaktionsgemisch wird i. Hochvak. zur Trockene eingedampft, der Rückstand mit Ethanol aufgerührt und nach 15 min filtriert. Das Filtrat wird zum Sirup eingeeengt, in 40 ml Wasser aufgenommen, mit 2.4 ml (1.9 g = 32 mmol) *N,N*-Dimethylhydrazin versetzt, mit Essigsäure auf pH 6 eingestellt und bei 40°C 16h aufbewahrt. Die braungelbe Lösung wird verdünnt und über sauren Ionenaustauscher (Amberlite IRC 50) gegeben. Aus dem gründlich neutral gewaschenen Ionenaustauscher werden die Produkte mit 2N Ammoniak eluiert. Das Eluat wird i. Hochvak. zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird säulenchromatographisch an 100 g Kieselgel-Hermann mit Chloroform/Methanol/konz. Ammoniak (1:1:1) und anschließend mit 3:3:1-Gemisch aufgetrennt. Die Fraktionen des Hauptproduktes werden vereinigt, eingeeengt und mit basischem Ionenaustauscher (Lewatit MP 500, OH⁻-Form) behandelt. Ausb. 330 mg (26%).

b) 1.0 g (2.2 mmol) Tetra-*N*-acetylsisamin (**16**) werden 4h in 50proz. Ba(OH)₂-Lösung unter Rückfluß erhitzt. Zur Aufarbeitung wird der Ansatz mit Wasser verdünnt, mit 2N H₂SO₄ auf pH 4.5 eingestellt und zentrifugiert. Die Lösung wird eingeeengt. Der Rückstand wird an 100 g Kiesel-

gel 60 (Merck) mit Chloroform/Methanol/Ammoniak (10:4:1) chromatographiert. Das Produkt wird mit basischem Ionenaustauscher (Lewatit MP 500, OH⁻-Form) behandelt und gefriergetrocknet. Ausb. 377 mg (56%). $[\alpha]_D^{20} = +116^\circ$ ($c = 0.5$ in Wasser); Schmp. 171–174°C.

¹H-NMR (270 MHz, D₂O, innerer Standard HOD $\delta = 4.67$): 1'-H $\delta = 5.18$ d, 2'-H 2.94 ddd, 3'a-H 2.06 dt, 3'b-H 1.83 m, 4'-H 4.73 m, 6'-H₂ 2.99 s, 1- und 3-H 2.69–2.49 m, 4-, 5- und 6-H 3.35–3.23 und 3.00 m, 2e-H 1.83 m, 2a-H 1.06 q, $J_{1',2'} = 2.2$, $J_{2',3'a} = 6.3$, $J_{2',3'b} = 10.2$, $J_{3'a,4'} = 4.9$, $J_{3'a,3'b} = 16.8$, $J_{2a,1+3+2e} \approx 12.6$ Hz. – ¹³C-NMR (80 MHz, D₂O, innerer Standard Dioxan $\delta = 67.4$): C-1 $\delta = 51.2$, C-2 36.6, C-3 50.3, C-4 85.8, C-5 77.0, C-6 78.3, C-1' 101.0, C-2' 47.4, C-3' 25.5, C-4' 96.7, C-5' 150.7, C-6' 43.3.

C₁₂H₂₄N₄O₄ · H₂O (306.4) Ber. C 47.04 H 8.56 N 18.29 Gef. C 46.68 H 8.57 N 18.06

1,3,2',6'-Tetrakis-*N*-(benzyloxycarbonyl)sisamin (15): 300 mg Sisamin (14) werden in Wasser mit 850 mg Chlorameisensäure-benzylester und 530 mg Na₂CO₃ 16h gerührt. Der Ansatz wird eingeeengt, mit Dioxan aufgenommen, filtriert und erneut zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird aus Pyridin/Methanol umkristallisiert. Ausb. 790 mg (92%), $[\alpha]_D = +61.5^\circ$ ($c = 1$ in Pyridin); Schmp. 244–246°C.

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]DMF, 120°C, innerer Standard DMF $\delta = 8.01$): 1'-H $\delta = 5.48$ d, 4'-H 4.70 m, 3'a-H 2.24 dt, 3'b-H und 2e-H 2.15 m, 2a-H 1.59 q, 4 NH 6.50–6.15 m, Ph 7.30 m, Ph-CH₂ 5.09; $J_{1',2'} = 2.5$, $J_{3'a,3'b} = 12.8$, $J_{3'a,4'} = J_{3'a,2'} = 3.9$, $J_{2a,1,3,2e} = 12.0$ Hz.

C₄₄H₄₈N₄O₁₂ (824.9) Ber. C 64.06 H 5.86 N 6.79 Gef. C 63.89 H 5.87 N 6.79

1,3,2',6'-Tetra-*N*-acetylsisamin (16): Eine Lösung von 3.0 g (4.9 mmol) 1,3,2',6'-Tetra-*N*-acetylsisomicin (2)¹¹ in 30 ml Wasser wird mit 3 ml konz. Ammoniak versetzt und unter Rühren langsam mit 3.12 g (14.7 mmol) NaIO₄ in 45 ml Wasser umgesetzt. Nach 1.5h wird das Reaktionsgemisch i. Hochvak. zur Trockene eingedampft. Der feste Rückstand wird mit 40 ml Ethanol aufgerührt, mit 40 ml Chloroform verrührt und nach ca. 15 min filtriert. Das Filtrat wird i. Vak. eingeeengt. Aus der konz. Lösung kristallisieren 1.16 g, in zwei weiteren Schritten zusätzlich 0.56 g (77.5%). Umkristallisation aus Ethanol/Ether. $[\alpha]_D^{20} = +170^\circ$ ($c = 1$ in Methanol), Schmp. 238–242°C.

¹H-NMR (90 MHz, D₂O): 1'-H $\delta = 5.47$ d, 4'-H 4.88 m, 6'-H₂ 3.79 s, 4 N-Ac ca. 2.00; $J_{1',2'} = 2.1$ Hz.

C₂₀H₃₂N₄O₈ (456.5) Ber. C 52.61 H 7.07 N 12.27 Gef. C 52.42 H 7.19 N 11.97

1,3,2',6'-Tetrakis-*N*-(ethoxycarbonyl)sisamin (17): Zu einer Lösung von 950 mg (1.3 mmol) 1,3,2',6'-Tetrakis-*N*-(ethoxycarbonyl)sisomicin (3)¹¹ in 15 ml Methanol und 1 ml konz. Ammoniak werden unter Rühren bei 0°C langsam 0.83 g (3.9 mmol) NaIO₄ in 10 ml Wasser getropft. Nach Entfernen der Kühlung wird 1h bei Raumtemp. gerührt und anschließend i. Hochvak. eingedampft. Der Rückstand wird in 30 ml Methanol aufgerührt, mit 30 ml Ethanol versetzt, gerührt und dann filtriert. Der Rückstand wird mit Ethanol gewaschen. Das Filtrat wird mit basischem Ionenaustauscher behandelt (Amberlite IRA 400) und zum Sirup eingeeengt. Der Sirup wird mit 40 ml Methanol aufgenommen, mit 0.89 ml (0.7 g = 11.6 mmol) *N,N*-Dimethylhydrazin versetzt, mit Essigsäure auf pH 6.5 eingestellt und bei 40°C über Nacht aufbewahrt. Die braungelbe Lösung wird mit Wasser verdünnt, mit Natriumcarbonat neutralisiert und i. Vak. zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird mit Chloroform aufgerührt und mit Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wird mit wenig Methanol aufgenommen, mit Ether verdünnt und nach Zugabe von Petrolether bei –20°C kristallisiert. Ausb. 530 mg (71%). Zur Charakterisierung wird aus Methanol/Ether mit Petrolether umkristallisiert. $[\alpha]_D^{23} = +107^\circ$ ($c = 1$ in Methanol); Schmp. 213–215°C.

¹H-NMR (270 MHz, [D₆]DMF, 120°C, innerer Standard DMF $\delta = 8.01$): 1'-H $\delta = 5.44$ d, 4'-H 4.73 m, 3'a-H 2.22 dt, 3'b-H und 2e-H 2.13 m, 2a-H 1.46 q, 4 NH 6.30–5.90 m, 4 CH₂ 4.04 m, 4 CH₃ 1.19 m; $J_{1',2'} = 2.4$, $J_{3'a,3'b} = 12.8$, $J_{3'a,4'} = J_{3'a,2'} = 4.0$, $J_{2a,2e} = 12.0$ Hz.

- ¹⁾ XXIV. Mitteil.: *H. Paulsen* und *A. Bünsch*, *Angew. Chem.* **92**, 929 (1980); *Angew. Chem.*, Int. Ed. Engl. **19**, 902 (1980).
- ²⁾ *H. Reimann*, *D. J. Cooper*, *A. K. Mallams*, *R. S. Jaret*, *A. Yehashel*, *M. Kugelman*, *H. F. Vernay* und *D. Schumacher*, *J. Org. Chem.* **39**, 1451 (1974).
- ³⁾ *S. Umezawa*, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **30**, 111 (1974).
- ⁴⁾ *M. J. Weinstein*, *G. M. Luedemann*, *E. M. Oden*, *G. H. Wagmann*, *J. P. Rosselet*, *J. A. Marquez*, *C. T. Coniglio*, *W. Charney*, *H. L. Herzog* und *J. Black*, *J. Med. Chem.* **6**, 463 (1963).
- ⁵⁾ *D. J. Cooper*, *R. S. Jaret* und *H. Reimann*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1971**, 285.
- ⁶⁾ *M. Kugelman*, *A. K. Mallams*, *H. F. Vernay*, *D. F. Crowe* und *M. Tanabe*, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1976**, 1088.
- ⁷⁾ *B. Lindberg*, *J. Lönngren* und *S. Svanson*, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **31**, 200 (1975).
- ⁸⁾ *R. D. Guthrie*, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **16**, 105 (1961).
- ⁹⁾ *P. S. O'Colla*, *Methods Carbohydr. Chem. Biochem.* **5**, 382 (1965).
- ¹⁰⁾ *J. Le Cocq* und *C. E. Ballou*, *Biochemistry* **3**, 976 (1964).
- ¹¹⁾ *E. Voss*, *P. Stadler*, *U. Petersen* und *H.-J. Kabbe*, DOS 27 26 197 (10. 6. 1977).

[200/80]