

SYNTHESE EINES ANTIBIOTISCH AKTIVEN DISACCHARIDS*

OSWALD LOCKHOFF, PETER STADLER, UWE PETERSEN

Zentralbereich Forschung und Entwicklung, Bayer AG, D-5090 Leverkusen (Bundesrepublik Deutschland)

UND RAINER ENDERMANN

Institut für Chemotherapie, Bayer AG, D-5600 Wuppertal (Bundesrepublik Deutschland)

(Eingegangen am 25. Juni 1982; angenommen am 8. September 1982)

ABSTRACT

The aminodisaccharide glycoside methyl 2,4-diamino-2,4-dideoxy-6-*O*-(2,6-diamino-2,6-dideoxy- α -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (**4**), which exhibits a structural resemblance to neamine, was synthesized *via* the azido method. Starting from 6-*O*-acetyl-2-azido-3,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy- α -D-glucopyranosyl bromide, the α -D-glycosylation of O-6 of methyl 2,4-diazido-3-*O*-benzyl-2,4-dideoxy- β -D-glucopyranoside was accomplished stereoselectively at low temperatures in the presence of mercury bromide. Against some gram-negative test-organisms, the activity of **4** was found to be in the same range as neamine, but directed against different germs.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Aminodisaccharidglycosid Methyl-2,4-diamino-2,4-dideoxy-6-*O*-(2,6-diamino-2,6-dideoxy- α -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosid (**4**), das strukturelle Verwandtschaft zu Neamin aufweist, wurde nach dem Azid-Verfahren synthetisiert. Von 6-*O*-Acetyl-2-azido-3,4-di-*O*-benzyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosylbromid ausgehend, wurde die α -D-Glycosylierung der OH-6-Gruppe von Methyl-2,4-diazido-3-*O*-benzyl-2,4-dideoxy- β -D-glucopyranosid stereoselektiv bei tiefen Temperaturen in Gegenwart von Quecksilberbromid durchgeführt. Gegenüber Gramnegativen Testorganismen zeigte **4** eine mit Neamin vergleichbare Wirkhöhe bei gleichzeitiger Verschiebung des Wirkspektrums.

EINLEITUNG

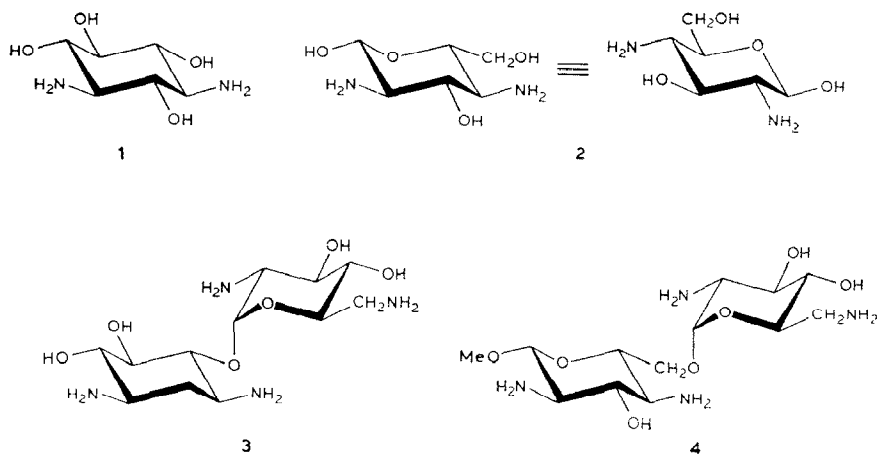
Aminoglycosidantibiotika sind gekennzeichnet durch Aminocyclitolringe, die mit einem oder zwei Aminozyuckerresten glycosidisch verbunden sind^{1,2}. Bis in jüngster Zeit sind diese Kohlenhydratreste in vielfältiger Weise modifiziert worden^{2,3}, seltener jedoch der Cyclitolring. Auf unserer Suche nach neuen antibakteriell wirk-

*Professor Dr. Otto Bayer in memoriam.

samen Verbindungen planen wir, den Streptaminteil durch einen Saccharidrest zu ersetzen. Untersuchungen dieser Art können z.B. bedeutsam sein für eine Verbesserung der therapeutischen Breite von Aminoglycosidantibiotika.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

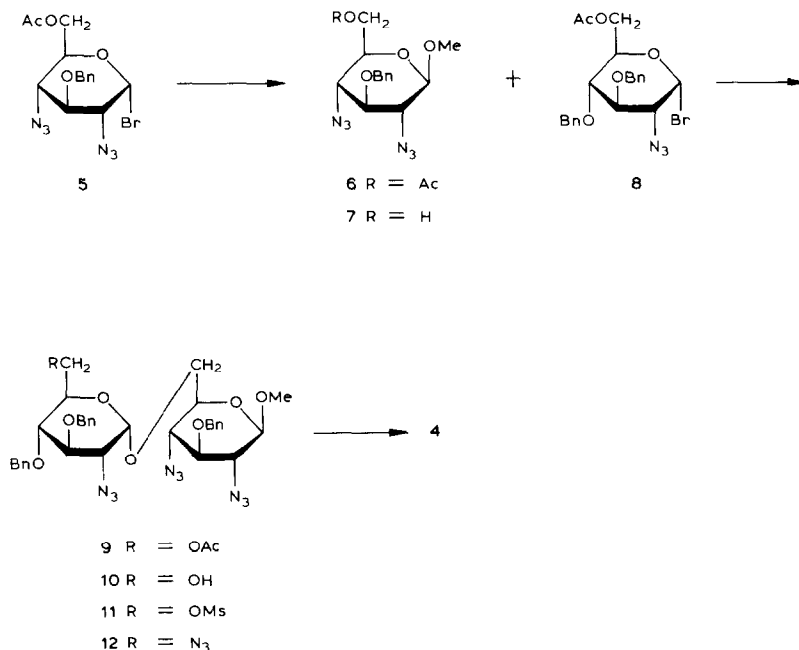
Ausgangspunkt unserer Überlegungen war die strukturelle Verwandtschaft des Streptamins (**1**) mit 2,4-Diamino-2,4-dideoxy- β -D-glucopyranose (**2**). In beiden Molekülen sind die Aminogruppen 1,3-diequatorial angeordnet, auch die anderen Substituenten stehen in equatorialen Positionen. Das C-5 Hydroxymethinelement im Streptamin ist im Pyranosering des Zuckers durch den Ringsauerstoff ersetzt.



Da Streptamin (**1**) oder 2-Desoxystreptamin nicht antibiotisch wirksam sind und diese Aktivität erst durch die Substitution mit einem anderen Saccharidrest erhalten wird, sollte auch der Diaminodideoxyzucker **2** glycosidisch mit einer zweiten Saccharideinheit verbunden werden. In struktureller Analogie zum antibiotisch aktiven Neamin (**3**) planen wir, die OH-6-Gruppe des Methyl-2,4-diamino-2,4-dideoxy- β -D-glucopyranosids mit 2,6-Diamino-2,6-dideoxy-D-glucopyranose α -glycosidisch zu verknüpfen. Die Synthese von **4** sollte sich nach der Azid-Methode durchführen lassen^{4,5}.

Die Koenigs-Knorr Synthese des Glycopyranosylbromids⁵ **5** mit Methanol und Silbercarbonat liefert das Methyl- β -D-glucosid **6** mit all-equatorialer Position der Substituenten am Pyranosering. Durch die Fixierung des Pyranosering in Form des Methyl- β -D-glucosids soll auch eine Cyclisierung der später freizusetzenden 4-Aminogruppe mit CHO-I ausgeschlossen werden⁶.

Durch Verseifung der Ac-6 wird das Glucosid **7** mit freier OH-6-Gruppe erhalten. Primäre Hydroxylgruppen sind bei Glycosidsynthesen am reaktionsfähigsten, so daß man bei Verwendung reaktiver Glycosylhalogenide vorteilhaft die β -D-Glycopyranosylhalogenide zur Darstellung von α -(1 $\rightarrow$ 6) verknüpften Disacchariden



einsetzt⁷. Wie wir fanden, läßt sich die gewünschte α -(1 $\rightarrow$ 6)-Disaccharidsynthese auch direkt mit dem α -D-Halogenid **8** durchführen. Voraussetzung dafür ist, daß Quecksilber-(II)-bromid als Katalysator verwendet wird und die Reaktionstemperatur auf -40° gesenkt wird⁸. Unter diesen Bedingungen entsteht das α -D-glycosidisch verbundene Disaccharid **9** mit hoher Stereoselektivität. Die Bildung des entsprechenden β -D-verknüpften Disaccharids ist dünnschichtchromatographisch und ^1H -N.m.r.-spektroskopisch nicht nachzuweisen.

Zur Einführung der vierten Azidofunktion in die 6'-Stellung des Disaccharids wird die Ac-6'-Gruppe in **9** verseift zum Derivat **10**, das dann zum 6'-Mesylat **11** umgesetzt wird. Der Austausch des Sulfonatrestes gegen die Azidogruppe ergibt das blockierte Tetraazidotetradesoxydisaccharid **12**.

Die Spaltung der Benzylether und die Reduktion der Azidogruppen zu Aminogruppen unter verschiedenen Bedingungen der katalytischen oder Transfer-Hydrierung erwies sich als problematisch, da die Reaktionen uneinheitlich verlaufen und das freie Disaccharidglycosid **4** nur in untergeordnetem Maße entsteht. In flüssigem Ammoniak kann **12** jedoch durch Behandlung mit Natrium⁹ in nahezu einheitlicher Reaktion zum Tetraaminotetradesoxydisaccharid **4** reduziert werden. Verbindung **4** wird durch Chromatographie an Kieselgel und basischem Austauscherharz als freie Base isoliert.

Die antibakterielle Aktivität von **4** wurde im Vergleich zu Neamin und Sisomicin gegen einige gramnegative Keime der Gattungen *Escherichia coli*, *Klebsiella* und *Pseudomonas* getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle I dargestellt. Im Agardiffusionstest zeigte **4** eine schwache Aktivität. Zwei der getesteten Keime wurden in ihrem

TABELLE I

ANTIBAKTERIELLE AKTIVITÄT VON **4**, NEAMIN · TETRAHYDROCHLORID UND SISOMICIN IM AGARDIFFUSIONSTEST^a

Verbindung	Konz. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Hemmhof					
		Klebs. 63	Klebs. 57 USA	E. Coli Neum.	E. Coli 14	Psdm. W	Psdm. Ellsw.
4	1000	0	18	0	0	0	14
	500	0	12	0	0	0	11
	25	0	0	0	0	0	0
	12,5	0	0	0	0	0	0
Neamin · 4HCl	1000	22	0	21	20	0	14
	500	20	0	19	18	0	11
	25	0	0	0	0	0	0
	12,5	0	0	0	0	0	0
Sisomicin	1000	33	39	30	32	40	42
	500	32	38	29	30	39	41
	25	24	30	22	22	28	31
	12,5	21	27	20	19	25	28

^aDurchmesser in mm.

Wachstum bei einer Konzentration von $\leq 500 \mu\text{g}/\text{mL}$ gehemmt, andere Keime wurden nicht beeinflusst. Neamintetrahydrochlorid zeigte eine mit **4** vergleichbare Wirkhöhe in diesen Konzentrationsbereichen. Interessant erscheint die Verschiebung des Wirkspektrums von **4** im Vergleich zu Neamin. Zwei der sechs Keime (*Pseudomonas W* und *Ellsw.*) reagierten ähnlich gegen Neamin und das Disaccharid **4**, vier verhielten sich unterschiedlich. Dabei fiel auf, daß **4** gegenüber *Klebsiella 57 USA* eine Aktivität aufweist und dieser Keim nicht von Neamin beeinflusst wird. Gegen die restlichen drei Organismen zeigte nur Neamin und nicht **4** Wirkung. Sisomicin zeigte die bekannte starke antibakterielle Aktivität und wirkt auch in großer Verdünnung noch gegen alle getesteten Keime.

EXPERIMENTELLER TEIL

Allgemeine Methoden. — Die Reaktionen wurden dünnschichtchromatographisch an Kieselgel GF₂₅₄ (Merck) verfolgt. Anfärbung: Schwefelsäure-Ethanol 1:9 (v/v) und Wärmebehandlung. Säulenchromatographie: Kieselgel 60 (Merck). Optische Drehung: Perkin-Elmer Polarimeter 141. ¹H-N.m.r.: Bruker WP 60 oder WH 360, innerer Standard Tetramethylsilan. Das Dichlormethan für die Glycosidsynthesen wurde durch Filtration über basisches Aluminiumoxid, Aktivitätsstufe 1 (Woelm) absolutiert. Die Glycosidsynthesen wurden unter einer Stickstoffatmosphäre in getrockneten Kolben durchgeführt, die mit Septen verschlossen waren.

Methyl-6-O-acetyl-2,4-diazido-3-O-benzyl-2,4-didesoxy-β-D-glucopyranosid (6). — Zu der gerührten Suspension von Molekularsieb (1.0 g) und Silbercarbonat (1.0 g)

in Dichlormethan (15 mL) und abs. Methanol (3 mL) wird langsam eine Lösung von 6-*O*-Acetyl-2,4-diazido-3-*O*-benzyl-2,4-didesoxy- α -D-glucopyranosylbromid⁵ (**5**, 1,0 g, 2,35 mmol) in Dichlormethan (10 mL) getropft. Nach 5 min wird die Mischung mit Dichlormethan (20 mL) verdünnt, über Celite filtriert und *in vacuo* eingengt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt (Laufmittel: Toluol–Aceton 30:1, v/v), Sirup (Ausb. 718 mg, 1,90 mmol; 81%), $[\alpha]_D^{20} +45^\circ$ (*c* 1,0, Dichlormethan).

Anal. Ber. für $C_{16}H_{20}N_6O_5$: C, 51,06; H, 5,36; N, 22,33. Gef.: C, 50,87; H, 5,39; N, 22,61.

Methyl-2,4-diazido-3-O-benzyl-2,4-didesoxy- β -D-glucopyranosid (**7**). — Die Lösung des Glucosids **6** (650 mg, 1,73 mmol) in abs. Methanol (10 mL) wird mit einer katalytischen Menge Natriummethoxid 30 min am Rückfluß erhitzt und anschließend mit saurem Ionenaustauscher SC 108 (H^+) neutralisiert. Das Harz wird abfiltriert und das Filtrat *in vacuo* zum reinen Sirup eingengt (Ausb. 562 mg, 1,68 mmol; 97%), $[\alpha]_D^{20} +48^\circ$ (*c* 0,93, Dichlormethan).

Anal. Ber. für $C_{14}H_{18}N_6O_4$: C, 50,29; H, 5,43; N, 25,14. Gef.: C, 50,13; H, 5,30; N, 25,20.

Methyl-6-O-(6-O-acetyl-2-azido-3,4-di-O-benzyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosyl)-2,4-diazido-3-O-benzyl-2,4-didesoxy- β -D-glucopyranosid (**9**). — Die Suspension von Verbindung **7** (500 mg, 1,5 mmol), Quecksilber-II-bromid (30 mg, 0,08 mmol) und Molekularsieb (1,0 g) in Dichlormethan (10 mL) wird 1 h bei Raumtemp. gerührt. Danach wird die Mischung auf -40° gekühlt und mit einer Lösung von 6-*O*-Acetyl-2-azido-3,4-di-*O*-benzyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosylbromid⁵ (**8**, 780 mg, 1,59 mmol) in Dichlormethan tropfenweise während 30 min versetzt. Die Mischung wird weitere 6 h bei dieser Temp. gehalten, dann wird über Nacht langsam auf Raumtemp. erwärmt. Dichlormethan (20 mL) wird zugefügt und die Mischung durch Celite filtriert. Das Filtrat wird mit verdünnter wäßriger Kaliumiodid-Lösung und dann mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und *in vacuo* eingengt. Der erhaltene Sirup wird chromatographisch gereinigt (Laufmittel: Toluol–Aceton 15:1, v/v). Man erhält **9** als farblosen Sirup (Ausb. 714 mg, 0,96 mmol, 64%), $[\alpha]_D^{20} +75,7^\circ$ (*c* 1,85, Dichlormethan); 1H -N.m.r. (360 MHz, $CDCl_3$): 7,55–7,31 (m, 15 H, 3 $CH_2C_6H_5$), 5,07 (d, 1 H, $J_{1',2'}$ 3,5 Hz, H-1'), 4,98–4,60 (m, 6 H, 3 CH_2Ph), 4,36 (dd, 1 H, H-6'a), 4,27 (dd, 1 H, H-6'b), 4,18 (d, 1 H, $J_{1,2}$ 8,0 Hz, H-1), 3,97 (ddd, 1 H, $J_{5',6'a}$ 2,2, $J_{5',6'b}$ 4,1 Hz, H-5'), 3,93–3,82 (m, 2 H, H-6a, 6b), 3,57 (s, OCH_3), 3,40 (dd, 1 H, $J_{2',3'}$ 10,0 Hz, H-2'), 3,31 (ddd, $J_{5,6a}$ 2,8, $J_{5,6b}$ 4,5 Hz, H-5), 2,05 (s, 3 H, Ac).

Anal. Ber. für $C_{36}H_{41}N_9O_9$: C, 58,13; H, 5,56; N, 16,95. Gef.: C, 57,96; H, 5,50; N, 17,13.

Methyl-2,4-diazido-6-O-(2-azido-3,4-di-O-benzyl-2-desoxy- α -D-glucopyranosyl)-3-O-benzyl-2,4-didesoxy- β -D-glucopyranosid (**10**). — Die Lösung von **9** (600 g, 0,81 mmol) in abs. Methanol (10 mL) wird mit einer katalytischen Menge Natriummethanolat 30 min unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemp. wird der Ansatz mit SC 108 (H^+) neutralisiert und vom Harz abfiltriert. Das Filtrat wird

in *vacuo* eingeengt zum farblosen Sirup (561 mg, 0,81 mmol, 99%), $[\alpha]_D^{25} + 70,3^\circ$ (*c* 2,0, Dichlormethan). Das $^1\text{H-N.m.r.}$ -Spektrum zeigt keine Acetylresonanz.

Anal. Ber. für $\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{N}_9\text{O}_9$: C, 58,19; H, 5,60; N, 17,96. Gef.: C, 58,16; H, 5,68; N, 18,11.

Methyl-2,4-diazo-3-O-benzyl-2,4-didesoxy-6-O-(2,6-diazo-3,4-di-O-benzyl-2,6-didesoxy- α -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosid (12). — Die Lösung des Disaccharids **10** (450 mg, 0,64 mmol) in abs. Pyridin (5 mL) und Methansulfonylchlorid (285 mg, 0,19 mL, 2,49 mmol) wird 6 h bei 0° gehalten und dann langsam auf Raumtemp. erwärmt. Die Mischung wird auf Eiswasser gegossen und zweimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird mehrfach mit verdünnter Salzsäure gewaschen bis die wäßrige Phase sauer bleibt, dann wird sie mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung neutralisiert, mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und in *vacuo* eingeengt. Der erhaltene, chromatographisch einheitliche Sirup (501 mg), der nicht näher charakterisiert wurde, wird in abs. *N,N*-Dimethylformamid (10 mL) gelöst, mit Natriumazid (320 mg, 4,9 mmol) versetzt und 1 h bei 90° gerührt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemp. wird durch Celite filtriert, mit Dichlormethan gewaschen und das Filtrat im Hochvakuum eingeengt. Der erhaltene hellbraune Sirup wird chromatographisch gereinigt (Laufmittel: Toluol–Aceton 75:1, v/v). Die Verbindung **12** wird als Sirup erhalten (394 mg, 0,54 mmol, 85%), $[\alpha]_D^{20} + 84,3^\circ$ (*c* 3,74, Dichlormethan).

Anal. Ber. für $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{N}_{12}\text{O}_7$: C, 56,19; H, 5,27; N, 23,13. Gef.: C, 56,09; H, 5,25; N, 23,40.

Methyl-2,4-diamino-2,4-didesoxy-6-O-(2,6-diamino-2,6-didesoxy- α -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosid (4). — Die auf -40° gekühlte Lösung von **12** (200 mg, 0,28 mmol) in Oxolan (4 mL) und flüssigem Ammoniak (~ 30 mL) wird unter Rühren so lange mit kleinen Mengen an Natrium versetzt, bis die tiefblaue Farbe 20 min bestehen blieb. Der Ansatz wird durch vorsichtige Zugabe von Ammoniumchlorid entfärbt und unter einem Stickstoffstrom und dann in *vacuo* eingeengt. Der erhaltene Rückstand wird durch Chromatographie gereinigt (Laufmittel: Dichlormethan–Methanol– 17° , wäßriges Ammoniak 2:4:1, v/v), wobei das Hauptprodukt isoliert wird. Der nach dem Einengen in *vacuo* erhaltene Sirup wird in Wasser (8 mL) gelöst und an basischem Austauschharz CNP-LF (NH_4^+) adsorbiert. Das Harz wird mit Wasser gewaschen. Eluieren mit 5° igem wäßrigem Ammoniak liefert **4**, das nach dem Gefriertrocknen als weißes amorphes Pulver anfällt (24 mg, 0,06 mmol, 24°), Zers. $93\text{--}97^\circ$, $[\alpha]_D^{20} + 58^\circ$ (*c* 0,73, Wasser).

Anal. Ber. für $\text{C}_{13}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_7$: C, 44,31; H, 8,01; N, 15,90. Gef.: C, 44,15; H, 8,30; N, 16,14.

LITERATUR

- 1 S. UMEZAWA, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **30** (1974) 111–182.
- 2 J. REDEN UND W. DURKHEIMER, *Top. Curr. Chem.*, **83** (1979) 105–170.
- 3 K. E. PRICE, J. C. GODFREY UND H. KAWAGUCHI, in D. PERLMAN (Ed.), *Structure-Activity Relationships Among the Semisynthetic Antibiotics*, Academic Press, New York, 1977, SS. 239–355 und 357–395.

- 4 H. PAULSEN UND W. STENZEL, *Angew. Chem.*, 87 (1975) 547–548; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 14 (1975) 558–559.
- 5 H. PAULSEN, O. LOCKHOFF, B. SCHRÖDER UND W. STENZEL, *Carbohydr. Res.*, 68 (1979) 239–255.
- 6 H. PAULSEN UND W. TODT, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 23 (1968) 115–232.
- 7 H. PAULSEN, *Angew. Chem.*, 94 (1982) 184–201.
- 8 H. PAULSEN UND O. LOCKHOFF, *Chem. Ber.*, 114 (1981) 3079–3101.
- 9 E. J. REIST, V. J. BARTUSKA UND L. GOODMAN, *J. Org. Chem.*, 29 (1964) 3725–3726.