



Ausschliessungspatent

Erteilt gemaeß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

## PATENTSCHRIFT

209 810

ISSN 0433-6461

(11)

Int.Cl.<sup>3</sup> 3(51) C 07 C103/52

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veroeffentlicht

(21) AP C 07 C / 2511 312  
(31) 380498(22) 20.05.83  
(32) 21.05.82(44) 23.05.84  
(33) US(71) siehe (73)  
(72) DEBONO, MANUEL;US;  
(73) ELI LILLY AND COMPANY; INDIANAPOLIS, US

## (54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON A-21978C-CYCLOPEPTIDDERIVATEN

(57) Verfahren zur Herstellung von A-21978C-Cyclopeptidderivaten mit der aus dem Formelblatt hervorgehenden Formel I, worin R eine durch -O-R<sup>2</sup> und X substituierte Benzoylgruppe ist, in welcher R<sup>2</sup> für C<sub>8</sub>-C<sub>15</sub>-Alkyl steht und X Wasserstoff, Chlor, Brom, Iod, Nitro, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkyl, Hydroxy, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy oder C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkylthio bedeutet und worin R<sup>1</sup> für Wasserstoff oder eine Aminoschutzgruppe steht, oder von pharmazeutisch unbedenklichen Salzen hiervon durch Umsetzung eines entsprechenden Kerns von A-21978C der Formel I, worin R jedoch Wasserstoff ist, so daß sich eine freie Aminogruppe ergibt, und die beiden anderen freien Aminogruppen entweder ungeschützt oder gegebenenfalls durch eine Schutzgruppe geschützt sind, oder eines entsprechenden pharmazeutisch unbedenklichen Salzes hiervon mit einem Acylierungsmittel, bei dem es sich um das der substituierten Benzoylgruppe R entsprechende freie Benzoësäurederivat oder einen aktivierten Ester hiervon handelt. Eine bevorzugte hiernach erhältliche Verbindung ist N<sub>Trp</sub>-p-(n-Dodecyloxy)benzoyl-A-21978C. Formel I

*Z 51 157 Z*

1

- 1 -

5

10

Titel der Erfindung:

- 15 Verfahren zur Herstellung von A-21978C-Cyclopeptid-  
derivaten

Anwendungsgebiet der Erfindung:

- 20 Die Erfindung bezieht sich auf neue Derivate von Cyclopeptiden, die antibiotische Eigenschaften besitzen, und auf das Verfahren zur Herstellung dieser antibiotisch wirksamen Derivate auf semisynthetischem Weg.

- 25 Charakteristik der bekannten technischen Lösungen und  
Aufgabe der Erfindung:

Die große Wahrscheinlichkeit und ständige Gefahr der Entwicklung antibiotikaspezifischer resistenter Stämme pathogener Mikroorganismen macht die Entwicklung neuer Antibiotika zu einem großen Bedürfnis. Vor allem Krankheitserreger innerhalb der grampositiven Arten von *Staphylococcus* und *Streptococcus* sind häufig resistent gegenüber herkömmlich verwendeten Antibiotika, wie Penicillin und Erythromycin, und in diesem Zusammenhang wird beispielsweise hingewiesen auf W. O. Faye, *Principles of Medicinal Chemistry*, Seiten 684 bis 686 (1974). Aufgabe der Erfindung ist daher die Schaffung

1 neuer und besonders wirksamer Antibiotika.

Darlegung des Wesens der Erfindung:

- 5 Diese Aufgabe wird nun erfindungsgemäß durch neue A-21978C-Cyclopeptidderivate und pharmazeutisch unbekannte Salze hiervon gelöst, die sich als wirksame antibiotische Mittel erwiesen haben.
- 10 Diese neuen Derivate können hergestellt werden durch Umsetzung des Kerns von A-21978C, der durch Deacylierung des geeignet blockierten Komplexes von A-21978C oder irgendeines seiner geeignet blockierten Einzelfaktoren C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> oder C<sub>5</sub> erhältlich ist, mit dem gewünschten Acylierungsmittel oder einem aktivierten Derivat hiervon.
- 15

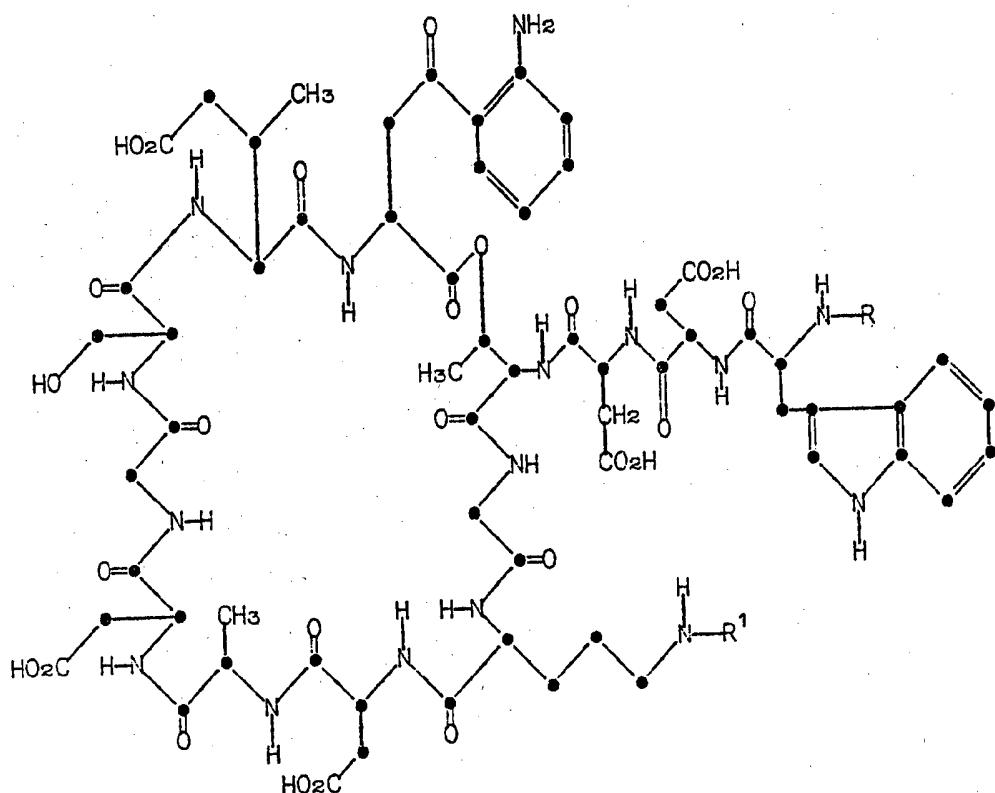
Die erfindungsgemäßen A-21978C-Cyclopeptidderivate haben die Formel I

20

25

30

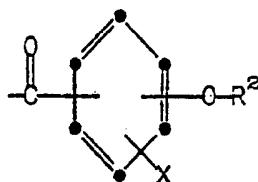
35



I

- 1 worin R eine substituierte Benzoylgruppe der folgenden Formel ist

5



- in welcher R<sup>2</sup> für C<sub>8</sub>-C<sub>15</sub>-Alkyl steht, und X Wasserstoff,  
10 Chlor, Brom, Iod, Nitro, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkyl, Hydroxy, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy oder C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkylthio ist, und worin R<sup>1</sup> Wasserstoff oder eine Aminoschutzgruppe bedeutet, oder sind Salze dieser Peptide, und diese Verbindungen sind entweder wertvolle semisynthetische antibakterielle Mittel oder  
15 Zwischenprodukte zur Herstellung solcher Mittel.

In der vorliegenden Beschreibung werden folgende Abkürzungen verwendet, bei denen es sich großteils um herkömmliche Bezeichnungen handelt:

20

Ala = Alanin

Asp = Asparaginsäure

Gly = Glycin

Kyn = Kynurenin

25

Orn = Ornithin

Ser = Serin

Thr = Threonin

Trp = Tryptophan

t-BOC = t-Butoxycarbonyl

30

Cbz = Benzyloxycarbonyl

DMF = Dimethylformamid

THF = Tetrahydrofuran

HPLC = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

NMR = <sup>1</sup>H-magnetische Kernresonanz

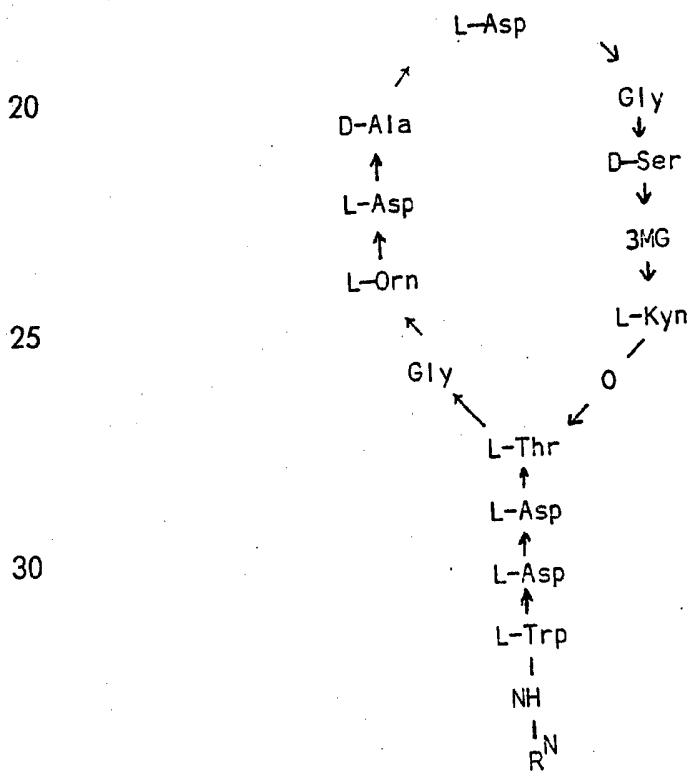
35

TLC = Dünnschichtchromatographie

UV = Ultraviolet

1 Die Antibiotika A-21978C sind eng verwandte saure Peptid-  
antibiotika.

Die Antibiotika A-21978C werden in US-PS 4 208 403  
5 beschrieben, die hiermit eingeführt wird. Wie aus US-PS  
4 208 403 hervorgeht, enthält der Antibiotikumkomplex  
A-21978 eine überwiegende Komponente, nämlich den Faktor  
C, bei dem es sich selbst wiederum um einen Komplex aus  
eng verwandten Faktoren handelt. Der Faktor C von  
10 A-21978, der als Komplex A-21978C bezeichnet wird, ent-  
hält die Einzelfaktoren  $C_0, C_1, C_2, C_3, C_4$  und  $C_5$ . Die  
Faktoren  $C_1, C_2$  und  $C_3$  sind überwiegende Faktoren, während  
die Faktoren  $C_0, C_4$  und  $C_5$  untergeordnete Faktoren dar-  
stellen. Die Struktur der Faktoren von A-21978C geht aus  
15 der folgenden Formel II hervor



- 1 worin 3MG für L-threo-3-Methylglutaminsäure steht und  
R<sup>N</sup> einen spezifischen Fettsäurerest bedeutet. Die spezi-  
fischen Reste R<sup>N</sup> der einzelnen Faktoren haben die im  
folgenden angegebenen Bedeutungen:

5

	<u>Faktoren von A-21978C</u>	<u>Rest R<sup>N</sup></u>
	C <sub>1</sub>	8-Methyldecanoyle
	C <sub>2</sub>	10-Methylundecanoyle
	C <sub>3</sub>	10-Methyldodecanoyle
10	C <sub>0</sub>	C <sub>10</sub> -Alkanoyl*
	C <sub>4</sub>	C <sub>12</sub> -Alkanoyl*
	C <sub>5</sub>	C <sub>12</sub> -Alkanoyl*

- \* Die genaue Art dieser Reste ist bis heute noch nicht  
15 bestimmt worden.

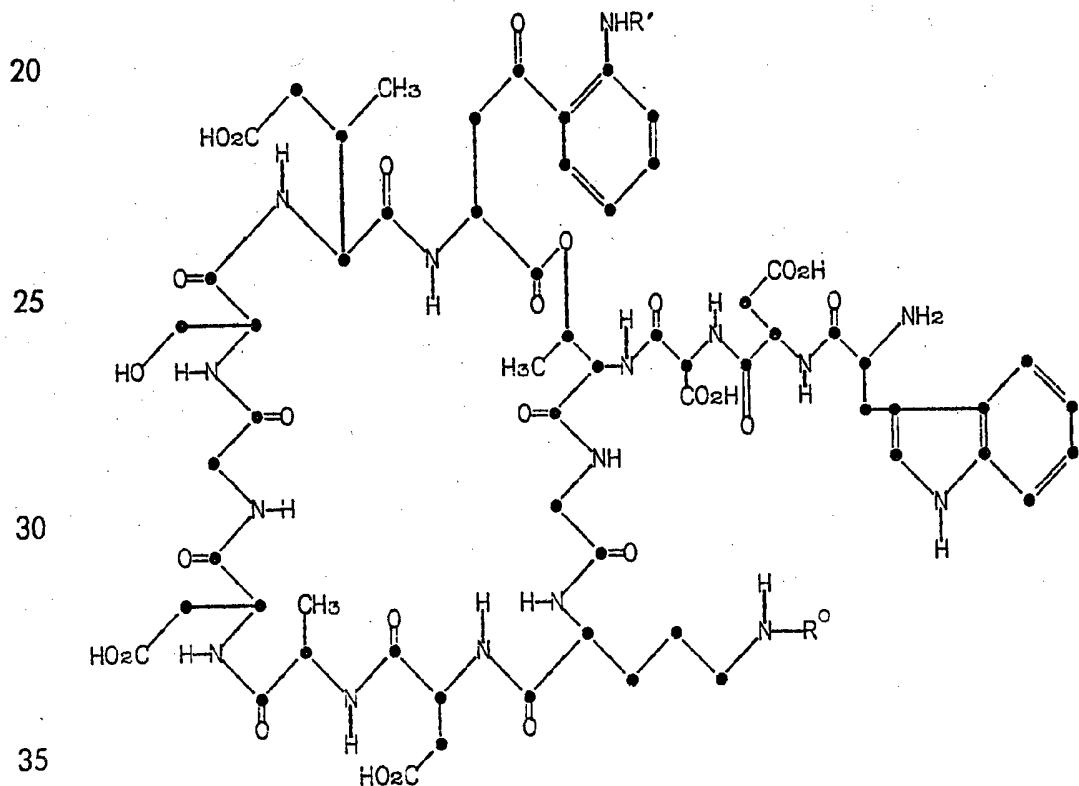
Steht man vor dem Problem einer Deacylierung eines Peptidantibiotikums, dann lässt sich nur äußerst schwer er-  
kennen, ob es ein Enzym gibt, das man für diesen Zweck  
20 verwenden kann. Die Auffindung eines solchen Enzyms ist sogar noch schwieriger, wenn das antibiotische Substrat einen Cyclopeptidkern enthält. Enzyme verfügen über ein hohes Ausmaß an Spezifität, und Unterschiede im Peptid-  
rest und in der Seitenkette des Substrats beeinflussen  
25 daher das Ergebnis des Versuchs einer Deacylierung. Eine Reihe von Mikroorganismen bilden darüberhinaus eine große Anzahl Peptidasen, die unterschiedliche Teile des Peptid-  
rests angreifen. Dies führt häufig zu schwer handhabbaren Produktgemischen.

30

Das Enzym, durch dessen Einsatz sich die Deacylierung der Fettsäureseitenkette von der α-Aminogruppe von Tryptophan erreichen lässt, kann durch einen Mikroorganismus aus der Familie der Actinoplanaceae, vorzugsweise durch den  
35 Mikroorganismus *Actinoplanes utahensis* NRRL 12052 oder eine Variante hiervon, gebildet werden. Zur Bewerkstelli-  
gung einer solchen Deacylierung gibt man ein Antibiotikum, das ausgewählt ist aus dem Komplex von A-21978C, den

- 1 Faktoren C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> und C<sub>5</sub> von A-21978C, dem  
blockierten Komplex von A-21978C oder den blockierten  
Faktoren C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> und C<sub>5</sub> von A-21978C, zu einer  
Kultur des Mikroorganismus. Die Angaben blockierte Fak-  
5 toren von A-21978C und blockierter Komplex von A-21978C  
beziehen sich entweder auf Einzelfaktoren von A-21978C  
oder Faktorengemische (Komplex), worin eine Aminoschutz-  
gruppe an der δ-Aminogruppe von Ornithin beim jeweiligen  
Einzelfaktor oder beim Faktorengemisch angeordnet ist.  
10 Man lässt die Kultur solange auf das Substrat einwirken,  
bis die Deacylierung praktisch beendet ist. Das dabei er-  
haltene entsprechende A-21978C-Cyclopeptid wird von der  
Fermentationsbrühe durch Anwendung bekannter Methoden  
abgetrennt.

15 Die durch diese enzymatischen Deacylierungen erhaltenen  
Cyclopeptide haben die folgende Formel III

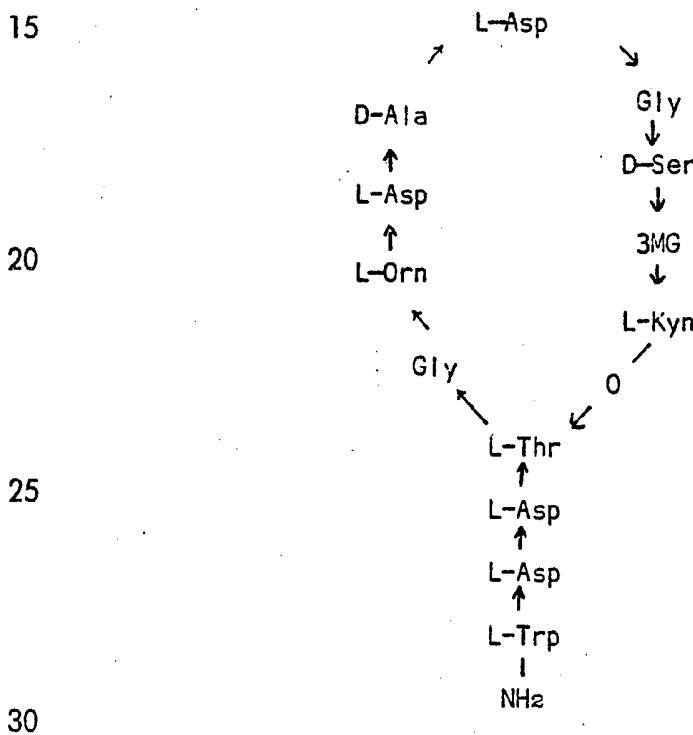


- 1 worin R' und R<sup>O</sup> unabhängig voneinander Wasserstoff oder  
eine Aminoschutzgruppe bedeuten, oder sind Salze hiervon.

Durch Entfernung des Acylrests vom Komplex von A-21978C

- 5 oder von den Einzelfaktoren  $c_0$ ,  $c_1$ ,  $c_2$ ,  $c_3$ ,  $c_4$  und  $c_5$  von A-21978C gelangt man zur Verbindung der Formel III, worin  $R^o$  und  $R'$  jeweils Wasserstoff bedeuten. Das deacylierte Molekül ist das gemeinsame Cyclopeptid, das in jedem der Faktoren des Antibiotikums A-21978C vorhanden ist.

10 Der Einfachheit halber wird diese Verbindung als Kern von A-21978C bezeichnet. Diese Verbindung lässt sich auch durch folgende Formel IV darstellen:



IV

worin 3MG für L-threo-3-Methylglutaminsäure steht.

- 1 Die Verbindungen der Formel III, worin R<sup>O</sup> oder R' eine andere Bedeutung als Wasserstoff haben, werden hergestellt durch Deacylierung der geeignet blockierten Faktoren C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> und C<sub>5</sub> des Antibiotikums A-21978C.
- 5 Diese Verbindungen werden hierin der Einfachheit halber als blockierte Kerne von A-21978C bezeichnet. Diese blockierten Verbindungen eignen sich als Zwischenprodukte zur Herstellung bestimmter Peptide der Formel I, nämlich derjenigen Verbindungen, bei denen R<sup>1</sup> eine Aminoschutzgruppe bedeutet.
- 10

Man kann den Kern von A-21978C oder die blockierten Kerne von A-21978C selbstverständlich in Form von freien Aminen oder von Säureadditionssalzen erhalten. Hierzu läßt sich jedes geeignete Säureadditionssalz verwenden, wobei jedoch pharmazeutisch unbedenkliche Säureadditionssalze bevorzugt sind. Unter pharmazeutisch unbedenklichen Salzen werden solche Salze verstanden, die zur Chemotherapie warmblütiger Tiere brauchbar sind.

20 Das Verfahren zur Herstellung des Kerns von A-21978C der Formel III wird unter Einsatz verschiedener Mikroorganismen eingehend in der am gleichen Tage wie die vorliegende Anmeldung eingereichten Parallelanmeldung mit dem internen Aktenzeichen X-5279 beschrieben. Das bevorzugte Deacylierungsenzym, nämlich *Actinoplanes utahensis* NRRL 12052, ist bei der Agricultural Research Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, U.S. Department of Agriculture, 1815 North University St., Peoria, Illinois 61604, v.St.A. hinterlegt und von dort unter der Nummer NRRL 12052 frei beziehbar. Das spätere Herstellungsbeispiel 1 zeigt die Herstellung des Kerns von A-21978C durch Fermentation unter Verwendung des Komplexes von A-21978C als Substrat und von *Actinoplanes utahensis* NRRL 12052 als Mikroorganismus. Andere Kulturen von *Actinoplanaceae*, die sich zur Herstellung des Kerne von A-21978C der Formel III verwenden lassen, sind ebenfalls

25

30

35

1 beim Northern Regional Research Laboratory hinterlegt und von dort unter den folgenden Hinterlegungsnummern frei beziehbar:

5	Actinoplanes missouriensis	NRRL 12053
	Actinoplanes sp.	NRRL 8122
	Actinoplanes sp.	NRRL 12065
	Streptosporangium roseum	
	var. hollandensis	NRRL 12064

10

Die Wirksamkeit eines bestimmten Stammes eines Mikroorganismus aus der Familie der Actinoplanaceae zur Durchführung der Deacylierung wird nach dem folgenden Verfahren bestimmt. Hierzu beimpft man ein geeignetes Wachstums-

15 medium mit dem Mikroorganismus. Die Kultur wird zwei oder drei Tage bei etwa 28°C auf einem Rotationsschüttler bebrütet. Sodann versetzt man die Kultur mit einem der Substratantibiotika und hält den pH-Wert des Fermentationsmediums auf etwa pH 6,5. Die Kultur wird bezüglich

20 ihrer Aktivität durch Untersuchung mit *Micrococcus luteus* überwacht. Ein Verlust an antibiotischer Aktivität ist ein Anzeichen dafür, daß der Mikroorganismus das zur Deacylierung geeignete Enzym bildet. Dies muß jedoch unter Anwendung einer der folgenden Methoden verifiziert werden:

25 (1) Analyse durch HPLC bezüglich Anwesenheit des intakten Kerns oder (2) Reacylierung mit einer geeigneten Seitenkette, wie Lauroyl, n-Decanoyl oder n-Dodecanoyl, zur Wiederherstellung einer Aktivität.

30 Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf neue Verbindungen, die durch Acylierung eines Kerns von A-21978C (Verbindung der Formel III) gebildet werden, wodurch Verbindungen mit der Cephemstruktur der folgenden Formel I entstehen:

35

1

5

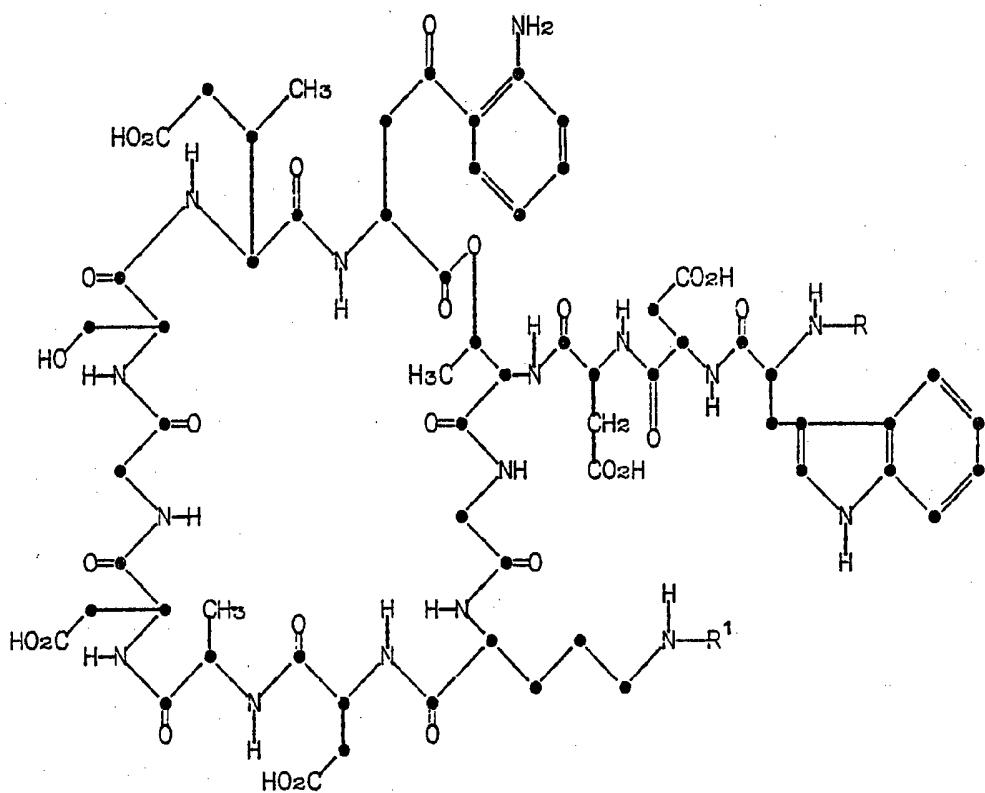
10

15

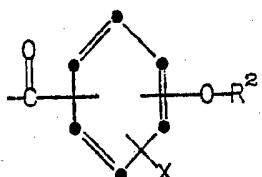
20

25

I



30



35

- 1 in welcher R<sup>2</sup> für C<sub>8</sub>-C<sub>15</sub>-Alkyl steht, und X Wasserstoff, Chlor, Brom, Iod, Nitro, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkyl, Hydroxy, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy oder C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkylthio ist, und worin R<sup>1</sup> Wasserstoff oder eine Aminoschutzgruppe bedeutet, oder die Salze  
5 hiervon gebildet werden.

In der substituierten Benzoylgruppe können die Funktionen

- O  
10 -C- und -OR<sup>2</sup> am Benzolring selbstverständlich in ortho-, meta- oder para-Stellung zueinander orientiert sein. Die para-Orientierung ist für diese Gruppen bevorzugt. Der Substituent X kann an jeder verfügbaren Stellung des Benzolrings vorhanden sein, die nicht von diesen beiden Gruppen besetzt ist.  
15

Unter der Angabe Alkyl werden vorliegend sowohl geradkettige als auch verzweigte Kohlenwasserstoffketten verstanden.

- 20 Die Angabe Aminoschutzgruppe bezieht sich auf die üblichen Aminoschutzgruppen, die mit den anderen funktionellen Gruppen im Molekül von A-21978C verträglich sind. Bevorzugt werden solche Aminoschutzgruppen, die sich nach Acylierung der jeweiligen Verbindung leicht abspalten  
25 lassen. Beispiele für geeignete Schutzgruppen gehen aus "Protective Groups in Organic Synthesis" von Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, New York, 1981, Kapitel 7, hervor. Besonders bevorzugte Aminoschutzgruppen sind t-Butoxycarbonyl und Benzoyloxycarbonyl.  
30

Beispiele für C<sub>8</sub>-C<sub>15</sub>-Alkylreste, die als Substituent R<sup>2</sup> erfindungsgemäß bevorzugt sind, sind folgende:

- 35 (a) -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, worin n eine ganze Zahl von 7 bis 14 ist, und

Die Verbindungen der Formel I sind zur Bildung von Salzen befähigt, welche ebenfalls Teil der vorliegenden Erfindung sind. Solche Salze eignen sich beispielsweise zur Abtrennung und Reinigung der Verbindungen. Pharmazeutisch unbedenkliche Alkalimetall-, Erdalkalimetall-, Amin- und Säure-additionssalze sind besonders brauchbar.

15 Die Verbindungen der Formel I haben beispielsweise fünf freie Carboxylgruppen, die Salze bilden können. Zur Erfahrung gehören daher Teilsalze, Mischsalze und vollständige Salze an diesen Carboxylgruppen. Bei der Herstellung dieser Salze sollen pH-Bereiche von über 10 vermieden werden, da die Verbindungen bei solchen pH-  
20 Werten instabil sind.

Zu Beispielen für geeignete Alkalimetall- und Erdalkalimetallsalze von Verbindungen der Formel I gehören die Natrium-, Kalium-, Lithium-, Cäsium-, Rubidium-, Barium-, Calcium- und Magnesiumsalze. Zu geeigneten Aminsalzen von Verbindungen der Formel I gehören die Ammoniumsalze sowie die primären, sekundären und tertiären  $C_1-C_4$ -Alkylammonium- und Hydroxy- $C_2-C_4$ -alkylammoniumsalze. Beispieldurchsetzung einer Verbindung der Formel I mit Ammoniumhydroxid, Methylamin, s-Butylamin, Isopropylamin, Diethylamin, Diisopropylamin, Cyclohexylamin, Ethanolamin, Triethylamin oder 3-Amino-1-propanol gebildeten Verbindungen.

Die kationischen Alkalimetall- und Erdalkalimetallsalze von Verbindungen der Formel I werden unter Anwendung von Verfahren hergestellt, wie sie für die Bildung kationischer Salze üblich sind. Hierzu löst man beispielsweise die

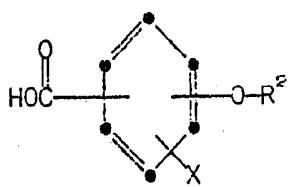
- 1 freie Säureform einer Verbindung der Formel I in einem geeigneten Lösungsmittel, wie warmem Methanol oder Ethanol und versetzt eine solche Lösung dann mit einer Lösung, die eine stöchiometrische Menge der gewünschten anorganischen Base in wässrigem Methanol enthält. Das auf diese Weise gebildete Salz kann durch Anwendung üblicher Methoden isoliert werden, beispielsweise durch Filtration oder Verdampfung des Lösungsmittels.
- 10 In ähnlicher Weise lassen sich auch die Salze organischer Amine bilden. Zu diesem Zweck kann man beispielsweise das jeweilige gasförmige oder flüssige Amin zu einer Lösung einer Verbindung der Formel I in einem geeigneten Lösungsmittel, wie Ethanol, geben und das Lösungsmittel und den Überschuß an Amin dann durch Verdampfung entfernen.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen haben ferner auch freie Aminogruppen und können daher Säureadditionssalze bilden, die ebenfalls Teil der Erfindung sind. Zu Beispielen für geeignete Säureadditionssalze von Verbindungen der Formel I gehören die Salze, die durch übliche Umsetzung mit sowohl organischen als auch anorganischen Säuren gebildet werden, wie mit Chlorwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure, Essigsäure, Bernsteinsäure, Zitronensäure, Milchsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Palmitinsäure, Cholsäure, Pamoasäure, Mucinsäure, D-Glutaminsäure, d-Kampfersäure, Glutarsäure, Glykolsäure, Phthalsäure, Weinsäure, Laurinsäure, Stearinsäure, Salicylsäure, Methansulfonsäure, Benzolsulfonsäure, Sorbinsäure, Picrinsäure, Benzoësäure oder Zimtsäure.

Die Verbindungen der Formel I werden hergestellt durch Acylierung einer Verbindung der Formel III unter Anwendung von Methoden, wie sie zur Bildung einer Amidbindung üblich sind. Diese Acylierung wird im allgemeinen durchgeführt, indem man die jeweilige Verbindung mit einem aktivierten Derivat der substituierten Benzoësäure (Formel V) umsetzt, die der gewünschten Acylgruppe (R)

1 entspricht:

5



V

- 10 Hierin haben X und R<sup>2</sup> die bereits oben erwähnten Bedeutungen.

Zu Beispielen für Verbindungen der Formel V gehören folgende: p-(n-Octyloxy)benzoësäure, p-(n-Decyloxy)benzoësäure, p-(n-Dodecyloxy)benzoësäure, p-(n-Pentadecyloxy)-benzoësäure, m-Chlor-p-(n-dodecyloxy)benzoësäure, p-Chlor-m-(n-decyloxy)benzoësäure, m-(n-Dodecyloxy)-p-methylbenzoësäure, m-Methoxy-p-(n-octyloxy)benzoësäure und m-Hydroxy-p-(n-pentyloxy)benzoësäure.

20

Unter einem aktivierten Derivat wird ein Derivat verstanden, das die Carboxylfunktion des Acylierungsmittels reaktionsfähig macht für eine Kupplung mit der primären Aminogruppe unter Bildung der Amidbindung, die die Seitenkette mit dem Kern verbindet. Geeignete aktivierte Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und Methoden zu ihrer Anwendung als Acylierungsmittel für ein primäres Amin sind dem Fachmann geläufig. Bevorzugte aktivierte Derivate sind (a) Säurehalogenide, wie Säurechloride, (b) Säureanhydride, wie Alkoxyameisensäureanhydride oder Aryloxyameisensäure-anhydride, oder (c) aktivierte Ester, wie 2,4,5-Trichlorphenylester, N-Hydroxybenztriazolester oder N-Hydroxysuccinimidester. Zu anderen Methoden für eine Aktivierung der Carboxylfunktion gehören eine Umsetzung der Carbonsäure mit einem Carbonyldiimid, wie N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid oder N,N'-Diisopropylcarbodiimid, unter Bildung eines reaktionsfähigen Zwischenprodukts, das infolge seiner Instabilität nicht isoliert wird. Eine solche

- 1 Umsetzung mit dem primären Amin wird direkt im Reaktionsgemisch durchgeführt.
- 5 Es ist für den Fachmann selbstverständlich, daß sich die Verbindungen der Formel I unter Anwendung selektiver Acylierungsverfahren und Einsatz von Aminoschutzgruppen herstellen lassen. Verwendet man beispielsweise eine Verbindung der Formel III, worin R' und R<sup>O</sup> Wasserstoff bedeuten, als Ausgangsmaterial, dann kann es sowohl an 10 der α-Aminogruppe von Tryptophan als auch an der δ-Aminogruppe von Ornithin zu einer Acylierung kommen, so daß N<sub>Trp</sub>, N<sub>Orn</sub>-Diacylderivate gebildet werden. Die Herstellung von Derivaten, die an der α-Aminogruppe von Tryptophan monoacyliert sind, erfolgt daher vorzugsweise durch Acylierung einer Verbindung der Formel III, in welcher die δ-Aminogruppe von Ornithin (nämlich die Stellung R<sup>O</sup>) durch eine Aminoschutzgruppe blockiert ist. Solche Ausgangsmaterialien werden vorzugsweise hergestellt, indem man den Faktor A-21978C vor seiner Deacylierung an dieser 20 Stellung blockiert. Die Aminogruppe von Kynurenin (nämlich die Stellung R' in der Formel III) ist die von den drei freien Aminogruppen im Kern von A-21978C am wenigsten reaktionsfähige Gruppe. Eine Acylierung der Stellung R der Formel I erfordert daher gewöhnlich keine Blockierung 25 der Aminogruppe von Kynurenin.

Aus dem folgenden Reaktionsschema I gehen allgemeine Verfahren für die Herstellung von Verbindungen der Formel I hervor. In diesem Reaktionsschema haben die 30 enthaltenen Symbole folgende Bedeutungen:

35

- [\*] = Rest von A-21978C  
N<sub>T</sub> = α-Aminogruppe von Tryptophan  
N<sub>O</sub> = δ-Aminogruppe von Ornithin  
N<sub>K</sub> = Aromatische Aminogruppe von Kynurenin  
R = Angegebene Substituenten der Formel I  
R<sub>N</sub> = Acylgruppe des natürlichen Faktors

1

B = Aminoschutzgruppe

5 Acyl = Acylierungsstufe

Deacyl = Deacylierungsstufe

Block = Acylierung mit einer Aminoschutzgruppe

5

Deblock = Entfernung einer Aminoschutzgruppe

10 Im Reaktionsschema I entsprechen die  $N_{Trp}$ -Monoacylderivate von A-21978C der allgemeinen Formel III.

15

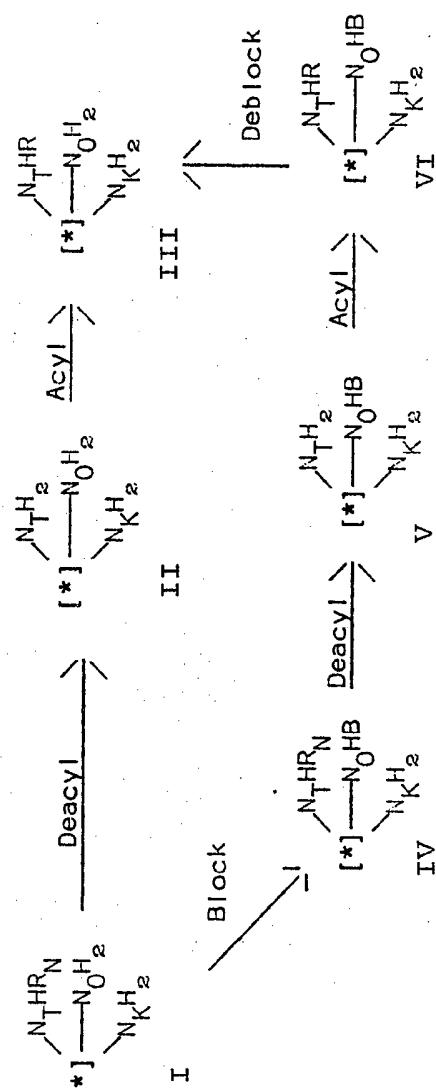
20 Reaktionsschema I: Herstellung von  $N_{Trp}$ -Monoacyl-A-21978C-Derivaten

25

30

35

35



1 Ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung der Verbindun-  
gen der Formel I stellt die Methode über einen aktiven  
Ester dar. Hierzu wird vor allem der 2,4,5-Trichlorphenylest-  
er der gewünschten Seitenkettensäure (Formel V) als  
5 Acylierungsmittel verwendet. Bei diesem Verfahren setzt  
man eine überschüssige Menge des aktiven Esters mit dem  
Kern bei Raumtemperatur in einem nicht reaktionsfähigen  
organischen Lösungsmittel um, wie DMF, THF, Diethylether  
10 oder Dichlormethan. Die Umsetzungszeit ist nicht kritisch,  
obgleich eine Reaktionszeit von etwa 24 bis 120 Stunden  
bevorzugt ist. Nach beendeter Umsetzung wird das Lösungs-  
mittel entfernt und der Rückstand durch Chromatographie  
gereinigt, beispielsweise durch Umkehrphasen-HPLC unter  
Verwendung von Siliciumdioxidgel-C<sub>18</sub>-Umkehrphasenharz als  
15 stationäre Phase und eines Gemisches aus H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>3</sub>CN  
als Lösungsmittelsystem.

Die 2,4,5-Trichlorphenylester werden hergestellt durch  
Behandlung der Seitenkettensäure (Formel V) mit 2,4,5-  
20 Trichlorphenol in Anwesenheit eines Kupplungsmittels, wie  
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid. Andere Methoden zur Her-  
stellung der aktiven Ester liegen im Rahmen des fach-  
männischen Könnens.

25 Die substituierten Säuren der Formel V und die aktivier-  
ten Derivate hiervon sind entweder bekannte Verbindungen  
oder können aus bekannten Verbindungen in an sich bekannter  
Weise hergestellt werden. Die Alkoxybenzoësäuren lassen  
sich am besten ausgehend von einer geeigneten Hydroxy-  
30 benzoësäure herstellen, indem man ein entsprechendes Alkyl-  
halogenid mit dem Dinatriumsalz der jeweiligen Hydroxy-  
benzoësäure umsetzt. Die für diese Verfahren als Ausgangs-  
materialien benötigten Hydroxybenzoësäuren und substitu-  
ierten Derivate hiervon sind entweder bekannte Verbindungen  
35 oder können in an sich bekannter Weise hergestellt werden.

- 1 Die erfindungsgemäßen A-21978C-Cyclopeptide können als  
antibakterielle Mittel entweder oral oder parenteral  
verabreicht werden. Die Verbindung von A-21978C wird  
gewöhnlich natürlich zusammen mit einem pharmazeutisch  
5 unbedenklichen Träger oder Verdünnungsmittel verabfolgt.

Die Verbindungen lassen sich intravenös oder intramuskulär  
verabreichen, indem man sie in Form einer sterilen  
wässrigen Lösung oder Suspension injiziert, der gewünsch-  
10 tenfalls verschiedene herkömmliche pharmazeutisch unbe-  
denkliche Konservierungsmittel, Pufferungsmittel, Solubili-  
sierungsmittel oder Suspendiermittel zugesetzt worden sind.  
Zur Bildung isotonischer Lösungen können auch andere  
15 Zusätze zugegeben werden, wie Kochsalz oder Glukose.  
Menge und Art solcher Zusätze bewegen sich im Rahmen des  
fachmännischen Könnens.

Für eine orale Anwendung kann man die Verbindungen in  
Kombination mit pharmazeutisch unbedenklichen Trägern  
20 oder Hilfsstoffen in Form von Kapseln, Tabletten oder  
Pulvern anwenden. Menge und Art solcher Träger oder Hilfs-  
stoffe liegen im Rahmen des fachmännischen Könnens.

Die Dosis einer Verbindung von A-21978C ist abhängig von  
25 einer Reihe von Überlegungen, wie beispielsweise der  
jeweils zu verwendenden Verbindung sowie der Art und  
Stärke der zu behandelnden Infektion. Die für eine Verab-  
reichung geeigneten Dosierungsbereiche und Dosierungs-  
einheiten lassen sich unter Zugrundelegung der MIC-Werte  
30 und ED<sub>50</sub>-Werte sowie der Toxizitätsdaten in Verbindung  
mit anderen Faktoren ermitteln, wie der Pharmakokinetik,  
den Merkmalen des Patienten oder Wirts und dem für die  
Infektion verantwortlichen Mikroorganismus.

1      Ausführungsbeispiele

5      Die Erfindung wird im folgenden anhand von Beispielen weiter erläutert, welche nicht als beschränkend aufzufassen sind.

Herstellungsbeispiel 1

Herstellung des Kerns von A-21978C

10

A. Fermentation von Actinoplanes utahensis

15

Man stellt eine Vorratskultur von Actinoplanes utahensis NRRL 12052 her und hält diese auf einer Agarschräge. Zur Herstellung der Schrägen verwendet man eines der folgenden Medien:

Medium A

20

	<u>Bestandteile</u>	<u>Menge</u>
	Vorgekochtes Hafermehl	60,0 g
	Hefe	2,5 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
25	Czapek-Mineralmischung*	5,0 ml
	Agar	25,0 g
	Deionisiertes Wasser	q.s. auf 1 Liter

30

Der pH-Wert vor dem Autoklavieren beträgt etwa 5,9. Er wird durch Zugabe von NaOH auf pH 7,2 eingestellt. Nach dem Autoklavieren liegt der pH-Wert bei etwa 6,7.

\* Die Czapek-Mineralmischung hat folgende Zusammensetzung:

35

	<u>Bestandteile</u>	<u>Menge</u>
	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (gelöst in 2 ml konz HCl)	2 g
	KCl	100 g
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	100 g
	Deionisiertes Wasser	q.s. auf 1 Liter

1

Medium B

	<u>Bestandteile</u>	<u>Menge</u>
5	Kartoffeldextrin	5,0 g
	Hefeextrakt	0,5 g
	Enzymhydrolysat von Casein*	3,0 g
	Rinderextrakt	0,5 g
	Glucose	12,5 g
10	Maisstärke	5,0 g
	Fleischpepton	5,0 g
	Rohrzuckermelasse	2,5 g
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,25 g
	CaCO <sub>3</sub>	1,0 g
15	Czapek-Mineralmischung	2,0 ml
	Agar	20,0 g
	Deionisiertes Wasser	q.s. auf 1 Liter

\* N-Z-Amin A, Humko Sheffield Chemical, Lyndhurst, NJ,

20 V.St.A.

Die Schrägen wird mit Actinoplanes utahensis NRRL 12052 inkuliert und die inkulierte Schrägen etwa 8 bis 10 Tage bei 30°C inkubiert. Unter Verwendung von etwa der Hälfte des  
25 Schrägenwachstums inkuliert man dann 50 ml eines vegetativen Mediums mit folgender Zusammensetzung:

	<u>Bestandteile</u>	<u>Menge</u>
30	Vorgekochtes Hafermehl	20,0 g
	Saccharose	20,0 g
	Hefe	2,5 g
	Getrocknete Kornschlempe*	5,0 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
35	Czapek-Mineralmischung	5,0 ml
	Deionisiertes Wasser	q.s. auf 1 Liter

- 1 Das Ganze wird mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt, wobei der pH-Wert nach Autoklavieren bei etwa 6,8 liegt.

\* National Distillers Products Co., 99 Park Ave., New  
5 York, NY, V.St.A.

Das inkulierte vegetative Medium wird in einem 250 ml fassenden Erlenmeyer-Weithalskolben etwa 72 Stunden bei 10 30°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert, der sich in einem Bogen mit einem Durchmesser von 5 cm mit 250 U/min bewegt.

Das inkubierte vegetative Medium kann direkt zur Inkultierung eines vegetativen Mediums der zweiten Stufe verwendet werden. Wahlweise und vorzugsweise bewahrt man dieses vegetative Medium bis zu einem späteren Gebrauch auf, indem man die Kultur in einer Dampfphase aus flüssigem Stickstoff hält. Für eine solche Aufbewahrung füllt man die Kultur in folgender Weise in eine Anzahl kleiner 20 Fläschchen ab: In jedes Fläschchen gibt man 2 ml inkubiertes vegetatives Medium und 2 ml einer Glycerin-Lactose-Lösung (Cryobiol 10, 364 bis 367 (1973)). Die so gebildeten Suspensionen werden in einer Dampfphase aus flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

25 • Unter Verwendung einer in dieser Weise hergestellten aufbewahrten Suspension (1 ml) beimpft man dann 50 ml eines vegetativen Mediums der ersten Stufe, welches die oben beschriebene Zusammensetzung hat. Das inkulierte vegetative Medium der ersten Stufe wird dann in der oben beschriebenen Weise inkubiert.

30 Zur Bildung eines größeren Volumens an Inokulum inkuliert man 400 ml eines vegetativen Mediums der zweiten Stufe, das die gleiche Zusammensetzung wie das vegetative Medium der ersten Stufe hat, mit 10 ml des inkubierten vegetativen Mediums der ersten Stufe. Das Medium der zweiten Stufe wird in einem 2 l fassenden Erlenmeyer-Weithals-

1 kolben etwa 48 Stunden bei 30°C auf einem Rotations-  
schüttler inkubiert, der unter einem Bogen von 5 cm Durch-  
messer mit 250 U/min bewegt wird.

5 Mit dem in der oben beschriebenen Weise hergestellten  
inkubierten vegetativen Medium der zweiten Stufe (80 ml)  
inokuliert man dann 10 l eines der folgenden sterilen  
Produktionsmedien:

10

Medium I

	<u>Bestandteile</u>	<u>Menge (g/l)</u>
	Erdnussmehl	10,0
15	Lösliches Fleischpepton	5,0
	Saccharose	20,0
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,25
20	Leitungswasser	q.s. auf 1 Liter

Dieses Medium hat nach 45 Minuten langer Sterilisation  
durch Autoklavierung bei 121°C unter einem Druck von  
etwa 1,1 bis 1,3 bar einen pH-Wert von etwa 6,9.

25

Medium II

	<u>Bestandteile</u>	<u>Menge (g/l)</u>
30	Saccharose	30,0
	Pepton	5,0
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0
	KCl	0,5
35	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,5
	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,002
	Deionisiertes Wasser	q.s. auf 1 Liter

1 Das Ganze wird mit HCl auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt, wobei der pH-Wert nach Autoklavierung bei etwa 7,0 liegt.

5

Medium III

	<u>Bestandteile</u>	<u>Menge (g/l)</u>
10	Glucose	20,0
	NH <sub>4</sub> Cl	3,0
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0
	ZnCl <sub>2</sub>	0,019
	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,304
15	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,062
	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,035
	CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,005
	CaCO <sub>3</sub>	6,0
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *	0,67
20	Leitungswasser	q.s. auf 1 Liter

\* Getrennt sterilisiert und unter aseptischen Bedingungen zugesetzt. Am Ende liegt der pH-Wert bei etwa 6,6.

25

Man läßt das inokulierte Produktionsmedium in einem 14 l fassenden Fermentationsgefäß etwa 66 Stunden bei einer Temperatur von etwa 30°C fermentieren. Das Fermentationsmedium wird mittels herkömmlicher Rührer bei einer Geschwindigkeit von etwa 600 U/min gerührt und mit steriler Luft so belüftet, daß die gelöste Menge an Sauerstoff auf über 30 % an Luftsättigung bei atmosphärischem Druck gehalten wird.

35

1      B. Deacylierung von A-21978C

5      Man fermentiert *Actinoplanes utahensis* unter Anwendung des im Abschnitt A beschriebenen Verfahrens und Einsatz des Mediums A für die Schrägen und des Produktionsmediums I, wobei man das Produktionsmedium etwa 67 Stunden inkubiert. Das Fermentationsmedium versetzt man mit rohem Komplex von A-21978C (100 g), der gemäß US-PS 4 208 403 hergestellt wird.

10     Die Deacylierung des Komplexes von A-21978C wird durch Untersuchung gegenüber *Micrococcus luteus* überwacht. Man lässt die Fermentation bis zur vollständigen Deacylierung weiterlaufen, die sich durch ein Verschwinden der Aktivität gegenüber *Micrococcus luteus* äußert, was nach einer Zeitdauer von etwa 24 Stunden der Fall ist.

15     C. Isolierung des Kerns von A-21978C

20     Die in der im Abschnitt B beschriebenen Weise erhaltene gesamte Fermentationsbrühe (20 l) wird unter Verwendung einer Filterhilfe (Hyflo Super-Cel, Johns Manville Corp.) filtriert. Der Mycelkuchen wird verworfen. Das erhaltene Filtrat wird durch eine Säule geführt, die 1,5 l HP-20-Harz enthält (DIAION Hochporöses Polymer, HP-Serie, Mitsubishi Chemical Industries Limited, Tokio, Japan). Der dabei erhaltene Säulenabstrom wird verworfen. Die Säule wird dann zur Entfernung restlicher filtrierter Brühe mit deionisiertem Wasser (10 l) gewaschen. Das dabei anfallende Waschwasser wird ebenfalls verworfen. Sodann eluiert man die Säule mit Gemischen aus Wasser und Acetonitril (jeweils 10 l in Verhältnissen von 95 : 5, 9 : 1 und 4 : 1), wobei man Fraktionen von jeweils 1 l auffängt.

1 Die Elution wird papierchromatographisch unter Verwen-  
dung eines Lösungsmittelsystems aus n-Butanol,  
Pyridin, Essigsäure und Wasser (15 : 10 : 3 : 12) und  
Detektion der Verbindungen durch UV-Fluoreszenz über-  
wacht. In diesem System haben die Faktoren von A-21978C  
5 einen  $R_f$ -Wert von etwa 0,56, während der Kern von  
A-21978C einen  $R_f$ -Wert von etwa 0,32 aufweist. Das Pro-  
dukt lässt sich ferner auch durch analytische HPLC  
unter Einsatz von Siliciumdioxidgel-C<sub>18</sub> und eines  
10 Lösungsmittelsystems aus Wasser und Methanol (3 : 1)  
das 0,1 % Ammoniumacetat enthält, und Detektion des  
Kerns mit einem UV-Monitor bei 254 nm überwachen.

15 Die Fraktionen, die den Kern enthalten, werden vereinigt,  
unter Vakuum zur Entfernung des Acetonitrils eingeengt  
und gefriergetrocknet, wodurch man zu 40,6 g halbge-  
reinigtem Kern von A-21978C gelangt.

20 D. Reinigung des Kerns von A-21978C

Man löst den gemäß obigem Abschnitt C erhaltenen halb-  
gereinigten Kern von A-21978C (15 g) in 75 ml eines Gemisches  
aus Wasser, Methanol und Acetonitri (82 : 10 : 8), das  
25 0,2 % Essigsäure und 0,8 % Pyridin enthält. Die Lösung  
wird in eine 4,7 x 192 cm messende Säule gepumpt, die  
3,33 l Siliciumdioxidgel-C<sub>18</sub> enthält (Quantum LP-1,  
Quantum Industries, 341 Kaplan Drive, Fairfield, N.J.  
07006, V.St.A.). Die Säule wird mit dem gleichen  
30 Lösungsmittelsystem entwickelt. Es werden Fraktionen  
mit einem Volumen von jeweils 350 ml gesammelt. Die  
Auftrennung wird bei 280 nm mit einem UV-Monitor über-  
wacht. Die den Kern enthaltenden Fraktionen werden  
vereinigt, unter Vakuum zur Entfernung der Lösungs-  
mittel eingeengt und gefriergetrocknet, wodurch man zu  
35 5,2 g gereinigtem Kern von A-21978C gelangt.

E. Eigenschaften des Kerns von A-21978C

Der Kern von A-21978C hat folgende Eigenschaften:

- 5 (a) Form: Weißer amorpher Feststoff, der unter kurzwelligem UV-Licht fluoresziert
- (b) Empirische Formel:  $C_{62}H_{82}N_{16}O_{26}$
- 10 (c) Molekulargewicht: 1466
- (d) Löslichkeit: Löslich in Wasser
- (e) Das Infrarotabsorptionsspektrum (KBr) zeigt Absorptionsmaxima bei:  
3300 (breit), 3042 (schwach), 2909 (schwach),  
1655 (stark), 1530 (stark), 1451 (schwach),  
1399 (mittel), 1222 (mittel), 1165 (schwach),  
1063 (schwach) und 758 (mittel bis schwach)  $\text{cm}^{-1}$ .
- 20 (f) Das UV-Absorptionsspektrum in Methanol zeigt Maxima bei 223 nm ( $\epsilon = 41482$ ) und 260 nm ( $\epsilon = 8687$ ).
- 25 (g) Die elektrometrische Titration in 66%-igem wässrigem Dimethylformamid ergibt die Anwesenheit von vier titrierbaren Gruppen mit  $pK_a$ -Werten von etwa 5,2, 6,7, 8,5 und 11,1 (anfänglicher pH = 6,12).
- 30

1      Herstellungsbeispiel 2

Anderes Verfahren zur Herstellung des Kerns von A-21978C

5      Der Kern von A-21978C wird nach dem im Herstellungs-  
      beispiel 1 beschriebenen Verfahren mit Ausnahme bestimm-  
      ter Änderungen im Abschnitt B hergestellt. Die Kultur  
      von Actinoplanes utahensis wird zuerst etwa 48 Stunden  
      inkubiert. Das Substrat ist ein halbgereinigter Komplex  
10     von A-21978C (50 g). Nach Zusatz des Substrats wird  
      etwa 16 Stunden inkubiert. Die filtrierte Brühe wird  
      durch eine Säule geführt, die 3,1 l HP-20-Harz enthält.  
      Die Säule wird mit 10 Volumina Wasser gewaschen und  
      dann mit einem Gemisch aus Wasser und Acetonitril  
15     (95 : 5) eluiert. Die Elution wird wie beim Herstellungs-  
      beispiel 1 überwacht. Nach Sammeln von 24 l Eluat wird  
      weiter unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches  
      aus Wasser und Acetonitril(9 : 1) eluiert. Die den Kern ent-  
      haltenden Fraktionen werden mit diesem Lösungsmittel-  
20     gemisch eluiert. Die dabei anfallenden Fraktionen werden  
      vereinigt, unter Vakuum zur Entfernung von Acetonitril  
      eingeengt und gefriergetrocknet, wodurch man zu 24,3 g  
      halbgereinigtem Kern von A-21978C gelangt.

25     Dieser halbgereinigte Kern von A-21978C (24,3 g) wird in  
      Wasser (400 ml) gelöst. Die Lösung wird in eine 4,7 x  
      192 cm messende Stahlsäule gepumpt, die 3,33 l Sili-  
      ciumdioxidgel-C<sub>18</sub> (Quantum LP-1) enthält, das in einem  
      Gemisch aus Wasser, Methanol und Acetonitril (8 :1 : 1)  
30     zubereitet ist, welches 0,2 % Essigsäure und 0,8 %  
      Pyridin enthält. Die Säule wird mit dem gleichen Lösungs-  
      mittelgemisch bei einem Druck von etwa 136 bar ent-  
      wickelt, wobei man Fraktionen mit jeweils 350 ml  
      sammelt. Die Elution wird durch UV-Licht bei 280 nm  
      überwacht. Die den Kern enthaltenden Fraktionen werden  
      vereinigt, unter Vakuum zur Entfernung der Lösungsmittel  
      eingeengt und gefriergetrocknet, wodurch man zu 14 g  
35     hochgereinigtem Kern von A-21978C gelangt.

1    Herstellungsbeispiel 3

Herstellung der Faktoren C<sub>2</sub> und C<sub>3</sub> von N<sub>Orn</sub>-t-BOC-A-21978C

5

Ein gemäß US-PS 4 208 403 hergestelltes Gemisch der Faktoren C<sub>2</sub> und C<sub>3</sub> von A-21978C (10 g) wird unter Be-  
schallung (200 mg/ml) in Wasser (50 ml) gelöst. Der pH-Wert der Lösung wird von 4,05 durch Zugabe von  
10 5n NaOH (3,6 ml) auf 9,5 eingestellt. Man gibt Di-t-  
butyldicarbonat (3,0 ml) zu und röhrt das Reaktionsge-  
misch 2 Stunden bei Raumtemperatur. Der pH-Wert des  
Reaktionsgemisches wird durch manuelle Zugabe von 5n  
NaOH (6,5 ml werden innerhalb von 2 Stunden zugesetzt)  
15    auf 9,5 gehalten.

Die Reaktion wird periodisch durch TLC über Silicium-  
dioxidgel unter Anwendung eines Lösungsmittelsystems  
aus CH<sub>3</sub>CN und H<sub>2</sub>O (7 : 3 und 8 : 2) und Detektion durch  
20    UV-Licht überwacht.

Nach etwa 10 Minuten trübt sich die Reaktionslösung  
rasch ein und erhöht sich der Verbrauch an Base. Nach  
etwa 30 Minuten erniedrigt sich die Geschwindigkeit der  
25    Erhöhung der Eintrübung und des Verbrauchs an Base, was  
die Beendigung der Reaktion anzeigen. Unabhängig davon  
wird die Reaktion zur Sicherstellung ihrer Beendigung  
jedoch noch weitere 90 Minuten fortgeführt. Am Ende der  
zweistündigen Umsetzungszeit wird das Reaktionsmaterial  
30    sofort lyophilisiert, wodurch man zu 12,7 g der Faktoren  
C<sub>2</sub> und C<sub>3</sub> von N<sub>Orn</sub>-t-BOC-A-21978 gelangt.

Unter Anwendung ähnlicher Verfahren führt man auch zwei  
Reaktionen mit 10 g Material und eine Reaktion mit 30 g  
35    Material durch. Bei jeder dieser Reaktionen beträgt die  
Umsetzungszeit nur 40 Minuten. Die zwei Versuche mit  
10 g Material führen zu 11,9 g bzw. zu 12,1 g Produkt.  
Die Umsetzung mit 30 g Material ergibt 35,4 g Produkt.

1      Herstellungsbeispiel 4

Herstellung des Kerns von A-21978C-N<sub>Orn</sub>-t-BOC

5

A. Fermentation von Actinoplanes utahensis

Man fermentiert Actinoplanes utahensis nach dem im Herstellungsbeispiel 1 unter Abschnitt A beschriebenen Verfahren unter Verwendung des schrägen Mediums A und des Produktionsmediums I, wobei man das Produktionsmedium etwa 66 Stunden inkubiert.

15

B. Deacylierung des Komplexes von N<sub>Orn</sub>-t-BOC-A-21978C

20

Der Komplex von A-21978C-N<sub>Orn</sub>-t-BOC (1185 g an rohem Substrat, das etwa 176 g Komplex an A-21978C enthält) wird zum Fermentationsmedium gegeben. Die Deacylierung wird wie beim Herstellungsbeispiel 1 im Abschnitt B beschrieben durchgeführt. Die Deacylierung ist aufgrund einer HPLC nach etwa 24 Stunden beendet.

25

C. Isolierung des Kerns von A-21978C-N<sub>Orn</sub>-t-BOC

30

Die gemäß Abschnitt B erhaltene Fermentationsbrühe (100 l) wird unter Verwendung einer Filterhilfe (Hyflo Super-Cel) filtriert. Das Filtrat wird durch eine Säule geführt, die 7,5 l HP-20-Harz (DIAION) enthält, und die Säule wird mit Wasser (38 l) gewaschen. Die Elution wird durch Siliciumdioxidgel-C<sub>18</sub>-HPLC unter UV-Detektion bei 254 nm überwacht. Mit der Waschflüssigkeit wird eine gewisse Menge an Kern eluiert. Die anschließende eigentliche Elution des Kerns wird unter Verwendung folgender Gemische aus Wasser und Acetonitril durchgeführt:

35

1      40 l (95 : 5), 40 l (9 : 1) und 100 l (85 : 15). Die  
den Kern enthaltenden Fraktionen werden vereinigt, unter  
Vakuum zur Entfernung des Lösungsmittels eingeengt und  
gefriergetrocknet, wodurch man zu 298,5 g halbgereinig-  
5 tem Kern von A-21978C-N<sub>Orn</sub>-t-BOC gelangt.

D. Reinigung des Kerns von A-21978C-N<sub>Orn</sub>-t-BOC

10     Der nach Abschnitt C erhaltene halbgereinigte Kern von  
A-21978C-N<sub>Orn</sub>-t-BOC (30 g) wird in einem Gemisch aus  
Wasser und Acetonitril (9 : 1) gelöst, das 0,2 % Essig-  
säure und 0,8 % Pyridin enthält (75 ml). Die Lösung wird  
auf eine 4,7 x 192 cm messende Stahlsäule gegeben, die  
15    3,33 l Siliciumdioxidgel-C<sub>18</sub> (Quantum LP-1) enthält, das  
mit dem gleichen Lösungsmittelsystem äquilibriert worden  
ist. Die Säule wird unter Druck mit einem Lösungsmittel-  
gemisch aus Wasser, Acetonitril und Methanol (80 : 15:5)  
entwickelt, das 0,2 % Essigsäure und 0,8 % Pyridin ent-  
hält, wobei man Fraktionen von jeweils 350 ml sammelt  
20    und die Detektion des Produkts durch UV-Licht bei 280 nm  
durchführt. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen  
werden vereinigt, unter Vakuum zur Entfernung des  
Lösungsmittels eingeengt und gefriergetrocknet, wodurch  
25    man zu 18,4 g des gereinigten Kerns von A-21978C-N<sub>Orn</sub>-  
t-BOC gelangt.

Der Kern von A-21978C-N<sub>Orn</sub>-t-BOC hat folgende Eigen-  
schaften:

30

(a)     Form: Weißer amorpher Feststoff, der unter  
kurzwelligem UV-Licht fluoresziert.

35

(b)     Empirische Formel: C<sub>67</sub>H<sub>90</sub>N<sub>16</sub>O<sub>28</sub>

(c)     Molekulargewicht: 1566

(d)     Löslichkeit: Löslich in Wasser

- 1 (e) Das Infrarotabsorptionsspektrum (KBr) zeigt Absorptionsmaxima bei:  
3345 (breit), 3065 (schwach), 2975 (schwach),  
2936 (schwach), ~1710 (Schulter), 1660 (stark),  
5 1530 (stark), 1452 (schwach), 1395 (mittel),  
1368 (schwach), 1341 (schwach), 1250 (mittel),  
1228 (mittel), 1166 (mittel bis schwach) und  
1063 (schwach)  $\text{cm}^{-1}$ .
- 10 (f) Das UV-Absorptionsspektrum in 90%-igem Ethanol zeigt Maxima bei 220 nm ( $\epsilon = 42000$ ) und 260 nm ( $\epsilon = 10600$ ).
- 15 (g) HPLC-Verweilzeit: 6 Minuten auf einer 4,6 x 300 mm messenden und mit Siliciumdioxidgel-C<sub>18</sub> gefüllten Säule unter Einsatz eines Lösungsmittelgemisches aus H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>CN und CH<sub>3</sub>OH (80 : 15 : 5), das 0,2 % NH<sub>4</sub>OAc enthält, bei 20 einer Fließgeschwindigkeit von 2 ml/min unter Detektion mit UV-Licht.

Herstellungsbeispiel 5

25 Andere Reinigung des Kerns von A-21978C-N<sub>Orn</sub>-t-BOC

Man löst den nach dem Herstellungsbeispiel 4, Abschnitt C, erhaltenen halbgereinigten Kern von A-21978C-N<sub>Orn</sub>-t-BOC (10,8 g) in Wasser und gibt die Lösung auf eine Säule, die 80 ml Amberlit IRA-68 (Rohm and Haas, Philadelphia, PA, V.St.A., Acetatcyclus) enthält. Die Säule wird mit Wasser gewaschen und bei einer Fließgeschwindigkeit von 5 ml/min der Reihe nach zuerst mit 30 0,05n Essigsäure (1080 ml), dann mit 0,1n Essigsäure (840 ml) und schließlich mit 0,2n Essigsäure (3120 ml) eluiert, wobei man Fraktionen von jeweils 120 ml sammelt. Die Säule wird durch analytische HPLC über Siliciumdi-

1 oxidgel-C<sub>18</sub> überwacht, wobei ein Lösungsmittelsystem  
aus Wasser, Acetonitril und Methanol (80 : 15 : 5)  
verwendet wird, das 0,2 % Ammoniumacetat enthält, und  
die Detektion des Produkts durch UV-Licht bei 254 nm  
5 vorgenommen wird. Die das Produkt enthaltenden Frak-  
tionen werden vereinigt. Der pH-Wert dieser Lösung wird  
mit Pyridin auf 5,8 eingestellt. Die Lösung wird dann  
unter Vakuum auf ein Volumen von etwa 200 ml eingeengt.  
Das Konzentrat wird mit Wasser versetzt und die erhal-  
10 tene Lösung zur Entfernung von Pyridin erneut konzen-  
triert. Dieses Konzentrat wird gefriergetrocknet, wodurch  
man zu 3,46 g gereinigtem Kern von A-21978C-N<sub>Orn</sub>-t-BOC  
gelangt.

15

Beispiel 1

Herstellung von N<sub>Trp</sub>-p-(n-Dodecyloxy)benzoyl-N<sub>Orn</sub>-t-  
BOC-A-21978C-Kern

20

Eine Lösung von 2,4,5-Trichlorphenyl-p-(n-dodecyloxy)-  
benzoat (0,9 g) und A-21978C-t-BOC-Kern (0,9 g) in  
400 ml wasserfreiem Dimethylformamid wird unter einer  
Stickstoffatmosphäre 120 Stunden bei Raumtemperatur  
25 gerührt. Das Lösungsmittel wird durch Verdampfen unter  
verringertem Druck entfernt. Das zurückbleibende Material  
wird 2 Stunden mit einem Gemisch aus Diethylether (400  
ml) und Chloroform (400 ml) gerührt. Das Produkt wird  
durch Filtrieren abgetrennt und getrocknet, wodurch man  
30 zu einem hellbraunen Pulver (0,962 g) gelangt. Ein  
Teil dieses Materials (0,78 g) wird in Methanol (200 ml)  
gelöst und durch präparative HPLC gereinigt, wozu eine  
Prep LC/System 500-Einheit (Waters Associates, Inc.,  
Milford, MA, V.St.A.) und eine Prep Pak-500-C<sub>18</sub>-Säule  
35 (Waters Associates) als stationäre Phase verwendet wird.  
Die Säule wird isokratisch betrieben, wobei ein Lösungs-  
mittelsystem aus Wasser, Methanol und Acetonitril (2:1:2)  
verwendet wird und Fraktionen von jeweils 250 ml (eine

- 1 Fraktion pro Minute) gesammelt werden. Die gewünschte  
Verbindung wird in den zweiten bis sechsten Fraktionen  
eluiert.
- 5 Die entsprechenden Fraktionen werden auf Basis des TLC  
vereinigt (Umkehrphasen-C<sub>18</sub>-Siliciumdioxidgel, Entwick-  
lung mit einem Lösungsmittelsystem aus Wasser, Methanol  
und Acetonitril (3 : 3 : 4), Detektion durch Besprühung  
mit Van Urk-Sprühmittel) durch Bioautographie der  
10 vereinigten Fraktionen unter Anwendung einer Dünnschicht-  
chromatographie mittels Siliciumdioxidgel, eines Lö-  
sungsmittelsystems aus Acetonitril, Aceton und Wasser  
(2 : 2 : 1) und Staphylococcus aureus als Detektions-  
organismus ergibt sich, daß das Produkt eine einzelne  
15 bioaktive Komponente ist. Das Verfahren führt zu 0,421 g  
 $N_{Trp}-p-(n-Dodecyloxy)benzoyl-N_{Orn}-t-BOC-A-21978C$ -Kern.

Beispiel 2

- 20 Herstellung von  $N_{Trp}-p-(n-Dodecyloxy)benzoyl-A-21978C$ -  
Kern

25 Man löst  $N_{Trp}-p-(n-Dodecyloxy)benzoyl-N_{Orn}-t-BOC-A-$   
 $21978C$ -Kern (230 mg) in 5 ml Trifluoressigsäure, die  
2 % Anisol enthält, und röhrt das Ganze 5 Minuten bei  
0°C. Die Lösung wird unter Vakuum zu einem Öl eingeengt  
und das Öl mit Et<sub>2</sub>O (100 ml) behandelt. Die Feststoffe  
werden abgetrennt, an der Luft getrocknet und in Wasser  
30 (10 ml) aufgenommen. Der pH-Wert dieser Lösung wird  
durch Zusatz von Pyridin von 3,25 auf 7 eingestellt.  
Die erhaltene Lösung wird lyophilisiert, wodurch man zu  
179 mg weißem amorphem  $N_{Trp}-p-(n-Dodecyloxy)benzoyl-$   
A-21978C-Kern gelangt. Bei einer dünnschichtchromato-  
35 graphischen Untersuchung mittels Siliciumdioxidgel  
unter Anwendung eines Lösungsmittelsystems aus Aceto-  
nitril, Aceton und Wasser (2 : 2 : 1) und Einsatz eines  
Van Urk-Sprühmittels zur Detektion ergibt sich für diese

1 Verbindung ein  $R_f$ -Wert von etwa 0,78.

Beispiel 3

5

Die antibakterielle Wirksamkeit der Verbindungen der Formel I kann *in vitro* gezeigt werden. Die bei der Untersuchung repräsentativer Verbindungen der Formel I bezüglich ihrer antibakteriellen Wirksamkeit unter Anwendung des Scheibendiffusionstests auf Agar-Platten erhaltenen Ergebnisse gehen aus der folgenden Tabelle I hervor. In dieser Tabelle I ist die Wirksamkeit durch die Größe (Durchmesser in mm) der beobachteten Zone gemessen, in der ein Wachstum des Mikroorganismus durch die jeweils untersuchte Verbindung gehemmt wird.

10

15

20

25

30

35

Tabelle I

35      30      25      20      15      10      5

Antibakterielle Wirksamkeit von Verbindungen der Formel I nach dem  
Scheiben-Diffusionstest auf Agarplatten

R	Verbindung	Größe der Hemmzone (mm) a				
		Staphylococcus aureus ATCC 6738P	Bacillus subtilis ATCC 6633	Micrococcus luteus ATCC 9341	Bacillus subtilis ATCC 6633 b	
H	p-(n-Dodecyloxy)-benzoyl	20	13	18	20	
R <sup>1</sup>	t-BOC-benzoyl	20	10	15	22	

a Die jeweiligen Verbindungen sind in Wasser in einer Konzentration von 1 mg/ml suspendiert. In die Suspension wird eine 7 mm große Scheibe getaucht, die man dann auf die Agaroberfläche legt. Es wird 24 bis 48 Stunden bei 25 bis 37°C inkubiert.

b Auf Minimalnähragar gewachsen.

- 1 Die bei der Untersuchung der antibakteriellen Wirksamkeit  
einer repräsentativen Verbindung der Formel I unter  
Anwendung des üblichen Agar-Verdünnungsversuchs erhal-  
tenen Ergebnisse gehen aus der folgenden Tabelle II  
5 hervor. In dieser Tabelle II ist die Wirksamkeit durch  
die minimale Hemmkonzentration (MIC-Werte) gemessen,  
nämlich durch die niedrigste Konzentration der Verbin-  
dung, die das Wachstum des Mikroorganismus hemmt.

10

15

20

25

30

35

Tabelle II

<u>Versuchsorganismen</u>	<u>MIC-Werte<sup>a</sup></u>
Staphylococcus aureus X1.1	1
Staphylococcus aureus V41 <sup>b</sup>	1
Staphylococcus aureus X400 <sup>c</sup>	2
Staphylococcus aureus S13E	1
Staphylococcus epidermidis EPI1	4
Staphylococcus epidermidis EPI2	2
Streptococcus pyogenes C203	0,25
Streptococcus pneumoniae Park I	0,015
Streptococcus Gruppe D X66	2
Streptococcus Gruppe 9960	1

<sup>a</sup> MIC in µg/ml

<sup>b</sup> penicillinresistenter Stamm

<sup>c</sup> methicillinresistenter Stamm

Antibiotische Wirksamkeit von N<sub>Trp</sub>-p-(n-Dodecylxy)benzoyl-A-21978C

1 Die Cyclopeptide von A-21978C der Formel I zeigen auch  
in vivo eine antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber  
experimentell hervorgerufenen Bakterieninfektionen. Ver-  
abreicht man Mäusen mit den gezeigten Infektionen zwei  
5 Dosen der zu untersuchenden Verbindung, dann lässt sich  
eine entsprechende Wirksamkeit beobachten, die in Form  
der ED<sub>50</sub>-Werte gemessen wird (wirksame Dosis in mg/kg,  
die einen Schutz von 50 % der Versuchstiere ergibt)  
(J. Bacteriol. 81, 233 bis 235 (1961)). Die dabei erhal-  
10 tenen ED<sub>50</sub>-Werte gehen aus der folgenden Tabelle III  
hervor.

15

20

25

30

35

Tabelle III

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35

In vivo Wirksamkeit von  $N_{Trp}$ -p-(n-Dodecylloxy)benzoyl-A-21978C

Verbindung der Formel I<sup>a</sup>

ED<sub>50</sub>-Werte<sup>b</sup>

R	<u>Staphylococcus aureus</u>	<u>Streptococcus pyogenes</u>
<u>subkutan</u>	<u>subkutan</u>	<u>oral</u>
$N_{Trp}$ -p-(n-Dodecylloxy)benzoyl	3,35	0,31

a R<sup>1</sup> = H

b mg/kg x 2

1 Die Verbindung N<sub>Trp</sub>-p-(n-Dodecyloxy)benzoyl-A-21978C  
zeigt nach intravenöser Verabreichung an Mäuse eine  
akute Toxizität in Form eines LD<sub>50</sub>-Wertes von 67,5 mg/kg.

5

10

15

20

25

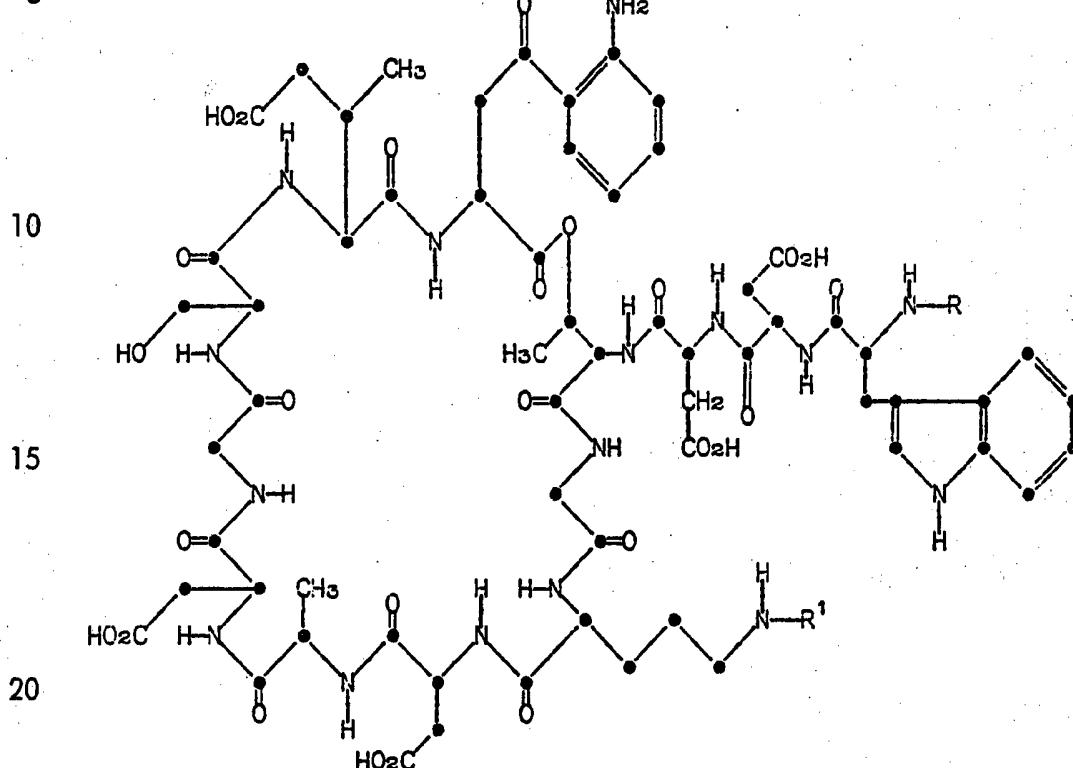
30

35

1 Erfindungsansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von A-21978C-Cyclopeptidderivaten der Formel I

5

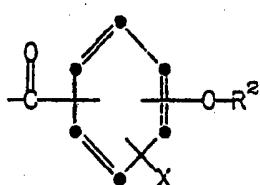


I

25

worin R eine substituierte Benzoylgruppe der folgenden Formel ist

30



35

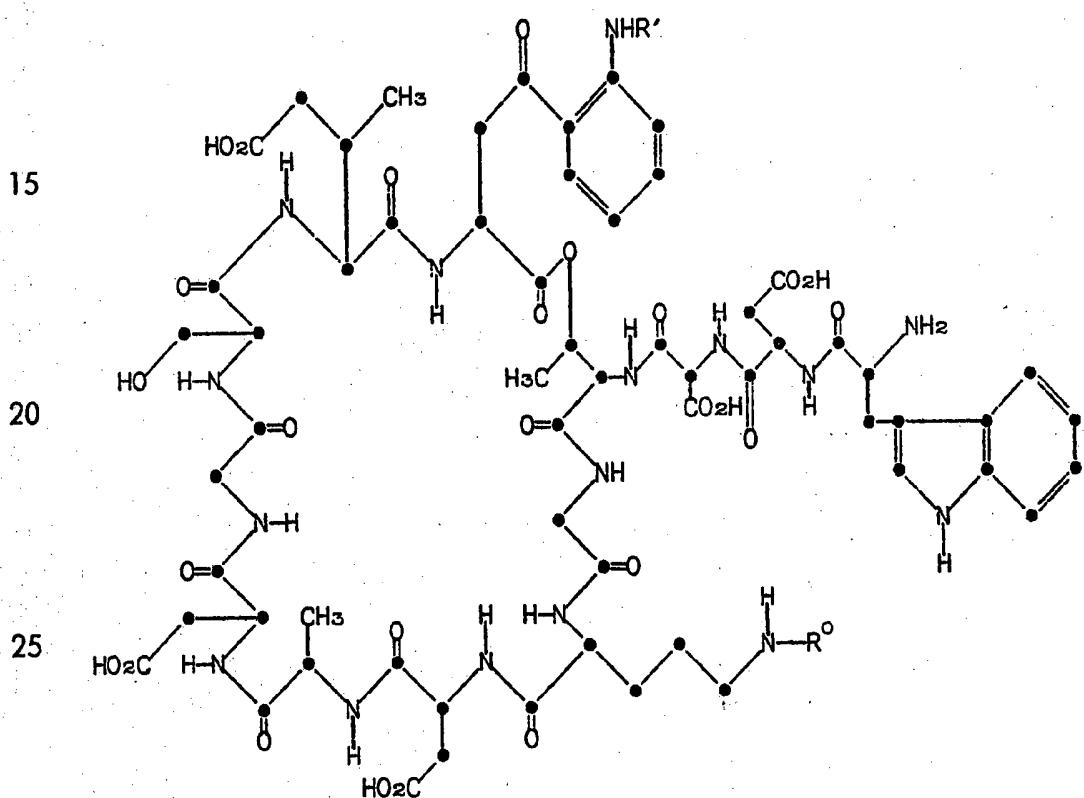
1 in welcher R<sup>2</sup> für C<sub>8</sub>-C<sub>15</sub>-Alkyl steht, und X Wasserstoff, Chlor, Brom, Iod, Nitro, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkyl, Hydroxy, C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkoxy oder C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>-Alkylthio ist, und worin R<sup>1</sup> Wasserstoff oder eine Aminoschutzgruppe bedeutet,

5

oder von pharmazeutisch unbedenklichen Salzen hiervon,

dadurch gekennzeichnet, daß man den Kern von A-21978C der Formel III

10



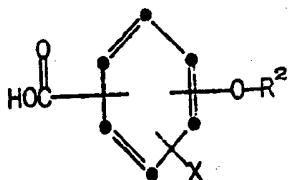
30

III

35 oder ein geeignet geschütztes Derivat hiervon, worin  
R' und R<sup>O</sup> unabhängig voneinander Wasserstoff oder eine  
Aminoschutzgruppe bedeuten, oder ein pharmazeutisch  
unbedenkliches Salz hiervon, mit einem Acylierungsmittel  
der Formel V

1

5



V

10 oder einem aktivierten Derivat hiervon, worin X und R<sup>2</sup> die oben angegebenen Bedeutungen haben, umsetzt.

2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen, worin R<sup>2</sup> für C<sub>10</sub>-C<sub>13</sub>-Alkyl steht, oder Salze hiervon herstellt.

3. Verfahren nach Punkt 2, dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen, worin R<sup>2</sup>-O- für Dodecyloxy steht, oder Salze hiervon herstellt.

20

4. Verfahren nach Punkt 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen, worin X für Wasserstoff steht, oder Salze hiervon herstellt.

25

5. Verfahren nach Punkt 2, dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen, worin R<sup>2</sup>-O- für p-(n-Dodecyloxy) steht und X Wasserstoff ist, oder Salze hiervon herstellt.

30

6. Verfahren nach Punkt 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen, worin X Chlor, Brom oder Iod bedeutet, oder Salze hiervon herstellt.

35

7. Verfahren nach Punkt 1, 2, 3 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen, worin R<sup>1</sup> eine Aminoschutzgruppe ist, oder Salze hiervon herstellt.

8. Verfahren nach Punkt 7, dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen, worin die Aminoschutzgruppe für t-Butoxycarbonyl steht, oder Salze hiervon herstellt.