



Ausschliessungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

209 810

Int. Cl.³

3(51) C 07 C103/52

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(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-R² und X substituierte Benzoylgruppe ist, in welcher R² für C₈-C₁₅-Alkyl steht und X Wasserstoff, Chlor, Brom, Iod, Nitro, C₁-C₃-Alkyl, Hydroxy, C₁-C₃-Alkoxy oder C₁-C₃-Alkylthio bedeutet und worin R¹ 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 Benzoessäurederivat oder einen aktivierten Ester hiervon handelt. Eine bevorzugte hiernach erhältliche Verbindung ist N_{Trp}-p-(n-Dodecyloxy)benzoyl-A-21978C. Formel I

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:

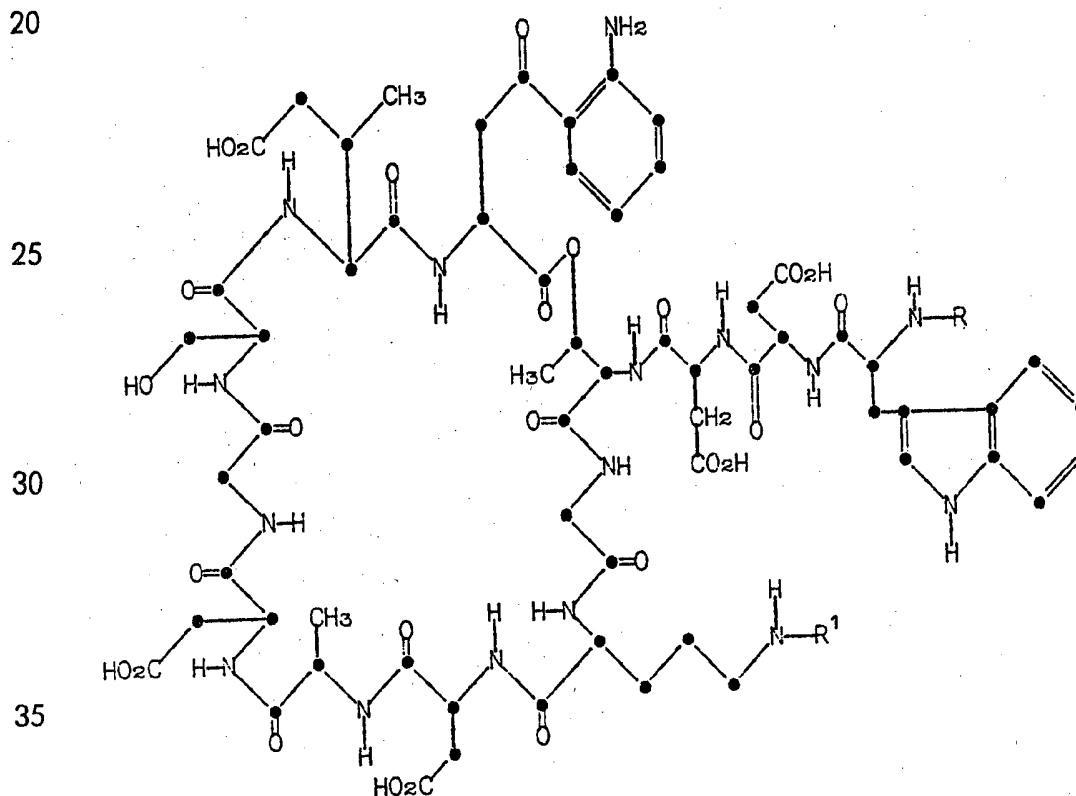
Die große Wahrscheinlichkeit und ständige Gefahr der Entwicklung antibiotikaspezifischer resistenter Stämme
30 pathogener Mikroorganismen macht die Entwicklung neuer Antibiotika zu einem großen Bedürfnis. Vor allem Krankheitserreger innerhalb der grampositiven Arten von Staphylococcus und Streptococcus sind häufig resistent gegenüber herkömmlich verwendeten Antibiotika, wie
35 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:

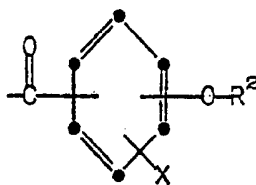
- 5 Diese Aufgabe wird nun erfindungsgemäß durch neue A-21978C-Cyclopeptidderivate und pharmazeutisch unbedenkliche Salze hiervon gelöst, die sich als wirksame antibiotische Mittel erwiesen haben.
- 10 Diese neuen Derivate können hergestellt werden durch Umsetzung des Kerns von A-21978C, der durch Deacylierung des geeignet blockierten Komplexes von A-21978C oder irgendeines seiner geeignet blockierten Einzelfaktoren C₀, C₁, C₂, C₃, C₄ oder C₅ erhältlich ist, mit dem
- 15 gewünschten Acylierungsmittel oder einem aktivierten Derivat hiervon.

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



- 1 worin R eine substituierte Benzoylgruppe der folgenden Formel ist

5



- 10 in welcher R^2 für C_8-C_{15} -Alkyl steht, und X Wasserstoff, Chlor, Brom, Iod, Nitro, C_1-C_3 -Alkyl, Hydroxy, C_1-C_3 -Alkoxy oder C_1-C_3 -Alkylthio ist, und worin R^1 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 größtenteils 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 = 1H -magnetische Kernresonanz
 35 TLC = Dünnschichtchromatographie
 UV = Ultraviolett

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

5

<u>Faktoren von A-21978C</u>		<u>Rest R^N</u>
	C_1	8-Methyldecanoyl
	C_2	10-Methylundecanoyl
	C_3	10-Methyldodecanoyl
10	C_0	C_{10} -Alkanoyl*
	C_4	C_{12} -Alkanoyl*
	C_5	C_{12} -Alkanoyl*

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

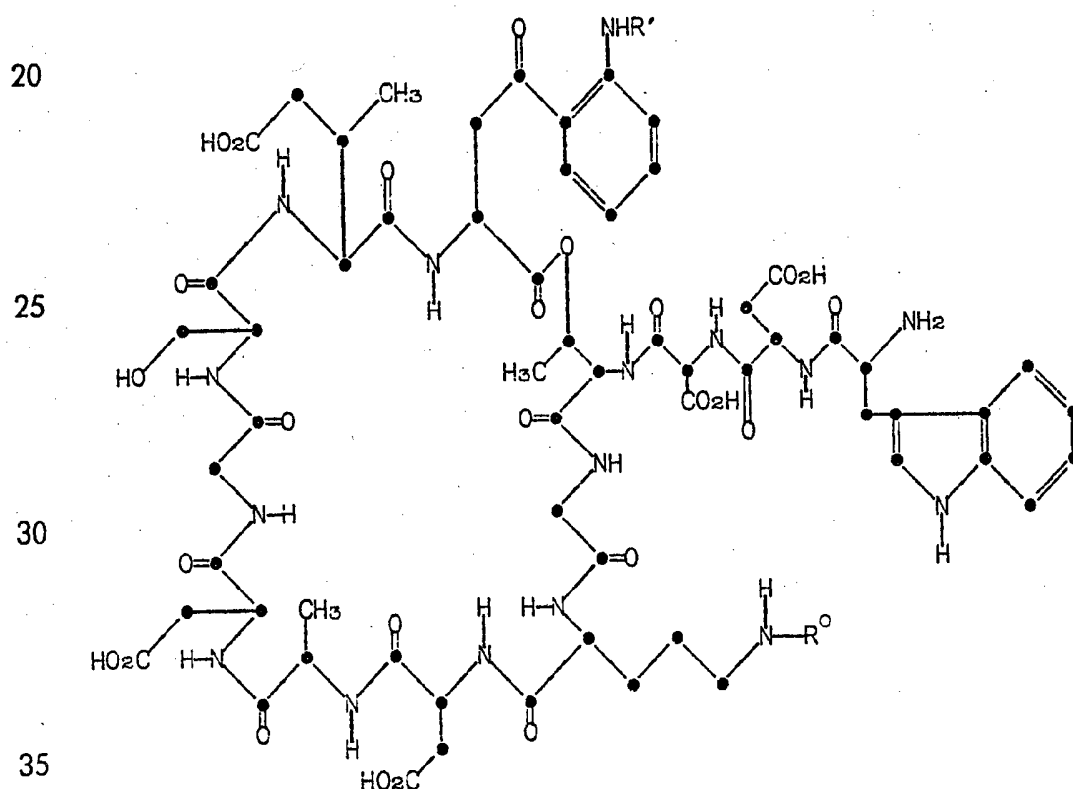
Steht man vor dem Problem einer Deacylierung eines Peptidantibiotikums, dann läßt sich nur äußerst schwer erkennen, ob es ein Enzym gibt, das man für diesen Zweck verwenden kann. Die Auffindung eines solchen Enzyms ist sogar noch schwieriger, wenn das antibiotische Substrat einen Cyclopeptidkern enthält. Enzyme verfügen über ein hohes Ausmaß an Spezifität, und Unterschiede im Peptidrest und in der Seitenkette des Substrats beeinflussen daher das Ergebnis des Versuchs einer Deacylierung. Eine Reihe von Mikroorganismen bilden darüberhinaus eine große Anzahl Peptidasen, die unterschiedliche Teile des Peptidrests 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 Mikroorganismus Actinoplanes utahensis NRRL 12052 oder eine Variante hiervon, gebildet werden. Zur Bewerkstelligung einer solchen Deacylierung gibt man ein Antibiotikum, das ausgewählt ist aus dem Komplex von A-21978C, den

35

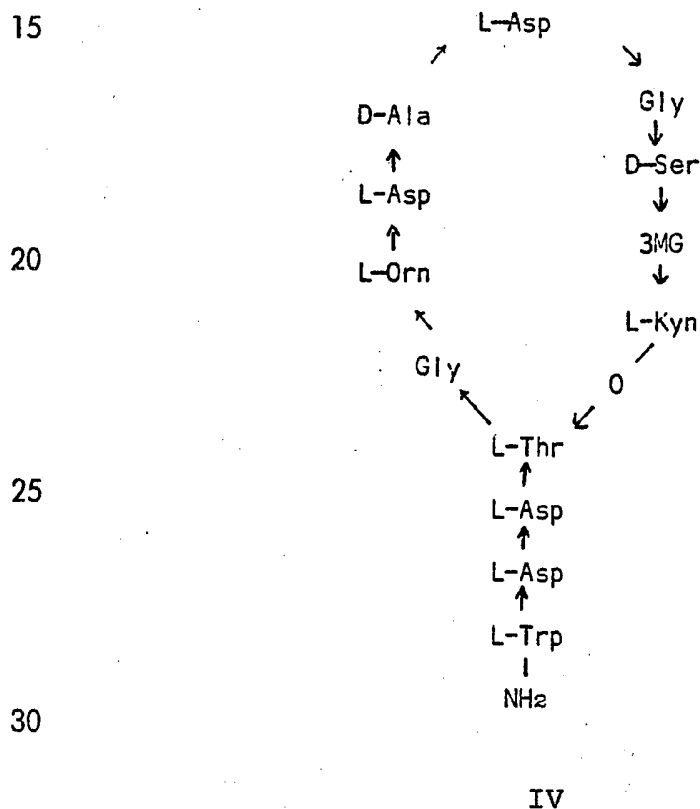
Die durch diese enzymatischen Deacylierungen erhaltenen Cyclopeptide haben die folgende Formel III



III

- 1 worin R' und R^O unabhängig voneinander Wasserstoff oder eine Aminoschutzgruppe bedeuten, oder sind Salze hiervon.

- 5 Durch Entfernung des Acylrests vom Komplex von A-21978C 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:



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

- 1 Die Verbindungen der Formel III, worin R^O oder R' eine
andere Bedeutung als Wasserstoff haben, werden herge-
stellt durch Deacylierung der geeignet blockierten Fak-
toren C_0 , C_1 , C_2 , C_3 , C_4 und C_5 des Antibiotikums A-21978C.
5 Diese Verbindungen werden hierin der Einfachheit halber
als blockierte Kerne von A-21978C bezeichnet. Diese blok-
kierten Verbindungen eignen sich als Zwischenprodukte
zur Herstellung bestimmter Peptide der Formel I, nämlich
derjenigen Verbindungen, bei denen R^1 eine Aminoschutz-
10 gruppe bedeutet.

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
15 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 Mikroorganis-
men eingehend in der am gleichen Tage wie die vorliegende
Anmeldung eingereichten Parallelanmeldung mit dem internen
25 Aktenzeichen X-5279 beschrieben. Das bevorzugte Deacy-
lierungsenzym, 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
30 61604, V.St.A. hinterlegt und von dort unter der Nummer
NRRL 12052 frei beziehbar. Das spätere Herstellungsbei-
spiel 1 zeigt die Herstellung des Kerns von A-21978C
durch Fermentation unter Verwendung des Komplexes von
A-21978C als Substrat und von *Actinoplanes utahensis*
35 NRRL 12052 als Mikroorganismus. Andere Kulturen von
Actinoplanaceae, die sich zur Herstellung des Kerne von
A-21978C der Formel III verwenden lassen, sind ebenfalls

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 Mikroorga-
nismus aus der Familie der Actinoplanaceae zur Durchfüh-
rung 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 Fermenta-
tionsmediums 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 Seiten-
kette, wie Lauroyl, n-Decanoyl oder n-Dodecanoyl, zur
Wiederherstellung einer Aktivität.

30 Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf neue Verbin-
dungen, 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

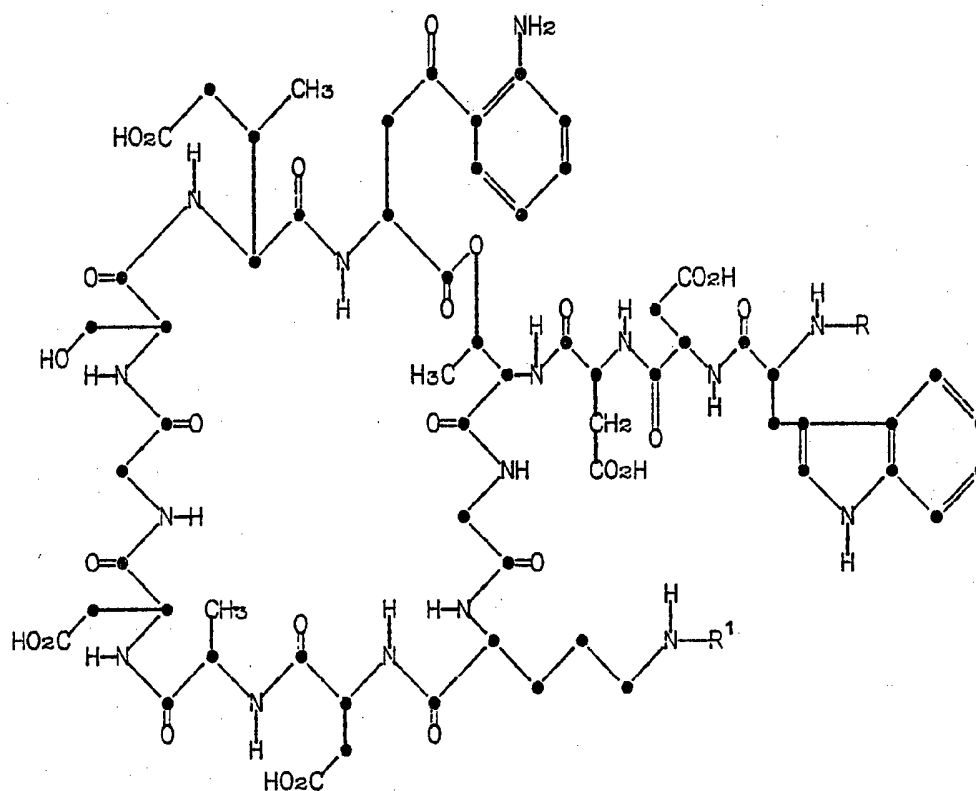
5

10

15

20

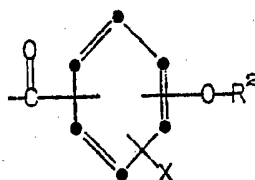
25



I

worin R eine substituierte Benzoylgruppe der folgenden Formel ist

30



35

- 1 in welcher R^2 für C_8-C_{15} -Alkyl steht, und X Wasserstoff,
Chlor, Brom, Iod, Nitro, C_1-C_3 -Alkyl, Hydroxy, C_1-C_3 -Alk-
oxy oder C_1-C_3 -Alkylthio ist, und worin R^1 Wasserstoff
5 hiervon gebildet werden.

In der substituierten Benzoylgruppe können die Funktionen
O
-C- und $-OR^2$ am Benzolring selbstverständlich in ortho-,
10 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 gerad-
kettige als auch verzweigte Kohlenwasserstoffketten ver-
standen.

20 Die Angabe Aminoschutzgruppe bezieht sich auf die übli-
chen Aminoschutzgruppen, die mit den anderen funktionellen
Gruppen im Molekül von A-21978C verträglich sind. Bevor-
zugt 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_8-C_{15} -Alkylreste, die als Substituent R^2
erfindungsgemäß bevorzugt sind, sind folgende:

- 35 (a) $-(CH_2)_nCH_3$, worin n eine ganze Zahl von 7
bis 14 ist, und

- 1
(b) $-(\text{CH}_2)_r \overset{\text{CH}_3}{\underset{|}{\text{CH}}} (\text{CH}_2)_s \text{CH}_3$, worin r und s unabhängig
voneinander für eine Zahl von 0 bis 12 stehen,
wobei r + s jedoch nicht größer als 12 oder
5 nicht kleiner als 5 sein dürfen.

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 Säureadditionssalze sind besonders brauchbar.

Die Verbindungen der Formel I haben beispielsweise fünf freie Carboxylgruppen, die Salze bilden können. Zur Erfindung 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-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 C₁-C₄-Alkylammonium- und Hydroxy-C₂-C₄-alkylammoniumsalze. Beispielhafte Aminsalze sind die durch Umsetzung einer Verbindung der Formel I mit Ammoniumhydroxid, Methylamin, s-Butylamin, Isopropylamin, Diethylamin, Diisopropylamin, Cyclohexylamin, Ethanolamin, Triethylamin oder 3-Amino-1-propanol gebildeten Verbindungen.

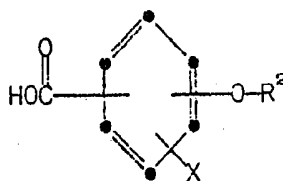
Die kationischen Alkalimetall- und Erdalkalimetallsalze von Verbindungen der Formel I werden unter Anwendung von Verfahren hergestellt, wie sie für die Bildung kationischer Salze üblich sind. Hierzu löst man beispielsweise die

- 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.
- 5
- 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.
- 15

- 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, Benzoessäure oder Zimtsäure.
- 20
- 25
- 30

- 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 Benzoessäure (Formel V) umsetzt, die der gewünschten Acylgruppe (R)
- 35

1 entspricht:



V

10 Hierin haben X und R² die bereits oben erwähnten Bedeutungen.

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

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 Aryloxyameisensäureanhydride, oder (c) aktivierte Ester, wie 2,4,5-Trichlorphenylester, N-Hydroxybenztriazolester oder N-Hydroxy-succinimidester. 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

25
30
35

- 1 Umsetzung mit dem primären Amin wird direkt im Reaktions-
gemisch durchgeführt.

- Es ist für den Fachmann selbstverständlich, daß sich die
5 Verbindungen der Formel I unter Anwendung selektiver
Acylierungsverfahren und Einsatz von Aminoschutzgruppen
herstellen lassen. Verwendet man beispielsweise eine Ver-
bindung der Formel III, worin R' und R^O Wasserstoff
bedeuten, als Ausgangsmaterial, dann kann es sowohl an
10 der α -Aminogruppe von Tryptophan als auch an der δ -Amino-
gruppe von Ornithin zu einer Acylierung kommen, so daß
N_{Trp}, N_{Orn}-Diacylderivate gebildet werden. Die Herstellung
von Derivaten, die an der α -Aminogruppe von Tryptophan
monoacyliert sind, erfolgt daher vorzugsweise durch Acy-
15 lierung einer Verbindung der Formel III, in welcher die
 δ -Aminogruppe von Ornithin (nämlich die Stellung R^O)
durch eine Aminoschutzgruppe blockiert ist. Solche Aus-
gangsmaterialien 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:

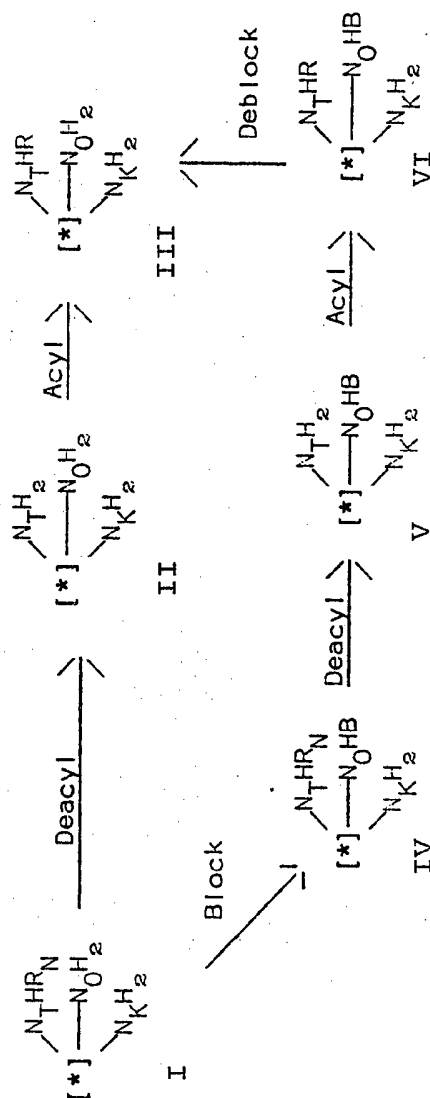
- [*] = Rest von A-21978C
N_T = α -Aminogruppe von Tryptophan
N_O = δ -Aminogruppe von Ornithin
35 N_K = Aromatische Aminogruppe von Kynurenin
R = Angegebene Substituenten der Formel I
R_N = Acylgruppe des natürlichen Faktors

- 1 B = Aminoschutzgruppe
 Acyl = Acylierungsstufe
 Deacyl = Deacylierungsstufe
 Block = Acylierung mit einer Aminoschutzgruppe
 5 Deblock = Entfernung einer Aminoschutzgruppe

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

10
15
20
25
30
35

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



- 1 Ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der Formel I stellt die Methode über einen aktiven Ester dar. Hierzu wird vor allem der 2,4,5-Trichlorphenylester 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 oder Dichlormethan. Die Umsetzungszeit ist nicht kritisch,
- 10 obgleich eine Reaktionszeit von etwa 24 bis 120 Stunden bevorzugt ist. Nach beendeter Umsetzung wird das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand durch Chromatographie gereinigt, beispielsweise durch Umkehrphasen-HPLC unter Verwendung von Siliciumdioxidgel- C_{18} -Umkehrphasenharz als
- 15 stationäre Phase und eines Gemisches aus $H_2O/CH_3OH/CH_3CN$ 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 Herstellung der aktiven Ester liegen im Rahmen des fachmännischen Könnens.

- 25 Die substituierten Säuren der Formel V und die aktivierten Derivate hiervon sind entweder bekannte Verbindungen oder können aus bekannten Verbindungen in an sich bekannter Weise hergestellt werden. Die Alkoxybenzoesäuren lassen sich am besten ausgehend von einer geeigneten Hydroxy-
- 30 benzoesäure herstellen, indem man ein entsprechendes Alkylhalogenid mit dem Dinatriumsalz der jeweiligen Hydroxybenzoesäure umsetzt. Die für diese Verfahren als Ausgangsmaterialien benötigten Hydroxybenzoesäuren und substituierten 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
Zusätze zugegeben werden, wie Kochsalz oder Glukose.
15 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 ED₅₀-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

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

Herstellungsbeispiel 1

10 Herstellung des Kerns von A-21978C

A. Fermentation von Actinoplanes utahensis

Man stellt eine Vorratskultur von Actinoplanes utahensis
NRRL 12052 her und hält diese auf einer Agarschräge. Zur
15 Herstellung der Schräge 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 ₂ HPO ₄	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 ₄ ·7H ₂ O (gelöst in 2 ml konz HCl)	2 g
	KCl	100 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ 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 ₄ · 7H ₂ O	0,25 g
	CaCO ₃	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,
V.St.A.

20

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

25

	<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 ₂ HPO ₄	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 inokulierte vegetative Medium wird in einem 250 ml
fassenden Erlenmeyer-Weithalskolben etwa 72 Stunden bei
30°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert, der sich in
10 einem Bogen mit einem Durchmesser von 5 cm mit 250 U/min
bewegt.

Das inkubierte vegetative Medium kann direkt zur Inoku-
lierung eines vegetativen Mediums der zweiten Stufe
15 verwendet werden. Wahlweise und vorzugsweise bewahrt man
dieses vegetative Medium bis zu einem späteren Gebrauch
auf, indem man die Kultur in einer Dampfphase aus flüssi-
gem 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 inkubier-
tes 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 auf-
bewahrten Suspension (1 ml) beimpft man dann 50 ml eines
vegetativen Mediums der ersten Stufe, welches die oben
beschriebene Zusammensetzung hat. Das inokulierte vege-
30 tative Medium der ersten Stufe wird dann in der oben be-
schriebenen Weise inkubiert.

Zur Bildung eines größeren Volumens an Inokulum inokuliert
man 400 ml eines vegetativen Mediums der zweiten Stufe,
35 das die gleiche Zusammensetzung wie das vegetative Medium
der ersten Stufe hat, mit 10 ml des inkubierten vege-
tativen 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_2PO_4	0,5
K_2HPO_4	1,2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	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_2HPO_4	1,0
KCl	0,5
35 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	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 ₄ Cl	3,0
	Na ₂ SO ₄	2,0
	ZnCl ₂	0,019
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,304
15	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,062
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,035
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,005
	CaCO ₃	6,0
	KH ₂ PO ₄ *	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 Schräge und des Produktions-
mediums 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 Deacy-
lierung weiterlaufen, die sich durch ein Verschwinden
15 der Aktivität gegenüber *Micrococcus luteus* äußert, was
nach einer Zeitdauer von etwa 24 Stunden der Fall ist.

20 C. Isolierung des Kerns von A-21978C

Die in der im Abschnitt B beschriebenen Weise erhal-
tene gesamte Fermentationsbrühe (20 l) wird unter Ver-
wendung einer Filterhilfe (Hyflo Super-Cel, Johns
Manville Corp.) filtriert. Der Mycelkuchen wird verwor-
25 fen. 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 Säulen-
abstrom wird verworfen. Die Säule wird dann zur Ent-
30 fernung restlicher filtrierter Brühe mit deionisiertem
Wasser (10 l) gewaschen. Das dabei anfallende Wasch-
wasser 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),
35 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
5 Detektion der Verbindungen durch UV-Fluoreszenz über-
wacht. In diesem System haben die Faktoren von A-21978C
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_{18} 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 eingengt
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 Acetonitril (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_{18} 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-
35 mittel eingengt und gefriergetrocknet, wodurch man zu
5,2 g gereinigtem Kern von A-21978C gelangt.

1 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
15 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) 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 Anwesen-
heit 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
10 inkubiert. Das Substrat ist ein halbgereinigter Komplex
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
15 dann mit einem Gemisch aus Wasser und Acetonitril
(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-C₁₈ (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
35 überwacht. Die den Kern enthaltenden Fraktionen werden
vereinigt, unter Vakuum zur Entfernung der Lösungsmittel
eingeengt und gefriergetrocknet, wodurch man zu 14 g
hochgereinigtem Kern von A-21978C gelangt.

1 Herstellungsbeispiel 3

Herstellung der Faktoren C₂ und C₃ von N_{Orn}-t-BOC-A-21978C

5

Ein gemäß US-PS 4 208 403 hergestelltes Gemisch der Faktoren C₂ und C₃ von A-21978C (10 g) wird unter Beschallung (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 rührt das Reaktionsgemisch 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.

20

Die Reaktion wird periodisch durch TLC über Siliciumdioxidgel unter Anwendung eines Lösungsmittelsystems aus CH₃CN und H₂O (7 : 3 und 8 : 2) und Detektion durch UV-Licht überwacht.

25

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 Erhöhung der Eintrübung und des Verbrauchs an Base, was die Beendigung der Reaktion anzeigt. 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 C₂ und C₃ von N_{Orn}-t-BOC-A-21978 gelangt.

35

Unter Anwendung ähnlicher Verfahren führt man auch zwei Reaktionen mit 10 g Material und eine Reaktion mit 30 g 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_{Orn}-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
10 des Produktionsmediums I, wobei man das Produktions-
medium etwa 66 Stunden inkubiert.

15 B. Deacylierung des Komplexes von N_{Orn}-t-BOC-A-21978C

Der Komplex von A-21978C-N_{Orn}-t-BOC (1185 g an rohem
Substrat, das etwa 176 g Komplex an A-21978C enthält)
wird zum Fermentationsmedium gegeben. Die Deacylierung
20 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_{Orn}-t-BOC

Die gemäß Abschnitt B erhaltene Fermentationsbrühe
(100 l) wird unter Verwendung einer Filterhilfe (Hyflo
Super-Cel) filtriert. Das Filtrat wird durch eine Säule
30 geführt, die 7,5 l HP-20-Harz (DIAION) enthält, und die
Säule wird mit Wasser (38 l) gewaschen. Die Elution
wird durch Siliciumdioxidgel-C₁₈-HPLC unter UV-Detektion
bei 254 nm überwacht. Mit der Waschflüssigkeit wird eine
gewisse Menge an Kern eluiert. Die anschließende eigent-
35 liche Elution des Kerns wird unter Verwendung folgender
Gemische aus Wasser und Acetonitril durchgeführt:

- 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_{Orn}-t-BOC gelangt.

D. Reinigung des Kerns von A-21978C-N_{Orn}-t-BOC

- 10 Der nach Abschnitt C erhaltene halbgereinigte Kern von
A-21978C-N_{Orn}-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-C₁₈ (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-
20 hält, wobei man Fraktionen von jeweils 350 ml sammelt
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_{Orn}-
t-BOC gelangt.

Der Kern von A-21978C-N_{Orn}-t-BOC hat folgende Eigen-
schaften:

30

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

35

(b) Empirische Formel: C₆₇H₉₀N₁₆O₂₈

(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) 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_{18}
gefüllten Säule unter Einsatz eines Lösungs-
mittelgemisches aus H_2O , CH_3CN und CH_3OH
(80 : 15 : 5), das 0,2 % NH_4OAc 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_{Orn}-t-BOC

Man löst den nach dem Herstellungsbeispiel 4, Abschnitt
C, erhaltenen halbgereinigten Kern von A-21978C-N_{Orn}-t-
30 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 Fließge-
schwindigkeit von 5 ml/min der Reihe nach zuerst mit
35 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-C₁₈ überwacht, wobei ein Lösungsmittelsystem
aus Wasser, Acetonitril und Methanol (80 : 15 : 5)
verwendet wird, das 0,2 % Ammoniumacetat enthält, und
5 die Detektion des Produkts durch UV-Licht bei 254 nm
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 eingengt.
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_{Orn}-t-BOC
gelangt.)

15

Beispiel 1

Herstellung von N_{Trp}-p-(n-Dodecyloxy)benzoyl-N_{Orn}-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-C₁₈-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_{18} -Siliciumdioxidgel, Entwicklung 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 Dünnschichtchromatographie mittels Siliciumdioxidgel, eines Lösungsmittelsystems aus Acetonitril, Aceton und Wasser (2 : 2 : 1) und Staphylococcus aureus als Detektionsorganismus 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 rührt das Ganze 5 Minuten bei 0°C. Die Lösung wird unter Vakuum zu einem Öl eingengt und das Öl mit Et_2O (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 dünnschichtchromatographischen Untersuchung mittels Siliciumdioxidgel
- 35 unter Anwendung eines Lösungsmittelsystems aus Acetonitril, 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
10 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
15 die jeweils untersuchte Verbindung gehemmt wird.

20

25

30

35

Tabelle I

35 30 25 20 15 10 5 1

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

Verbindung	Größe der Hemmzone (mm) ^a	
	Staphylococcus aureus ATOC 6738P	Micrococcus luteus ATOC 6633 ATOC 9341 ATOC 6633 ^b
R		
p-(n-Dodecyloxy)-benzoyl	H	
p-(n-Dodecyloxy)-t-BOC benzoyl		

	20	13	18	20
	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-
5 tenen Ergebnisse gehen aus der folgenden Tabelle II
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

1
5
10
15
20
25
30
35

Antibiotische Wirksamkeit von N_{Trp}-p-(n-Dodecyloxy) benzoyl-A-21978C

<u>Versuchsorganismen</u>	<u>MIC-Werte^a</u>
Staphylococcus aureus X1.1	1
Staphylococcus aureus V41 ^b	1
Staphylococcus aureus X400 ^c	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

^a MIC in µg/ml

^b penicillinresistenter Stamm

^c methicillinresistenter Stamm

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 ED₅₀-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 ED₅₀-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-Dodecyloxy)benzoyl-A-21978C

<u>Verbindung der Formel I^a</u>	<u>ED₅₀-Werte^b</u>		
	<u>Staphylococcus aureus</u>	<u>Streptococcus pyogenes</u>	<u>oral</u>
	<u>subkutan</u>	<u>subkutan</u>	
N _{Trp} -p-(n-Dodecyloxy)benzoyl	3,35	0,31	200

a R¹ = H

b mg/kg x 2

1 Die Verbindung N_{Trp}-p-(n-Dodecyloxy)benzoyl-A-21978C
zeigt nach intravenöser Verabreichung an Mäuse eine
akute Toxizität in Form eines LD₅₀-Wertes von 67,5 mg/kg.

5

10

15

20

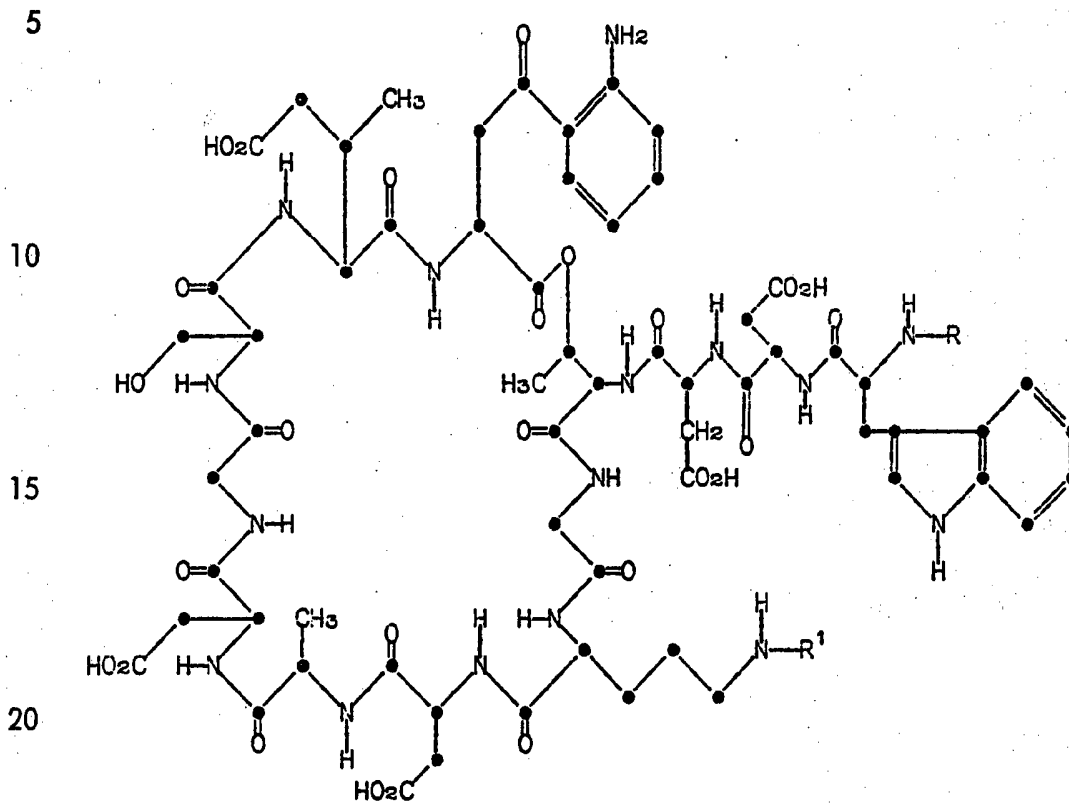
25

30

35

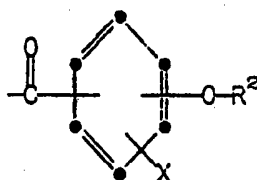
1 Erfindungsansprüche

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



I

25 worin R eine substituierte Benzoylgruppe der folgenden Formel ist



35

1 in welcher R^2 für C_8-C_{15} -Alkyl steht, und X Wasserstoff,
Chlor, Brom, Iod, Nitro, C_1-C_3 -Alkyl, Hydroxy, C_1-C_3 -Alk-
oxy oder C_1-C_3 -Alkylthio ist, und worin R^1 Wasserstoff
oder eine Aminoschutzgruppe bedeutet,

5 oder von pharmazeutisch unbedenklichen Salzen hiervon,

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

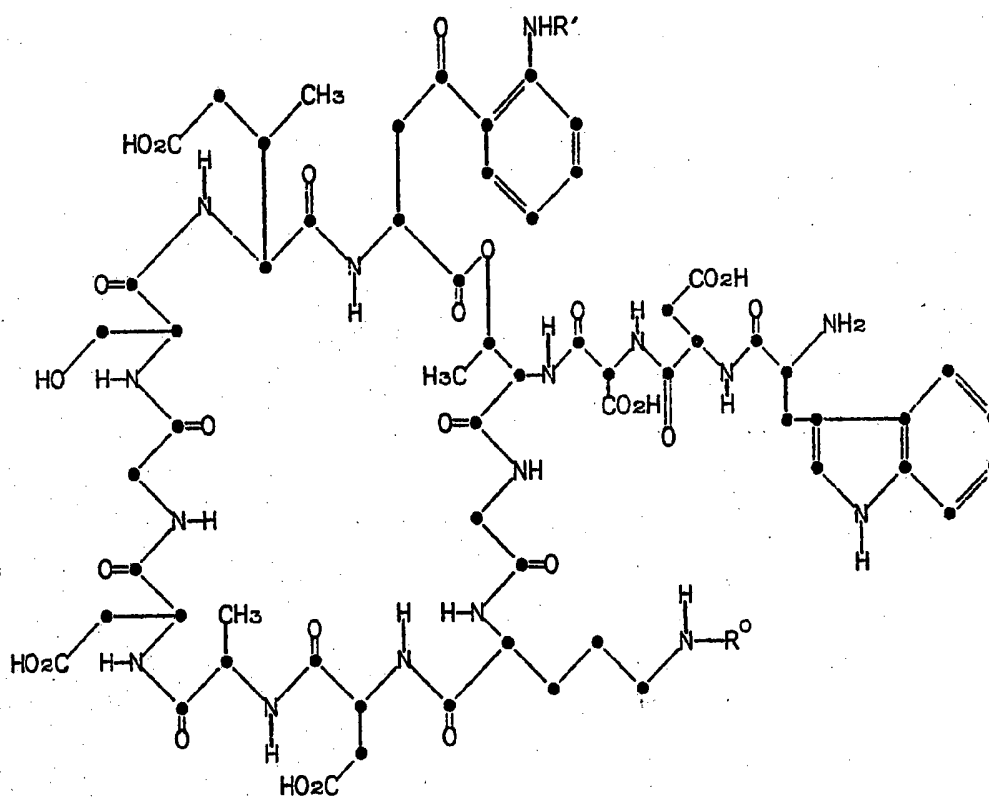
10

15

20

25

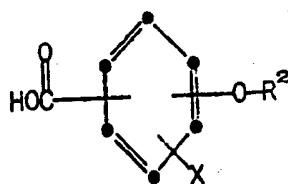
30



III

oder ein geeignet geschütztes Derivat hiervon, worin
35 R^1 und R'' 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 R² die oben angegebenen Bedeutungen haben, umsetzt.

2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen, worin R² für C₁₀-C₁₃-Alkyl steht, oder Salze hiervon herstellt.

15

3. Verfahren nach Punkt 2, dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen, worin R²-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 R²-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 R¹ 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.