

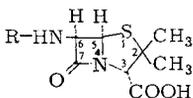
Oligopeptid-Transportsystems²⁾ zu erwarten. Da Wirkort der Penicilline bzw. Cephalosporine das an der Außenseite der Cytoplasmamembran sitzende Murein-Biosynthese-System³⁾ ist, sollten sich durch Wegfall der opt⁻-Mutanten Informationen über die Wirkungsweise der Derivate gewinnen lassen, z. B. darüber, ob ein neuer Wirkort innerhalb der Cytoplasmamembran vorliegt.

Synthese der Peptid-Derivate

Bei der Darstellung von Derivaten der 6-Aminopenicillansäure (6-APS) und der 7-Aminocephalosporansäure (7-ACS) ist insbesondere deren große Labilität gegenüber sauren und basischen Bedingungen zu beachten, die zu zahlreichen Spaltungs-, Abbau- und Umlagerungsreaktionen führt^{4,5)}. Die in der Peptidchemie vielfach zum N-terminalen Schutz verwendete Benzyloxycarbonylgruppe⁶⁾ läßt sich zwar hydrogenolytisch unter neutralen Bedingungen abspalten, Schwierigkeiten waren jedoch wegen der Vergiftung des Hydrierkatalysators durch den in 6-APS sowie 7-ACS enthaltenen Schwefel zu erwarten. Bei Derivaten der Cephalosporine bestand zusätzlich die Gefahr der Hydrierung der Δ^3 -Doppelbindung. In Vorversuchen mit 6-(Benzyloxycarbonyl-alanyl-alanyl-alanyl-amino)penicillansäure (**2b**) gelang es trotzdem, durch spezielle Hydrierbedingungen (s. Experimenteller Teil) die Schutzgruppe zu entfernen. Abspaltung der Urethan-Gruppe mit Fluorwasserstoff nach der von *Sakakibara*⁷⁾ beschriebenen Methode führt im Falle der als Versuchsmodell verwendeten 7-(Benzyloxycarbonyl-alanyl-alanyl-alanyl-amino)cephalosporansäure (Z-Ala-Ala-Ala-7-ACS-OH, **9**) nicht zum gewünschten Produkt. Die Verwendung und Abspaltung der *N-tert*-Butyloxycarbonylgruppe mit 1.2 N HCl in Eisessig ergab beim Modell 6-(*tert*-Butyloxycarbonyl-alanyl-alanyl-amino)penicillansäure (**10**) ebenfalls zahlreiche Nebenprodukte.

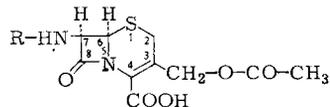
Zum Erfolg führte die Anwendung einer unter äußerst milden acidolytischen Bedingungen abspaltbare Schutzgruppe, nämlich die von *Sieber* und *Iselin*^{8,9)} eingeführte 1-(Biphenyl-4-yl)-1-methylethoxycarbonyl-Gruppe. Diese Bmeoc-Gruppe^{*)} konnte mit 50proz. Essigsäure in 2 Stunden oder mit 1.5proz. Trifluoressigsäure in Dichlormethan

Derivate der
6-Aminopenicillansäure (6-APS)



Nr.	R
1	+ H ₂ -Ala-Ala-
1a	Bmeoc-Ala-Ala-
2	+ H ₂ -Ala-Ala-Ala-
2a	Bmeoc-Ala-Ala-Ala-
2b	Z-Ala-Ala-Ala-

Derivate der
7-Aminocephalosporansäure (7-ACS)



Nr.	R
3	+ H ₂ -Ala-Ala-
3a	Bmeoc-Ala-Ala-
4	+ H ₂ -Ala-Ala-Ala-
4a	Bmeoc-Ala-Ala-Ala-

*) Andere gebräuchliche Abkürzung: Bpoc [abgeleitet von dem laut Nomenklaturregeln der IUPAC falschen Namen 2-(Biphenyl-4-yl)-2-propyloxycarbonyl].

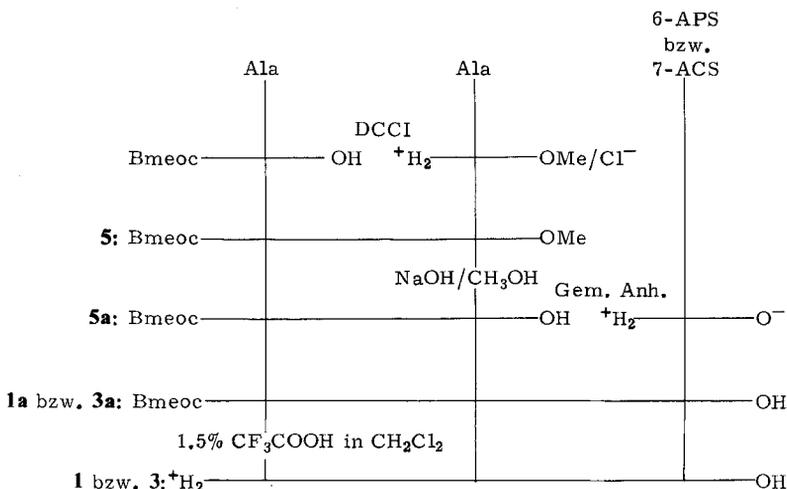
innerhalb weniger Minuten abgespalten werden. Die besondere Labilität führt auch hier zu einer Reihe von Problemen, die bei der Wahl der Synthesebedingungen für die Peptidantibiotika-Konjugate **1**–**4** berücksichtigt werden mußten.

Zur Verknüpfung der als C-terminale Aminosäuren fungierenden 6-APS bzw. 7-ACS mit dem N-geschützten L-Alanyl-L-alanin bzw. L-Alanyl-L-alanyl-L-alanin bot sich die Methode des gemischten Anhydrids^{10,11)} an. Während jedoch 6-APS nach dieser Methode vollständig reagierte, setzte sich 7-ACS nur zu ca. 50% um.

Diese Ausbeute erhöhte sich nicht bei Anwendung des gemischten Anhydrids mit Chlorkohlensäure-ethylester oder Pivaloylchlorid an Stelle des zuerst verwendeten Chlorkohlensäure-isobutylesters unter Temperaturen von -10 bzw. -20°C . Auch der Einsatz von Salzen des 7-ACS mit 1 N NaOH oder Kaliumhydrogencarbonat anstelle der sonst eingesetzten *N*-Methylmorpholiniumsalze hatte keinen merklichen Einfluß auf die Umsetzung. Die Bildung des gemischten Anhydrids in Dimethylformamid anstelle von Tetrahydrofuran oder die Anwendung eines Überschusses an 7-ACS gaben ebensowenig eine erhöhte Ausbeute. Alaninpeptide mit den unterschiedlichen N-Schutzgruppen Bmeoc und Z reagierten gleichfalls schlecht.

Da diese geringe Ausbeute in Kauf genommen werden mußte, war es wichtig, daß sich die nichtumgesetzten Reaktionsprodukte nach Salzbildung mit Dicyclohexylamin abtrennen ließen. Durch Kondensation von Bmeoc-geschütztem Alanin mit Alaninmethylester wurde das vollgeschützte Dipeptid Bmeoc-(Ala)₂-OMe (**5**) erhalten, aus dem durch Verseifung die freie Säure **5a** gewonnen wurde. Kondensation von **5a** mit 6-APS bzw. 7-ACS nach der Methode des gemischten Anhydrids ergab Bmeoc-(Ala)₂-6-APS-OH (**1a**) bzw. Bmeoc-(Ala)₂-7-ACS-OH (**3a**). Durch Behandeln mit 1.5proz. Trifluoressigsäure in Dichlormethan wurden die freien Peptide **1** und **3** erhalten.

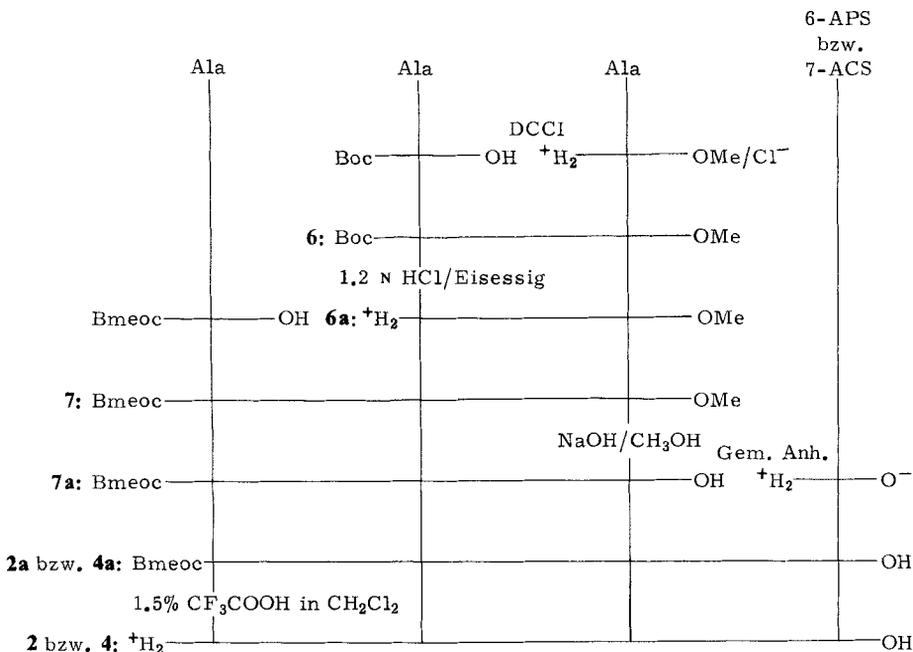
Schema 1. Darstellung von 6-(L-Alanyl-L-alanyl-amino)penicillansäure (**1**) und 7-(L-Alanyl-L-alanyl-amino)cephalosporansäure (**3**)



Kondensation von Boc-Ala-OH mit $^+\text{H}_2$ -Ala-OMe/Cl⁻ nach der Carbodiimidmethode ergab Boc-(Ala)₂-OMe (**6**), aus dem durch Einwirkung von 1.2 N HCl in Eisessig das Dipeptidester-hydrochlorid **6a** erhalten wurde. Kupplung des Dipeptidesters **6a** mit

Bmeoc-Ala-OH und Carbodiimid (Weg 1) ergab Bmeoc-(Ala)₃-OMe (**7**) und dessen Verseifung die freie Säure **7a**. Kondensation des N-geschützten **7a** mit 6-APS bzw. 7-ACS nach der Methode des gemischten Anhydrids ergab Bmeoc-(Ala)₃-6-APS-OH (**2a**) bzw. Bmeoc-(Ala)₃-7-ACS-OH (**4a**). Diese ließen sich durch Einwirkung von 1.5proz. Trifluoressigsäure in Dichlormethan in die freien Peptide **2** und **4** überführen.

Schema 2. Darstellung von 6-(L-Alanyl-L-alanyl-L-alanyl-amino)penicillansäure (**2**) nach Weg 1 und von 7-(L-Alanyl-L-alanyl-L-alanyl-amino)cephalosporansäure (**3**)

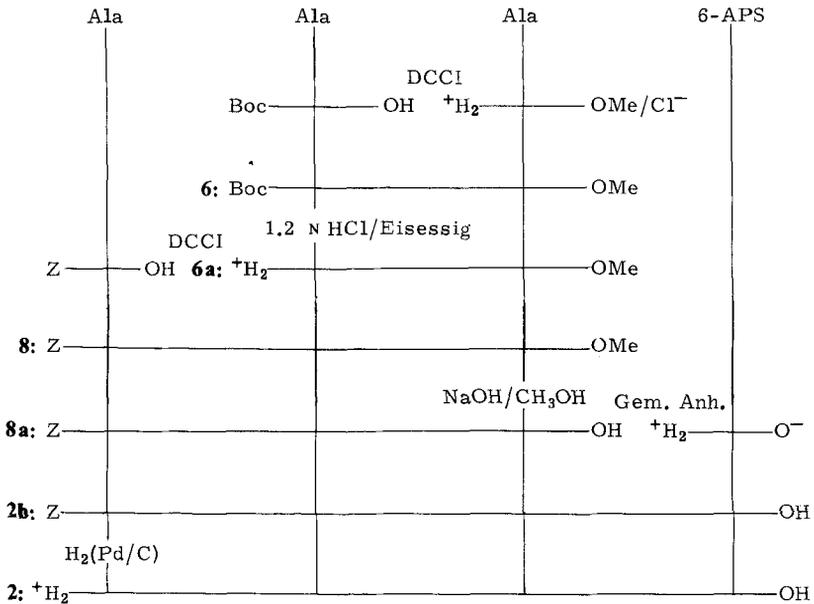


Kondensation des Alanyl-alanin-methylesters (**6a**) mit Benzylloxycarbonyl-alanin nach der Carbodiimidmethode (Weg 2) ergab Z-(Ala)₃-OMe (**8**). Das vollgeschützte Trialanylderivat **8** wurde verseift und nach der Methode des gemischten Anhydrids mit 6-Aminopenicillansäure (6-APS) kondensiert. Hydrogenolytische Abspaltung der Benzylloxycarbonyl-Schutzgruppe von Z-(Ala)₃-6-APS-OH (**2b**) unter Beachtung spezieller Bedingungen (vgl. Experimenteller Teil) ergab ein mit nach Weg 1 dargestelltes, sich in allen Dünnschichtsystemen identisch verhaltendes Produkt.

Die freien Peptidderivate **1** – **4** liegen nach Abspaltung der N-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure zum Teil als Trifluoressigsäure mit variablem Wassergehalt vor. Nach der acidolytischen Abspaltung der Bmeoc-Gruppe von den geschützten Peptidderivaten **1a**, **3a** und **4a** verschiebt sich im IR-Spektrum die β-Lactam-Bande um 10 – 15 cm⁻¹ zu niederen Wellenzahlen. Nur bei dem durch hydrogenolytische Deblockierung von **2b** erhaltenen Derivat **2** erscheint die Bande bei wesentlich tieferen Wellenzahlen. Da die Verbindung **2** aus **2b** dünnschichtchromatographisch identisch mit dem acidolytisch erhaltenen Trialanylderivat **2** aus **2b** (vgl. Experimenteller Teil) ist, könnten die höheren

Wellenzahlen auf die Trifluoracetatbildung der Acidolyseprodukte zurückgeführt werden.

Schema 3. Darstellung von 6-(L-Alanyl-L-alanyl-L-alanyl-amino)penicillansäure (**2**) nach Weg 2



Chemische und antibiotische Eigenschaften

Während die freien Cephalosporansäurepeptide **3** und **4** sich in wäßrigen und organischen Lösungsmitteln als relativ stabil erwiesen, begannen sich die der Penicillansäurederivate bereits in Wasser und wasserhaltigen Lösungsmitteln in ein hydrophiles Produkt umzuwandeln. So zeigte eine 1proz. wäßrige Lösung von 6-[(Alanyl)₃-amino]penicillansäure (**2**) bei 40°C nach 19 Stunden eine ca. 70proz. Umwandlung zu diesem Produkt, in 10proz. Essigsäure unter denselben Bedingungen eine nahezu vollständige Umwandlung. Salzbildung durch Zugabe von 1 Äquivalent Kaliumhydrogencarbonat verhindert diese Reaktion weitgehend. Die Abspaltung der Bmeoc-Gruppe von den Penicillansäurepeptiden **1a** und **2a** in halbkonzentrierter Essigsäure ergab ebenfalls merkliche Mengen des Umwandlungsproduktes, so daß wir die Abspaltung schließlich mit 1.5proz. Trifluoressigsäure in Dichlormethan durchführten. Trotzdem zeigten die Verbindungen **1**–**4** nach Abspaltung der Schutzgruppen im Dünnschichtchromatogramm noch etwa 5–10% Verunreinigungen, die auch durch Kristallisation nur teilweise entfernbar waren.

7-[(Alanyl)₂-amino]cephalosporansäure (**3**) und 7-[(Alanyl)₃-amino]cephalosporansäure (**4**) wurden mit Hilfe des Plattendiffusionstests¹²⁾ auf ihre antibakterielle Wirksamkeit gegen *Escherichia coli* K 12 untersucht. Im Minimalmedium nach Davis und Mingioli¹³⁾ unter Zusatz von 1.5% Agar und einer Einsaatdichte von $1.3 \cdot 10^7$ Zellen/ml war quantitativ eine erhöhte Wirksamkeit der Di- und Trialanylderivate **3**

Tabelle 1. Minimale Hemmkonzentrationen von Di- und Trialanylderivaten der 6-Aminopenicillansäure (6-APS) und 7-Aminocephalosporansäure (7-ACS) auf Bakterien als Testorganismen^{a)}

Wirkung auf	Penicillin G	Cephalotin	6-APS	1	1a	2	2a	2b	7-ACS	3	3a	4	4a
<i>Escherichia coli</i> K 12	0.5	0.05	2.5	0.25	0.2	2.5	0.5	3	2.5	1	0.5	1.25	0.5
<i>E. coli</i> K 12 opt ⁻ -Mutante			2.5	0.25									
Steigerungsfaktor	5	50	1	10	12.5	1	5	1	1	2.5	0.5	2	5
<i>Bacillus subtilis</i>	0.05	0.0001	1	0.01	0.02	5	0.02	0.075	0.5	0.03	0.01	0.05	0.05
<i>B. subtilis</i> opt ⁻ -Mutante			1	0.01									
Steigerungsfaktor	20	10000	1	100	50	1	50	13	1	17	50	10	10

a) Angabe der minimalen Hemmkonzentrationen (mmol) im Biophotometer; opt⁻ = Mutanten mit Defekt im Oligopeptid-Transportsystem.

und 4 gegenüber 7-ACS zu beobachten. Die genauere Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration im Biophotometer ergab für die Derivate 3 und 4 bezüglich unsubstituiertem 7-ACS eine Wirkungssteigerung um den Faktor 2.5 bzw. 2 gegen *Escherichia coli* K 12 und gegen *Bacillus subtilis* um die Faktoren 17 bzw. 10 (Tabelle 1). Bei dem 6-Aminopenicillansäurederivat 1 wurden Wirkungssteigerungen um den Faktor 10 (*E. coli*) und 100 (*B. subtilis*) gefunden.

Das Trialanylderivat 2 von 6-APS zeigte qualitativ keine erhöhte Wirksamkeit. Die Wirkung der Derivate 1–4 kann durch Di- und Tripeptide in Konzentrationen bis zu 50 mmol/l nicht aufgehoben werden. Vergleichende Versuche mit opt⁻-Mutanten¹⁴⁾ und Wildtypen beider Testorganismen ergaben die gleiche minimale Hemmkonzentration für die Verbindung 1. Somit dürfte keine aktive Einschleusung über das Oligopeptid-Transportsystem stattfinden, und es ist vermutlich außer den bekannten, kein weiterer Wirkort innerhalb der cytoplasmatischen Membran vorhanden. Die erhöhte Wirkungssteigerung durch die N-geschützten Derivate stützt diese Schlußfolgerung.

Herrn Professor Dr. H. Zähler und Fräulein Dr. H. Diddens, Lehrstuhl Mikrobiologie I am Institut für Biologie II der Universität Tübingen, danken wir für Untersuchungen der antibakteriellen Wirkungen. Herrn Dipl.-Biol. M. Dorgerloh haben wir für Diskussionsbeiträge zu danken. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit zu Dank verpflichtet (SFB 76).

Experimenteller Teil

Abkürzungen: Boc = *tert*-Butyloxycarbonyl, Bmeoc = 1-(Biphenyl-4-yl)-1-methylethoxycarbonyl, Z = Benzylloxycarbonyl, 6-APS = 6-Aminopenicillansäure, 7-ACS = 7-Aminocephalosporansäure, DCCI = *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid, DMF = Dimethylformamid, DCH = Dicyclohexylharnstoff, EE = Essigester, NEM = *N*-Ethylmorpholin, NMM = *N*-Methylmorpholin, PE = Petrolether, THF = Tetrahydrofuran. – Die Lösungsmittel für Peptidsynthese und Chromatographie wurden nach bekannten Methoden¹⁵⁾ getrocknet und anschließend über eine 140-cm-Vigreux-Kolonne unter Feuchtigkeitsausschluß fraktioniert. – L-Alanin wurde von der Fa. Merck, 6-Aminopenicillansäure purum und Bmeoc-L-alanin (Dicyclohexylaminsalz) puriss. von der Fa. Fluka bezogen. 7-Aminocephalosporansäure (Gehalt ca. 97%) war ein Geschenk der Fa. Ciba-Geigy. Benzyloxycarbonyl-L-alanin^{16,17)} *tert*-Butyloxycarbonyl-L-alanin^{18,19)} und L-Alanin-methylester-hydrochlorid²⁰⁾ wurden nach bekannten Methoden⁶⁾ synthetisiert. – Dünnschichtchromatographie: Silicagelplatten, Kieselgel 60 F₂₅₄ (Fa. Merck Nr. 5714). Fließmittel (Angabe im Text bei R_F) I = Chloroform/Methanol (50:50), II = Ethanol/Wasser (70:30), III = 2-Butanol/Eisessig/Wasser (67:10:23), IV = Essigester/Pyridin/Eisessig/Wasser (67:21:6:11), V = 1-Butanol/Eisessig/Wasser (60:20:20). Die Detektion der Verbindungen erfolgte durch UV-Licht, mit Ninhydrinreagens²¹⁾ oder Chlor/4,4'-Bis(dimethylamino)diphenylmethan (TDM-Reagens²²⁾). – Elementaranalysen wurden als Einfachbestimmungen im Mikroanalytischen Labor unseres Chemischen Instituts von Herrn H. J. Wurmstich mit einem Elemental Analyzer Modell 1104 (Fa. Carlo Erba) durchgeführt. – Schmelzpunkte wurden von den i. Vak. über P₂O₅ getrockneten Substanzen nach Tottoli in offenen Kapillaren bestimmt und sind nicht korrigiert. – Drehwerte wurden mit einem Zeiss-Polarimeter OLD-5 bei $\lambda = 365, 405, 436, 546$ und 578 nm gemessen; für Vergleiche mit Literaturwerten wurden $[\alpha]_D$ durch graphische Extrapolation ermittelt. – Die Messung der IR-Spektren erfolgte mit IR-Spektrometern 221 und 021 der Fa. Perkin Elmer ($c = 1$ mg/300 mg KBr). – Alle aufgeführten Aminosäuren haben L-Konfiguration.

tert-Butyloxycarbonyl-alanyl-alanin-methylester²³) (Boc-Ala-Ala-OMe, **6**): 51.64 g (0.37 mol) ⁺H₂-Ala-OMe/Cl⁻ werden in 700 ml CH₂Cl₂ suspendiert und unter Eiskühlung 40.1 ml (0.37 mol) NEM zugetropft. Dann wird bei 0 °C 70 g (0.37 mol) festes Boc-Ala-OH und anschließend 389 ml (0.39 mol) einer eiskalten Lösung von DCCI in CH₂Cl₂ (c = 1 mol/l) zugegeben. Nach 17 h bei 0 °C wird vom DCH abgenutscht, das Filtrat eingedampft und der Rückstand in 1 Liter EE gelöst. Es wird 2mal mit je 500 ml 5proz. Citronensäure, 3mal mit je 500 ml 5proz. NaHCO₃-Lösung und 3mal mit je 500 ml Wasser gewaschen, wobei zur besseren Phasentrennung jeweils einige Milliliter konz. Natriumchlorid-Lösung zugegeben werden. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wird die organische Phase eingedampft und Boc-Ala-Ala-OMe (**6**) aus CH₂Cl₂/PE kristallisiert. Ausbeute 102 g (81%); Schmp. 109 °C (Lit.²³): 110–111 °C), [α]_D²³ = -59.9° (c = 1, Methanol); R_FI = 0.79; R_FII = 0.75; R_FIII = 0.74, R_FIV = 0.84, R_FV = 0.71.

C₁₂H₂₂N₂O₅ (274.3) Ber. C 52.54 H 8.08 N 10.21 Gef. C 52.55 H 8.14 N 10.14

Alanyl-alanin-methylester-hydrochlorid (⁺H₂-Ala-Ala-OMe/Cl⁻, **9**): 2 g (7.29 mmol) Boc-Ala-Ala-OMe (**6**) werden in 20 ml 1.2 N HCl in Eisessig gelöst und 25 min gerührt. Nach dem Eindampfen erhält man ein farbloses Öl, welches aus Methanol/Ether umgefällt und einige Stunden bei 0 °C belassen wird. Trocknen des harzigen Rückstandes im Ölpumpenvak. über P₂O₅/KOH ergibt einen stark hygroskopischen, weißen Schaum. Ausbeute 1.5 g (97%); Schmp. ca. 80 °C (unscharf, Zers.); R_FIII = 0.32, R_FIV = 0.14, R_FV = 0.38 (Verbindung in allen DC-Systemen völlig rein).

[1-(Biphenyl-4-yl)-1-methylethoxycarbonyl]-alanyl-alanin-methylester (Bmeoc-Ala-Ala-OMe, **5**): 2.55 g (18.3 mmol) ⁺H₂-Ala-OMe/Cl⁻ werden in 16 ml CH₂Cl₂ gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit 2.08 ml (18.3 mmol) NMM sowie 4 g (12.2 mmol) Bmeoc-Ala-OH versetzt. Dann werden bei 0 °C 13.4 ml (13.4 mmol) einer Lösung von DCCI in CH₂Cl₂ (c = 1 mol/l) zugefügt. Nach 17 h bei 0 °C wird vom DCH abgenutscht und eingedampft. Der Rückstand wird in 100 ml EE gelöst und 3mal mit je 50 ml 5proz. Citronensäure, 3mal mit je 50 ml 5proz. NaHCO₃-Lösung und 4mal mit je 50 ml Wasser gewaschen. Die EE-Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Eindampfen erhält man **5** als hygroskopischen Schaum. Ausbeute 4.9 g (97%); Schmp. 49–52 °C (unscharf), [α]_D²³ = 46.7° (c = 1, Methanol); R_FI = 0.81, R_FII = 0.77, R_FIII = 0.77, R_FIV = 0.86, R_FV = 0.76.

C₂₃H₂₈N₂O₅ (412.5) Ber. C 66.97 H 6.84 N 6.79 Gef. C 66.76 H 7.04 N 6.61

[1-(Biphenyl-4-yl)-1-methylethoxycarbonyl]-alanyl-alanin (Bmeoc-Ala-Ala-OH, **5a**): 1.5 g (3.64 mmol) Bmeoc-Ala-Ala-OMe **5** werden in 30 ml Methanol gelöst, 7.28 ml (7.28 mmol) 1 N NaOH zugegeben und 74 min bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird 20 min im Eisbad gekühlt, mit eiskalter 5proz. Citronensäure-Lösung auf pH 6 eingestellt und 4mal mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden 3mal mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Eindampfen erhält man einen weißen Schaum, der aus Essigester/Hexan bei 0 °C kristallisiert werden kann. Ausbeute 1.14 g (79%); Schmp. ca. 90° (unscharf, Zers.), [α]_D²³ = -37.2° (c = 0.75, Methanol); R_FIII = 0.72, R_FIV = 0.65, R_FV = 0.72.

C₂₂H₂₆N₂O₅ (398.4) Ber. C 66.32 H 6.58 N 7.03 Gef. C 66.17 H 6.76 N 6.96

6-([1-(Biphenyl-4-yl)-1-methylethoxycarbonyl]-alanyl-alanyl-amino)penicillansäure (Bmeoc-Ala-Ala-6-APS-OH, **1a**): 1.04 g (2.6 mmol) Bmeoc-Ala-Ala-OH (**5a**) und 296 µl (2.6 mmol) NMM in 7 ml THF werden auf -20 °C gekühlt und tropfenweise mit 348 µl (2.6 mmol) Chlorkohlensäure-isobutylester versetzt. Nach 10 min bei -20 bis -15 °C wird eine kalte Lösung (0 °C) von 0.675 g (3.12 mmol) 6-APS und 591 µl (5.2 mmol) NMM in 6 ml 50proz. wäbrigem THF zugegeben, wobei die Temp. auf 0 °C ansteigt. Nach 2 h bei dieser Temp. wird i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wird mit 1-Butanol versetzt und 2mal mit 5proz. wäbriger Citronensäure sowie 5mal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird eingedampft, der Rückstand in

Methanol/EE gelöst und PE zugegeben, wobei **1a** als weißer, kristalliner Niederschlag ausfällt. Ausbeute 1.22 g (79%); Schmp. 195 °C, $[\alpha]_D^{23} = +101^\circ$ ($c = 1.0$, Methanol); $R_{FII} = 0.78$, $R_{FIII} = 0.65$, $R_{FIV} = 0.55$, $R_{FV} = 0.68$. – IR: 1780 cm^{-1} (β -Lactam).

$\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$ (596.7) Ber. C 60.39 H 6.08 N 9.39 S 5.37
Gef. C 60.21 H 6.16 N 9.12 S 5.06

6-(Alanyl-alanyl-amino)penicillansäure-trifluoracetat ($^+ \text{H}_2\text{-Ala-Ala-6-APS-O}^- \cdot \text{CF}_3\text{COOH}$, **1** · CF_3COOH): Zur Lösung von 200 mg (0.335 mmol) Bmeoc-Ala-Ala-6-APS-OH (**1a**) in 2 ml CH_2Cl_2 werden 2 ml einer 3proz. Lösung von Trifluoressigsäure in CH_2Cl_2 gegeben. Es fällt sofort ein weißer Niederschlag aus, der nach 10 min abzentrifugiert und 3mal mit einer Mischung aus EE/Hexan, 2mal mit Hexan sowie 1mal mit Ether digeriert wird. Ausbeute 114 mg (95%); Schmp. 145–150 °C (Zers.); $R_{FII} = 0.53$, $R_{FV} = 0.30$. – IR: 1770 cm^{-1} (β -Lactam).

$\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$ Ber. C 40.68 H 4.91 F 12.1 N 11.86 S 6.79
Gef. C 41.82 H 5.12 F 15.4 N 11.44 S 6.84

Das so erhaltene Trifluoracetat von **1** zeigt laut DC noch Spuren von Verunreinigungen. Bereits in schwach essigsauerm Medium wandelt es sich in ein hydrophileres Produkt um.

7-([1-(Biphenyl-4-yl)-1-methylethoxycarbonyl]-alanyl-alanyl-amino)cephalosporansäure (Bmeoc-Ala-Ala-7-ACS, **3a**): Die Verbindung wird analog der Darstellung von **1a** aus **5a** und 7-ACS hergestellt. Zur weiteren Reinigung und um ca. 40% nichtumgesetztes **5a** zu entfernen, wird der nach dem Waschen und Eindampfen der organischen Phase erhaltene Rückstand in Methanol gelöst und Dicyclohexylamin bis zur schwach basischen Reaktion zugesetzt. Bei Zugabe von Ether fällt Bmeoc-Ala-Ala-7-ACS-OH · DCHA (**3b**) aus, welches aus Methanol/EE/PE umkristallisiert wird. Um die freie Säure **3a** zu erhalten, wird das Salz **3b** in 1-Butanol gelöst, 2mal mit 5proz. wäßriger Citronensäure und 5mal mit Wasser gewaschen, die organische Phase eingedampft, der ölige Rückstand in EE gelöst und **3a** mit PE gefällt. Ausbeute 42%; Schmp. 145 °C (Zers.); $R_{FII} = 0.78$, $R_{FIII} = 0.46$, $R_{FIV} = 0.43$, $R_{FV} = 0.55$. – IR: 1780 cm^{-1} (β -Lactam).

$\text{C}_{32}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_9\text{S}$ (652.7) Ber. C 58.88 H 5.56 S 4.91 Gef. C 58.60 H 6.36 S 5.17

7-(Alanyl-alanyl-amino)cephalosporansäure ($^+ \text{H}_2\text{-Ala-Ala-7-ACS-O}^-$, **3**): 783 mg (1.2 mmol) Bmeoc-Ala-Ala-7-ACS-OH (**3a**) werden in 7.8 ml CH_2Cl_2 gelöst und mit 7.8 ml einer 3proz. Lösung von Trifluoressigsäure in CH_2Cl_2 versetzt. Der sofort ausfallende weiße Niederschlag wird nach 20 min bei 0 °C abzentrifugiert und mehrmals mit CH_2Cl_2 gewaschen. Dann wird in Methanol gelöst, Acetonitril zugegeben und ca. 15 h bei 0 °C belassen. Nach dem Abzentrifugieren, Waschen mit Acetonitril und Ether erhält man **3**, das noch Spuren von Verunreinigungen zeigt. Ausbeute 478 mg (96%); Schmp. 235–240 °C (Zers.); $R_{FII} = 0.53$, $R_{FIII} = 0.10$, $R_{FV} = 0.16$. – IR: 1765 cm^{-1} (β -Lactam).

$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_7\text{N}_4\text{S}$ (414.4) Ber. C 46.37 H 5.35 N 13.52 S 7.74
Gef. C 45.38 H 5.26 N 13.03 S 7.85

[1-(Biphenyl-4-yl)-1-methylethoxycarbonyl]-alanyl-alanyl-alanin-methylester (Bmeoc-Ala-Ala-Ala-OMe, **7**): 3 g (9.16 mmol) Bmeoc-Ala-OH werden in 8 ml CH_2Cl_2 gelöst und bei 0 °C 2.9 g (13.75 mmol) $^+ \text{H}_2\text{-Ala-Ala-OMe/Cl}^-$ (**6a**) sowie 1.56 ml (13.75 mmol) NMM zugegeben. Dann versetzt man unter Eiskühlung mit 10.1 ml (10.1 mmol) einer eiskalten Lösung von DCCI in CH_2Cl_2 ($c = 1 \text{ mol/l}$). Nach 17 h bei 0 °C wird von DCH abgenutscht und eingedampft. Der Rückstand wird in 100 ml EE gelöst und unter Eiskühlung 3mal mit je 50 ml 5proz. wäßriger Citronensäure, 3mal mit je 50 ml 5proz. wäßriger NaHCO_3 und 5mal mit je 40 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, eingedampft und **7** aus Methanol/Chloroform/PE kristallisiert. Ausbeute 3.13 g (71%); Schmp. 176 °C, $[\alpha]_D^{23} = -67.9^\circ$

($c = 1$, Methanol); $R_{F\text{I}} = 0.81$, $R_{F\text{II}} = 0.76$, $R_{F\text{III}} = 0.76$, $R_{F\text{IV}} = 0.81$, $R_{F\text{V}} = 0.73$. – ^{13}C -NMR-Daten siehe Tabelle 2.

$\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}$ (483.6) Ber. C 64.58 H 6.88 N 8.69 Gef. C 64.29 H 6.92 N 8.46

[1-(*Biphenyl-4-yl*)-1-methylethoxycarbonyl]-alanyl-alanyl-alanin (Bmeoc-Ala-Ala-Ala-OH, **7a**): Zur Lösung von 4 g (8.27 mmol) Bmeoc-Ala-Ala-Ala-OMe (**7**) in 66 ml Methanol werden 16.54 ml (16.54 mmol) 1 N NaOH zugefügt; dann wird 50 min bei Raumtemp. gerührt, 10 min im Eisbad gekühlt und durch Zugabe von eiskalter, 10proz. wäßriger Citronensäure auf pH 5 eingestellt. Anschließend gibt man 100 ml EE dazu und soviel Wasser bis sich zwei Phasen bilden. Die organische Phase wird abgetrennt und die wäßrige Phase 2mal mit je 50 ml EE nachextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Ausbeute 3.74 g (96%); Schmp. 229°C , $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -57.7^\circ$ ($c = 1$, Methanol); $R_{F\text{III}} = 0.70$, $R_{F\text{IV}} = 0.56$, $R_{F\text{V}} = 0.71$.

$\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_6$ (469.5) Ber. C 63.96 H 6.66 N 8.95 Gef. C 64.34 H 6.84 N 8.99

6-⟨[1-(*Biphenyl-4-yl*)-1-methylethoxycarbonyl]-alanyl-alanyl-alanylamin⟩penicillansäure (Bmeoc-Ala-Ala-Ala-6-APS-OH, **2a**): Das Trialanylderivat **2a** wird wie für **1a** beschrieben aus **7a** und 6-APS hergestellt. Die vereinigten citronensauren Waschwässer werden jedoch 2mal mit 1-Butanol nachextrahiert, die organischen Phasen vereinigt und 3mal mit gesättigter NaCl-Lösung und 3mal mit Wasser gewaschen. Bei Zugabe von EE zur fast völlig eingedampften organischen Phase kristallisiert farbloses **2a** aus, das man nach 12 h bei 0°C abfiltriert. Aus der Mutterlauge läßt sich durch Zugabe von PE weiteres **2a** fast gleicher Reinheit erhalten. Ausbeute 71%; Schmp. ca. 200°C (Zers.); $R_{F\text{II}} = 0.74$, $R_{F\text{III}} = 0.49$, $R_{F\text{IV}} = 0.43$, $R_{F\text{V}} = 0.61$. – IR: 1790 cm^{-1} (β -Lactam).

$\text{C}_{33}\text{H}_{41}\text{O}_8\text{N}_5\text{S} \cdot 0.5\text{ H}_2\text{O}$ (676.8) Ber. C 58.58 H 6.26 N 10.35 S 4.74

Ber. C 58.40 H 6.32 N 9.95 S 4.68

6-(Alanyl-alanyl-alanylamin)penicillansäure ($^+ \text{H}_2\text{-Ala-Ala-Ala-6-APS-O}^-$, **2**): 270 mg (0.40 mmol) Bmeoc-Ala-Ala-Ala-6-APS-OH (**2a**) werden zu 2.7 ml einer 3proz. Lösung von Trifluoressigsäure in CH_2Cl_2 gegeben. Nach 15 min bei Raumtemp. wird mit EE sowie Hexan versetzt. Der ausgefallene Niederschlag wird abzentrifugiert und mit Hexan sowie Ether gewaschen. Das so erhaltene **2** zeigt bei der DC ca. 6% Verunreinigungen. Ausbeute 173 mg (94%); Schmp. ca. 190°C (Zers.); $R_{F\text{II}} = 0.50$, $R_{F\text{III}} = 0.15$, $R_{F\text{V}} = 0.32$. – IR: 1760 cm^{-1} (β -Lactam).

Die Verbindung **2** lagert sich bereits in essigsaurem Medium in ein hydrophileres Produkt um.

7-⟨[1-(*Biphenyl-4-yl*)-1-methylethoxycarbonyl]-alanyl-alanyl-alanylamin⟩cephalosporansäure (Bmeoc-Ala-Ala-Ala-7-ACS-OH, **4a**): Die Verbindung wird wie unter **1a** beschrieben aus **7a** und 7-ACS hergestellt und wie bei **2a** beschrieben gewaschen. Zur Entfernung von ca. 50% nichtumgesetztem **7a** wird aus Ethanol/PE und Methanol/EE/PE umgefällt. Das so erhaltene **4a** enthält noch ca. 5% Verunreinigungen. Ausbeute 45%; Schmp. ca. 200°C (Zers.); $R_{F\text{II}} = 0.73$, $R_{F\text{III}} = 0.39$, $R_{F\text{IV}} = 0.32$, $R_{F\text{V}} = 0.47$. – IR: 1775 cm^{-1} (β -Lactam).

7-(Alanyl-alanyl-alanylamin)cephalosporansäure ($^+ \text{H}_2\text{-Ala-Ala-Ala-7-ACS-O}^-$, **4**): Zur Lösung von 381 mg (0.526 mmol) Bmeoc-Ala-Ala-Ala-7-ACS-OH (**4a**) in 8 ml 2,2,2-Trifluoethanol werden 8 ml einer 3proz. Lösung von Trifluoressigsäure in CH_2Cl_2 gegeben. Nach 15 min bei Raumtemp. werden EE und Hexan zugesetzt. Der ausgefallene Niederschlag wird abzentrifugiert und mit Hexan sowie Ether gewaschen. Durch dreimaliges Digerieren mit warmem Methanol erhält man **4**, welches nur Spuren von Verunreinigungen enthält. Ausbeute 179 mg (70%); Schmp. ca. 200°C (Zers. unter Braunfärbung); $R_{F\text{II}} = 0.48$, $R_{F\text{III}} = 0.09$, $R_{F\text{IV}} = 0.13$. – IR: 1760 cm^{-1} (β -Lactam).

$\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_8\text{S}$ (485.5) Ber. S 6.60 Gef. S 6.65

Benzyloxycarbonyl-alanyl-alanyl-alanin-methylester (Z-Ala-Ala-Ala-OMe, **8**): Zur Lösung von 28.08 g (0.13 mol) $^+ \text{H}_2\text{-Ala-Ala-OMe/Cl}^-$ in einer Mischung aus 200 ml CH_2Cl_2 und 150 ml DMF werden 29.69 g (0.13 mol) festes Z-Ala-OH gegeben. Bei 0°C werden 17.31 ml (0.13 mol) NEM sowie 146 ml (0.15 mol) einer eiskalten Lösung von DCCI in CH_2Cl_2 ($c = 1 \text{ mol/l}$) zugesetzt. Nach 20 h bei 0°C wird vom DCH abgenutscht, das Filtrat eingedampft und der Rückstand in 500 ml EE und 200 ml 1-Butanol gelöst. Es wird 3mal mit je 200 ml verd. H_2SO_4 ($\text{pH} = 3.0$), 3mal mit je 200 ml 5proz. wäßriger NaHCO_3 -Lösung sowie 3mal mit je 200 ml Wasser gewaschen, dann i. Vak. eingedampft und **8** aus Methanol/Chloroform/PE kristallisiert. Ausbeute 42.9 g (85%); Schmp. 176°C , $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -56.3^\circ$ ($c = 1$, Eisessig); $R_{\text{FII}} = 0.75$, $R_{\text{FIII}} = 0.71$, $R_{\text{FV}} = 0.71$.

$\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_6$ (379.4) Ber. C 56.98 H 6.64 N 11.08 Gef. C 57.48 H 6.82 N 11.26

Benzyloxycarbonyl-alanyl-alanyl-alanin (Z-Ala-Ala-Ala-OH, **8a**): Zu einer Lösung von 38.3 g (0.10 mol Z-Ala-Ala-Ala-OMe (**8**)) in 638 ml Methanol werden 127 ml 1 N NaOH gegeben. Nach 2 h bei Raumtemp. werden unter Eiskühlung 127 ml 1 N HCl zugefügt, wobei die Temp. nicht über 12°C ansteigen und die Lösung anschließend pH 6 zeigen soll. Nach Einengen auf etwa 100 ml wird mit eiskaltem Wasser versetzt, wobei **8a** auskristallisiert. Nach mehrstündigem Stehenlassen bei 0°C wird abgenutscht und das Produkt so lange mit kaltem Wasser gewaschen, bis im Waschwasser keine Chloridionen mehr nachzuweisen sind. Ausbeute 31.4 g (85%); Schmp. 228°C (Lit.²⁴): $224 - 226^\circ\text{C}$), $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -79^\circ$ ($c = 1.16$, Trifluoressigsäure (Lit.²⁴); $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -75^\circ$ ($c = 0.45$ in Trifluoressigsäure); $R_{\text{FIII}} = 0.62$, $R_{\text{FIV}} = 0.51$, $R_{\text{FV}} = 0.64$. - ^{13}C -NMR-Daten siehe Tabelle 2.

$\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_6$ (365.4) Ber. C 55.88 H 6.35 N 11.50 Gef. C 56.09 H 6.42 N 11.48

Zu vergleichenden ^{13}C -NMR-Messungen (Tabelle 2) wurde eine Probe Z-Ala-Ala-Ala-OH hydrolytisch (Methanol, 10proz. Pd/Kohle) in das freie $^+ \text{H}_2\text{-Ala-Ala-Ala-O}^-$ übergeführt.

6-(Benzyloxycarbonyl-alanyl-alanyl-alanyl-amino)penicillansäure (Z-Ala-Ala-Ala-6-APS-OH, **2b**): Die Verbindung wird wie unter **1a** beschrieben aus **8a** und 6-APS hergestellt und aufgearbeitet, wobei von 6-APS jedoch 2 Äquivalente, gelöst in wäßrigem KHCO_3 (2.2 Äquivalente bezogen auf **8a**) eingesetzt werden. **2b** kristallisiert aus Methanol/Chloroform/PE. Ausbeute 1.9 g (68%); Schmp. 153°C (Zers.), $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +78.6^\circ$ ($c = 0.92$, Methanol); $R_{\text{FII}} = 0.75$. - IR: 1780 cm^{-1} (β -Lactambande).

$\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{O}_8\text{N}_5\text{S}$ (563.6) Ber. C 53.28 H 5.90 N 12.42 S 5.69

Gef. C 52.89 H 5.82 N 11.68 S 5.29

6-(Alanyl-alanyl-alanyl-amino)penicillansäure ($^+ \text{H}_2\text{-Ala-Ala-Ala-6-APS-O}^-$, **2**): Da bei der hydrolytischen Abspaltung der Benzyloxycarbonylgruppe unter üblichen Bedingungen die Reaktion infolge Vergiftung des Katalysators nach kurzer Zeit zum Stillstand kommt, wird wie folgt verfahren: 1 g (1.77 mmol) Z-Ala-Ala-Ala-6-APS OH (**2b**) in 40 ml Methanol wird im Verlauf von 4 h zu einer von Wasserstoff durchströmten Suspension von 300 mg 10proz. Pd/Kohle in 40 ml Methanol getropft und zugleich eine Suspension von 700 mg 10proz. Pd/Kohle in 40 ml Methanol. Nach 7 und nach 14 h wird nochmals eine Suspension von jeweils 1 g 10proz. Pd/Kohle in 30 ml Methanol zugetropft. Dünnschichtchromatographisch läßt sich prüfen, daß 21 h nach Hydrierbeginn die Z-Gruppe vollständig abgespalten und das Produkt **2** identisch mit dem durch Acidolyse von **2a** erhaltenen ist. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Eindampfen der Lösung erhält man 620 mg **2** in über 90proz. Reinheit. Nach Lösen in Methanol und Zugabe von wenig Ether kristallisieren bei Raumtemp. 116 mg **2**, welches nur noch eine Spur einer lipophilen Verunreinigung aufweist. Aus der Mutterlauge können zwei weitere Fraktionen (269 und 145 mg) erhalten werden. Gesamtausbeute 530 mg (70%); Schmp. ca. 190°C (Zers.); $R_{\text{FII}} = 0.50$, $R_{\text{FIII}} = 0.15$, $R_{\text{FV}} = 0.32$. - IR: 1735 cm^{-1} (β -Lactam).

$\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{O}_6\text{N}_5\text{S} \cdot 1.5 \text{ H}_2\text{O}$ (456.6) Ber. C 44.72 H 6.62 Gef. C 44.44 H 6.39

Tabelle 2. ^{13}C -NMR-Daten der Trialanylpeptide

Verbindung	Lösungs- mittel	C_β	Alanin-Signale ^{a)} C_α	CO	Schutzgruppen-Signale
Z-Ala ¹ -Ala ² -Ala ³ -O ⁻ (8a)	D ₂ O/Dioxan (pH = 7)	16.5 (2) 16.8 (1) 17.4 (3)	49.3 (1) 50.9 (2,3)	179.6 (3) 175.3 (1) 173.4 (2)	Z: 67.0 (CH ₂), 157.4 (CO); Phenyl: 136.2 (C-1), 128.7 (C-3, C-5), 127.6 (C-2, C-6), 128.3 (C-4)
Bmeoc-Ala ¹ -Ala ² -Ala ³ -OMe ^{b)} (7)	[^{12}C , ^2H]DMSO	18.4 (3) 19.4 (1,2) 20.0 (1,2)	49.1 (1,2) 53.4 (3)	173.5 (1,2) 173.4 (3)	OMe: 51.4 (CH ₃); Bmeoc: 31.0 (CH ₃), 81.3 (C-1), 155.9 (CO); Biphenyl: 126.3 (C-3, C-5), 127.9 (C-2, C-6), 128.1 (C-2, C-6), 128.8 (C-4), 130.4 (C-3, C-5), 139.8 (C-1), 141.5 (C-1), 147.5 (C-4)
+ H ₂ -Ala ¹ -Ala ² -Ala ³ -O ⁻ (9)	D ₂ O (pH = 6)	16.5 (1,3) 17.5 (2)	48.8 (1) 49.7 (2) 50.8 (3)	170.6 (1,2) 173.4 (3)	— —

a) Die Sequenzposition ist in Klammern angegeben; deren Zuordnung erfolgte anhand vergleichbarer Verbindungen^{25,26}.

b) Die chemischen Verschiebungen weisen auf eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen Bmeoc-CO und Ala³-NH hin.

- 1) *H. Diddens, H. Zähler, E. Kraas, W. Göhring und G. Jung*, Eur. J. Biochem. **66**, 11 (1976).
- 2) Übersicht bei: *B. P. Rosen*, Bacterial Transport (Microbiology Series Vol. 4), Dekker, New York 1978.
- 3) Vgl.: *R. Reiner*, Antibiotica und ausgewählte Chemotherapeutica, Thieme, Stuttgart 1974, und dort zitierte Lit.
- 4) *M. S. Manhas und A. K. Bose*, Synthesis of Penicillin, Cephalosporin C and Analogs, Dekker, New York 1969.
- 5) *P. G. Sammes*, Chem. Rev. **76**, 113 (1976).
- 6) *E. Wünsch* in Methoden der organischen Chemie (*Houben-Weyl-Müller*), 1. Aufl., Bd. 15/1, S. 47 ff., Thieme, Stuttgart 1974.
- 7) *S. Sakakibara und Y. Shiminishi*, Bull. Chem. Soc. Jpn. **38**, 1412 (1965).
- 8) *P. Sieber und B. Iselin*, Helv. Chim. Acta, **51**, 614 (1968).
- 9) *P. Sieber und B. Iselin*, Helv. Chim. Acta, **52**, 1525 (1969).
- 10) *N. F. Albertson*, Org. React. **12**, 157 (1962).
- 11) *A. A. W. Logn, J. H. C. Naylor, H. Smith, T. Taylor und N. Ward*, J. Chem. Soc. C, **1971**, 1920 (1971).
- 12) *H. Zähler, R. Hütter und E. Bachmann*, Arch. Mikrobiol. **36**, 325 (1960).
- 13) *B. D. Davis und E. S. Mingioli*, J. Bacteriol. **60**, 17 (1950).
- 14) *H. Diddens*, Dissertation Univ. Tübingen 1979.
- 15) *J. A. Riddick und W. B. Bunger*, Organic Solvents, Physical Properties and Methods of Purification, 3. Aufl., Wiley Interscience, New York 1970.
- 16) *M. Bergmann und L. Zervas*, Chem. Ber. **65**, 1192 (1932).
- 17) *F. Marchiori, R. Rocchi und E. Scoffone*, Gazz. Chim. Ital. **93**, 834 (1963).
- 18) *G. W. Anderson und A. C. McGregor*, J. Am. Chem. Soc. **79**, 6180 (1957).
- 19) *E. Schnabel*, Liebigs Ann. Chem. **702**, 188 (1967).
- 20) *M. Brenner und W. Huber*, Helv. Chim. Acta, **36**, 1109 (1953).
- 21) *E. Stahl* in Dünnschicht-Chromatographie (*E. Stahl*), 1. Aufl., S. 418 ff., Springer, Berlin 1962.
- 22) *E. von Arx, M. Faupel und M. Brugger*, J. Chromatogr. **120**, 224 (1976).
- 23) *G. M. Bonora, D. Nisato und C. Toniolo*, Makromol. Chem. **176**, 2535 (1975).
- 24) *M. Goodman, R. Rupp und F. Naider*, Bioorg. Chem. **1**, 294 (1971).
- 25) *K. Wüthrich*, NMR in Biological Research: Peptides and Proteins, 1. Aufl., S. 175 ff., North-Holland Publ., Amsterdam 1976, und dort zitierte Lit.
- 26) *W. Voelter, G. Jung, E. Breitmaier und E. Bayer*, Z. Naturforsch., Teil B, **26**, 213 (1971).
- 27) *D. Leibfritz, R. Oekonomopulos, N. Dubischar, H. Lachmann und G. Jung*, Veröffentlichung in Vorbereitung.

[114/79]