

31. Ein einfacher Zugang zu 3-Amino-nocardicinsäure

Modifikationen von Antibiotika. 17. Mitteilung [1]

von Karl Schaffner-Sabba, Beat W. Müller, Riccardo Scartazzini und Hansuli Wehrli

Departement Forschung, Division Pharma, Ciba-Geigy AG, CH-4002 Basel

(28.XI.79)

A Simple Route to 3-Amino-nocardicinic Acid

Summary

Starting from nocardicin A (**1**), a novel and efficient procedure for the preparation of 3-amino-nocardicinic acid (**4**) and its protected derivatives **6** and **8-11** is described.

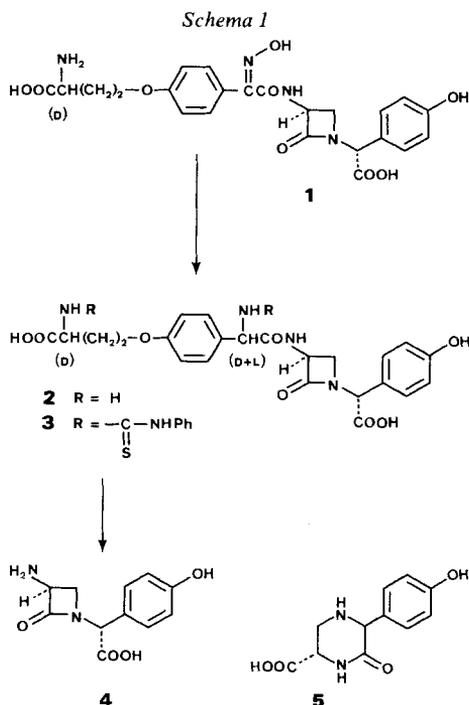
Im Jahre 1976 beschrieben *Imanaka et al.* [2] die Isolierung des gegen gram-negative Keime wirksamen β -Lactam-Antibiotikums Nocardicin A (**1**)¹⁾ aus der Kulturbrühe von *Nocardia uniformis tsuyamanensis* (ATCC 21806). Die in ihrem Aufbau einzigartige Struktur von Nocardicin A (**1**) mit einer endständigen α -Aminosäurefunktion (D-Homoserin) in der Acylseitenkette und einem nicht anelierten β -Lactamring ergab sich aus spektroskopischen Daten und Abbaubefunden von *Kamiya et al.* [4] [5]. Dieselben Autoren beschrieben auch ein erstes Verfahren zur Abspaltung der Acylseitenkette von Nocardicin A (**1**) [3] [6] (*Schema 1*). Dabei resultierte die 3-Amino-nocardicinsäure (**4**), die für die Herstellung von Derivaten in der Nocardicinreihe von zentraler Bedeutung ist²⁾. Dazu wurde **1** vorerst mittels katalytischer Hydrierung in das (D,L)-Epimerengemisch der entsprechenden Diamine (vgl. **2**)³⁾ überführt, das sich nach der von *Edman* [9] zur Spaltung von Peptiden entwickelten Reaktionssequenz durch Umsatz mit Phenylisothiocyanat in das binäre D,L-Gemisch der Bis-thioharnstoffe **3** umwandeln liess. Bei der abschliessenden Behandlung mit Salzsäure oder Trifluoressigsäure⁴⁾ resultierte dann die gewünschte 3-Amino-nocardicinsäure (**4**). Obwohl auf breiter Basis Optimie-

1) Für die Isolierung und Charakterisierung der in kleinen Ausbeuten gefassten, biologisch durchwegs schwächer aktiven Begleitstoffe Nocardicin B bis G vgl. [3].

2) Unter Vernachlässigung der momentan ungleichen medizinisch-pharmazeutischen Gewichtung der beiden Reihen, entspricht die Umwandlung **1** \rightleftharpoons **4** in der Nocardicinreihe formal der Überführung des natürlichen Cephalosporin C in 7-Amino-cephalosporansäure auf dem Cephalosporin-gebiet (vgl. dazu z.B. das PCl_5 -Verfahren zur Abspaltung der Seitenketten von Cephalosporinen [7] und Penicillinen [8]).

3) Die (D)-Komponente des Gemisches **2** ist identisch mit Nocardicin C, einem der Begleitstoffe von **1**.

4) Für eine exper. Beschreibung der gesamten Reaktionsfolge und insbesondere der verschiedenen Varianten der Säurebehandlung vgl. [6].

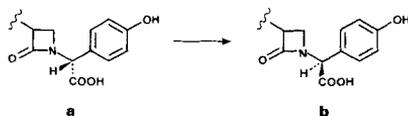


ungsversuche durchgeführt worden sind [6], konnte die eher mässige Ausbeute der abschliessenden Säurespaltung nicht wesentlich angehoben werden. Dieser Befund, mit seinen negativen Auswirkungen auf das Gesamtverfahren, hat, den Autoren der Arbeit gemäss, seine Ursache in einer ausgeprägten Säurelabilität von **4**, das unter den stark sauren Bedingungen zum Teil in das Piperazinon **5** [3] übergeht⁵⁾.

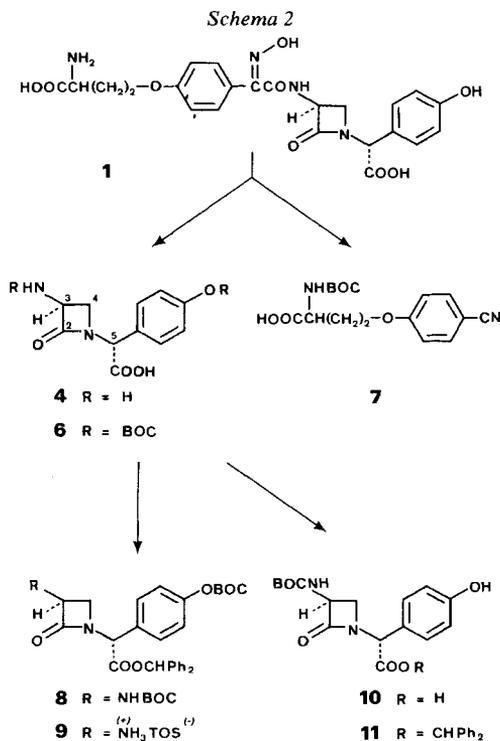
Wir berichten nun über ein präparativ einfaches, zweistufiges Verfahren zur Überführung von Nocardicin A (**1**) in 3-Amino-nocardicinsäure (**4**) in einer Gesamtausbeute von 68%. Aufgrund der basischen bzw. vergleichsweise milden sauren Bedingungen der beiden Einzelstufen ist dabei weder ein Umlagerungsprodukt der Struktur **5** noch eine partielle Epimerisierung in α -Stellung zur Carbonsäurefunktion (vgl. Fussnote 5) nachzuweisen.

In der ersten Stufe des neuen Verfahrens wurde Nocardicin A (**1**)⁶⁾ in Dioxan/Wasser bei pH 10,2 (durch Zugabe von NaOH konstant gehalten) und einer Tem-

⁵⁾ Zusätzliche Ausbeuteverluste dürften sich gemäss NMR.-Analyse des Rohproduktes überdies aus einer partiellen Konfigurationsumkehr in α -Stellung zur Carbonsäurefunktion während der Reaktion oder Aufarbeitung ergeben (vgl. **a** \rightarrow **b**; unveröffentlichte Befunde einer Nachbearbeitung in unsern Laboratorien).



⁶⁾ Eine grössere Menge von Nocardicin A (**1**) wurde uns in verdankenswerter Weise von der Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan, zur Verfügung gestellt.



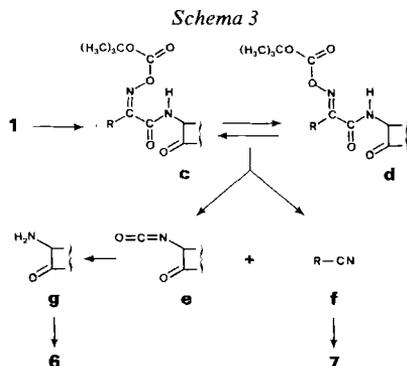
peratur von 55° mit einem Überschuss von Di-*t*-butyl-pyrocbonat behandelt. Dabei resultierten die Di-BOC-Säure **6** (80%) und das Nitril **7**, die sich problemlos trennen liessen (Schema 2)⁷⁾. Aus **6** wurde darauf durch Trifluoressigsäure-Behandlung (8 Min. bei 0-5°) die freie 3-Amino-nocardicinsäure (**4**) [3] [6]⁸⁾ in 86proz. Ausbeute erhalten.

Die Relaisverbindung **6** erschloss ausserdem Zugänge zu verschiedenartig geschützten Derivaten des Grundkörpers (Schema 2), die sich im Zusammenhang mit synthetischen Arbeiten in dieser Reihe als wichtig erweisen dürften. So ergab die Einwirkung von Diphenyldiazomethan auf **6** den Ester **8**, dessen *N*-BOC-Gruppierung bei Behandlung mit *p*-Toluolsulfonsäure unter Ausbildung des *p*-Toluolsulfonates **9** abgespalten wurde. In einer zweiten Reihe von Versuchen wurde die *O*-BOC-Gruppe von **6** durch Baseneinwirkung hydrolysiert und die resultierende Säure **10** mit Ph_2CN_2 in den Ester **11** umgewandelt.

Damit ist ausgehend von genuinem Nocardicin A (**1**) ein neuer, ergiebiger Zugang zur 3-Amino-nocardicinsäure (**4**) und deren geschützten Derivaten **6** sowie **8-11** erschlossen worden.

7) Wurde unter sonst identischen Bedingungen an Stelle von Di-*t*-butyl-pyrocbonat z.B. mit Benzyloxycarbonylchlorid umgesetzt, so wurden an Stelle von **6** und **7** die entsprechenden Benzyloxycarbonyl-Derivate erhalten.

8) Herrn Dr. T. Kamiya danken wir bestens für die Überlassung einer Probe von **4** für Identifikationszwecke.



Auf Untersuchungen zum Mechanismus der Schlüsselreaktion $1 \rightarrow 6+7$ wurde im Rahmen der vorliegenden, rein präparativ orientierten Arbeit verzichtet. Es erscheint jedoch als plausibel, dass sich aus **1** vorerst ein Zwischenprodukt **c** bildet (Schema 3). Ob sich das *O*-(*t*-Butoxycarbonyl)oxim **c** in der an sich ungünstigen (*Z*)-Form direkt fragmentiert ($\rightarrow \text{e} + \text{f}$) oder ob der Fragmentierung ein Gleichgewicht mit **d** (*E*-Form) vorgelagert ist, kann aufgrund der bisherigen Versuche nicht entschieden werden. Im Gegensatz dazu stellen sich bezüglich der Formulierung des anschliessenden Zerfalls des Isocyanats **e** zum Amin **g**, das mit überschüssigem Reagens weiterreagiert ($\rightarrow \text{6}$), keinerlei Fragen. Aus den Strukturen der isolierten Endprodukte **6** und **7** ist ersichtlich, dass in irgend einer Phase des Reaktionsablaufs zusätzlich die Phenolgruppe wie auch die Aminofunktion der Homoserin-Teilstruktur mit dem in grossem Überschuss vorhandenen Di-*t*-butyl-pyrocbonat in Reaktion treten.

Herrn Dr. *H. Bickel* sind wir für sein grosses, dieser Arbeit entgegengebrachtes Interesse zu Dank verpflichtet.

Experimenteller Teil⁹⁾

Allgemeines. Die Smp. (nicht korrigiert) wurden auf einem *Kofler*-Block oder im Ölbad bestimmt. Die optischen Drehungen wurden in einem Rohr von 10 cm Länge gemessen (auf *Perkin-Elmer*, Mod. 241; Konzentration ca. 1%; Lösungsmittel in Klammern). UV.-Spektren: auf *Cary 118*. Für andere Angaben s. [4] von [1].

Herstellung von N,O-Bis(t-butoxycarbonyl)-3-amino-nocardicinsäure¹⁰⁾ (6) und N-(t-Butoxycarbonyl)-O⁴-(4'-cyanophenyl)homoserin (7). In 1,6 l Wasser wurden 160 g (0,31 mol) Nocardicin-Amonohydrat ($1 \cdot \text{H}_2\text{O}$)⁶⁾ aufgenommen und durch Zutropfen von 20proz. NaOH-Lösung bis zum Erreichen von pH 10,2 in Lösung gebracht. Nach Zugabe von 200 ml (0,99 mol) Di-*t*-butyl-pyrocbonat in 1 l Dioxan wurde 3 Std. bei 55° gerührt, wobei durch Zugabe von 20proz. NaOH-Lösung bei pH 9,8–10,2 gehalten wurde. Nach Zufügen von weiteren 150 ml (0,74 mol) Di-*t*-butyl-pyrocbonat und einer Reaktionsdauer von insgesamt 7 Std. erreichte die in Aliquoten gemessene UV.-Absorption bei 250 nm ein Intensitätsmaximum. Das Gemisch wurde darauf auf 30° abgekühlt und weitere 24 Std. gerührt, wobei im Verlaufe der ersten 4 Std. zusätzlich 250 ml (1,24 mol) Di-*t*-butyl-pyrocbonat zugetropft wurden. Darauf wurde von den Feststoffen abfiltriert und mit Dioxan nachgewaschen. Das Filtrat wurde i.V. auf ca. 1,5 l eingeeengt, mit Essigester extrahiert und die Essigester-Phase 2mal mit Wasser gewaschen. Die Essigester-Phase wurde eliminiert. Die vereinigten Wasseranteile wurden bei 5° mit konz. Salzsäure auf pH 4,2 angesäuert. Dabei resultierte ein kristallines Gemisch von **6** und **7**, das abfiltriert und mit 0,5 l Wasser gewaschen wurde. Anschliessend wurde

⁹⁾ Frl. *V. Wild* sowie den Herren *M. Hartmann* und *A. Tanner* sind wir für ihre sorgfältige experimentelle Mitarbeit zu Dank verpflichtet.

¹⁰⁾ Der systematische Name der nicht geschützten 3-Amino-nocardicinsäure (**4**) lautet: 2-[3' β -Amino-2'-oxo-azetan-1'-yl]-2-(4''-hydroxyphenyl)essigsäure.

unter wiederholtem Aufrühren des Kristallisates mit 1,5 l Essigester gewaschen, wobei 7 in Lösung ging und so von 6 abgetrennt wurde: 108,1 g (80%) 6, Smp. 173° (Zers.), $[\alpha]_D^{20} = -156 \pm 1^\circ$ (0,5N wässer. NaHCO₃-Lösung). - IR. (Nujol): 3370, 1755, 1735, 1705. - NMR. (DMSO-d₆): 1,37 (s, (CH₃)₃C); 1,50 (s, (CH₃)₃C); 3,10 (m, H-C(4)); 3,78 (t, J=5, H-C(4)); 4,71 (br., H-C(3)); 5,50 (s, H-C(5)); 7,32 und 7,45 (A₂B₂, J=9, 4 arom. H); 7,60 (d, J=8, HN).

C₂₁H₂₈N₂O₈ (436,46) Ber. C 57,79 H 6,47 N 6,42% Gef. C 57,89 H 6,60 N 6,44%

Aus der oben erwähnten Essigester-Waschlösung (1,5 l) kristallisierten durch Einengen auf ca. 200 ml, 48,0 g (51%) 7, das nach Umkristallisation aus Äther bei 144-145° schmolz; $[\alpha]_D^{20} = -8 \pm 1^\circ$ (0,5N wässer. NaHCO₃-Lösung). - UV. (0,5N wässer. NaHCO₃-Lösung): 250 (22000). - IR. (Nujol): 3400, 2270, 1775, 1720, 1610. - NMR. (DMSO-d₆): 1,38 (s, (CH₃)₃C); 1,95-2,35 (m, 2 H-C(3)); 4,14 (m, 2 H-C(4), H-C(2)); 7,08 und 7,71 (A₂B₂, J=9, 4 arom. H).

C₁₆H₂₀N₂O₅ (320,35) Ber. C 59,99 H 6,29 N 8,75% Gef. C 59,91 H 6,31 N 8,73%

3-Amino-nocardicinsäure¹⁰ (4). Eine Lösung von 20 g (45,9 mmol) 6 in 100 ml Trifluoressigsäure wurde 8 Min. bei 0-5° gerührt (Gasentwicklung) und anschliessend bei 20° Badtemp./11 Torr im RV. (Trockeneis-Kühlung) eingedampft. Der Rückstand wurde mit Äther digeriert, abfiltriert, mit Äther gewaschen und i.HV. getrocknet. Dann wurde in 80 ml Methanol gelöst und die Lösung mit 30proz. methanolischer Triäthylaminlösung auf pH 4,3 gestellt. Dabei resultierten 9,3 g (86%) kristallines 4 vom Smp. 196-200° (Zers.). Identifizierung mit 4 aus [6]⁸) im DC. (Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser 40:24:6:30), IR. (Nujol) und NMR. (D₂O und 1 Mol-Äquiv. NaHCO₃).

N,O-Bis(t-butoxycarbonyl)-3-amino-nocardicinsäure-(diphenylmethyl)ester (8). Eine Lösung von 25,3 g (58,0 mmol) 6 in 400 ml Dioxan wurde mit 15,0 g Diphenyldiazomethan bei 10-15° umgesetzt. Nach 4 Std. wurde die Lösung durch Zutropfen von Essigsäure entfärbt und im RV. bei 25° Badtemp. eingedampft. Kristallisation des resultierenden Schaumes aus Äthanol lieferte 31,8 g (91%) 8 vom Smp. 153-155°. Umkristallisation aus Äthanol ergab eine Analysenprobe vom Smp. 155-157°, $[\alpha]_D^{20} = -89 \pm 1^\circ$ (CHCl₃). - IR. (CH₂Cl₂): 3400, 1760, 1720. - NMR. (CDCl₃): 1,40 (s, (CH₃)₃C); 1,57 (s, (CH₃)₃C); 3,05 (d×d, J_{3,4}=3, J_{3,4}=5, H-C(4)); 3,90 (t, J=5, H-C(4)); 4,87 (br., H-C(3)); 5,11 (d, J=8, HN); 5,76 (s, H-C(5)); 6,93 (s, COOCH); ca. 7,0-7,5 (m, 14 arom. H).

C₃₄H₃₈N₂O₈ (602,68) Ber. C 67,76 H 6,36 N 4,65% Gef. C 67,66 H 6,47 N 4,79%

O-(t-Butoxycarbonyl)-3-ammonio-nocardicinsäure-(diphenylmethyl)ester-(p-toluolsulfonat)¹¹ (9). In 100 ml Acetonitril wurden 6,02 g (10 mmol) 8 mit 4,0 g (21 mmol) p-Toluolsulfonsäure-monohydrat 40 Min. bei RT. gerührt. Dann wurde mit 100 ml Äther versetzt und zur Vervollständigung der Kristallisation 1 Std. bei 0° gehalten. Abfiltrieren der Kristalle, Kristallisation einer zweiten Charge aus der Mutterlauge und gemeinsame Umkristallisation aus 2-Propanol ergaben 3,1 g 9 vom Smp. 155-158° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -83 \pm 1^\circ$ (CH₃OH). - IR. (Nujol): 1775, 1765, 1740, 1605. - NMR. (DMSO-d₆): 1,50 (s, (CH₃)₃C); 2,29 (s, CH₃-Ph); 3,22 (d×d, J_{3,4}=3, J_{4,4}=5, H-C(4)); 3,82 (t, J=5, H-C(4)); 4,65 (m, H-C(3)); 5,96 (s, H-C(5)); 6,91 (s, COOCH); 7,0-7,7 (m, 18 arom. H); 8,74 (br., H₃N⁺).

C₃₆H₃₈N₂O₉S (674,77) Ber. C 64,08 H 5,68 N 4,15 S 4,75%
Gef. „ 64,09 „ 5,81 „ 4,08 „ 4,74%

N-(t-Butoxycarbonyl)-3-amino-nocardicinsäure (10). Eine Lösung von 9,0 g (21 mmol) 6 und 2,23 g (21 mmol) Natriumcarbonat wurde in 60 ml Wasser 2 Std. bei 60° gehalten. Filtration und Einstellen des Filtrates auf pH 4,2 (2N Salzsäure) ergaben einen Niederschlag, welcher abfiltriert, mit Wasser und Essigester gewaschen und dann aus Methanol/Essigester umkristallisiert wurde. Dabei resultierten 5,8 g 10 vom Smp. 201° (Zers.), $[\alpha]_D^{20} = -213 \pm 1^\circ$ (DMSO). - IR. (Dioxan): 3390, 1765, 1740, 1715, 1610, 1595. - NMR. (DMSO-d₆): 1,35 (s, (CH₃)₃C); 2,97 (d×d, J_{3,4}=2, J_{4,4}=5, H-C(4)); 3,69 (t, J=5, H-C(4)); 4,65 (m, H-C(3)); 5,30 (s, H-C(5)); 6,77 und 7,15 (A₂B₂, J=8,5, 4 arom. H); 7,57 (d, J=8, HN).

C₁₆H₂₀N₂O₆ (336,34) Ber. C 57,14 H 6,00 N 8,33% Gef. C 57,30 H 6,04 N 8,47%

¹¹) Der systematische Name von 9 lautet: [1-(4'-(t-Butoxycarbonyloxy)-a-(diphenyl)methoxycarbonylbenzyl)-2-oxo-azetan-3-yl]ammonium-(p-toluolsulfonat).

N-(*t*-Butoxycarbonyl)-3-amino-nocardicinsäure-(diphenylmethyl)ester (**11**). Eine Lösung von 4,55 g (13,5 mmol) **10** in 100 ml Methanol wurde mit 5 g Diphenyldiazomethan in 30 ml Chloroform versetzt und 3 Std. bei 10° gerührt. Dann wurde der Überschuss an Diphenyldiazomethan mit Essigsäure zersetzt (Entfärbung), es wurde in Essigester aufgenommen, mit ges. wässer. Lösungen von NaHCO₃ und NaCl (bis zum Neutralpunkt) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Das erhaltene Rohprodukt wurde an 250 g Kieselgel chromatographiert, wobei die mit Toluol/Essigester 4:1 eluierten produkthaltigen Fraktionen vereinigt, eingedampft und aus Aceton/Hexan kristallisiert wurden. Dabei resultierten 6,4 g **11** vom Smp. 176-178° (Zers.), $[\alpha]_D^{20} = -111 \pm 1^\circ$ (CHCl₃). - IR. (CH₂Cl₂): 3580, 3420, 1760, 1742, 1720, 1618, 1600, 1518. - NMR. (CDCl₃): 1,33 (s, (CH₃)₃C); 2,96 (d × d, J_{3,4} = 3, J_{4,4} = 5, H-C(4)); 3,82 (t, J = 5, H-C(4)); 4,77 (br., H-C(3)); 5,14 (d, J = 8, HN); 5,60 (s, H-C(5)); 6,93 (s, COOCH); 6,7-7,0 (m, 14 arom. H).

C₂₉H₃₀N₂O₆ (502,57) Ber. C 69,31 H 6,02 N 5,57% Gef. C 69,47 H 6,18 N 5,56%

Für die Ausführung der Mikroanalysen danken wir Herrn Dr. *W. Padowetz*, für die Aufnahme und Diskussion der NMR.-Spektren den Herrn Dres. *H. Fuhrer* und *G. Rist*.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 16. Mitteilung: *R. Scartazzini*, *Helv.* 60, 1510 (1977).
- [2] *H. Aoki, H. Sakai, M. Kohsaka, T. Konomi, J. Hosoda, E. Iguchi & H. Imanaka*, *J. Antibiotics* 29, 492 (1976).
- [3] *T. Kamiya*, 'Recent Advances in the Chemistry of β -Lactam Antibiotics', Ed. J. Elks, The Chemical Society, London 1977, S. 281-294.
- [4] *M. Hashimoto, T. Komori & T. Kamiya*, *J. Amer. chem. Soc.* 98, 3023 (1976).
- [5] *M. Hashimoto, T. Komori & T. Kamiya*, *J. Antibiotics* 29, 890 (1976).
- [6] *T. Kamiya, Y. Saito, M. Hashimoto, T. Teraji, T. Takaya, T. Komori, O. Nakaguti, T. Oku, Y. Shio-kawa, K. Hemmi & H. Takasugi*, Deutsche Offenlegungsschrift Nr. 2529941.
- [7] *B. Fechtig, H. Peter, H. Bickel & E. Vischer*, *Helv.* 51, 1108 (1968).
- [8] *H. W. O. Weissenburger & M. G. van der Hoeven*, *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* 89, 1081 (1970).
- [9] *P. Edman*, *Acta chem. Scand.* 4, 277 und 283 (1950).