Über Aminosäure-Antagonisten, III¹ Synthese von 4-Alkoxy-2-oxo-trans-3-butensäurealkylestern

On Amino Acid Antagonists, III¹ Syntheses of 4-Alkoxy-2-oxo-trans-3-butenoic Acid Esters

Wolfram Trowitzsch

Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Abteilung Niedermolekulare Naturstoffe, Braunschweig-Stöckheim

(Z. Naturforsch. **32b**, 1068–1071 [1977]; eingegangen am 16. April 1977)

 β, γ -Unsaturated α -Keto Esters, Antibiotic Activity

The syntheses of the above biologically active esters are described. By NMR spectroscopy it is shown that the corresponding ethyl compound 4 may exist in both the *trans* and the *cis* conformers. Starting with 4, addition of an appropriate alcohol results in the corresponding 4-alkoxy compound of 4. The described esters are antagonists of aspartic acid as well as of oxalacetic acid and inhibited the growth of *E. coli* MRE 600.

Kürzlich konnten wir zeigen, daß einige β , γ -ungesättigte α -Ketoester antibiotische Wirksamkeit gegenüber gram-positiven und gram-negativen Bakterien besitzen¹.

In der vorangegangenen Publikation sind u.a. Ketoester beschrieben, deren entsprechende a-Aminosäuren bisher nicht bekannt sind. In dieser Mitteilung wird über die Synthese der Titelverbindungen berichtet, unter denen der 4-Methyläther der entsprechenden a-Aminosäure sowohl als Naturprodukt ^{2,3} isoliert, wie auch bereits synthetisch zugänglich gemacht worden ist ⁴. L-2-Amino-4-methoxy-trans-3-butensäure (1) konnte erstmals 1972 aus einem Pseudomonas aeruginosa Stamm isoliert werden ².

Rando hat gezeigt, daß 1 die Aspartat-Transaminase aus Schweineherz irreversibel hemmt⁵.

Um den Wirkungsmechanismus der ungesättigten Ketoester mit dem der entsprechenden Amino-

Sonderdruckanforderungen an Dr. W. Trowitzsch, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Abteilung Niedermolekulare Naturstoffe, Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig-Stöckheim.

säuren vergleichen zu können, sollte 4-Methoxy-2-oxo-trans-3-butensäureäthylester (2) dargestellt werden.

Versuche, 2 durch alkalische Kondensation von Ameisensäureester und Brenztraubensäureäthylester darzustellen, schlugen wegen der hohen Acidität der Methylprotonen des Pyruvates fehl. Selenoxidation von 4-Methoxy-trans-3-butenon (3) verlief nur unter Verlust der Enoläther-Funktion.

Zum Erfolg führte schließlich die von CLAISEN⁶ entwickelte und von R. G. Jones optimierte Methode⁷, in Verbindungen mit aciden Methylenprotonen durch Kondensation mit *ortho*-Ameisensäuretrialkylestern und Essigsäureanhydrid Alkoxymethylengruppen einzuführen.

Für diese Reaktion erwiesen sich die Methylprotonen des Pyruvates als hinreichend sauer. Unter Verwendung von Brenztraubensäureäthylester und Ameisensäuretriäthylester konnten bis zu 35% Ausbeute an 4-Äthoxy-trans-3-butensäureäthylester (4) erhalten werden, wenn die im experimentellen Teil beschriebenen Temperaturen und Zeiten eingehalten wurden.

Nach diesen Versuchen fanden wir 4 bereits in der Literatur von R. Kuhn und P. Lutz⁸ beschrieben. Diese Autoren hielten jedoch ihr Produkt für ein cis-trans-Isomerengemisch, da das IR-Spektrum von 4 im Doppelbindungsbereich 5 Banden aufweist. Abb. 2 zeigt deutlich, daß 4 nur in reiner trans-Konfiguration vorliegt. Die fünf beobachteten IR-Banden müssen daher eine andere Ursache besitzen.

Folgende Untersuchungen stützen die Vermutung, daß die IR-Banden durch cis- und trans-Konformere erzeugt werden, d.h., daß die durch Rotation um die zentrale Einfachbindung entstehenden Verbindungen 4a und 4b vorhanden sind.

Die Isomerisierung verläuft bei Raumtemperatur zu schnell für die NMR-Zeitskala, sie wird jedoch durch die IR-Spektroskopie erfaßt.

Bei niedrigen Temperaturen aufgenommene ¹H–NMR-Spektren (100 Hz) zeigen eine erhebliche

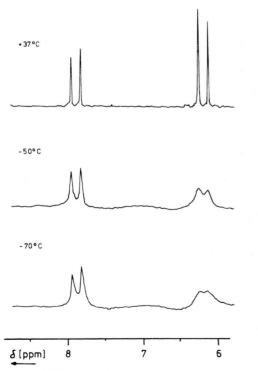


Abb. 1. 100 MHz¹–H–NMR-Spektren von 4, aufgenommen bei drei Temperaturen. Gezeigt ist der Bereich der olefinischen Protonen (TMS = 0 ppm).

Signalverbreiterung des Dubletts bei hohem Feld des AB-Systems (siehe Abb. 1).

Zunächst lag die Vermutung nahe, daß sich der Tieffeld-Teil des AB-Systems verbreitern würde, denn dieser zeigt bereits bei Raumtemperatur die breiteren und weniger hohen Linien (siehe Abb. 2).

Diesen Effekt konnten wir mit Hilfe eines INDOR-Experiments auf Kopplung mit den Äthermethylenprotonen in 4 und 5 bzw. mit den Äthermethylprotonen in 2 zurückführen.

Mittels eines Molekülmodells kann gezeigt werden, daß bei Rotation um die zentrale Einfach-

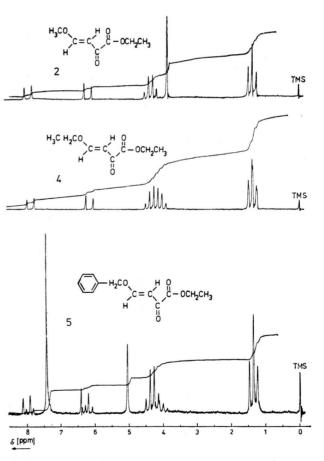


Abb. 2. 60 MHz⁻¹H-NMR-Spektren von 2, 4 und 5 (+ ca. 30% 4).

bindung in 4 tatsächlich die magnetische Beeinflussung für H-3 am größten ist. R. Mecke und K. Noack⁹ berichten, daß auch in einigen Alk-3-en-2-onen für die C=O-Schwingungen 2 Banden gefunden werden und führen dies auf das gleichzeitige Vorliegen von *cis*- und *trans*-Konformeren dieser ungesättigten Ketone zurück.

4 besitzt die erwartete Reaktivität am C-Atom 4. So ließ sich durch Zugabe eines Überschusses von trockenem Methanol zu 4 bereits nach kurzem Erwärmen quantitativ der gewünschte 4-Methyläther 2 darstellen. Die Reaktion verläuft unter Erhalt der Konfiguration der Doppelbindung. Die olefinischen Protonen koppeln mit einer Konstanten von $J=13~{\rm Hz}$ (Abb. 2).

Beschreiben läßt sich diese Reaktion als eine nukleophile Substitution an einem mesomeriestabilisierten Michael-Akzeptor.

Es läßt sich ein Additions-Eliminierungs-Mechanismus formulieren, wobei sich im zweiten Schritt das sterisch günstigere *trans*-Produkt einstellt (Schema 1).

Nach dem gleichen Prinzip konnte mit einem Überschuß an Benzylalkohol 4 in den entsprechenden trans-Benzyläther überführt werden (5). Wurde bei Ölpumpenvakuum ($ca. 5 \times 10^{-2}$ Torr) und 40 °C über einen Zeitraum von 20 min der überschüssige

Benzylalkohol abdestilliert, erhielt man bereits eine Umsetzung von ca. 60% zum Benzyläther 5. In Abb. 2 ist das ¹H–NMR-Spektrum des Reaktionsgemisches abgebildet. Wiederholung der Prozedur lieferte quantitativ 5.

Die hier beschriebenen Reaktionen liefern einen in vitro Beweis für den von Rando⁵ postulierten Wirkungsmechanismus von 1. Danach ist der eigentliche Inhibitor das Ketimin B, das aus der ungesättigten α -Aminosäure und Pyridoxalphosphat nach Wasserstoffwanderung aus dem Aldimin A entsteht (Schema 2).

2 und 4 hemmen das Wachstum von $E.\ coli$ mit einer minimalen Hemmkonzentration von $10^{-4} \mathrm{Mol/l}.$ Zugabe von Oxalessigsäure oder Asparaginsäure heben die Hemmwirkung vollständig auf.

Experimenteller Teil

Herstellung von 4-Äthoxy-2-oxo-trans-3-butensäureäthylester (4)

Nach der Arbeitsweise von Jones wurden 81,2 g (0,7 mol) Brenztraubensäureäthylester, 180 g (1,2 mol) Orthoameisensäuretriäthylester und 185 g (1,8 mol) Essigsäureanhydrid in einem 1 l-Kolben auf einem Ölbad für 12 h auf 120 °C gehalten. Für weitere 12 h erhöhte man die Temperatur auf 140 °C. Die flüchtigen Produkte ließ man über ein kurzes (5 cm), sich verengendes gebogenes Glasrohr in eine Vorlage destillieren. Das Produktgemisch wurde unter Ölpumpenvakuum fraktioniert. Bei 80 °C und 10-2 Torr wurden 38 g eines hellen, leicht gelb gefärbten Öles erhalten. Als Vorfraktion wurde ein Gemisch aus Essigsäure, Essigsäureanhydrid und nicht umgesetztem Brenztraubensäureester erhalten.

C₈H₁₂O₄ (MG 172,18)

Ber. C 55,80 H 7,03, Gef. C 55,74 H 7,09.

 λ_{max} : 286 nm (Äthanol).

¹H-NMR-Spektrum; EM 360 (CDCl₃/TMS): δ [ppm] = 7,90 (d, 1, J = 13 Hz), 6,16 (d, 1, J = 13 Hz), 4,32 (q, 2), 4,08 (q, 2), 1,36 (t, 6).

Massenspektrum; MS 9 (T = 50 °C): m/e (%) M+ = 172 (14,7), (M+1)+ = 173 (11,4), 99 (100), 71 (85,2).

IR-Spektrum (in CHCl₃): $\nu = 3020$, 2980, 1725, 1680, 1645, 1600 und 1585 cm⁻¹.

Herrn Professor Dr. H. Sahm (KFA Jülich) danke ich für die hilfreichen Diskussionen über die biochemischen Aspekte dieser Arbeit. Den Herren Dr. V. Wray und Dr. L. Ernst (Abteilung Physikalische Meßtechnik der GBF) danke ich für die NMR-Experimente.

- Mitteilung: W. Trowitzsch und H. Sahm, Z. Naturforsch. 32c, 78 [1977].
 Mitteilung: W. Trowitzsch, Liebigs Ann. Chem., im Druck.
 J. P. Scannell, P. L. Pruess, T. C. Demny, L. H.
- SELLO, T. WILLIAMS und A. STEMPEL, J. Antibiotics 25, 122 [1972].

 3 U. SAHM, G. KNOBLOCH und F. WAGNER, J. Anti-
- biotics 26, 389 [1973].
- ⁴ D. D. KEITH, J. A. TORTORA, K. INEICHEN und W.
- Leimgruber, J.A. Tortora, K. Infeichen und W. Leimgruber, Tetrahedron 31, 2633 [1975].
 R. R. Rando, Nature 250, 586 [1974].
 Übersicht O. Bayer in Houben-Weyl-Müller, 4. Auflage Bd. 7/1, Seite 49, Thieme, Stuttgart 1954.
 R. G. Jones, J. Am. Chem. Soc. 73, 3684 [1951].
 R. Kuhn und P. Lutz, Biochem. Z. 338, 554 [1963].
 R. Mecke und K. Noack, Chem. Ber. 93, 210 [1960].