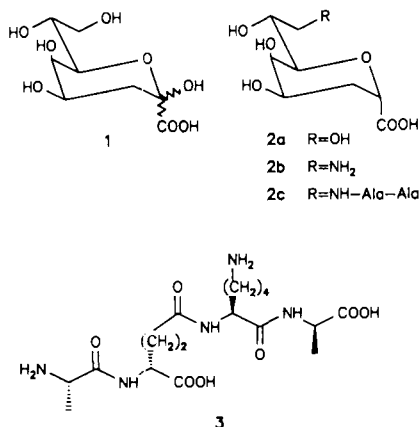


Synthese von Zellwandpeptidkonjugaten der 2,3-Didesoxy- β -D-manno-2-octulosäure

Von Hans-Georg Lerchen* und Hein-Peter Kroll

Professor Karl Heinz Büchel zum 60. Geburtstag gewidmet

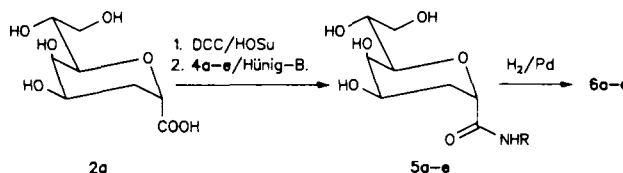
Lipopolysaccharide sind Bestandteile der äußeren Membran gramnegativer Bakterien und spielen eine wichtige Rolle für Wachstum und Virulenz der Keime^[1]. Ein bakterien-spezifisch und zugleich universell vorkommendes Strukturelement in der inneren Core-Region ist die 3-Desoxy-D-manno-2-octulosäure (KDO) **1**; die Hemmung ihrer Biosynthese ist somit ein attraktives Ziel der Wirkstoff-forschung^[2]. Schlüsselenzym der Biosynthese ist die Cytidinmonophosphat(CMP)-KDO-Synthetase^[3]. Als po-tente Enzyminhibitoren erwiesen sich die 2-Desoxy- β -KDO-Derivate **2a** und **2b**, die aber aufgrund struktureller Parame-ter die Bakterienmembran nicht passieren können^[4a]. Um



dieses Problem zu lösen, wurden von *Lartey* et al. sowie von *Claesson* et al. 8-Amino-verknüpfte Dipeptidkonjugate **2c** hergestellt, die über Peptid-Permeasen aktiv in die Bakte-rienzelle aufgenommen und dort durch Peptidasen unter Freisetzung des Enzyminhibitors **2b** gespalten werden^[4b,c]. Die Abspaltung des Dipeptids erfolgt aber in vivo auch durch eukaryontische Peptidasen vor Erreichen der Bakte-rienzelle^[5]. Um das Prinzip dennoch therapeutisch nutzbar zu machen, müssen Prodrugs von **2a** hergestellt werden, die in vivo so stabil sind, daß erst nach Aufnahme in die Bakte-rienzelle der Enzyminhibitor **2a** freigesetzt wird.

Wir beschreiben hier die Synthese von 1-Carboxy-verknüpften Peptidkonjugaten der 2-Desoxy- β -KDO **2a**, deren Stabilität durch Einführung unterschiedlicher potentieller Spaltstellen moduliert werden kann. Als Carrierpeptide wählten wir Sequenzen, die sich von bakteriellen Zellwand-peptiden ableiten und die im Rahmen des Peptidoglycan-stoffwechsels bevorzugt in die Bakterienzelle aufgenommen werden^[6]. Die Verknüpfung mit der 2-Desoxy- β -KDO **2a** erfolgt dabei über die terminalen Aminofunktionen von **3** oder entsprechenden Teilsequenzen. Zunächst werden die geeignet geschützten Peptidderivate **4** nach gängigen Metho-den hergestellt^[7] (Tabelle 1). Die Oligopeptidfragmente **4** können als Salze mit Dicyclohexylcarbodiimid(DCC)/N-Hydroxysuccinimid (HoSu) in Gegenwart von Hünig-Base nach der Wunsch-Weygand-Methode^[8] sehr effizient mit **2a** zu den geschützten Konjugaten **5** gekuppelt werden (Sche-ma 1). Die abschließende Deblockierung zu **6** erfolgt in ei-nem Schritt durch Hydrogenolyse (Tabelle 1).

Alle deblockierten Glycokonjugate **6** erwiesen sich als sta-bil gegenüber Peptidasen. Voraussetzung für die antibakte-rielle Wirksamkeit ist aber neben der Aufnahme der Konju-gate in die Bakterienzelle auch die Freisetzung des Enzyminhibitors am Wirkort. Um also das Carrier-Potential von Zellwandpeptidfragmenten abschätzen zu können, muß-ten potentielle Spaltstellen, z. B. in Form von aktivierten Estern^[9], zwischen Wirkmolekül und Peptid eingebaut wer-den.



Schema 1. Verknüpfung der 2-Desoxy- β -KDO **2a** mit geschützten Peptidderi-vaten **4a-e** zu den Konjugaten **5a-e** und vollständige Deblockierung zu **6a-e** (siehe Tabelle 1).

Die Caesiumsalz-Methode^[10] eröffnet einen eleganten Weg, die Carboxygruppe von **2a** ohne Schutz der Hydro-xygruppen in empfindliche Esterderivate zu überführen. Ins-besondere wird dabei das Problem der selektiven Schutz-gruppenabspaltung unter Erhalt einer neu generierten Ester-bindung umgangen (Schema 2).

Tabelle 1. Verknüpfung der 2-Desoxy- β -KDO **2a** mit geschützten Peptidderivaten **4** zu **5** und Deblockierung zu den freien Glycokonjugaten **6** [a, b].

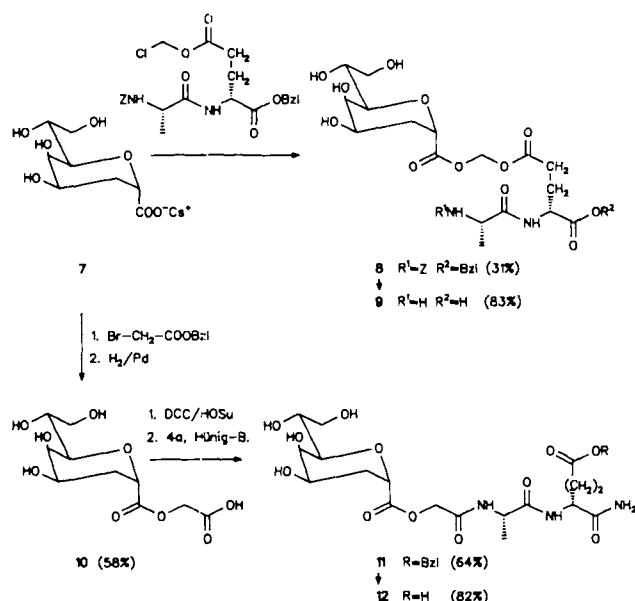
Zellwandpeptid-Edukte	geschützte 2d- β -KDO-Konjugate	Ausb. [%]	freie Glycokonjugate	Ausb. [%]
4a H-Ala-D-Gln-Bzl · HCl	5a 2d- β -KDO-Ala-D-Gln-Bzl	89	6a 2d- β -KDO-Ala-D-Gln	91
4b H-Ala-D-Glu(Bzl)-Bzl · TFA	5b 2d- β -KDO-Ala-D-Glu(Bzl)-Bzl	72	6b 2d- β -KDO-Ala-D-Glu	93
4c H-Ala-D-Glu(Lys(Z)-Bzl)-Bzl · TFA	5c 2d- β -KDO-Ala-D-Glu(Lys(Z)-Bzl)-Bzl	43	6c 2d- β -KDO-Ala-D-Glu(Lys)	82
4d H-Ala-D-Glu(Lys(Z)-D-Ala-Bzl)-Bzl · TFA	5d 2d- β -KDO-Ala-D-Glu(Lys(Z)-D-Ala-Bzl)-Bzl	75	6d 2d- β -KDO-Ala-D-Glu(Lys-D-Ala)	80
4e H-D-Glu(Lys(Z)-Bzl)-Bzl · TFA	5e 2d- β -KDO-D-Glu(Lys(Z)-Bzl)-Bzl	46	6e 2d- β -KDO-D-Glu(Lys)	80

[a] iGln = Isoglutamin, 2d- β -KDO = 2,3-Didesoxy- β -D-manno-2-octulosonoyl, TFA = Trifluoressigsäure, Z = N-Benzylloxycarbonyl. [b] Die Reinheit der neuen Verbindungen wurde durch ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie überprüft.

[*] Dr. H.-G. Lerchen
Bayer AG, Zentrale Forschung, Q18
W-5090 Leverkusen
Dr. H.-P. Kroll
Bayer AG, Institut für Chemotherapie
W-5600 Wuppertal

Ausgangsverbindung ist das Caesium-2,3-didesoxy- β -D-manno-2-octulosonat **7**, das aus **2a** mit Cs₂CO₃ gewonnen wird. Der geminale Diester **8** wird durch Alkylierung von **7** mit Z-Alanyl-D-glutamyl- α -benzyl- γ -chlormethylester^[11] zunächst in geschützter Form erhalten und dann hydrogeno-

lytisch deblockiert (**8** → **9**). Ebenfalls durch Alkylierung mit anschließender Hydrogenolyse ist der Glycolsäureester **10** zugänglich, der breit modifizierbar ist. So können durch weitere Umsetzungen mit Zellwandpeptidsequenzen Konjugate wie **11** erhalten werden, die sich hydrogenolytisch zu **12** deblockieren lassen.



Schema 2. Anknüpfung von Zellwandpeptidfragmenten an **2a** durch Alkylierung von Caesium-2,3-didesoxy-β-D-manno-2-octulosonat.

Die Spaltbarkeit durch bakterielle Enzyme konnte für die Konjugate **9** und **12** gezeigt werden^[13]. Die in vitro gemessene antibakterielle Aktivität^[14] von **9** belegt sowohl die Aufnahme des Konjugats in die Bakterienzelle als auch die Freisetzung des Inhibitors. Durch die verschiedenen Modifizierungen der 1-Carboxyfunktion der 2-Desoxy-β-KDO in **6**, **9** und **12** wird eine Abstufung der in-vivo-Stabilität der Zellwandpeptidkonjugate in Hinblick auf eine selektive Freisetzung des Enzyminhibitors innerhalb der Bakterienzelle erreicht.

Eingegangen am 5. Juni 1991 [Z 4679]

CAS-Registry-Nummern:

2a, 107573-28-4; **4a**, 59524-62-8; **4b**, 66025-58-9; **4c**, 137040-40-5; **4d**, 137040-42-7; **4e**, 137040-44-9; **5a**, 137040-52-9; **5b**, 137040-53-0; **5c**, 137040-54-1; **5d**, 137040-55-2; **5e**, 137040-56-3; **6a**, 137040-57-4; **6b**, 137040-58-5; **6c**, 137040-59-6; **6d**, 137040-60-7; **6e**, 137040-61-0; **7**, 137040-45-0; **8**, 137040-46-1; **9**, 137040-47-2; **10**, 137040-48-3; **11**, 137040-49-4; **12**, 137040-50-7; BrCH₂COOBzl, 5437-45-6; Z-Alanyl-D-glutamyl-α-benzyl-γ-chlormethylester, 137040-51-8.

- [1] Übersicht: O. Lüderitz, M. A. Freudenberg, C. Galanos, V. Lehman, E. T. Rietschel, D. H. Shaw, *Curr. Top. Membr. Transp.* **17** (1982) 79.
- [2] Übersicht: F. Unger, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **38** (1981) 323.
- [3] M. A. Ghalambor, E. C. Heath, *J. Biol. Chem.* **241** (1966) 3216; W. E. Kohlbrenner, S. W. Fesik, *ibid.* **260** (1985) 14695.
- [4] a) A. Claesson, K. Luthman, K. Gustafsson, G. Bondesson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **143** (1987) 1063; b) R. Goldman, W. E. Kohlbrenner, P. Lartey, A. Pernet, *Nature* **329** (1987) 730; c) A. Claesson, A. M. Jansson, B. C. Pring, S. M. Hammond, B. Ekström, *J. Med. Chem.* **30** (1987) 2309.
- [5] P. Lartey, *Drugs of the Future* **13** (1988) 555.
- [6] E. W. Goodell, *J. Bacteriol.* **163** (1985) 305; E. W. Goodell, C. F. Higgins, *ibid.* **169** (1987) 3861.
- [7] Übersicht: E. Wünsch in *Methoden Org. Chem. (Houben-Weyl)* **15/1,2** (1974).
- [8] E. Wünsch, F. Drees, *Chem. Ber.* **99** (1966) 110; F. Weygand, D. Hoffmann, E. Wünsch, *Z. Naturforsch. B21* (1966) 426.

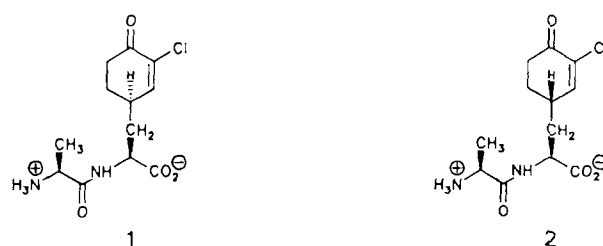
- [9] Übersicht: H. Bundgaard in B. Roche (Hrsg.): *Bioreversible Carriers in Drug Design*, Pergamon, London 1987, S. 13-94.
- [10] B. F. Gisin, *Helv. Chim. Acta* **56** (1973) 1476; W. H. Kruijzinga, B. Strijveen, R. M. Kellogg, *J. Org. Chem.* **46** (1981) 4321; H.-G. Lerchen, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **26** (1985) 5257.
- [11] Herstellung aus Z-L-Ala-D-Glu(OH)-Bzl mit Chlormethyl-chlorsulfat unter Phasentransferbedingungen (vgl. [12]). Bei der Umsetzung mit **7** erfolgt als Nebenreaktion eine Cyclisierung des Glutaminsäure-Bausteins zum Imid.
- [12] B. Baltzer, E. Binderup, W. v. Daehne, W. O. Godtfredsen, K. Hansen, B. Nielsen, H. Sorensen, S. Vangedal, *J. Antibiot.* **33** (1980) 1183.
- [13] Die Spaltbarkeit wurde mit einem CMP-KDO-Synthetase-Assay überprüft. Die Derivate **9** und **12** zeigen nur nach Freisetzung des Enzyminhibitors durch Vorbehandlung mit Bakterienzellsat Aktivität in diesem Enzymtest.
- [14] Nach 24 und 36 h wurde mit 2.2 μM **9** eine Reduktion der Keimzahlen von *Salmonella typhimurium* um 3.6 log-Stufen gegenüber der unbehandelten Kontrolle gemessen.

Enantio- und diastereoselektive Totalsynthese des antimykotisch wirkenden Naturstoffes Chlorotetain: Revision der relativen Konfiguration **

Von Hanno Wild* und Liborius Born

Professor Karl Heinz Büchel zum 60. Geburtstag gewidmet

Das vor kurzem aus dem *Bacillus-subtilis*-Stamm BGSC 1 E 2 isolierte Dipeptid Chlorotetain, dem die Struktur **1** zugeordnet wurde^[1], hat ähnliche antimykotische Eigenschaften wie das verwandte und bereits länger bekannte Bacilysin^[2]. Obwohl bisher drei Synthesen für die C-terminale Aminosäure des Bacilysins, Anticapsin, beschrieben sind^[3], ist ein stereoselektiver allgemeiner Zugang zu Aminosäuren dieses ungewöhnlichen Typs bisher nicht bekannt. Wir berichten hier über die erste Totalsynthese des Chlorotetains, aufgrund derer dem Naturstoff die zu **1** epimere Struktur **2** mit (S)-Konfiguration des C-Atoms im Cyclohexenylrest zukommt.



Bei der Syntheseplanung war zu berücksichtigen, daß Chlorotetain nur bei einem pH-Wert um 5 in Lösung stabil ist. Oberhalb pH 7 und unterhalb pH 5 nimmt die biologische Aktivität, besonders beim Erwärmen, rasch ab^[1]. Hauptreaktionsweg im Alkalischen ist die intramolekulare 1,4-Addition des Amides an das Enon-System unter Bildung eines 6-Oxo-octahydroindols^[3b,c]. Da die Gefahr dieser Nebenreaktion auch bei Zwischenstufen der Synthese besteht, sollte das Enon erst zu einem möglichst späten Zeitpunkt freigesetzt werden. Schema 1 zeigt die Reaktionsfolge, die

[*] Dr. H. Wild
Bayer AG, Chemisch-wissenschaftliches Labor Pharma
Postfach 101709, W-5600 Wuppertal 1
Dr. L. Born
ZF-DZA Strukturforchung
Bayerwerk, W-5090 Leverkusen

[**] Herrn Prof. G. Jung, Tübingen, danken wir für eine Probe natürlichen Chlorotetains.