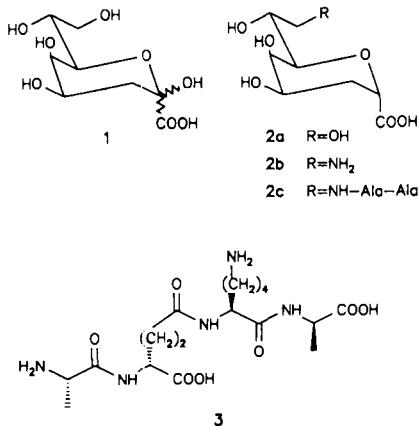


Synthese von Zellwandpeptidkonjugaten der 2,3-Didesoxy- β -D-manno-2-octulosonsäure

Von Hans-Georg Lerchen* und Hein-Peter Kroll

Professor Karl Heinz Büchel zum 60. Geburtstag gewidmet

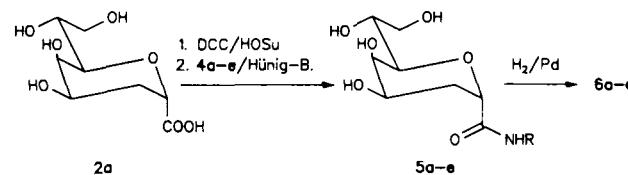
Lipopolysaccharide sind Bestandteile der äußeren Membran gramnegativer Bakterien und spielen eine wichtige Rolle für Wachstum und Virulenz der Keime^[1]. Ein bakterien-spezifisch und zugleich universell vorkommendes Strukturelement in der inneren Core-Region ist die 3-Desoxy-D-manno-2-octulosonsäure (KDO) 1; die Hemmung ihrer Biosynthese ist somit ein attraktives Ziel der Wirkstoffforschung^[2]. Schlüsselenzym der Biosynthese ist die Cytidinmonophosphat(CMP)-KDO-Synthetase^[3]. Als potente Enzyminhibitoren erwiesen sich die 2-Desoxy- β -KDO-Derivate 2a und 2b, die aber aufgrund struktureller Parameter 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 Bakterienzelle 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 Bakterienzelle^[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 Bakterienzelle 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 Zellwandpeptiden 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 Teilesequenzen. Zunächst werden die geeignet geschützten Peptidderivate 4 nach gängigen Methoden hergestellt^[7] (Tabelle 1). Die Oligopeptidfragmente 4 können als Salze mit Dicyclohexylcarbodiimid(DCC)/N-Hydroxysuccinimid (HoSu) in Gegenwart von Hünig-Base nach der Wünsch-Weygand-Methode^[8] sehr effizient mit 2a zu den geschützten Konjugaten 5 gekuppelt werden (Schema 1). Die abschließende Deblockierung zu 6 erfolgt in einem Schritt durch Hydrogenolyse (Tabelle 1).

Alle deblockierten Glykonjugate 6 erwiesen sich als stabil gegenüber Peptidasen. Voraussetzung für die antibakterielle Wirksamkeit ist aber neben der Aufnahme der Konjugate in die Bakterienzelle auch die Freisetzung des Enzyminhibitors am Wirkort. Um also das Carrier-Potential von Zellwandpeptidfragmenten abschätzen zu können, mußten potentielle Spaltstellen, z. B. in Form von aktivierten Estern^[9], zwischen Wirkmolekül und Peptid eingebaut werden.



Schema 1. Verknüpfung der 2-Desoxy- β -KDO 2a mit geschützten Peptidderivaten 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 Hydroxygruppen in empfindliche Esterderivate zu überführen. Insbesondere wird dabei das Problem der selektiven Schutzgruppenabspaltung unter Erhalt einer neu generierten Esterbindung umgangen (Schema 2).

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

| Zellwandpeptid-Edukte | geschützte 2d- β -KDO-Konjugate | Ausb. [%] | freie Glykonjugate | Ausb. [%] |
|--|---|-----------|--|-----------|
| 4a H-Ala-D-iGln-Bzl · HCl | 5a 2d- β -KDO-Ala-D-iGln-Bzl | 89 | 6a 2d- β -KDO-Ala-D-iGln | 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-Benzylcarbonyl. [b] Die Reinheit der neuen Verbindungen wurde durch 1 H- und 13 C-NMR-Spektroskopie überprüft.

[*] Dr. H.-G. Lerchen

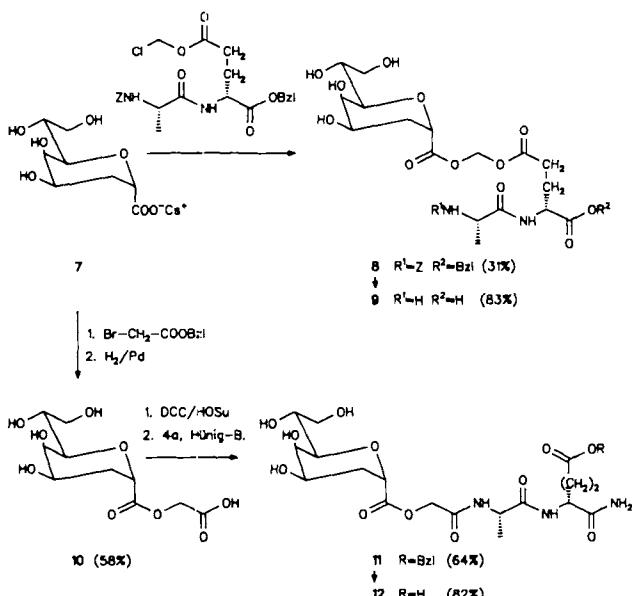
Bayer AG, Zentrale Forschung, Q18
W-5090 Leverkusen

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 Cs_2CO_3 gewonnen wird. Der geminale Diolester 8 wird durch Alkylierung von 7 mit Z-Alanyl-D-glutamyl- α -benzyl- γ -chlormethylester^[11] zunächst in geschützter Form erhalten und dann hydrogено-

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** de-blockieren 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**: 137040-60-9; **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; $\text{BrCH}_2\text{COOBzl}$: 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. Ghalambar, 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. B* 21 (1966) 426.

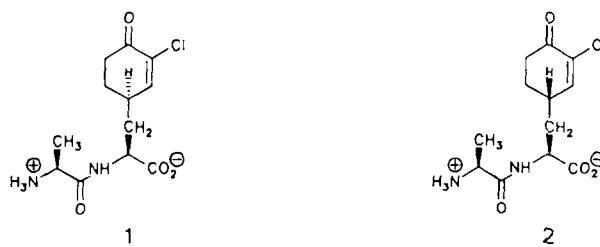
- [9] Übersicht: H. Bundgaard in B. Roche (Hrsg.): *Bioreversible Carriers in Drug Design*, Pergamon, London 1987, S. 13-94.
- [10] B. F. Gisin, *Helv. Chim. Acta* 56 (1973) 1476; W. H. Kruizinga, B. Strijtveen, R. M. Kellogg, *J. Org. Chem.* 46 (1981) 4321; H.-G. Lerchen, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* 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. Sørensen, 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 Bakterienzellsatz 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 I zugeordnet wurde^[11], hat ähnliche antimykotische Eigenschaften wie das verwandte und bereits länger bekannte Bacilysin^[12]. Obwohl bisher drei Synthesen für die C-terminale Aminosäure des Bacilysins, Anticapsin, beschrieben sind^[13], 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 I epimere Struktur **2** mit (*S*)-Konfiguration des C-Atoms im Cyclohexenylrest zu kommt.



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^[11]. Hauptreaktionsweg im Alkalischen ist die intramolekulare 1,4-Addition des Amides an das Enon-System unter Bildung eines 6-Oxoocatahydroindols^[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 Strukturforschung
Bayerwerk, W-5090 Leverkusen

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