

(Boc-CH₃), 37.4 (CH₂), 78.6 (Boc-C_q), 128.6 (C_{7h2}), 134.6 (C_{6a}), 137.0 (C_{6a}), 148.4 (C_{7h2}), 155.7 (Boc-CO), 159.6 (C_{6a}), 161.9 (C_{7h2}), 162.9 (COOH).

23: Aus **22** (0.32 g, 1 mmol) wie für **7** beschrieben. Kristallisation aus Ethanol/Ether. Ausbeute 0.42 g (93%); homogen (DC-System A). – ESI-MS: *m/z*: 448 [M + H]⁺, 470 [M + Na]⁺, 492 [M + 2 Na]⁺.

Eingegangen am 31. Januar 1996 [Z 8774]

Stichworte: Aminosäuren · Heterocyclen · Oxidationen · Peptidmimetica · Synthesemethoden

Synthese des DNA-Gyrase-Inhibitors Microcin B17, eines Peptidantibiotikums mit 43 Aminosäuren und acht aromatischen Heterocyclen im Peptidrückgrat **

Georgi Videnov, Dietmar Kaiser, Marc Brooks und Günther Jung*

Professor Helmut Zahn zum 80. Geburtstag gewidmet

Die vollständige Strukturaufklärung des höchst ungewöhnlichen Polypeptids Microcin B17 (McB17)^[1, 2], eines DNA-Gyrase-Inhibitors, ergab, daß vier Oxazol- und vier Thiazolringe in seinem Peptidrückgrat aus 43 Aminosäuren enthalten sind. McB17 hemmt die DNA-Replikation mit bemerkenswert hoher Aktivität^[3]. Das glycinreiche Peptidantibiotikum wird ribosomal von *Escherichia coli* Stamm LP 17^[4] synthetisiert. Posttranslationale enzymatische Modifikationen von Glycin-, Serin- und Cysteinresten im Vorläuferpeptid, das aus 69 Aminosäuren besteht, führen zur Bildung von 2-Aminomethylthiazol-4-carbonsäure [gly(Thz)] und 2-Aminomethylloxazol-4-carbonsäure [gly(Oxa)] sowie von 2-[2'-Aminomethylloxazol-4'-yl]-thiazol-4-carbonsäure [gly(OxaThz)] und 2-[2'-Aminomethylthiazol-4'-yl]-oxazol-4-carbonsäure [gly(ThzOxa)] (Abb. 1). Die Synthese dieser neuartigen starren Aminosäuren und ihrer Boc- und Fmoc-Derivate wird in der voranstehenden Zuschrift beschrieben^[6]. Im folgenden berichten wir über die Totalsynthese des McB17^[5].

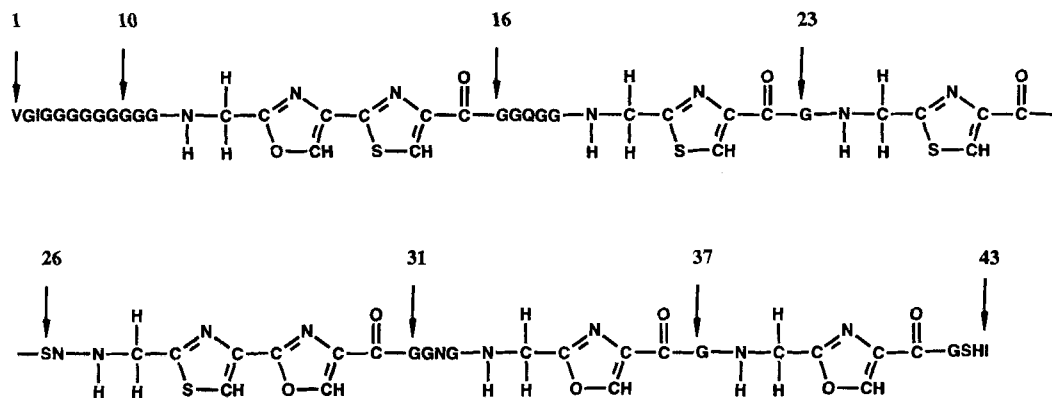


Abb. 1. Formel des glycinreichen Peptidantibiotikums Microcin B17, das acht heterocyclische, das Peptidrückgrat versteifende Modifikationen enthält [1, 2]. Proteinogene Aminosäuren werden mit dem Ein-Buchstaben-Code abgekürzt und wie im unmodifizierten Vorläuferprotein numeriert.

McB17 wurde durch Festphasensynthese nach der 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Strategie ausgehend von Fmoc-Ile-Wang-Harz synthetisiert. Die Fmoc-Aminosäuren wurden mit 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU)/N-Hydroxybenzotriazol(HOBT)/Diisopropylethylamin(DIEA) in äquimolarem Verhältnis gekuppelt und der Verlauf der Reaktion mit Ninhydrin überprüft. Da die schrittweise Synthese des an Glycinresten reichen N-terminalen Teils Probleme bereitete, setzten wir Fmoc-Gly-Gly-OH, Fmoc-Gly-Gly-Gly-OH, Fmoc-Ile³-Gly⁴-OH und Boc-Val¹-Gly²-OH

[*] Prof. Dr. G. Jung, Dr. G. Videnov, Dipl.-Chem. D. Kaiser, Dipl.-Biol. M. Brooks
Institut für Organische Chemie der Universität
Auf der Morgenstelle 18, D-72076 Tübingen
Telefax: Int. +7071/29 6925
E-mail: guenther.jung@uni-tuebingen.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert (SFB 323, Projekt C2-Jung).

an den entsprechenden Positionen ein (Abb. 1). Besonders Boc-Val¹-Gly²-OH, Fmoc-Ile³-Gly⁴-OH und Fmoc-Gly⁵-Gly⁶-OH mußten zweimal gekuppelt werden. Das Peptid wurde mit Dimethylsulfid/*m*-Kresol/Ethandithiol/Trifluoressigsäure (3:3:3:91) innerhalb 1 h bei Raumtemperatur vom Harz abgespalten und mit Ether gefällt.

Rohes synthetisches McB17 wies eine Reinheit von ca. 50 % auf und wurde chromatographisch mit semipräparativer HPLC [Nucleosil 300 C 18 5 µm, 8 × 250 mm; CH₃CN/H₂O mit 0.1 %iger Trifluoressigsäure (TFA)] gereinigt (Reinheit > 95 %). Die Übereinstimmung von gereinigtem synthetischen McB17 mit nativem wurde durch HPLC (Abb. 2), Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS) und heteronuclearer 2D-NMR-Spektroskopie bestätigt. Das Massenspektrum von synthetischem Microcin B17 zeigt Signale eines doppelt und eines dreifach geladenen Moleküls mit der zu erwartenden Masse (Abb. 2). Die Enantiomerenreinheit des HPLC-gereinigten McB17 wurde gaschromatographisch über ein derivatisiertes Hydrolysat (48 h) an einer Chirasil-Val-Säule bestimmt und lag innerhalb der üblichen Toleranz (< 1 %).

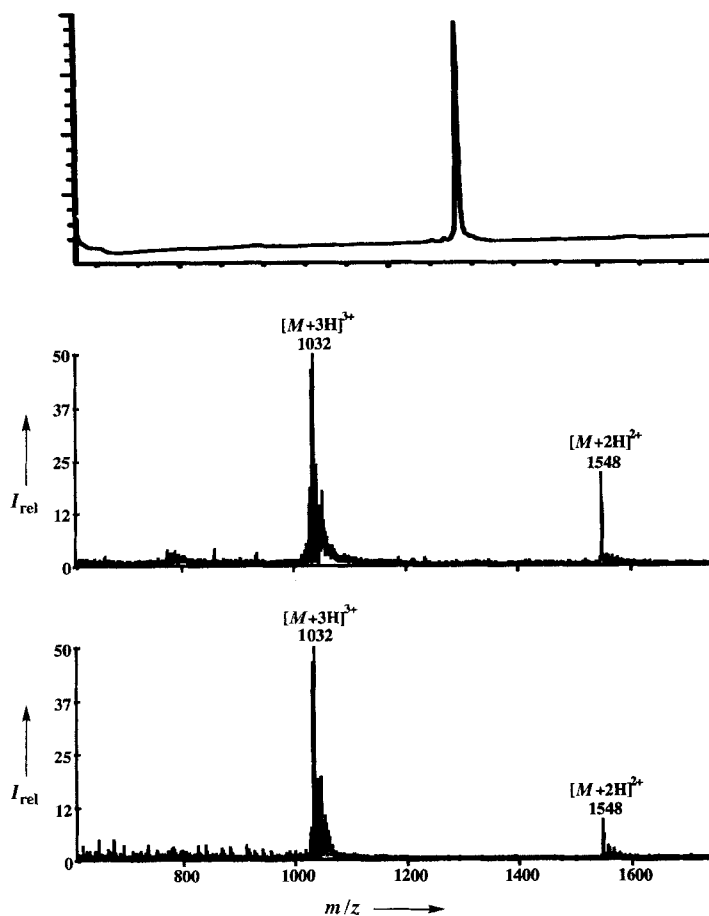


Abb. 2. HPL-Chromatogramm von gereinigtem synthetischem Microcin B17 (oben) und ESI-Massenspektren des synthetischen (Mitte) und des gereinigten nativen (unten) Microcins B17 ($M_r = 3094$).

2D-¹H, ¹³C-HSQC-Spektren wurden aufgenommen, um die Struktur des aus 43 Aminosäuren bestehenden Peptids zu bestätigen. Hierbei konnten wir auf unsere vollständige NMR-Signalzuordnung sowohl des ¹⁵N- als auch des ¹³C, ¹⁵N-markierten natürlichen McB17 zurückgreifen^[2]. Wie erwartet zeigten sich in der Aren-Region des Spektrums neben den Signalen des

Histidins acht weitere Signale, die den CH-Gruppen der acht fünfgliedrigen Heteroarene zugeordnet werden können. Die Thiazolringe weisen eine chemische Verschiebung für ¹³C zwischen $\delta = 125$ und 130 und die Oxazolringe zwischen $\delta = 140$ und 146 auf. Das Spektrum des synthetischen Produkts zeigt deutlich die Signale der heteroaromatischen Modifikationen, die genau mit denen des natürlichen McB17 übereinstimmen (Abb. 3). Lediglich das CH-Signal des Restes an Position 29

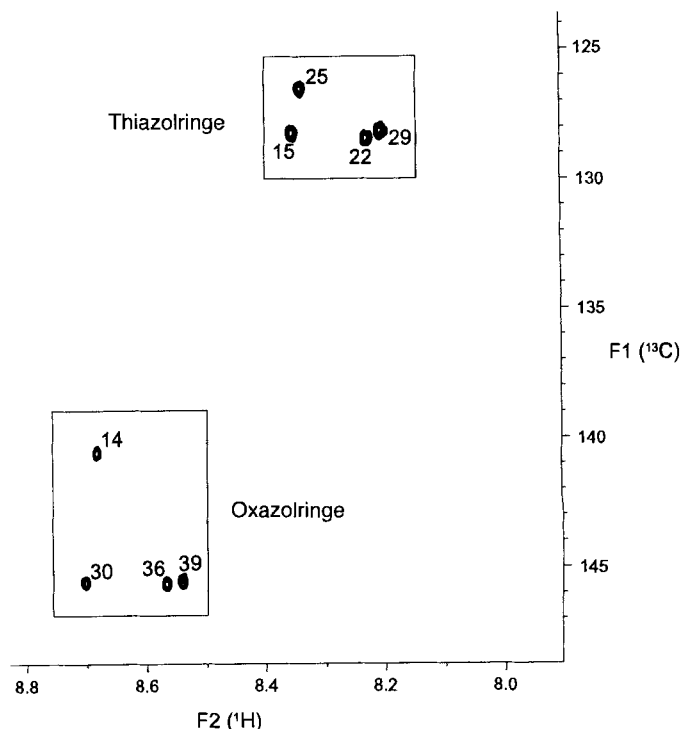


Abb. 3. Aren-Bereich des ¹H, ¹³C-HSQC-Spektrums von synthetischem Microcin B17 ($c = 8 \text{ mg mL}^{-1}$ in [D₆]DMSO) mit den Signalen der CH-Einheiten der acht Heterocyklen (siehe Abb. 1). Die Zuordnung erfolgte nach Lit. [2]. Die Numerierung der heterocyclischen Reste entspricht der Sequenzposition im unmodifizierten Vorläuferprotein.

zeigt kleine Abweichungen vom entsprechenden Signal der ¹³C, ¹⁵N-markierten Probe, wahrscheinlich wegen der starken pH-Abhängigkeit der Signale aus diesem Teil des Moleküls, die auch schon bei den natürlichen Proben beobachtet wurde^[2]. Die Signale der CH-Gruppen des Imidazols sind sowohl bei der synthetischen als auch bei der natürlichen Probe verbreitert und bei der für die Abbildung 3 gewählten Schnittebene nicht sichtbar^[2]. Die Signale im Aliphaten-Bereich des Spektrums stimmen ebenfalls mit den Signalen der natürlichen Probe überein.

Als Indikator für Microcin B17 wurde ein Stamm von *Escherichia coli* (rec A⁻) in einem Agar-Diffusionsassay verwendet. Lyophilisiertes synthetisches Microcin wurde in einem Puffer gelöst und auf einer Agarplatte aufgetragen. Nach Inkubation zeigten die Hemmhöfe die gleiche antibakterielle Aktivität an wie bei nativem McB17.

Die Totalsynthese bestätigt die von uns publizierte Struktur-aufklärung^[1, 2] und dient als solide Basis für unsere laufenden Studien zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen dieses Gyrase-Inhibitors.

Experimentelles

NMR: 2D-NMR-Spektren wurden bei 600.13 MHz (¹H) mit einem Bruker-AMX2-600-Spektrometer, ausgerüstet mit einem inversen Tripelresonanz-Probenkopf, aufgenommen. McB17 wurde in [D₆]DMSO ($c = 8 \text{ mg mL}^{-1}$ Referenz

DMSO ($\delta(^1\text{H}) = 2.50$; $\delta(^{13}\text{C}) = 43.5$; 305 K) gelöst. Für die ^1H , ^{13}C -HSQC-Spektren bei natürlicher Isotopenhäufigkeit wurde eine Pulssequenz mit erhöhter Sensitivität unter Einsatz von gepulsten Feldgradienten zur Kohärenzselektion verwendet [7, 8]. Die Offset-Frequenz wurde auf $\delta = 135$ (Aren-Bereich) und $\delta = 45$ (Aliphaten-Bereich) in der indirekten ^{13}C -Dimension gesetzt und die Experimente mit einer Bandbreite von $\Delta\delta = 30$ bzw. 70 in der indirekten Dimension aufgenommen. Antibakterielle Assays: Die Aktivität des McB17 wurde durch den „Limited dilution assay“ [9] getestet. Auflösen einer lyophilisierten Probe in Tris-Puffer (pH 8), der 50% Harnstoff und 1 mM EDTA enthielt, ergab eine Konzentration von 1 mg McB17 pro mL. Proben von 5 μL einer Verdünnungsreihe wurden auf M63-Glucose-Platten, die mit 3 mL Minimal-Topagar bedeckt und frisch mit 2×10^7 Indikatorbakterien beimpft waren, aufgetragen. Nach Inkubation bei 37 °C (ca. 15 h) wurden die Durchmesser der Hemmhöfe gemessen. Der Reziprokwert der Mindestmenge an McB17, die noch einen deutlichen Hemmhof hervorrief, wurde als Aktivität definiert. Als Indikator-Stamm diente *E. coli* K12 16-19 Ufr/recA⁻/B1/Tl⁻, T5-sensitiv (Stammsammlung der Universität Tübingen, Lehrstuhl für Mikrobiologie), welcher wegen einer Mutation im SOS-regulierten recA⁻-Gen hypersensitiv auf McB17 reagiert [10].

Eingegangen am 31. Januar 1996 [Z 8775]

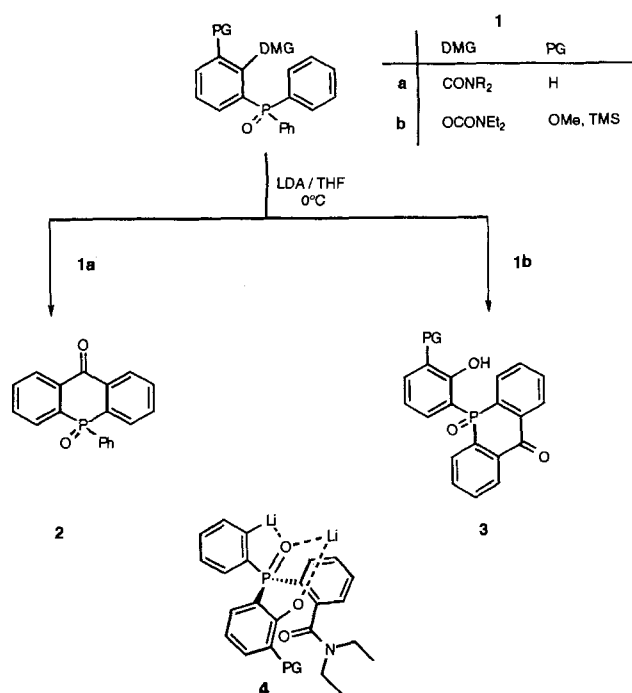
Stichworte: DNA-Gyrase-Inhibitor · Microcin B17 · Naturstoffe · Peptidantibiotika · Peptidsynthesen

- [1] A. Bayer, S. Stevanovic, S. Freund, J. Metzger, G. Jung in *Peptides 1992* (Hrsg.: C. H. Schneider, A. N. Eberle), Escom, Leiden, 1993, S. 117–118.
 [2] a) A. Bayer, S. Freund, C. N. Nicholson, G. Jung, *Angew. Chem.* 1993, 105, 1410–1413; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1993, 32, 1336–1339; b) A. Bayer, S. Freund, G. Jung, *Eur. J. Biochem.* 1995, 234, 414–426.
 [3] F. Baquero, F. Moreno, *FEMS Microbiol. Lett.* 1984, 23, 117–124.
 [4] J. L. Vizán, C. Hernandez-Chico, I. del Catillo, F. Moreno, *EMBO J.* 1991, 10, 467–476.
 [5] G. Videnov, D. Kaiser, C. Kempter, G. Jung in *Peptides, Chemistry, Structure and Biology* (Hrsg.: P. T. P. Kaumaya, R. S. Hodges), Mayflower Scientific, Kingswinford, England, 1996.
 [6] G. Videnov, D. Kaiser, C. Kempter, G. Jung, *Angew. Chem.* 1996, 108, 1604.
 [7] J. Cavanagh, A. G. Palmer III, P. E. Wright, M. Rance, *J. Magn. Reson.* 1991, 91, 429–436.
 [8] L. E. Kay, P. Keifer, T. Saarinen, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 10663–10665.
 [9] A. Mayr-Harting, A. J. Hedges, R. C. W. Berkey, *Methods Microbiol.* 1972, 7 A, 315–422.
 [10] M. Herrero, F. Moreno, *J. Gen. Microbiol.* 1986, 132, 393–402.

Carbanionen-vermittelte Heterocyclisierungen: allgemeiner und regiospezifischer Zugang zu Dibenzo[*b,e*]phosphininonen durch Synthese-Äquivalente der anionischen Friedel-Crafts- und der entfernten Fries-Umlagerung**

Matthew Gray, Brian J. Chapell, Nicholas J. Taylor und Victor Snieckus*

Wir berichten hier über die erste Carbanionen-vermittelte Synthese der Dibenzo[*b,e*]phosphininone 2 und 3 aus den Carbamoyl- und Carbamoyloxytriarylphosphanoxiden 1a bzw. 1b (Schema 1); die Reaktionen können als synthetische Äquivalente der anionischen Friedel-Crafts- bzw. der entfernten Fries-



Schema 1. LDA = Lithiumdiisopropylamid, TMS = Trimethylsilyl.

Umlagerung aufgefaßt werden. Diese grundlegend neue Reaktionsweise von Triarylphosphanoxiden wird nahegelegt durch den „Effekt der durch Komplexierung induzierten Annäherung“ (Complex Induced Proximity Effect, CIPE)^[1] und ist Teil einer neuen, allgemeinen Klasse durch Lithiierung induzierter, regiospezifischer Heterocyclisierungen^[2], die einen schonenden und regioselektiven Zugang zu substituierten, kondensierten und an Heterocyclen anellierten Phosphorinonen ermöglichen (Tabelle 1). Diese wenig untersuchte Klasse von P-Heterocyclen^[3] mit Bedeutung für grundlegende Untersuchungen zur Bindung in Phosphorverbindungen^[4], zur Turnstile-Geometrie^[5] und zur Aromatizität von Phosphacyclen^[6] war bisher im wesentlichen aufgrund der Einschränkungen, die aus der klassischen Friedel-Crafts-Technik herrühren^[4–7], nicht zugänglich. Zusätzliches Interesse an dieser Verbindungsklasse erwächst aus der Popularität atropisomerer Diarylphosphanliganden wie Binap in der asymmetrischen Synthese und homogenen Katalyse^[8].

Ermutigt durch den Nachweis der effektiven lenkenden Eigenschaften von P(O)Ph₂^[9] bei der Metallierung (Directed Metalation Group, DMG) wurden die durch Behandlung der entsprechenden *ortho*-lithiierten Benzamide mit ClP(O)Ph₂ (Tabelle 1)^[10] hergestellten Carbamoyltriarylphosphanoxide 1a (R = Et, *i*Pr) mit LDA versetzt (2.2 Äquiv./THF/0 °C) und lieferten in glatter Cyclisierung das Dibenzo[*b,e*]phosphininon 2 (Tabelle 1, Einträge 1, 2). Eine kürzlich von Mortier^[11] gemachte Beobachtung legte die Cyclisierung der korrespondierenden Carbonsäure nahe, die, direkt eingesetzt, in etwas geringerer Ausbeute zum gleichen Produkt führte (Eintrag 3). Wie ein Experiment mit einem entsprechenden Edukt zeigt, treten die denkbare Konkurrenz bei der Metallierung zwischen drei möglichen Positionen und die anschließende Cyclisierung zum Phosphininon sowie zwei Arten der Fluorenonbildung (Eintrag 4, Pfeile a, b und c) nicht auf; man erhält nur ein Phosphorinon, dessen Struktur durch Röntgenstrukturanalyse bestätigt wird^[12a]. Die zweifache anionische Cyclisierung eines doppelt Carbamoyl-substituierten Triarylphosphanoxids (Eintrag 5)

[*] Prof. V. Snieckus, Dr. M. Gray, B. J. Chapell^[+], Dr. N. J. Taylor^[+]
 Guelph-Waterloo Centre for Graduate Work in Chemistry
 University of Waterloo
 Waterloo, N2L 3G1, ON (Kanada)
 Telefax: Int. + 519/746 5884
 E-mail: Snieckus@BuLi.UWaterloo.ca

[+] Röntgenstrukturanalysen

[**] Diese Arbeit wurde von dem NSERC Canada, NSERC/Monsanto Industrial Chair Award und dem Province of Ontario URIF program (Grant No. 2318101) gefördert.