

Schema 2. Abschluß der Synthese von **1**: Cyclisierung und letzte Reaktionen am Makrocyclengerüst.

Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Die Reinigung des Rohprodukts erfolgte durch Chromatographie (SiO<sub>2</sub>, Toluol). Man erhielt 36 mg (52 %) **15** als farblosen Feststoff.

Spektroskopische Daten von **1**: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): δ = 7.33 (s, 16 H, Aryl-H), 2.26 (s, 24 H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): δ = 207.0 (×), 134.8 (×), 125.5 (+), 102.5 (×), 15.8 (+); IR (KBr): ν̄ = 2982–2852, 1928, 1602, 1502, 833 cm<sup>-1</sup>; MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 568 (100, M<sup>+</sup>), 553 (50); HR-MS: ber.: 568.3129; gef.: 568.3123. (×) und (+) bezeichnen die Phasen im DEPT-Spektrum.)

Eingegangen am 19. April,  
ergänzte Fassung am 13. September 1999 [Z13288]  
International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 3721–3723

**Stichwörter:** Allene • Cyclophane • Kohlenwasserstoffe • Makrocyclen

- Baharfar, R. Hekmat-Shoar, H. Norouzi-Arasi, *J. Chem. Res. (S)* **1997**, 376–377.
- [9] S. Thorand, N. Krause, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 8551–8553.
- [10] N. Krause, D. Seebach, *Chem. Ber.* **1987**, 120, 1845–1851.
- [11] T. L. Macdonald, D. R. Reagan, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 4740–4747.
- [12] a) T. J. Wenzel, T. C. Bettles, J. E. Sadlowski, R. E. Sievers, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 5903–5904; b) T. J. Wenzel, R. E. Sievers, *Anal. Chem.* **1981**, 53, 393–399.
- [13] N. Krause, A. Gerold, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 194–213; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 186–204.
- [14] R. B. Prince, T. Okada, J. S. Moore, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 245–249; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 236–239, zit. Lit.

## Membranverankerung und Intervesikel-Transfer eines Derivats des Antibiotikums Moenomycin A\*\*

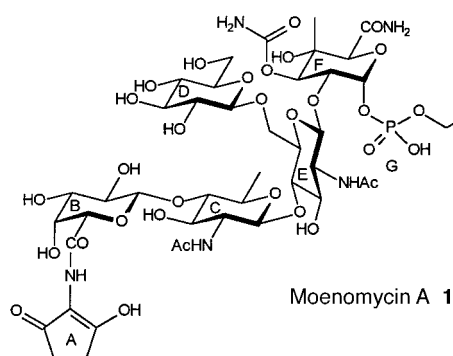
Alexej Anikin, Andrij Buchynskyy,  
Uwe Kempin, Katka Stembera,  
Peter Welzel\* und Gabriela Lantzsch\*

Die Glycopeptidantibiotika, von denen Vancomycin das bekannteste ist, haben aufgrund des Resistenzproblems bei klassischen Antibiotika zunehmende Bedeutung bei der Behandlung bakterieller Infektionen.<sup>[1]</sup> Ihre Wirkung beruht auf einer Bindung (als Dimere oder begünstigt durch Membranverankerung) an membrangebundene Peptidoglycancorstufen, die endständig D-Ala-D-Ala tragen; sie unterbinden dadurch den Transglycosylierungsschritt (und/oder die Transpeptidierung<sup>[2]</sup>) in der Endphase der Peptidoglycansynthese. Nun gibt es eine andere Klasse von Antibiotika, die Moenomycine (z. B. Moenomycin A **1**), die ebenfalls den Transglycosylierungsschritt inhibieren, jedoch mit einem völlig anderen Wirkungsmechanismus: Sie sind reversible

- [1] H. F. Schuster, G. M. Coppola, *Allenenes in Organic Synthesis*, Wiley, New York, **1984**.
- [2] a) F. Diederich, *Cyclophanes*, Monographs in *Supramolecular Chemistry*, Vol. 2 (Hrsg.: J. F. Stoddart), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1991**; b) F. Vögtle, *Cyclophane Chemistry*, Wiley, New York, **1993**.
- [3] F. Vögtle, *Supramolekulare Chemie*, Teubner, Stuttgart, **1989**.
- [4] Es wurde bereits über die Synthese von Cyclophanen berichtet, die ausschließlich acetylenische Brücken aufweisen: a) T. Kawase, N. Ueda, H. R. Darabi, M. Oda, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 1658–1660; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1556–1558; b) T. Kawase, H. R. Darabi, M. Oda, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 2803–2805; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 2664–2666.
- [5] S. Grimme, J. Harren, A. Sobanski, F. Vögtle, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1491–1509.
- [6] a) K.-L. Noble, H. Hopf, L. Ernst, *Chem. Ber.* **1984**, 117, 474–488; b) D. Cao, H. Kolshorn, H. Meier, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 7069–7072.
- [7] M. S. Brody, R. M. Williams, M. G. Floyd, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 3429–3433.
- [8] Berechnungen zur Struktur von 1,2,4,5,7,8,10,11-Cyclododecaoctaen und dessen Octamethyl-Derivat: I. Yavari, D. Nori-Shargh, R.

[\*] Prof. Dr. P. Welzel, Dr. A. Anikin, Dipl.-Chem. A. Buchynskyy, Dr. U. Kempin, Dipl.-Biochem. K. Stembera  
Institut für Organische Chemie der Universität  
Talstraße 25, D-04103 Leipzig  
Fax: (+49) 341-973-6599  
E-mail: welzel@organik.orgchem.uni-leipzig.de  
Dr. G. Lantzsch  
Institut für Experimentelle Physik I der Universität  
Vor dem Hospitaltore 1, D-04103 Leipzig  
Fax: (+49) 341-973-2599  
E-mail: lantzsch@rz.uni-leipzig.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Innovationskolleg „Chemisches Signal und biologische Antwort“), vom Fonds der Chemischen Industrie und von Hoechst Marion Roussel gefördert. Wir danken Professor Dr. A. Blume (Institut für Physikalische Chemie, Halle) für die Möglichkeit, die Stopped-flow-Experimente in seinem Institut ausführen zu können, Prof. Dr. A. C. Rodloff und Frau B. Pless (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie, Leipzig) für ihre Unterstützung bei der Bestimmung der MHK-Werte sowie Dr. D. Müller (Ruhr-Universität Bochum) und Dr. T. Staroske (University of Cambridge) für die Massenspektren.



Enzyminhibitoren.<sup>[3]</sup> Damit sind sie auch ideale Werkzeuge für die Aufklärung der bisher unbekannten Struktur des Enzyms und des Mechanismus der Transglycosylierungsreaktion.

Die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Moenomycine sind intensiv untersucht worden,<sup>[4]</sup> und es gibt auch einen Vorschlag zur Erklärung ihrer Wirkungsweise.<sup>[5]</sup> Dabei wird angenommen, daß sie mit dem (den) Substrat(en) der Transglycosylierungsreaktion um eine Substratbindungsstelle am Enzym konkurrieren, am wahrscheinlichsten mit der Bindungsstelle für den wachsenden Peptidoglycanstrang (dem Glycosyldonor bei der Transglycosylierungsreaktion).<sup>[5]</sup> Der Oligosaccharidteil der Transglycosylasehemmer vom Moenomycintyp wird vom Enzym hochselektiv erkannt.<sup>[4]</sup> Es gibt jedoch eine weitere Vorbedingung für die antibiotische Aktivität: die Membranverankerung durch den Lipidteil. Daher führt Abspaltung des C<sub>25</sub>-Lipids<sup>[6]</sup> oder Einführung einer oder mehrerer OH-Gruppen in die Lipidkette<sup>[7]</sup> zum vollständigen Verlust der antibiotischen Aktivität.

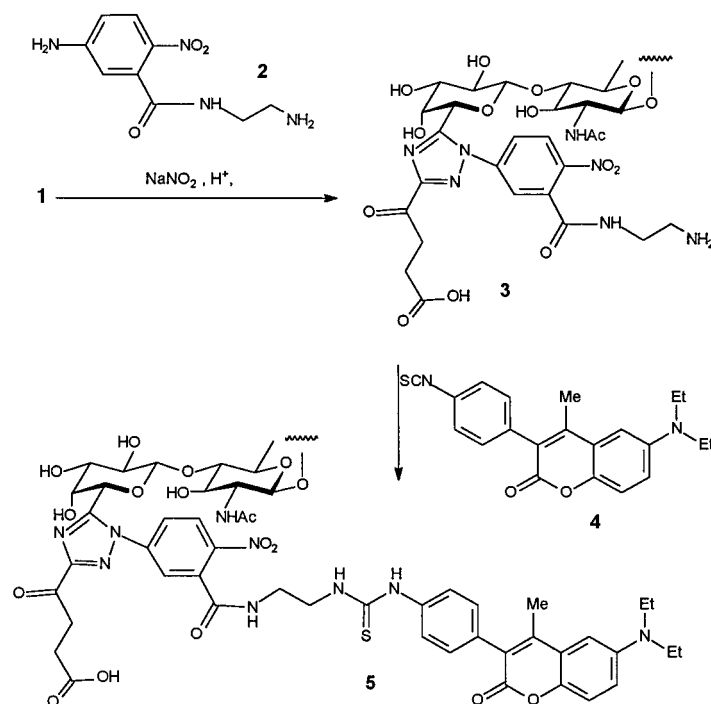
Während man über die Struktur-Wirkungs-Beziehungen im Oligosaccharidteil der Moenomycine ziemlich genau Bescheid weiß, fehlen derartige Kenntnisse für den Lipidteil. Versuche, die Wechselwirkung von Moenomycin mit künstlichen Membranen (1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin-Vesikel, POPC-Vesikel) durch isotherme Titrationskalorimetrie im Konzentrationsbereich der minimalen Hemmkonzentration (MHK, siehe unten) zu studieren, waren erfolglos, weil die Methode sich als nicht ausreichend empfindlich erwies.<sup>[8]</sup>

Wir beschreiben hier erfolgreiche Experimente, die eine quantitative Bestimmung der Wechselwirkung von Moenomycin mit künstlichen Membranen mit Hilfe von Fluoreszenzmethoden erlauben. Diese Experimente ergaben erstmals Informationen zur Verankerung von Moenomycin in der Lipidmembran durch Ermittlung eines Verteilungskoeffizienten sowie zum Transfer von Moenomycin zwischen Vesikeln durch Bestimmung der entsprechenden Geschwindigkeitskonstante. Der erste Parameter ist wichtig, um zu verstehen, inwieweit die Membranbindung für die Wechselwirkung mit dem Enzym (und damit für die antibiotische Wirksamkeit) von Bedeutung ist. Die zweite Größe ist von Bedeutung im Zusammenhang mit der Pharmakokinetik. Es sei darauf hingewiesen, daß die ungünstigen Transporteigenschaften des Moenomycins seinen Einsatz in der Humanmedizin bisher ausgeschlossen haben.

Die Bausteine C und E–I von 1 sind für die antibiotische Wirksamkeit unentbehrlich.<sup>[4]</sup> Es war daher geplant, den

Fluoreszenzmarker an den Baustein A anzuknüpfen. Eine Reaktionssequenz, bestehend aus a) der Reaktion der enolisierten  $\beta$ -Diketon-Ein-

heit von Moenomycin A mit dem aus 2 hergestellten Diazoniumsalz, b) Japp-Klingemann-Ringspaltung der resultierenden Azoverbindung und c) Triazolbildung aus dem intermediären Amidrazon, führte zur Verbindung 3 (Schema 1).<sup>[9]</sup> Bemerkenswerterweise konnte 2 selektiv in das aromatische Diazoniumsalz umgewandelt werden, da die aliphatische Aminogruppe unter den Bedingungen der Bildung des Diazoniumsalzes durch Protonierung geschützt war.



Schema 1. Synthese von 5.

3 wurde dann mit dem 7-Diethylamino-4-methylcoumarin-Chromophor durch Reaktion mit dem Isothiocyanat 4<sup>[10]</sup> verknüpft, wobei das Thioharnstoffderivat 5 entstand. 5 wurde durch sorgfältige chromatographische Trennungen gereinigt und durch Elektrospray-Ionencyclotron-Resonanz-Massenspektrometrie (ESI-ICR-MS) sowie sein Fluoreszenzspektrum ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 396 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 477 nm,<sup>[11]</sup> in Methanol) charakterisiert. Die MHK-Werte gegen sieben *Staphylokokkus aureus*-Stämme wurden mit einer Mikroverdünnungsmethode auf Mikrotiterplatten bestimmt. Unter diesen Bedingungen erwies sich Moenomycin A um mehr als eine Zehnerpotenz (MHK im Bereich von  $6.9 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ ) aktiver, als bisher bekannt war.<sup>[4]</sup> Für 3 wurde eine MHK von  $1.7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  und für 5 eine von  $1.2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  ermittelt. Der Grund für diese Unterschiede in den antibiotischen Aktivitäten ist bisher unbekannt, aber sowohl 3 als auch 5 dürften für Bindungsuntersuchungen mit dem Enzym gut geeignet sein (dies wird derzeit bearbeitet).

Es ist bekannt, daß Moenomycin A oberhalb einer bestimmten Konzentration (der kritischen Micellbildungskon-

zentration, CMC) Micellen bildet. Die CMC ist abhängig vom pH-Wert und der Ionenstärke (ungefähr  $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  bei pH 6.8).<sup>[12]</sup> Der Befund, daß das Cumarin-markierte Moenomycin-A-Derivat **5** bei Konzentrationen von  $50\text{--}200 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$  klare wäßrige Dispersionen ergab, weist auf das Vorliegen von Monomeren und/oder Micellen hin. Nach Zugabe unilamellarer POPC-Vesikel zur wäßrigen Dispersion von **5** stieg die Fluoreszenzintensität auf einen neuen konstanten Wert an (Abbildung 1). Dieser Effekt spiegelt den

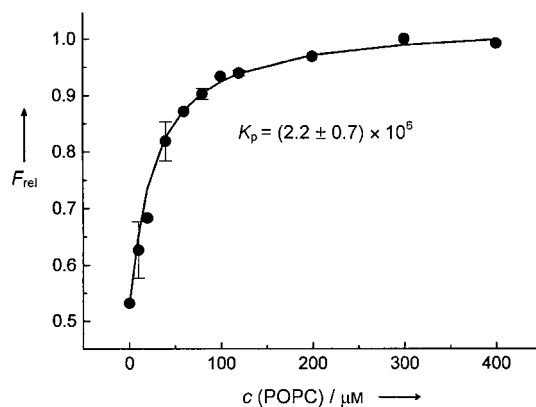


Abbildung 1. Fluoreszenzintensität von **5** als Funktion der Lipidkonzentration. Die experimentellen Daten sind Mittelwerte aus drei Messungen mit unterschiedlichen Konzentrationen von **5** (50, 100 und 200 nm).

Einbau von **5** in die Vesikel wider. Aus der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der POPC-Konzentration wurde der Verteilungskoeffizient  $K_p$  bestimmt.  $K_p$  ist dabei durch  $X^m/X^w$  definiert, wobei  $X^m$  und  $X^w$  die Molenbrüche von **5** in der Membran und in der Wasserphase sind. Die Fluoreszenzintensität ist dann durch Gleichung (1) gegeben. Die Fluoreszenzintensitäten  $F_0$  und  $F_\infty$  beziehen sich auf die Fälle, daß

$$F = (K_p F_\infty + W F_0 / C_L) / (W / C_L + K_p) \quad (1)$$

**5** vollständig in Wasser gelöst bzw. vollständig membranverankert ist.  $W$  ist die Konzentration von Wasser ( $55 \text{ mol L}^{-1}$ ) und  $C_L$  die Lipidkonzentration in der Probe. Auf der Grundlage dieses Formalismus wurde  $K_p$  zu  $(2.2 \pm 0.7) \times 10^6$  bestimmt (siehe Abbildung 1).

Der Transfer von **5** zwischen POPC-Vesikeln wurde durch Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) untersucht, eine sehr leistungsfähige Methode für diese Fragestellung. Ein besonders geeignetes Donor-/Acceptor-Paar wurde von Silvius und Mitarbeitern beschrieben. Die Autoren berichteten, daß die Fluoreszenz von 7-Diethylamino-4-methylcumarin (siehe oben) effektiv durch den (4-Dimethylamino)-azobenzol-Chromophor (DABS,  $\lambda_{\text{abs}}$ : 447 nm) gelöscht wird.<sup>[11]</sup> Wir verwendeten für diese Untersuchungen Verbindung **5** und das DABS-markierte Phospholipid **6**, das nach der Methode von Silvius et al.<sup>[11]</sup> hergestellt worden war. Abbildung 2 illustriert die Ergebnisse des Löschexperiments. POPC-Vesikel, die unterschiedliche Mengen des Quencher-Lipids **6** enthielten, wurden asymmetrisch mit geeigneten Mengen des Donors beladen. Durch den zunehmenden Anteil von **6** in den Vesikeln verringerte sich die Fluoreszenzintensität von **5**. Im Vergleich mit den Ergebnissen von

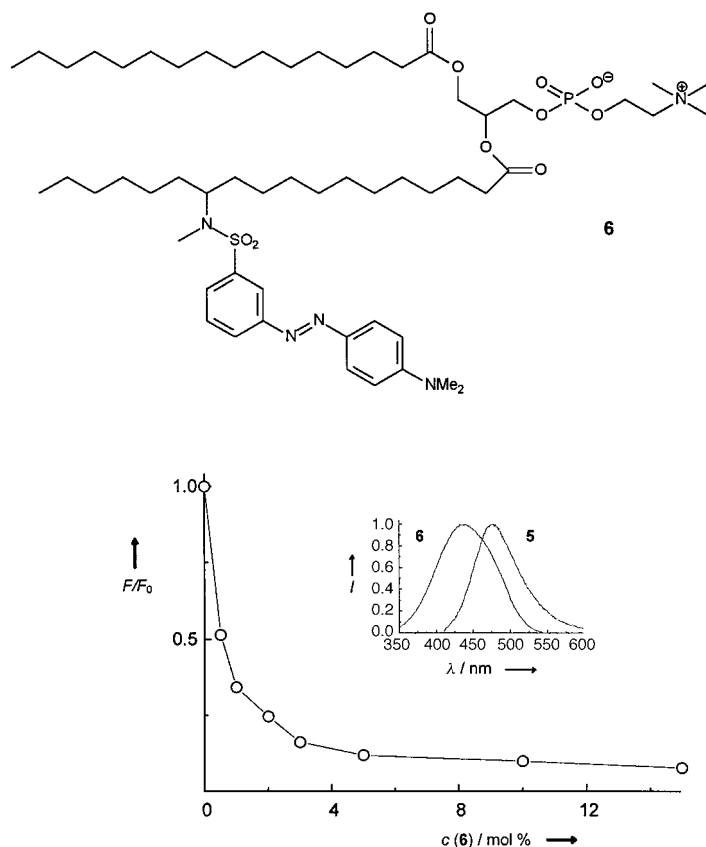


Abbildung 2. Löschen der Cumarin-Fluoreszenz von in POPC-Vesikel eingebautem **5** bei Zunahme der Konzentration von **6**. Der Einschub zeigt die Überlappung des Absorptionsspektrums von **6** mit dem Emissionsspektrum von **5**.

Silvius et al. wird deutlich, daß für 50prozentige Löschung ein etwas höherer Anteil von **6** in den Membranen benötigt wird (0.57 Mol-%). Dieser Unterschied beruht wahrscheinlich auf verschiedener Lokalisation der Donorgruppe in den beiden Membransystemen. Die Membrantransfer-Experimente wurden ausgeführt, wie in Abbildung 3 dargestellt ist. Die Zugabe

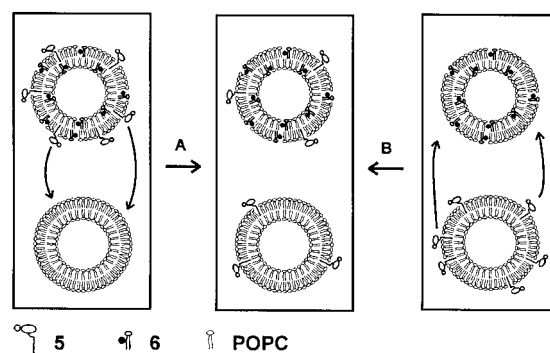


Abbildung 3. Das Prinzip des Intervesikel-Transfer-Experiments. A: „Reine“ POPC-Vesikel wurden zu Donor- und Acceptor-markierten POPC-Vesikeln zugemischt. B: Donor-markierte Vesikel wurden zu Acceptor-markierten Vesikeln zugemischt.

von POPC-Vesikeln zu Vesikeln, die den Donor **5** und das Acceptorlipid **6** enthielten, führte zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität (siehe Abbildung 4). Dagegen trat beim Mischen von Vesikeln, die nur den Donor enthielten, mit

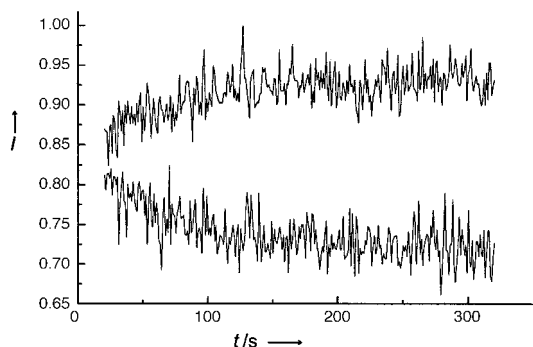


Abbildung 4. Verlauf der Fluoreszenzintensität in den beiden Intervesikel-Transfer-Experimenten A und B (siehe Abbildung 3).

solchen, in die der Acceptor eingebaut war, eine Abnahme der Fluoreszenzintensität ein. Die entgegengesetzte Tendenz in diesen beiden Mischexperimenten zeigt den Transfer von **5** zwischen den Vesikeln an. Im ersten Fall verringert sich die Zahl der gelöschten Donormoleküle durch Übergang in die acceptorfreen Vesikel und im zweiten erhöht sie sich durch Übergang in die mit dem Acceptor besetzten Vesikel. Der Molenbruch der übertragenen Moleküle von **5**,  $X = n_D / (n_D + n_{DQ})$ , wurde nach Gleichung (2) abgeschätzt, wobei  $n_D$ ,  $n_{DQ}$

$$X = (F_\infty - F_0) / (F_{TX} - F_0) \quad (2)$$

und  $F_{TX}$  die Zahl der nichtgelöschten und der gelöschten Donormoleküle bzw. die Fluoreszenzintensität nach Zugabe von Triton X-100 (1 %) bezeichnen. Aus drei Experimenten mit unterschiedlichen Mengen des Acceptorlipids **6** (0.5, 1 und 2 %) wurde  $X = 0.4 - 0.5$  ermittelt, ein vernünftiger Wert bei Mischung gleicher Lipidmengen.

Der Transfer von **5** ist ein schneller Prozeß. Man konnte abschätzen, daß  $t_{1/2}$  in der Größe von Sekunden liegt (siehe Abbildung 4). Nachfolgende Stopped-flow-Experimente (Abbildung 5) ergaben  $k_t = 0.25 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}$ , ermittelt unter

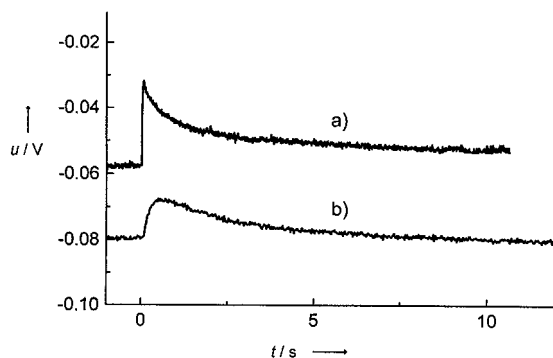


Abbildung 5. Verlauf der Spannung in den Stopped-flow-Experimenten a) bei Zugabe von POPC-Vesikeln zu einer wäßrigen Lösung von **5** (Einschub) und b) bei Mischung von mit **5** und **6** markierten POPC-Vesikeln mit „reinen“ POPC-Vesikeln (Transfer). Die Spannung ist der Fluoreszenzintensität umgekehrt proportional.

Verwendung der einfachen Beziehung (3), die sich durch Integration aus Gleichung (4) ergibt. Dabei bedeuten  $V_0$  und

$$V(t) = -k_t |V_0 - V_\infty| t \quad (3)$$

$$k_t = [(dV(t)/dt)_{t=0}] / (V_\infty - V_0) \quad (4)$$

$V_\infty$  die abgelesene Spannung (umgekehrt proportional zur Fluoreszenzintensität) unmittelbar nach Zusammengeben der POPC-Vesikel und der wäßrigen Lösung von **5** in der Meßzelle und nach Einstellung des Gleichgewichts. Die Anfangsgeschwindigkeitskonstante  $k_t = 0.25 \text{ s}^{-1} = 15 \text{ min}^{-1}$  ist mit den entsprechenden Werten von kurzkettigen Phospholipiden (unverzweigte  $C_{11}$ - oder  $C_{12}$ -Ketten) vergleichbar.<sup>[13]</sup>

Der Einbau von **5** in Lipidvesikel wurde ebenfalls im Stopped-flow-Regime beobachtet. Die Anfangsgeschwindigkeitskonstante dieses Prozesses mit  $k_t = 0.8 \text{ s}^{-1}$  ist mit der gefundenen Intervesikel-Transfergeschwindigkeit vergleichbar.

Insgesamt haben wir hiermit ein experimentelles System entwickelt, welches erstmals erlaubt, die Wechselwirkung von Verbindungen des Moenomycin-Typs mit Modellmembranen zu untersuchen. Die Resultate können für Konkurrenzexperimente mit neuen Moenomycin-Analoga verwendet werden. Wir gehen davon aus, daß sie die Grundlage für die Entwicklung von Transglycosylasehemmern mit verbesserten Transporteigenschaften darstellen. Dies wird in unserem Labor derzeit untersucht.

### Experimentelles

**3** wurde entsprechend der Synthese eines Thiol-Analogons<sup>[9]</sup> hergestellt und durch Ultrafiltration (Amicon INC, YM 3) und anschließende Chromatographie gereinigt: a) Flash-Chromatographie (FC; Kieselgel, 1-Propanol/2 mol L<sup>-1</sup> Ammoniak 7:3), b) Mitteldruck-Chromatographie (MPLC, RP<sub>18</sub>, Methanol/Wasser 1:1). Die Ausbeute war 38 %. Das <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum war im Einklang mit der angegebenen Struktur.  $C_{78}H_{117}N_{10}O_{37}P$  (1817.80, 1817.73), FAB-MS (Matrix: 3-Nitrobenzylalkohol):  $m/z$  1817.3 ( $[M+H]^+$ ), 1839.6 ( $[M+Na]^+$ ).

**5** wurde durch Reaktion von **3** mit **4** in einer Pyridin-DMF-Lösung (1:10) bei 20 °C hergestellt. Nach 48 h wurden die Lösungsmittel abdestilliert, und der Rückstand wurde durch Chromatographie gereinigt: a) FC (Kieselgel, Chloroform/Methanol 20:12 → Chloroform/Methanol/Wasser 20:12:2, 2 ×), b) MPLC (RP<sub>18</sub>, Acetonitril/Wasser 1:1, 3 ×). Die Ausbeute war 25 %.  $C_{99}H_{137}N_{12}O_{39}PS$  (2182.26, 2180.86), ESI-ICR-MS:  $m/z$  2181.8685 ( $[M+H]^+$ , ber.: 2181.8642), 2203.7990 ( $[M+Na]^+$ , ber.: 2203.8462).

Die MHK-Werte wurden im Mikroverdünnungstest bestimmt (Iso-Sensitest-Medium, Oxoid). Die Präparate wurden seriell (Faktor 2) im Medium verdünnt und anschließend mit den entsprechenden Keimen inokuliert. Die Keimsaat betrug  $1 \times 10^5 \text{ cfu mL}^{-1}$ . Nach 24stündigem Inkubieren bei 37 °C wurde die MHK als die Konzentration ermittelt, bei der visuell kein Bakterienwachstum (Trübung) sichtbar war.

POPC-Vesikel, die **6** enthielten und mit **5** beladen waren (1.5 mL einer 300 µM Lösung) wurden mit „reinen“ POPC-Vesikeln (gleiches Volumen, gleiche Konzentration) unter Rühren gemischt. In einer analogen Reihe von Experimenten wurden POPC-Vesikel, die nur **6** enthielten, mit solchen, die mit **5** beladen waren, gemischt. Die Sondenkonzentration in den Proben wurde aus der Fluoreszenzintensität in Anwesenheit von 1 % Triton X-100, durch das der Energietransfer eliminiert wird, bestimmt. Die Untergrundfluoreszenz und der innere Filtereffekt wurden durch die Verwendung entsprechender Leerproben bzw. Triton X-100-behandelter Proben korrigiert. Der Einfluß von Triton X-100 auf die Quantenausbeute von **5** wurde ebenfalls berücksichtigt. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur an einem CD900-Spektrofluorometer (Edinburgh Instruments, Spaltbreite des Anregungs- und Emissionsmonochromators: 1 nm bzw. 1.5 nm) durchgeführt. Für die Stopped-flow-Messungen wurde ein Hi-Tech-Scientific-SF51-Gerät verwendet.

Eingegangen am 29. Juni 1999 [Z13647]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 3703–3707

**Stichwörter:** Antibiotika • Fluoreszenzspektroskopie • Glycolipide • Liposomen • Phospholipide

- [1] Übersichten: D. H. R. Williams, B. Bardsley, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1264–1286; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1172–1193; K. C. Nicolaou, C. N. C. Boddy, S. Bräse, N. Winssinger, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2230–2287; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2096–2152.
- [2] Die Frage nach dem Wirkungsmechanismus ist kürzlich neu aufgeworfen worden: M. Ge, Z. Chen, H. R. Onishi, J. Kohler, L. L. Silver, R. Kerns, S. Fukuzawa, C. Thompson, D. Kahne, *Science* **1999**, *284*, 507–511.
- [3] P. Welzel in *Antibiotics and Antiviral Compounds – Chemical Synthesis and Modifications* (Hrsg.: K. Krohn, H. Kirst, H. Maas), VCH, Weinheim, **1993**, S. 373–378, zit. Lit.
- [4] N. El-Abadla, M. Lampilas, L. Hennig, M. Findeisen, P. Welzel, D. Müller, A. Markus, J. van Heijenoort, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 699–722.
- [5] O. Ritzeler, L. Hennig, M. Findeisen, P. Welzel, D. Müller, A. Markus, G. Lemoine, M. Lampilas, J. van Heijenoort, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 1675–1694.
- [6] S. Marzian, M. Happel, U. Wagner, D. Müller, P. Welzel, H.-W. Fehlhaber, A. Stärk, H.-J. Schütz, A. Markus, M. Limbert, Y. van Heijenoort, J. van Heijenoort, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 5299–5308.
- [7] U. Kempin, L. Hennig, P. Welzel, S. Marzian, D. Müller, H.-W. Fehlhaber, A. Markus, Y. van Heijenoort, J. van Heijenoort, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 8471–8482, zit. Lit.
- [8] H. Heerklotz, A. Donnerstag, G. Klose, P. Welzel, A. Markus, A. Giel, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [9] U. Kempin, L. Hennig, D. Müller, A. Markus, P. Welzel, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5087–5090; U. Kempin, L. Hennig, D. Knoll, P. Welzel, D. Müller, A. Markus, J. van Heijenoort, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 17669–17690.
- [10] **8** wurde wie folgt hergestellt: a) Reaktion von 7-Diethylamino-4-methyl-cumarin mit dem aus *N*-(4-Aminophenyl)-acetamid erhaltenen Diazoniumsalz, b) Hydrolyse des Amids, c) Reaktion mit Thiophosgen.
- [11] Siehe: J. R. Silvius, R. Leventis, P. M. Brown, M. Zuckermann, *Biochemistry* **1987**, *26*, 4279–4287.
- [12] G. Lantzsch, H. Binder, H. Heerklotz, P. Welzel, G. Klose, *Langmuir* **1998**, *14*, 4095–4104.
- [13] J. Silvius, R. Leventis, *Biochemistry* **1993**, *32*, 13318–13326.

## Asymmetrische Synthese der Nakijichinone – selektive Inhibitoren des Her-2/Neu-Protoonkogens\*\*

Petra Stahl und Herbert Waldmann\*

Extrazelluläre Wachstumssignale werden in vielen Fällen von Transmembranrezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität erkannt. Diese Proteine lösen zahlreiche intrazelluläre Signalkaskaden aus, die Zellwachstum, Proliferation und andere genetische Programme regulieren.<sup>[1]</sup> Eine Fehlregulierung dieser Signalketten kann zur Entwicklung von Krankheiten beitragen oder diese gar hervorrufen. Zum Beispiel steht eine erhöhte Rezeptor-Tyrosinkinase-Aktivität in en-

gem Zusammenhang mit der Carcinogenese und verstärktem Tumorwachstum.<sup>[2]</sup> Ein besonders wichtiges Beispiel hierfür ist das Her-2/Neu-Protoonkogen (auch als erbB-2 bezeichnet). Dieser Rezeptor ist in ca. 30 % aller primären Brust-, Eierstock- und Magencarcinome sehr stark überexprimiert.<sup>[1, 3, 4]</sup> Die verstärkte Expression korreliert eng mit dem klinischen Verhalten dieser Neoplasmen, so daß Tumoren mit Her-2-Amplifizierung aggressiver sind und mit einer niedrigeren Überlebensquote der Patienten einhergehen. Verbindungen, die selektiv die Her-2-Aktivität blockieren können, sind daher von größter Bedeutung für die Entwicklung neuer Cytostatika.<sup>[1, 2, 5]</sup> ein monoklonaler Antikörper gegen Her-2 wurde von Genentech bereits für eine revolutionäre Behandlung von Brustkrebs in die Klinik eingeführt. Darüber hinaus können solche Wirkstoffe wahrscheinlich als wertvolle Sonden für die Analyse von Signalpfaden fungieren.<sup>[2, 6, 7]</sup> Bisher sind nur wenige Naturstoffe mit intrinsischer Tyrosinkinase-inhibierender Aktivität isoliert worden, und insbesondere wurde noch kein Naturstoff, der Her-2 inhibiert, synthetisiert.<sup>[2, 6]</sup> Die Nakijichinone **1a–d** (siehe Schema 1) wurden jedoch als selektive Inhibitoren der Her-2/Neu-Kinase identifiziert. Sie weisen eine ausgeprägte Cytotoxizität gegen L-1210-Leukämiezellen der Maus und menschliche KB-Epidermoid-Carcinomazellen auf.<sup>[8]</sup> Hier beschreiben wir die erste enantioselektive Totalsynthese der Nakijichinone.

Die Nakijichinone enthalten drei grundlegende Strukturelemente: eine Aminosäure, eine zentrale *para*-chinoide Einheit und ein Diterpenoidsystem. Um ein hohes Maß an Konvergenz zu erreichen, wurden die Nakijichinone retrosynthetisch zunächst in Isospongiachinon **2**, einen an sich schon interessanten Naturstoff,<sup>[9]</sup> und eine Aminosäure zerlegt, die im letzten Schritt der Synthese durch konjugierte Addition an den in **2** vorhandenen vinylogenen Methylester eingeführt werden kann (Schema 1).<sup>[8]</sup> Weiterhin war vorgesehen, das selektiv funktionalisierte chinoid System durch Oxidation einer Tetramethoxy-substituierten aromatischen Vorstufe **3** zu einer 1,4-Dicarbonylverbindung und nachfolgende selektive Verseifung einer der beiden dabei gebildeten vinylogenen Esterfunktionen herzustellen. Für die Synthese der Diterpeneinheit und ihre Kupplung mit dem Alkoxy-substituierten Aren kam die reduktive Alkylierung des  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Ketons **4** vom Wieland-Miescher-Typ mit einem Benzylhalogenid **5** zum Einsatz. Diese Strategie hatte sich bereits bei der Herstellung verwandter Naturstoffe bewährt.<sup>[10]</sup> Schließlich beabsichtigten wir, die endocyclische 3,4-Doppelbindung durch Olefinierung eines Ketons an C-4 und nachfolgende Isomerisierung der entstandenen exocyclischen Doppelbindung einzuführen. Darüber hinaus war geplant, die C-13-Methylgruppe durch eine Olefinierungs/Reduktions-Sequenz an einem intermediär gebildeten Keton einzubringen.

Die Synthese der Benzylhalogenide **8** und **9** aus Brenzcatechin **6** ist in Schema 2 dargestellt. Zunächst wurde **6** zum entsprechenden *ortho*-Chinon oxidiert, das rasch NaOMe addierte. Die nachfolgende Reoxidation lieferte erneut ein *ortho*-Chinon, das unter sauren Bedingungen zur entsprechenden *para*-chinoiden Verbindung umgelagert wurde.<sup>[11]</sup> Die Ketogruppen wurden dann reduziert und das resultierende 1,4-Diphenol zum Tetramethoxybenzol **7** O-methyliert.

[\*] Prof. H. Waldmann, Dipl.-Chem. P. Stahl  
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie  
Otto-Hahn-Straße 11, D-44227 Dortmund  
Fax: (+49) 231-133-2499  
E-mail: herbert.waldmann@mpi-dortmund.mpg.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.