

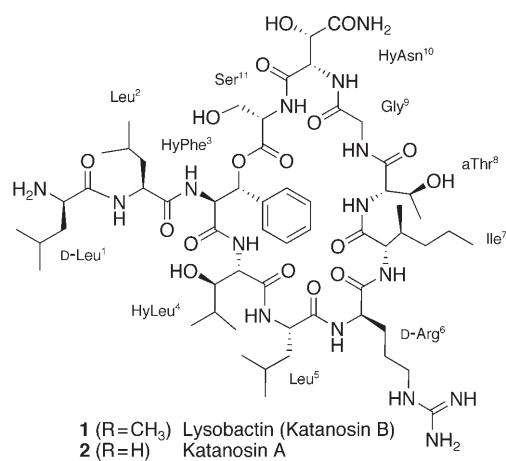
Totalsynthesen von Lysobactin (Katanosin B)

Jean-Marc Campagne*

Antibiotika · Depsipeptide · Peptide · Totalsynthesen

Durch Überverordnung und Missbrauch von Antibiotika tauchen zunehmend neue pathogene Bakterienstämme auf, die gegen alle gängigen Behandlungsmethoden resistent sind. Jüngsten Schätzungen zufolge leiden 20 % aller Stationärpatienten an vor oder während des Krankenhausaufenthaltes erworbenen Infektionen, deren Erreger in 70 % der Fälle gegen eines oder mehrere der am häufigsten verschriebenen Antibiotika resistent sind.^[1] Besonders das Aufkommen Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*-Stämme sowie Vancomycin-resistenter Enterokokken ist inzwischen eines der Hauptprobleme im Gesundheitswesen. Daher wird zunehmend nach Antibiotika mit grundlegend neuen Strukturen und/oder Wirkmechanismen gesucht, da diese deutlich weniger anfällig für Kreuzresistenzen mit bekannten Antibiotika sind.^[2] Trotz intensiver Forschungen ist in den letzten 40 Jahren aber nur eine geringe Zahl neuer antimikrobieller Substanzen auf den Markt gekommen.^[3]

Lysobactin (**1**) und Katanosin A (**2**) sind hochaktiv gegen Gram-positive Bakterien und zeigen eine besonders starke



Wirkung gegen Methicillin-resistente Stämme von *Staphylococcus aureus* (MRSA) sowie gegen Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE). Darüber hinaus konnte ihre Wirksamkeit in einem systemischen murinen *S. aureus*-Infekti-

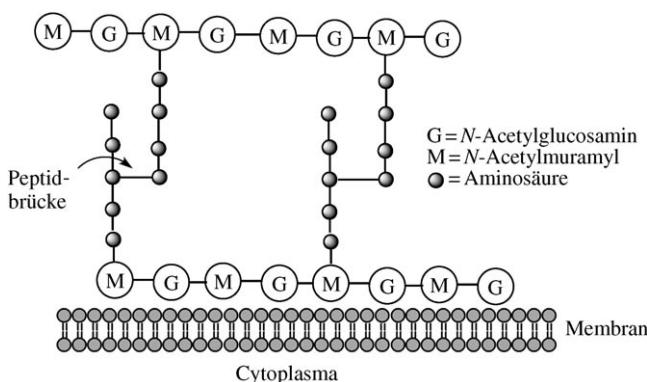
onsmodells *in vivo* nachgewiesen werden.^[4] Die erste Isolierung von Lysobactin gelang bei Squibb durch die Fermentation eines Lysobacter-Stammes (ATCC53042), der aus einer Laubstreu-Probe im Washington Crossing State Park (USA) gewonnen worden war.^[5,6] Unabhängig davon isolierte man bei Shionogi zwei Naturstoffe namens Katanosin A und B aus einem Bodenbakterium (Gattung: *Cytophaga*), das in Katano (Japan) gefunden worden war.^[7-9] Erst später wurde deutlich, dass es sich bei Lysobactin und Katanosin B um ein und dieselbe Struktur handelt.^[10] Katanosin A konnte vor kurzem ebenfalls isoliert werden; es tritt bei der Fermentation von Lysobacter als metabolisches Nebenprodukt auf.^[3]

Lysobactin hat eine „lassoartige“ Struktur, bestehend aus einem linearen (ein D-Leu-Leu-Dipeptid) und einem cyclischen Teil (ein 28-gliedriges Depsipeptid). Der Makrocyclus ist aus neun Aminosäuren aufgebaut, von denen fünf nicht-proteogen sind (eine D-Arg-Seitenkette sowie β -hydroxylierte HyAsn-, HyPhe-, aThr- und HyLeu-Seitenketten), und wird durch eine Esterbindung zwischen der β -Hydroxygruppe des Hydroxyphenylalanins und dem C-Terminus des Serins geschlossen.^[11] Die Primärstruktur wurde kürzlich röntgenanalytisch bestätigt.^[12] Hierbei wurde auch nachgewiesen, dass die Struktur im Festkörper durch vier Wasserstoffbrücken bestimmt wird, die dem Molekül eine globuläre Konformation verleihen, in der hydrophile und hydrophobe Domänen unterscheidbar sind. Diese hoch organisierte Struktur konnte durch Lösungs-NMR-Untersuchungen weiter bestätigt werden.^[12]

Der Wirkmechanismus beider Antibiotika ist auf molekularer Ebene noch nicht vollständig geklärt, es wird jedoch angenommen, dass sich die Wirkungsweise von der des Vancomycins unterscheidet.^[4] Zwar inhibieren sowohl Vancomycin als auch Lysobactin die Peptidoglycanbiosynthese, dies geschieht jedoch an unterschiedlichen Angriffspunkten. Peptidoglycan ist der Hauptbestandteil bakterieller Zellwände und besteht hauptsächlich aus polymerer, β -1,4-verknüpfter *N*-Acetylglucosaminyl-*N*-acetylmuraminsäure, die über kurze Peptide vernetzt ist (Schema 1).

Die Biosynthese von Peptidoglycan findet in drei Stufen statt (Schema 2). In einer chemisch stark vereinfachten Darstellung^[13] erfolgt während der Stufen 1 und 2 die Bildung des so genannten Lipids II (die „monomere“ Disaccharyl-Pentapeptid-Einheit) im Cytoplasma bzw. dessen Transport zur äußeren Oberfläche der bakteriellen Zellmembran (Translokation). In Stufe 3 der Biosynthese folgt dann die enzymatisch durch Transglycosylasen katalysierte Polymerisierung der Disaccharid-Einheiten (Lipid II wirkt an den Enden der verlängerten Peptidoglycan-Ketten zur 4-OH-Gruppe des

[*] Prof. Dr. J.-M. Campagne
Institut Charles Gerhardt Montpellier
Ecole Nationale Supérieure de Chimie
8 rue de l'Ecole Normale, 34296 Montpellier (Frankreich)
Fax: (+33) 4-6714-7212
E-Mail: jean-marc.campagne@enscm.fr



Schema 1. Vereinfachte Struktur von Peptidoglycan.

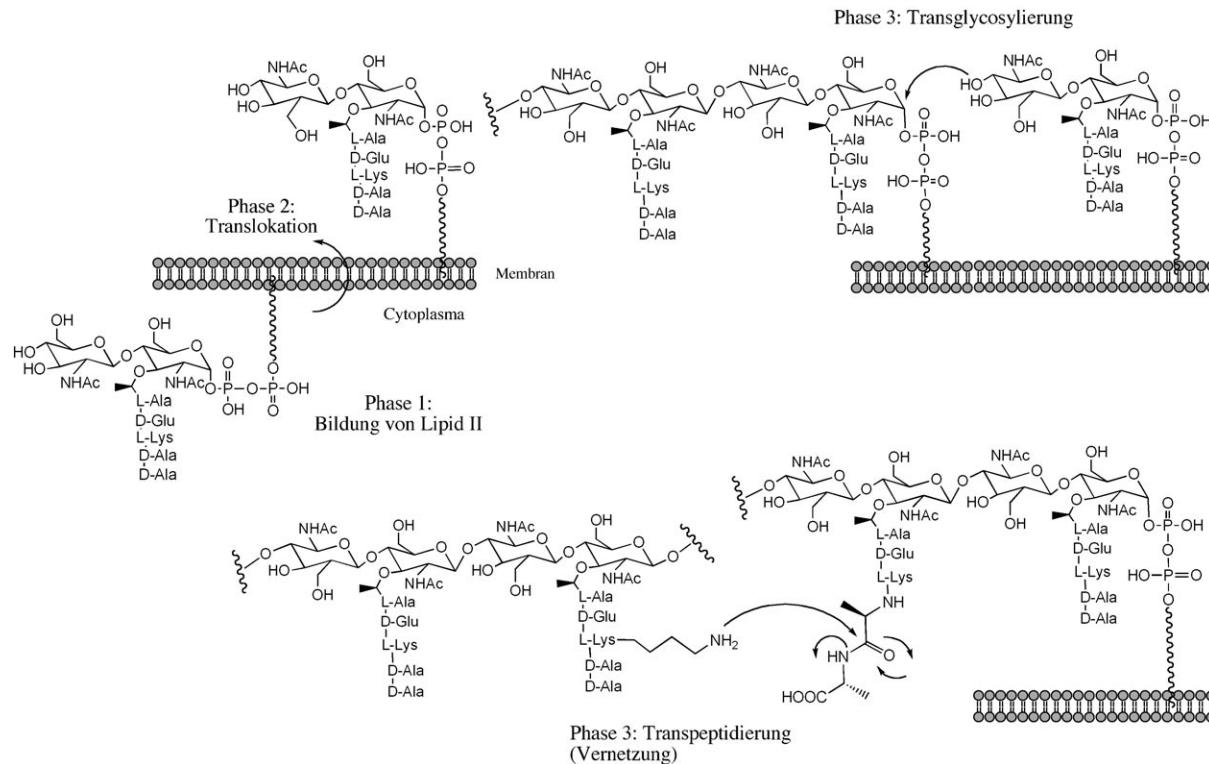
GlcNAc als Donor).^[14] Die Vernetzung der Peptidketten erfolgt in einer Transpeptidierungsreaktion der ε -NH₂-Gruppe einer Lys³-Seitenkette mit einem benachbarten D-Ala⁴, was zu einer Abspaltung von D-Ala⁵ als freie Aminosäure führt. Es ist dieser „Reifungsprozess“, der dem nunmehr entstandenen Peptidoglycan-Netzwerk seine außergewöhnliche Stabilität verleiht.

Vancomycin inhibiert die Transpeptidierung durch Bindung an den D-Ala-D-Ala-Terminus der Pentapeptideinheit von Lipid II, wobei die Hemmwirkung durch Zugabe von Ac-Lys-D-Ala-D-Ala aufgehoben wird. Die Tatsache, dass sich die Wirkung von Lysobactin nicht auf diese Weise unterdrücken lässt, ist als Nachweis für die Existenz zweier unterschiedlicher Wirkmechanismen anzusehen.^[4] Die Wirkung von Lysobactin in Bakterien ist mechanistisch noch nicht genau

geklärt, man geht aber davon aus, dass sie auf der Inhibition der Transglycosylierung und/oder der Bildung von Lipid II beruht. Die Hemmung der Peptidoglycanbiosynthese beeinträchtigt die mechanischen Eigenschaften der bakteriellen Zellwand und erhöht somit die Lyseanfälligkeit der Zelle. Es wird vermutet, dass Lysobactin auf ähnliche Weise agiert wie andere Antibiotika, die in die Synthese von Lipid II eingreifen, wie etwa Ramoplanin (ein cyclisches Depsipeptid mit Disaccharid- und Lipidresten) oder Mannopeptimycin (ein aus sechs Aminosäuren aufgebautes, glycosyierte Peptid).^[13a] Eine Lösung dieser Frage ist in nächster Zeit zu erwarten, da monomeres Lipid II seit kurzem sowohl auf synthetischem als auch auf enzymatischem Weg zur Verfügung steht.^[13b,2b]

Der Wirkmechanismus von Lysobactin lässt minimale Hemmkonzentrationen (MICs) im submikromolaren Bereich zu, die etwa 50-mal niedriger sind als beim Vancomycin. Dies macht Lysobactin zu einer vielversprechenden Alternative im Kampf gegen Infektionen durch Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE).

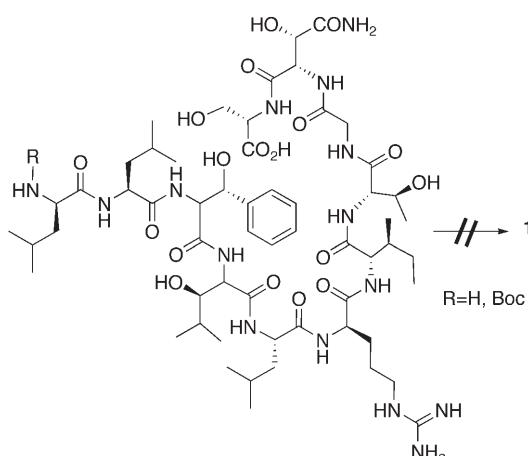
Eine Reihe von Arbeitsgruppen hat sich mit der Totalsynthese von Lysobactin beschäftigt,^[15–20] zudem beschrieben Bradley et al. eine Festphasensynthese eines vereinfachten Analogs.^[20] Erfolgreich zum Abschluss gebracht wurde die Totalsynthese nun kürzlich durch von Nussbaum et al.^[21] (Bayer AG) sowie durch VanNieuwenhze et al.,^[21] wobei sich die beiden Synthesewege grundsätzlich unterscheiden: Der von Nussbaum'sche Ansatz beruht hauptsächlich auf Überlegungen um die dreidimensionale Struktur des Lysobactins, wohingegen VanNieuwenhze einen eher klassischen Weg der Peptidsynthese gewählt hat.



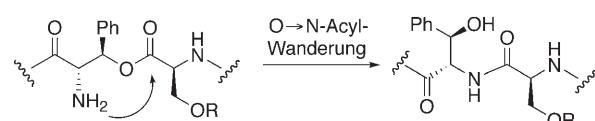
Schema 2. Überblick über die Biosynthese von Peptidoglycan.

Die durch von Nussbaum et al. entworfene Synthesestrategie orientierte sich an dem hohen Ordnungsgrad der 3D-Struktur. Zum Aufbau des makrocyclischen Grundgerüsts von Lysobactin war eine konformationsgesteuerte Cyclisierung vorgesehen,^[22] in der die ungeschützten Seitenketten der Hydroxyaminoäuren durch Bildung von Wasserstoffbrücken die makrocyclische Reaktion bevorzugen sollten. Dementsprechend waren nur minimale Schutzgruppenoperationen notwendig, um das für die Makrocyclisierung vorgesehene Vorstufenmolekül zu synthetisieren. Während Biosynthese-wege gewöhnlich über Makrolactonisierungen verlaufen,^[23] greift man in der chemischen Cyclisierung von Depsipeptiden meist auf Makrolactamisierungen zurück.^[24] Im aktuellen Fall sollte die einfache Verfügbarkeit der Secosäure des Naturstoffs genutzt werden,^[25] um eine Semisyntese auf Basis einer Makrolactonisierung zu versuchen (Schema 3). Dieser Ansatz erwies sich jedoch als erfolglos, was wahrscheinlich auf die hohe Zahl potenziell reaktiver Hydroxygruppen zurückzuführen ist.

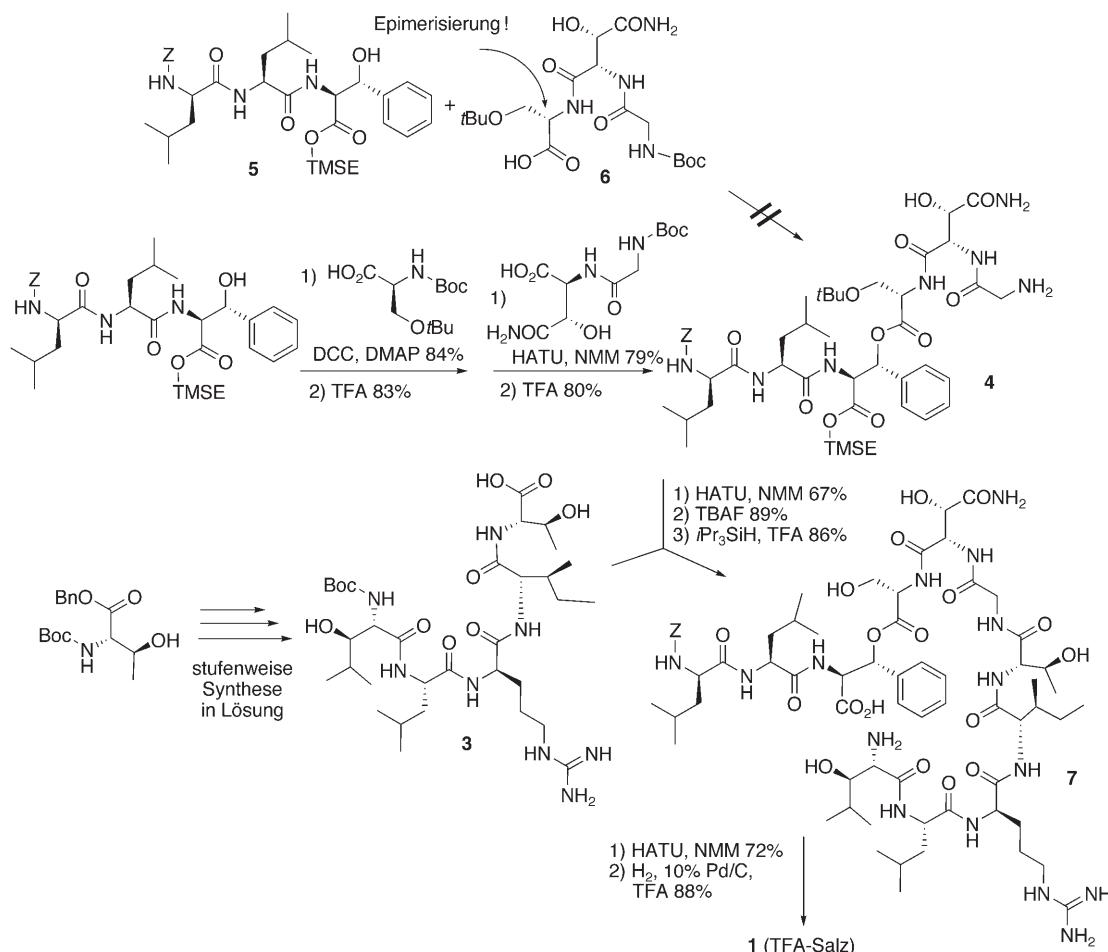
In einem zweiten Ansatz, der von einer Makrolactamisierung ausging, wurde das Peptid zunächst in zwei Fragmente aufgeteilt: ein Hexapeptid **3** und ein Pentapeptid **4**. Diese Strategie ist insofern überraschend, als sie das Vor-



Schema 3. Versuch einer Makrolactonisierung.



Schema 4.



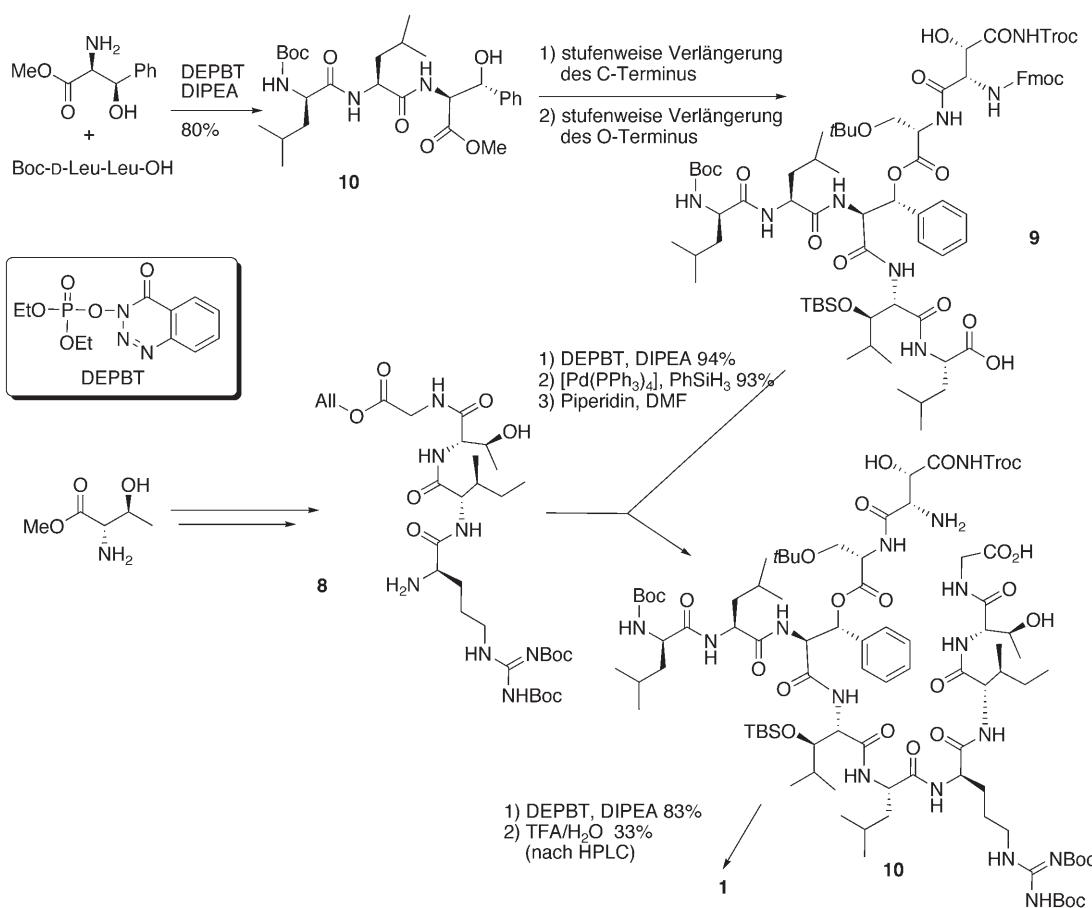
Schema 5. Synthese von Lysobactin (**1**) nach von Nussbaum et al. Bn = Benzyl, Boc = *tert*-Butyloxycarbonyl, DCC = *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, HATU = *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, NMM = *N*-Methylmorpholin, TBAF = Tetrabutylammoniumfluorid, TFA = Trifluoressigsäure oder Trifluoracetat, TMSE = 2-(Trimethylsilyl)ethyl.

handensein eines Glycins nicht nutzt, mit dem eine nicht-epimerisierende inter- oder intramolekulare Kupplung von Peptidfragmenten möglich gewesen wäre. Ein weiterer wichtiger Aspekt betrifft die Notwendigkeit, das „lineare“ Dipeptid in einem frühen Syntheseschritt in die „Lassostruktur“ einzuführen, da das Stickstoffatom am HyPhe nicht entschützt werden kann, ohne eine O→N-Wanderung des Acyls zu riskieren. Diese würde zur Bildung des entsprechenden Amids führen (Schema 4).^[26]

Das Pentapeptid **3** wurde konventionell durch eine stufenweise Peptidsynthese in Lösung gewonnen, bei der Boc als temporäre N-terminale Schutzgruppe, ein Benzylester am C-Terminus und HATU als Kupplungsreagens verwendet wurden. Es sei darauf hingewiesen, dass keine der Seitenketten (einschließlich der basischen Guanidinium-Gruppe des d-Arg) geschützt war. Bei der Synthese von Fragment **4** wurde aus Konvergenzgründen zunächst die Kupplung von **5** und **6** vorgesehen (Schema 5), allerdings war zu bedenken, dass die Veresterung mit einem hohen Grad an C_a-Epimerisierung am Serin verläuft. Folglich wurde zuerst der Serinrest eingeführt, um im Anschluss das Boc-Gly-HyAsn-OH-Dipeptid mit guter Ausbeute kuppeln zu können. Diese letzte, zu Fragment **4** führende Kupplung ist wiederum beeindruckend, da es weder zu einer Epimerisierung noch zu einer Dehydratisierung der Asparagin-Seitenketten kommt. Mit den nunmehr vorhandenen Peptiden **3** und **4** wurde die erste intermolekulare

Peptidkupplung an der sterisch zugänglichsten Stelle zwischen der Gly- und der aThr-Seitenkette ausgeführt. Auf diese Weise wurde das lineare Pseudopeptid mit einer Ausbeute von 67% und ohne Epimerisierung erhalten. Nach Entfernen der Schutzgruppen an den HyPhe³-, HyLeu⁴- und Ser¹¹-Seitenketten konnte unter klassischen Bedingungen die konformationsgesteuerte Makrolactamisierung mit einer beachtlichen Ausbeute von 72% durchgeführt werden. Nach Hydrogenolyse des Z-Carbamats (in Gegenwart von Trifluoressigsäure) wurde Lysobactin (**1**) als Trifluoracetatsalz mit einer Ausbeute von 88% isoliert.

Der von VanNieuwenhze et al. beschriebene Weg zum Lysobactin ist aus Sicht der klassischen Peptidsynthese der konventionellere Ansatz (Schema 6). Die beiden wichtigsten Kupplungsstellen, die zu den Peptiden **8** und **9** führen, waren zwischen Gly-HyAsn und Leu-d-Arg vorgesehen: Zum einen ermöglicht das achirale Glycin epimerisierungsfreie Peptidkupplungen, zum anderen verlaufen Kupplungen zwischen L- und d-Aminosäuren in der Regel effizienter als die der d-d- oder L-L-Paare. Das Pseudopeptid **8** wurde ausgehend von d-allo-Thr-OMe in einer gängigen, stufenweisen Peptidsynthese in Lösung gewonnen, wogegen sich die Synthese des Pseudopeptids **9** wegen der empfindlichen Estergruppe sowie der Möglichkeit einer O→N-Acyl-Wanderung (siehe Schema 3) schwieriger gestaltete. Daher wurde zunächst Verbindung **10** durch Kupplung von Boc-d-Leu-Leu-OH und HyPhe-OMe



Schema 6. Synthese von Lysobactin (**1**) nach VanNieuwenhze et al. DIPEA = Diisopropylethylamin, TBS = *tert*-Butyldimethylsilyl, Troc = Trichlorethoxycarbonyl.

erzeugt, wobei sich (wie auch in der gesamten Synthese) die Verwendung von DEPBT (3-(Diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4-3*H*-on)^[27,28] zur Minimierung von Epimerisierungen als unerlässlich herausstellte. Zur anschließenden Synthese von Peptid **9** wurde zunächst die Peptidkette am C-Terminus von **10** auf klassische Art stufenweise verlängert, worauf eine weitere, von der Hydroxygruppe der HyPhe-Seitenkette ausgehende Peptidverlängerung folgte. Die Kupplung der Peptide **8** und **9** konnte mit einer Ausbeute von 94 % und dank der Verwendung von DEPBT ohne Epimerisierung des C α am Leucin erreicht werden. Nach Entschützung des N- und C-Terminus wurde die Makrolactamisierung erneut unter Einsatz von DEPBT ausgeführt, womit vollständig geschütztes Lysobactin **10** in einer Ausbeute von 83 % erhalten wurde. Nachdem alle Schutzgruppen, die der jeweiligen Anforderung entsprechend gewählt worden waren (Troc, TBS, *t*Bu und Boc), unter sauren Bedingungen entfernt wurden, erhielt man nach HPLC-Aufreinigung Lysobactin (**1**) in einer Ausbeute von 33 %.

Zusammenfassend sind zwei Totalsynthesen von Lysobactin, einem vielversprechenden Wirkstoff gegen Vancomycin-resistente Bakterien vorgestellt worden. Erwähnenswert ist die Tatsache, dass das D-Leu-Leu-Fragment bereits zu Beginn der Synthese eingeführt werden muss, um so die mögliche Bildung vieler Nebenprodukte im linearen Teil der „Lassostruktur“ zu unterdrücken. Beide Ansätze unterscheiden sich konzeptionell stark. Den sicher riskanteren Ansatz beschreiben von Nussbaum et al. (Peptidkuppung potenziell epimerisierender C-terminaler Aminosäuren, Verwendung ungeschützter Arginine und Asparagine sowie hydroxylierter Seitenketten), und insbesondere die von der komplexen 3D-Struktur ausgehende retrosynthetische Analyse von Lysobactin ist sehr beeindruckend. Auf der anderen Seite zeigt der klassische Ansatz von VanNieuwenhze et al. den derzeitigen Stand der Technik in der Peptidsynthese auf und zeichnet sich insbesondere durch die geschickte Auswahl von Kupplungsstellen aus. Zudem ermöglicht die komplementäre Schutzgruppenstrategie die vollständige Entschützung aller funktionellen Gruppen unter sauren Bedingungen in nur einem Schritt.

Wenn auch konzeptionell verschieden, so sind beide Synthesen hochgradig konvergent und in ihrer Stufenzahl vergleichbar (neun bzw. zehn als jeweils längste durchgehende Stufenfolge, ausgehend von einem D-Leu-Leu-HyPhe-Derivat). Somit ebnen beide Totalsynthesen den Weg zu weiteren chemischen Modifikationen und sollten einen tieferen Einblick in den biologischen Mechanismus der antibakteriellen Wirkung von Lysobactin ermöglichen.

Online veröffentlicht am 17. Oktober 2007

[1] A. Coates, Y. Hu, R. Bax, C. Page, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 895.

- [2] a) *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 391–774 (Schwerpunkttausgabe über Antibiotikaresistenz); b) P. Welzel, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4610.
- [3] F. von Nussbaum, M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand, D. Haebich, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5194; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5072.
- [4] H. Maki, K. Miura, Y. Yamano, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 1823.
- [5] D. P. Bonner, J. O'Sullivan, S. K. Tanaka, J. M. Clark, R. R. Whitney, *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 1745.
- [6] J. O'Sullivan, J. E. McCullough, A. A. Tymiak, D. R. Kirsch, W. H. Trejo, P. A. Principe, *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 1740.
- [7] T. Kato, H. Hinoo, Y. Terui, J. Kikuchi, J. Shoji, *J. Antibiot.* **1989**, *42*, C2.
- [8] J. Shoji, H. Hinoo, K. Matsumoto, T. Hattori, T. Yoshida, S. Matsuura, E. Kondo, *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 713.
- [9] T. Kato, H. Hinoo, Y. Terui, J. Kikuchi, J. Shoji, *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 719.
- [10] In der Originalarbeit wurde *allo*-Threonin (aThr) fälschlicherweise die D-Konfiguration zugeordnet.
- [11] A. A. Tymiak, T. J. McCormick, S. E. Unger, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1149.
- [12] F. von Nussbaum, S. Anlauf, J. Benet-Buchholz, D. Haebich, J. Koebberling, L. Musza, J. Telser, H. Ruebsamen-Waigmann, N. A. Brunner, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2085; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2039.
- [13] a) E. Breukink, B. de Kruijff, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 321; b) R. S. Narayan, M. S. VanNieuwenhze, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 1399.
- [14] A. L. Lovering, L. H. de Castro, D. Lim, N. C. J. Strynadka, *Science* **2007**, *315*, 1402.
- [15] G. Cardillo, L. Gentilucci, M. Gianotti, A. Tolomelli, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2489.
- [16] S. Armaroli, G. Cardillo, L. Gentilucci, M. Gianotti, A. Tolomelli, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1105.
- [17] G. Cardillo, L. Gentilucci, A. Tolomelli, C. Tomasini, *Synlett* **1999**, 1727.
- [18] a) C. Palomo, M. Oiarbide, I. Ganboa, J. I. Miranda, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8955; b) C. Palomo, J. M. Aizpurua, I. Ganboa, B. Odriozola, E. Maneiro, J. I. Miranda, R. Urchegui, *Chem. Commun.* **1996**, 161.
- [19] A. M. Hafez, T. Dudding, T. R. Wagerle, M. H. Shah, A. E. Taggi, T. Lectka, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5819.
- [20] B. J. Egner, M. Bradley, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 14021.
- [21] A. Guzman-Martinez, R. Lamer, M. S. VanNieuwenhze, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6017.
- [22] J. Blankenstein, J. Zhu, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 1949.
- [23] C. T. Walsh, *Science* **2004**, *303*, 1805.
- [24] a) Y. Hamada, T. Shioiri, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4441; b) F. Sárbabia, S. Chammaa, A. S. Ruiz, L. M. Ortiz, F. J. L. Herrera, *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 1309; c) J. S. Davies, *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 471.
- [25] Lysobactin ist durch Fermentation im Grammstabverfügbar: F. Von Nussbaum, N. Brunner, S. Anlauf, R. Endermann, C. Fuerstner, E. Hartmann, J. Koebberling, J. Ragot, G. Schiffer, J. Schuhmacher, N. Svenstrup, J. Telser, M.-A. Bruening (Bayer Healthcare AG, Germany), WO 04099239.
- [26] Bezuglich einer Anwendung dieser Eigenschaft in der chemischen Ligation von Peptiden: Y. Sohma, Y. Kiso, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1549.
- [27] H. Li, X. Jiang, Y.-h. Ye, C. Fan, T. Romoff, M. Goodman, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 91.
- [28] C.-X. Fan, X.-L. Hao, Y.-H. Ye, *Synth. Commun.* **1996**, *26*, 1455.