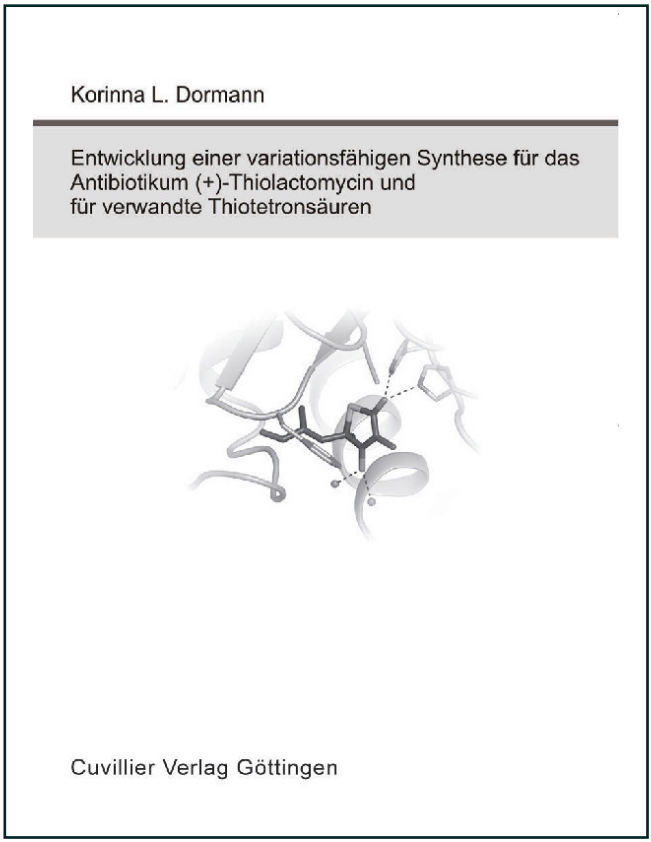
Korinna Dormann (Autor)

Entwicklung einer variationsfähigen Synthese für das Antibiotikum (+)-Thiolactomycin und für verwandte Thiotetronsäuren



https://cuvillier.de/de/shop/publications/1767

Copyright:
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: https://cuvillier.de

1 Einleitung

Die Entwicklung neuer Antibiotika ist gerade heute überaus wichtig. Die Erfolgsgeschichte der Antibiotika begann mit der Einführung der ersten Sulfonamide und Penicilline in den Jahren 1935 und 1940, wodurch die einst hohe Mortalitätsrate bakterieller Infektionen stark abnahm.[1] In den siebziger Jahren wurde die Zahl an verfügbaren Antibiotika als ausreichend empfunden und die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Verbindungen dieses Wirkprofils infrage gestellt.[1,2] Als eine Folge davon wurden nur zwei Substrate mit neuen Wirkmechanismen auf den Markt gebracht: das Oxazolidinon Linezolid und das Lipopeptid Daptomycin.[3] Zu diesem Einbruch bei den neu entwickelten Antibiotika führten aber auch kommerzielle Gründe. Wegen der enormen Entwicklungskosten für neue Medikamente verlagerte die pharmazeutische Industrie ihren Schwerpunkt von den akuten Krankheiten (Kurzzeittherapie) zu den profitableren chronischen Erkrankungen (Langzeittheraphie). Im starken Kontrast zu ihrer früheren Erfolgsgeschichte sind die schnell und effizient wirkenden Antibiotika heute aus rein ökonomischer Sicht wenig attraktive Arzneimittel.[4]

Diese Entwicklung hat jedoch fatale Folgen. Früher heilbare Krankheiten werden durch Resistenzen schnell schwer zu behandeln, denn jeder Antibiotika-Einsatz führt unweigerlich zu Resistenzbildung und begrenzt damit die Lebenszeit eines jeden Antibiotikums. Multiresistente Varianten von *Mycobacterium tuberculosis* beispielsweise verlangen nach neuen Medikamenten gegen Tuberkulose. Tuberkulose stellt heute die weltweit am weitesten verbreitete Infektionskrankheit dar. Man schätzt, dass ca. 1.9 Milliarden Menschen Träger von *Mycobacterium tuberculosis* sind.[5] Daneben ziehen sich in US-Krankenhäusern jährlich etwa zwei Millionen Patienten bakterielle Infektionen zu. Bei etwa 70% dieser Infektionen sind die Erreger gegen mindestens ein Medikament resistent.[6] Insgesamt entstehen in den USA dadurch Mehrkosten von fünf Milliarden US-Dollar im Jahr. Damit droht das Auftreten von Resistenzen die Zeit zurückzudrehen und die Menschheit in Bezug auf die Behandlung von Infektionskrankheiten in die 30er Jahre zurückzuwerfen.[7]

Um gegen die aufkommenden Resistenzen gerüstet zu sein, müssen Antibiotika mit neuen Wirkmechanismen entwickelt werden.[1] Die üblichen Angriffspunkte der gängigen

---

[1] S. Rachakonda, L. Cartee, *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 775-793.
[2] L. Silver, K. Bostian, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1990**, *9*, 455-461.
[3] U. Holzgrabe, T. Dingermann, I. Zündorf, *Pharm. i. Unserer Zeit* **2006**, *5,* 388-389.
[4] F. von Nussbaum, M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand, D. Häbich, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5149-5254; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5071-5129.
[5] D. M. Morens, G. K. Folkers, A. S. Fauci, *Nature* **2004**, *430*, 242-249.
[6] Infectious Disease Society of America (IDSA): http://www.idsociety.org
[7] M. Leeb, *Nature* **2004**, *431*, 892-893.

Antibiotika sind DNA-Replikation (z. B. das Chinolon Ciprofloxacin), Transkription (das Ansamycin Rifamycin), Translation (das Polyketid Tetracyclin oder das Makrolid Erythromycin A), Zellwandbiosynthese (das β-Lactam-Antibiotikum Penicillin oder das Glycopeptid Vancomycin) oder Coenzymbiosynthese (das Sulfonamid Prontosil). Daneben sind eine Reihe[3] von Substanzen bekannt, die das Wachstum von Bakterien mit einem neuen Wirkmechanismus hemmen, nämlich über eine Blockierung der Fettsäurebiosynthese: Isoniazid, Triclosan, Cerulenin, der kürzlich[8] isolierte Naturstoff Platensimycin und eben Thiolactomycin, mit dessen Synthese sich die vorliegende Arbeit befasst. Auf diesen Wirkmechanismus wird in Kapitel 1.2.1 (S. 6 ff.) genauer eingegangen. Von den zuletzt erwähnten Substanzen wird bisher nur Isoniazid klinisch zur Bekämpfung von Tuberkulose eingesetzt.[3]

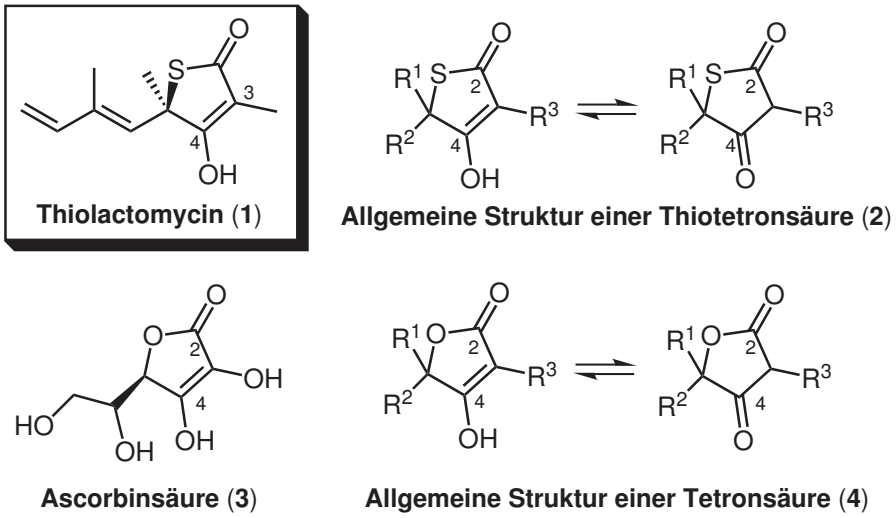
Um neue antibakterielle Arzneimittel zu entwickeln, nimmt der Synthesechemiker oft antibakteriell wirksame Naturstoffe als "Leitstruktur" zum Vorbild und verbessert ihre pharmakologischen Eigenschaften durch Substituentenvariation. 75% der zwischen 1984 und 2004 eingereichten neuen Wirkstoffe zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten basierten auf Naturstoff-Leitstrukturen.[9] Dabei geht es nicht allein um die Verbesserung der Aktivität einer Leitstruktur, auch Verfügbarkeit, Stabilität, Toxizität und Resistenzen sind wichtige Punkte, die bei der Optimierung berücksichtigt werden müssen. Für die Variation der Substituenten von antibiotisch wirksamen Naturstoffen genügt nicht immer die Semisynthese, wiewohl diese oft schnell zu Anhaltspunkten für Struktur-Aktivitäts-Beziehungen führen. Um zu möglichst umfassenden Variationen zu gelangen, ist die Totalsynthese die Methode der Wahl zur Strukturvariation. Konkret betonten Forscher Anfang des Jahres 2006, dass "eine der Beschränkungen für Fortschritte" auf dem Gebiet der Thiolactomycin-Forschung "der schwierige Zugang zu synthetischen Thiolactomycin-Analoga" sei.[10]

---

[8] J. Wang, S. M. Soisson, K. Young, W. Shoop, S. Kodali, A. Galgoci, R. Painter, G. Parthasarathy, Y. S. Tang, R. Cummings, S. Ha, K. Dorso, M. Motyl, H. Jayasuriya, J. Ondeyka, K. Herath, C. Zhang, L. Hernandez, J. Allocco, A. Basilio, J. R. Tormo, O. Genilloud, F. Vicente, F. Pelaez, L. Colwell, S. H. Lee, B. Michael, T. Felcetto, C. Gill, L. L. Silver, J. D. Hermes, K. Bartizal, J. Barrett, D. Schmatz, J. W. Becker, D. Cully, S. B. Singh, *Nature* **2006**, *441*, 358-361.
[9] D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022-1037.
[10] Y.-M. Zhang, S. W. White, C. O. Rock, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 17541-17544.

1.1 Thiotetronsäure-Naturstoffe: Isolierung und Strukturvergleich

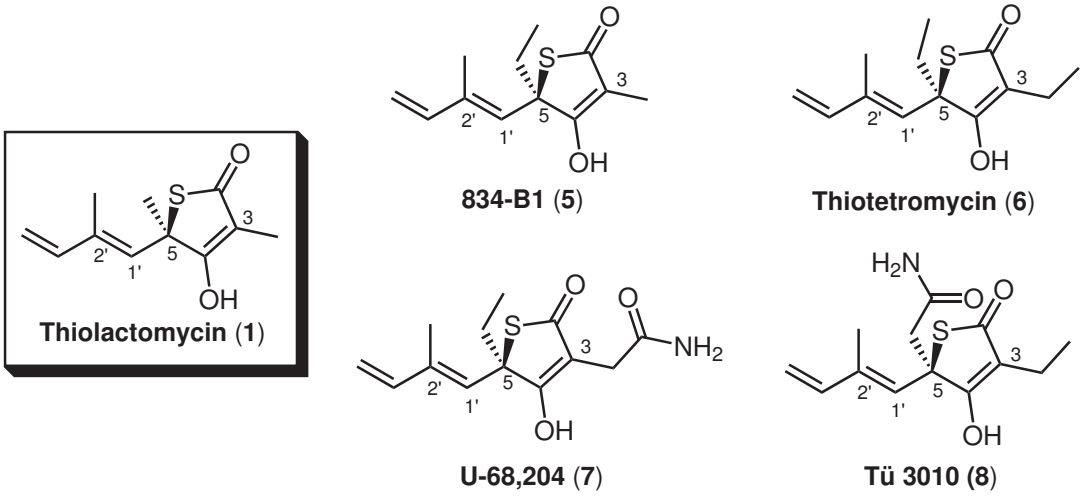
Thiolactomycin[11] (**1**) besitzt einen fünfgliedrigen Ring, der eine vinyloge Thiokohlensäure enthält und damit als Thiotetronsäure (**2**) das Schwefelanalogon einer Tetronsäure (**4**) darstellt. Tetronsäuren können als vinyloge Kohlensäuren aufgefasst werden.



Schema 1: Thiolactomycin[11] (1) und Ascorbinsäure (3) als bekannteste Vertreter von Thiotetronsäuren (2) bzw. Tetronsäuren[12] (4)

Während Tetronsäuren, angefangen mit dem bekanntesten Vertreter Ascorbinsäure (**3**), in der Natur weit verbreitet sind,[12] sind Thiotetronsäuren seltener. Der bei weitem bekannteste Vertreter der Thiotetronsäuren ist Thiolactomycin (**1**). Daneben sind noch vier weitere Thiotetronsäure-Naturstoffe bekannt (Schema 2).

[11] Isolierung von Thiolactomycin: H. Oishi, T. Noto, H. Sasaki, K. Suzuki, T. Hayashi, H. Okazaki, K. Ando, M. Sawada, *J. Antiobiotics* **1982**, *35*, 391-395.
[12] A. L. Zografos, D. Georgiadis, *Synthesis* **2006**, 3157-3188.



Schema 2: Thiolactomycin[11] (1) und die Thiotetronsäure-Naturstoffe 834-B1[13] (5), Thiotetromycin[14] (6), U-68,204[15] (7) und Tü 3010[16] (8)

Thiolactomycin (**1**) wurde als erster Vertreter der Klasse der Thiotetronsäuren entdeckt. 1982 wurde **1** aus einer Bodenprobe isoliert, worin es vom Actinomyceten-Stamm *Nocardia* sp. No. 2-20 produziert wird.[11] In den folgenden sieben Jahren wurden vier weitere Thiotetronsäure-Naturstoffe isoliert:

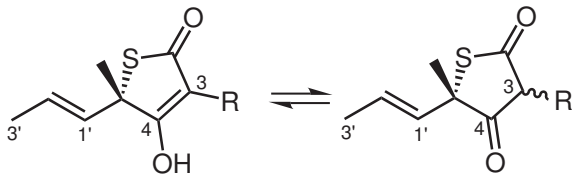
- 834-B1 (**5**), gebildet von *Streptomyces* sp. Y-0834H,[13]
- Thiotetromycin (**6**) aus *Streptomyces* sp. OM-674,[14]
- U-68,204 (**7**) aus *Streptomyces thiolactonus* UC 8478[15] und
- Tü 3010 (**8**) aus *Streptomyces olivaceus* Tü 3010.[16]

All diesen natürlichen Thiotetronsäuren ist neben dem Thiolactonring die endständige Dieneinheit gemeinsam, deren $^{1',2'}$*E*-Konfiguration von Sasaki *et al.*[17] für Thiolactomycin unkommentiert festgelegt, wohl aber der Kristallstruktur entnommen wurde. Auch das quartäre schwefelhaltige Stereozentrum an C-5 weisen alle Thiotetronsäuren auf. Dessen Konfiguration wurde bisher nur für Thiolactomycin anhand der Kristallstrukturanalyse[17] festgelegt und musste später von 5*S* auf 5*R* revidiert werden.[18] Der endgültige Struk-

[13] Isolierung von 834-B1: T. Sato, K. Suzuki, S. Kadota, K. Abe, S. Takamura, M. Iwanami, *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 890-896.
[14] Isolierung von Thiotetromycin: S. Omura, Y. Iwai, A. Nakagawa, R. Iwata, Y. Takahashi, H. Shimizu, H. Tanaka, *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 109-114; Struktur: S. Omura, A. Nakagawa, R. Iwata, A. Hatano, *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 1781-1782.
[15] Isolierung von U-68,204: L. A. Dolak, T. M. Castle, S. E. Truesdell, O. K. Sebek, *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 26-31.
[16] Isolierung von Tü 3010: C. Rapp, G. Jung, C. Isselhorst-Scharr, H. Zähner, *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, *11*, 1043-1047.
[17] Strukturzuordnung: H. Sasaki, H. Oishi, T. Hayashi, I. Matsuura, K. Ando, M. Sawada, *J. Antiobiotics* **1982**, *35*, 396-400; dabei sollten die kristallographischen Daten zu einem späteren Zeitpunkt berichtet werden, aufgeführt wurden nur ^{1}H-NMR-, ^{13}C-NMR-, IR-, UV- und Massenspektrum, Elemantaranalyse und Drehwert.
[18] Das *Corrigendum*, das diesen Sachverhalt mit "by remeasurement of X-ray crystallographic analysis" erklärt, folgt zeitlich auf eine Veröffentlichung von Thomas *et al.* (1987)[21] über die Kristallstruktur von (5*R*)-2,5-

turbeweis gelang Chambers und Thomas[19] 1989 durch die erste Synthese von optisch aktivem Thiolactomycin (**1**). Auf diese Synthese wird in Kap. 1.3.3 (S. 14) eingegangen. Für alle[20] anderen Thiotetronsäuren, für die die Konfiguration des gemeinsamen C-5-Stereozentrums nicht bewiesen wurde (von 834-B1 konnte aufgrund Substanzmangels nicht einmal ein Drehwert gemessen werden[13]), wird ebenfalls eine 5*R*-Konfiguration vermutet. Dies folgt aus der Annahme eines gemeinsamen Biosyntheseweges für alle Thiotetronsäuren (siehe Kap. 1.3.1, S. 11). Die einzige Variation der Thiotetronsäuren tritt im Bereich der C-3- und C-5-Substituenten auf, die neben längeren Alkylgruppen (verlängert um je eine Methylgruppe **1** → **5** → **6**) auch Amidgruppen (**7**, **8**) enthalten.

Tabelle 1: Keto-Enol-Tautomerengleichgewicht verschieden substituierter Thiotetronsäuren (10 und 11)[21,22]



R = H: Enol-**10** R = H: Keto-**10**
R = Me: Enol-**11** R = Me: Keto-**11**

	R		4-Enol-Form		4-Keto-Form
10	H	d_6-DMSO	100	:	0
10	H	$CDCl_3$	0	:	100
11	Me	d_6-DMSO	100	:	0
11	Me	$CDCl_3$	85	:	15

Die Thiotetronsäuren teilen mit den Tetronsäuren aufgrund der Strukturanalogie das Auftreten einer 4-Keto-4-Enol-Tautomerie [Schema 1 (S. 3), Tabelle 1]. In Lösung wird das Gleichgewicht der beiden tautomeren Formen vom Solvens und vom Substituenten an C-3 beeinflusst, wie für die Thiotetronsäuren **10** (3-Substituent = H) und **11** (3-Substituent = Me) gezeigt (Tabelle 1). Die Thiotetronsäure **10** lag laut ^{1}H-NMR-Spektrum im polaren Lösungsmittel DMSO nur in ihrer 4-Enolform vor, während im weniger polaren Lösungsmittel $CDCl_3$ nur die 4-Ketoform zu erkennen war.[22] Beim Übergang zu **11** mit einer

Dihydro-4-hydroxy-5-methyl-3-phenyl-5-prop-1'-enyl-2-oxothiophen: H. Sasaki, H. Oishi, T. Hayashi, I. Matsuura, K. Ando, M. Sawada, *J. Antiobiotics* **1988**, *41*, C-6.

[19] M. S. Chambers, E. J. Thomas, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1989**, 23-24.

[20] Jung *et al.*[16] schreiben dem Naturstoff Tü 3010 in Analogie zu Thiolactomycin eine 5*S*-Konfiguration zu, da die richtige Konfiguration von Thiolactomycin damals gerade erst veröffentlicht wurde.

[21] Auftreten von Keto-Enol-Tautomeren bei Thiotetronsäuren sowie Kristallstruktur einer Thiotetronsäure: M. S. Chambers, E. J. Thomas, D. J. Williams, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1987**, 1228-1230.

[22] Werte für die aufgeführten Keto-Enol-Gleichgewichte: M. S. Chambers, E. J. Thomas, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 417-431.

Methylgruppe an C-3 erhöhte sich der Enolanteil, sodass selbst im weniger polaren Lösungsmittel $CDCl_3$ die Enolform überwog. Diese Tendenz wird durch eigene Ergebnissen bestätigt (Kap. 3.2.1, S. 92).

1.2 Biologische Aktivität von Thiolactomycin

Die biologische Wirkung der Thiotetronsäuren ist für Thiolactomycin am ausführlichsten untersucht worden und eröffnet, wie schon in der Einleitung angedeutet, interessante Möglichkeiten für die Entwicklung neuer antibakteriell wirkender Medikamente.

Thiolactomycin zeigt antibakterielle Wirkung gegenüber einer Vielzahl gram-positiver und gram-negativer Bakterien, darunter Darmbakterien, säurebeständige sowie anaerobe Bakterien.[23,24] Von besonderer medizinischer Bedeutung ist seine Wirkung gegenüber Pathogenen wie *Mycobacterium tuberculosis*[25] und *Plasmodium falciparum*[26], den Erregern von Tuberkulose und Malaria. Die Wirkung von Thiolactomycin ist bakteriostatisch und nicht bakterizid und dazu im Allgemeinen moderat.[23] Thiolactomycin wird bei Ratten oral und intramuskulär schnell aufgenommen und rasch im Gewebe verteilt, und das bei gleichzeitig geringer Toxizität.[23] Im Mausmodell zeigt es eine gute Wirksamkeit bei Harnwegsinfekten und bei Entzündungen des Bauchfells.[23] Die antibakterielle Wirkung[27] von Thiolactomycin ist auf molekularer Ebene auf eine Hemmung der Fettsäurebiosynthese zurückzuführen, worauf im Folgenden eingegangen wird.

1.2.1 Wirkmechanismus von Thiolactomycin

Die Abgrenzung des Inneren der Zelle von ihrer Umgebung durch eine Zellmembran stellt ein zentrales Grundprinzip zellulären Lebens dar. Die Membran wird durch eine Lipid-

[23] a) *in-vitro*-Aktivität: T. Noto, S. Miyakawa, H. Oishi, H. Endo, H. Okazaki, *J. Antiobiotics* **1982**, *35*, 401-410; b) Biologische Eigenschaften und Aktivität im Mausmodell: S. Miyakawa, K. Suzuki, T. Noto, Y. Harada, H. Okazaki, *J. Antiobiotics* **1982**, *35*, 411-419.
[24] R. J. Heath, S. W. White, C. O. Rock, *Appl. Microbiol Biotechnol* **2002**, *58*, 695-703.
[25] L. Kremer, J. D. Douglas, A. R. Baulard, C. Morehouse, M. R. Guy, D. Alland, L. G. Dover, J. H. Lakey, W. R. Jacobs, P. J. Brennan, D. E. Minnikin, G. S. Besra, *J. Biolog. Chem.* **2000**, *275*, 16857-16864 und R. A. Slayden, R. E. Lee, J. W. Armour, A. M. Cooper, I. M. Orme, P. J. Brennan, G. S. Besra, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 2813-2819.
[26] R. F. Waller, P. J. Keeling, R. G. K. Donald, B. Striepen, E. Handman, N. Lang-Unnasch, A. F. Cowman, G. S. Besra, D. S. Roos, G. I. McFadden, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, 12352-12357; R. F. Waller, S. A. Ralph, M. B. Reed, V. Su, J. D. Douglas, D. E. Minnikin, A. F. Cowman, G. S. Besra, G. I. McFadden, *Antimicrob. Agents. Chemother,* **2003**, *47*, 297-301. S. M. Jones, J. E. Urch, R. Brun, J. L. Harwood, C. Berry, I. H. Gilbert, *Bioorg. Medicinal Chem.* **2004**, *12*, 683-692.
[27] Thiolactomycin hemmt daneben auch die Mycolsäurebiosynthese: R. A. Slayden, R. E. Lee, J. W. Armour, A. M. Cooper, I. M. Orme, P. J. Brennan, G. S. Besra, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 2813-2819. Dieser weniger gut untersuchte Wirkmechanismus soll in Kap. 1.2.1 ausgeklammert bleiben.

Doppelschicht aufgebaut, deren Hauptbestandteil Derivate von Fettsäuren darstellen.[28,29] In der Natur existieren zwei unterschiedliche biochemische Systeme zur Synthese von Fettsäuren – Typ I und Typ II. Bei der Typ-I-Fettsäurebiosynthese werden alle Schritte der Biosynthese durch ein multifunktionelles Enzym katalysiert, das aus mehreren Enzymeinheiten besteht und bei Tieren wie auch beim Menschen vorkommt.[24] Im Gegensatz dazu tritt die Typ-II-Biosynthese bei Bakterien sowie Pflanzen auf und wird über die Zusammenarbeit mehrerer einzelner, cytosolischer Enzyme bewerkstelligt.[24] Da die Fettsäuresynthese für Bakterien essentiell ist und Unterschiede zwischen den bakteriellen und menschlichen Enzymen vorliegen, sind Wirkstoffe wie Thiolactomycin, die selektiv Typ-II-Fettsäure-Synthasen hemmen, potenziell antibakteriell wirkende und dabei nebenwirkungsarme Medikamente.[24]

[28] R. J. Heath, S. Jackowski, C. O. Rock, "Fatty acid and phospholipid metabolism in prokaryotes", D. E. Vance (Hrsg.), J. E. Vance (Hrsg.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes,* 4th Edn., **2002**, *Elsevier*, 56-63 und 88-89.

[29] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, "membrane structure", B. Alberts (Hrsg.), *Molecular biology of the cell*, (4th Edn.), **2002**, Taylor and Francis, Garland Science, 583-603.