

- [7] T. Mori, K. Takahashi, M. Kashiwabara, D. Uemura, C. Katayama, S. Iwadare, Y. Shizuri, R. Mitomo, F. Nakano, A. Matasuzaki, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 1073–1076.
[8] R. L. Danheiser, J. S. Nowick, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 1176–1185, zit. Lit.
[9] J. Mulzer in *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 6 (Hrsg.: B. M. Trost, I. Fleming), Pergamon, Oxford, **1991**, S. 342–350.
[10] Übersicht zum Einsatz von Opferanoden in der präparativen Elektrochemie: J. Chaussard, J.-C. Folest, J.-Y. Nedelec, J. Perichon, S. Sibille, M. Troupel, *Synthesis* **1990**, 369–381.
[11] K.-H. Schwarz, K. Kleiner, R. Ludwig, H. Schick, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 4013–4015.
[12] T. Moriwake, *J. Org. Chem.* **1966**, 31, 983–985.
[13] E. Burkhardt, R. D. Rieke, *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 416–417.
[14] S. N. Inaba, R. D. Rieke, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 155–156.
[15] T. Imamoto, T. Kusumoto, Y. Tawarayama, Y. Sugiria, T. Mita, Y. Hatanaka, M. Yokoyama, *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 3904–3912.
[16] G. Cahiez, P.-Y. Chavant, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 7373–7376.
[17] L.-C. Chao, R. D. Rieke, *J. Org. Chem.* **1975**, 40, 2253–2255.
[18] S. Araki, H. Ito, Y. Butsugan, *Synth. Commun.* **1988**, 18, 453–458.
[19] P. S. Johar, S. Araki, Y. Butsugan, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1992**, 711–713.
[20] A. Fürstner, *Synthesis* **1989**, 571–590, zit. Lit.
[21] Organoindiumverbindungen ähnlicher Struktur werden in [18] diskutiert.
[22] Für das aus Zink und **2** entstehende Reformatsky-Reagens wird die Struktur eines analogen Zink-Esterenolates wahrscheinlich gemacht (W. R. Vaughan, S. C. Bernstein, M. E. Lorber, *J. Org. Chem.* **1965**, 30, 1790–1795). In welcher Weise diese Enolate aggregieren sind, sei zunächst dahingestellt.
[23] D. Borrman, R. Wegler, *Chem. Ber.* **1969**, 102, 64–70.

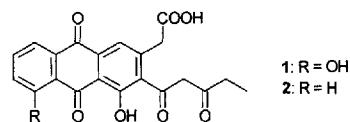
Synthese von 4-Desoxyaklanonsäure und deren mikrobielle Umwandlung in Anthracyclinone**

Von Karsten Krohn*, Ernst Roemer, Michael Top und Christina Wagner*

Professor Eckehard Volker Dehmlow
zum 60. Geburtstag gewidmet

Über die Zwischenstufen, die bei der Polyketid-Biosynthese auf dem Weg von der hypothetischen, enzymgebundenen, offenkettigen Polyketo-Vorstufe zu den Cyclisierungsprodukten durchlaufen werden, ist wenig bekannt^[11]. Eine bemerkenswerte Ausnahme ist Aklanonsäure **1**, eine partiell cyclisierte achirale Anthracyclin-Vorstufe, die aus Mutanten von *Streptomyces galilaeus* und *Streptomyces peucetius*^[12] als Mutantenprodukt isoliert wurde und als zentrales Intermediat der Anthracyclin-Biosynthese gilt^[3]. Der Einbau isotopenmarkierter Aklanonsäure **1** in eine Reihe von Anthracyclinen hat gezeigt, daß hier ein echtes Intermediat und nicht nur ein Shunprodukt vorliegt^[4].

Die Entdeckung von Aklanonsäure **1** regte dazu an, die enantioselektive Cyclisierung achiraler Ketoester-Vorstufen – ein bisher ungelöstes Problem der Anthracyclin-Synthese – mit einer mikrobiellen Umwandlung anzugehen. Wir berichten nun über die Synthese und die Biotransformation der



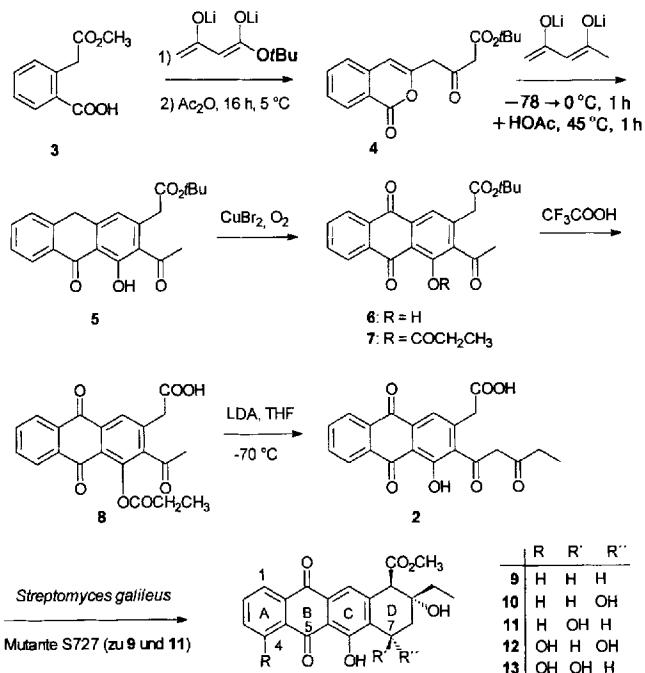
[*] Prof. Dr. K. Krohn, Dr. E. Roemer, M. Top
Fachbereich Chemie und Chemietechnik der
Universität-Gesamthochschule
Postfach 1621, D-33098 Paderborn
Telefax: Int. +5251/60-3245

Dr. C. Wagner
Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V.
Beutenbergstraße 11, D-07745 Jena

[**] Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Forschung und Technologie gefördert.

nichtnatürlichen 4-Desoxyaklanonsäure **2** zu Anthracyclinonen vom Typ der Aklavinone.

Die Synthese von **2** geht vom bekannten Homophthalsäuremonoester **3**^[5] aus, der mit dem Dilithiumsalz des *tert*-Butylacetooacet-Dianions im Überschuß umgesetzt wird (Schema 1). Die zunächst gebildete offenkettige Säure wird



Schema 1. LDA = Lithiumdiisopropylamid.

ohne Isolierung mit Acetanhydrid zum Isocumarin **4**^[6] (57%) cyclisiert. Behandlung mit dem Dilithiumsalz des Acetylacet-Dianions im dreifachen Überschuß führt nach dem Verfahren von Yamaguchi et al.^[7] zum Anthron **5** (72%), das mit Luftsauerstoff in Gegenwart von Kupferbromid zum Anthrachinon **6** (87%) oxidiert wird. Die Überführung des durch Chelatbildung wenig reaktiven Phenols in das entsprechende Propionat **7** (82%) gelingt mit Propionylchlorid in Gegenwart von 5% 4-Dimethylaminopyridin. Um eine vorzeitige basenkatalysierte Cyclisierung bei der anschließenden Kettenverlängerung durch Venkataraman-Umlagerung^[8] zu vermeiden, wird der *tert*-Butylester **7** zuvor mit Trifluoressigsäure zur Säure **8** verseift (98%). Die intramolekulare Umlagerung der Acylgruppe gelingt durch Umsetzung bei –40 °C mit LDA in THF. Neben 70% des Kettenverlängerungsprodukts 4-Desoxyaklanonsäure **2** (C-Acylierung) werden noch ca. 30% des möglicherweise über O-Acylierung gebildeten Verseifungsprodukts **6** isoliert, das erneut eingesetzt werden kann. Analog gelingt auch die Synthese von Aklanonsäure **1**^[9].

Mit dem Syntheseprodukt **2** konnte nun getestet werden, ob Mutanten von *Streptomyces* diese nichtnatürliche Vorstufe als Substrat akzeptieren und in enantiomerenreine, in der Natur bisher nicht gefundene 4-Desoxyanthracycline umwandeln.

Der dazu benutzte Mutantenstamm S727 wurde durch Behandlung von *Streptomyces galilaeus* (Cinerubin-Produzent) mit *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N'*-nitrosoguanidin (MNNG) (2 mg mL^{−1}, pH 9) erhalten. Die Mutante S727 reichert keine Anthracycline oder Anthracyclinone an und wurde erstmals benutzt, um Aklanonsäure **1** in Cinerubin umzuwandeln^[10]. Der Wildtyp ist als Produzent von Aklavinon **12** und Aklavinon-II **13** bekannt^[11].

In den Fütterungsversuchen werden insgesamt 34 mg 4-Desoxyaklanonsäure **2** den Kulturen des Stammes S727 (elf Kolben mit je 80 mL Kulturlösigkeit) zugesetzt. Nach eintägiger Inkubation wird der pH-Wert der Kulturen auf pH 8.5 eingestellt und die Metabolite mit Chloroform/Methanol (9:1, v/v) extrahiert. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen zeigen neben drei roten bis violetten Substanzen zwei gelbe Hauptprodukte. Die polare Verbindung (3 mg) weist das typische Verhalten von im Ring A zweifach hydroxylierten Anthracyclinen auf (Dehydratisierung zu fluoreszierenden Naphthacendionen). Sie ist jedoch nicht mit synthetischem 4-Desoxyaklavonon **10** identisch^[12], sondern es handelt sich nach NMR-Untersuchungen um das C-7-epimere 4-Desoxyaklavonon-II **11**^[11, 12]. Das unpolare Hauptprodukt (17 mg, $[\alpha]_D^{20} = 31$ ($c = 0.2$ in Methanol); Schmp. 174.5 °C) lässt sich durch Vergleich mit racemischen synthetischen Substanzen als 4,7-Didesoxyaklavonon **9** identifizieren^[12]. Die Enantiomerenreinheit wird durch HPLC an einer chiralen Säule nachgewiesen (Chiradex, Merck; Gradient: T_0 50%: 0.1% Triethylamin gepuffert mit HOAc auf pH 4.4/50proz. Methanol; t_{15} : 100proz. Methanol). Das racemische 4,7-Didesoxyaklavonon^[12] zeigte erwartungsgemäß zwei Peaks; beim Produkt **9** aus der mikrobiellen Umwandlung handelt es sich um das Enantiomer mit geringerer Retentionszeit. Obwohl keine direkten Vergleichswerte (z.B. Drehwerte) zur Bestimmung der absoluten Konfiguration bekannt sind, nehmen wir für **9** die natürliche (9*R*,10*R*)-Konfiguration an, da der Wildtyp der benutzten Mutante ebenfalls Aklavonone mit dieser absoluten Konfiguration produziert.

Damit ist erstmals gezeigt, daß relativ einfache achirale nichtnatürliche Vorstufen in einer mehrstufigen Biotransformation mit hoher Ausbeute (56%) in optisch aktive Anthracyclinen überführt werden können. In der Daunorubicin-Reihe haben die bereits klinisch eingesetzten 4-Desmethoxy-Analoga gegenüber den Naturstoffen in vitro verbesserte Antitumorwirkung^[13]. Mit dieser neuen „hybrid“ Synthesetechnik, in der die chemische Synthese mit einer mehrstufigen Biotransformation kombiniert wird, kann man mit anderen Mutanten auch zu glycosidischen Anthracyclinen gelangen^[14]. Die Synthese der Biosyntheseintermediate **1** und **2** ist darüber hinaus so konzipiert, daß Isotopenmarkierungen zum Studium der Biosynthese möglich sind.

Eingegangen am 13. März 1993 [Z 5920]

- [1] a) R. B. Herbert, *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*, Chapman and Hall, London, 1989, S. 31–62; b) D. O'Hagan, *The Polyketide Metabolites*, Horwood, New York, 1991.
- [2] K. Eckardt, D. Tresselt, G. Schumann, W. Ihn, C. Wagner, *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 1034–1039.
- [3] C. Wagner, K. Eckhardt, W. Ihn, G. Schumann, C. Stengel, W. F. Fleck, D. Tresselt, *J. Basic Microbiol.* **1991**, *31*, 223–240.
- [4] K. Eckardt, G. Schumann, U. Gräfe, W. Ihn, C. Wagner, W. F. Fleck, H. Thrum, *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 1096–1097.
- [5] L. F. Fieser, M. Fry, *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *62*, 3489–3494.
- [6] T. M. Harris, C. H. Harris, T. A. Oster, L. E. Brown Jr., J. Y.-C. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6180–6186.
- [7] M. Yamaguchi, K. Hasebe, H. Higashi, M. Uchida, A. Irie, T. Minami, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1611–1623.
- [8] U. S. Cheema, K. C. Gulati, K. Venkataraman, *J. Chem. Soc.* **1932**, 925–933.
- [9] E. Roemer, Dissertation, Universität Braunschweig, 1992.
- [10] G. Schumann, C. Stengel, K. Eckardt, W. Ihn, *J. Basic Microbiol.* **1986**, *26*, 249–255.
- [11] D. Tresselt, K. Eckardt, J. Tax, *Tetrahedron* **1975**, *31*, 613–617.
- [12] K. Krohn, M. Klimars, H. J. Köhle, E. Ebeling, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 3677–3694.
- [13] F. Arcamone in *Doxorubicin*, Academic Press, New York **1981**, S. 259–279.
- [14] C. Wagner, unveröffentlicht.

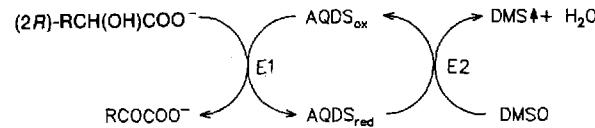
Selektive Dehydrierung von Aldon- und Aldarsäuren mit *R*-konfigurierter α -Position zu 2-Oxocarbonsäuren und Reduktion der Oxogruppe der *N*-Acetylneuraminsäure mit *Proteus mirabilis* **

Von Carsten Schinschel und Helmut Simon*

Professor Lothar Jaenicke zum 70. Geburtstag gewidmet

Region- und stereoselektive Reaktionen an Kohlenhydraten oder deren Derivaten ohne Schutzgruppen sind von erheblichem Interesse. So ist z.B. die mikrobielle Dehydrierung von *D*-Sorbit zu *L*-Sorbose durch *Acetobacter suboxidans* die Schlüsselreaktion der *L*-Ascorbinsäuresynthese. Wie wir fanden, dehydrieren entsprechend angezüchtete Zellen von *Proteus mirabilis* in Aldon- und Aldarsäuren selektiv und quantitativ ein in α -Position zur Carboxylatgruppe stehendes, *R*-konfiguriertes C-Atom zur Oxogruppe.

Die in Schema 1 dargestellte Reaktionsfolge ergab z.B. aus Aldonsäuren der Pentose- und Hexoserie Pent-2-ulosen- bzw. Hex-2-ulosenäuren. Wir führten die Reaktionen präparativ im Maßstab von 10 mmol in 100–200 mM Lösungen ohne Puffer mit ruhenden Zellen von *P. mirabilis* durch. *D*-Gulonat konnte sogar in 500 mM Lösung nahezu quantitativ dehydriert werden. Als artifizieller Elektronenmediator



Schema 1. Enzymatische Dehydrierung von (2*R*)-Aldon- und -Aldarsäuren. E1 = HVOR [(2*R*)-Hydroxycarboxylat-Viologen-Oxidoreduktase]; AQDS = Anthrachinon-2,6-disulfonat, E2 = Dimethylsulfoxid-Reduktase; DMSO = Dimethylsulfoxid; DMS = Dimethylsulfid. (2*S*)-RCH(OH)COO[−] wird nicht umgesetzt und bewirkt keine wesentliche Hemmung. Die Reste R ergeben sich aus Tabelle 1.

hat sich dabei das stabile und preiswerte AQDS ($E'_0 = -184$ mV) bewährt. Das von uns gefundene Enzym HVOR(E1) in *P. mirabilis* und *P. vulgaris*^[11] dehydriert (2*R*)-Hydroxycarboxylate und transferiert die Elektronen auf AQDS (1 mM), das sie an die in den Zellen ebenfalls vorhandene DMSO-Reduktase (E2) abgibt, die schließlich DMSO zu DMS reduziert. Dieses verläßt aufgrund seines niedrigen Siedepunkts und seiner geringen Wasserlöslichkeit das bei 38 °C gehaltene System. Es kann kondensiert und reoxidiert werden. Es ist aber auch möglich, mit Konzentrationen von ca. 200 mM AQDS die Reaktion nur mit der in den Zellen vorhandenen HVOR durchzuführen. Die Isolierung der Oxosäuren ist bei dieser Methode jedoch etwas aufwendiger. Die Säuren wurden als Natrium- oder Kaliumsalze erhalten.

Tabelle 1 faßt die Ergebnisse zusammen. Die mikrobiellen Reaktionen verliefen, bis auf einen Fall, nahezu quantitativ. Wie die Dehydrierungen von 6-Phospho-*D*-gluconat und 4-*O*-(*β*-*D*-Galactopyranosido)-*D*-gluconat (Lactobionat) zeigen, gelingt die Reaktion auch mit phosphorylierten oder glycosylierten Aldonaten einwandfrei. Die beiden Aldarsäu-

[*] Prof. Dr. H. Simon, Dr. C. Schinschel
Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der
Technischen Universität München
Lichtenbergstraße 4, D-85747 Garching
Telefax: Int. + 89/3209-3345

[**] Diese Arbeit wurde im Rahmen des Sonderforschungsbereich 145 von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der BASF AG und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Frau Dr. H. White danken wir für Hilfen bei der Zellanzucht, Frau N. Schmuderer für technische Assistenz und Prof. Dr. C. Wandrey (Jülich) für einige Gramm *N*-Acetylneuraminsäure.