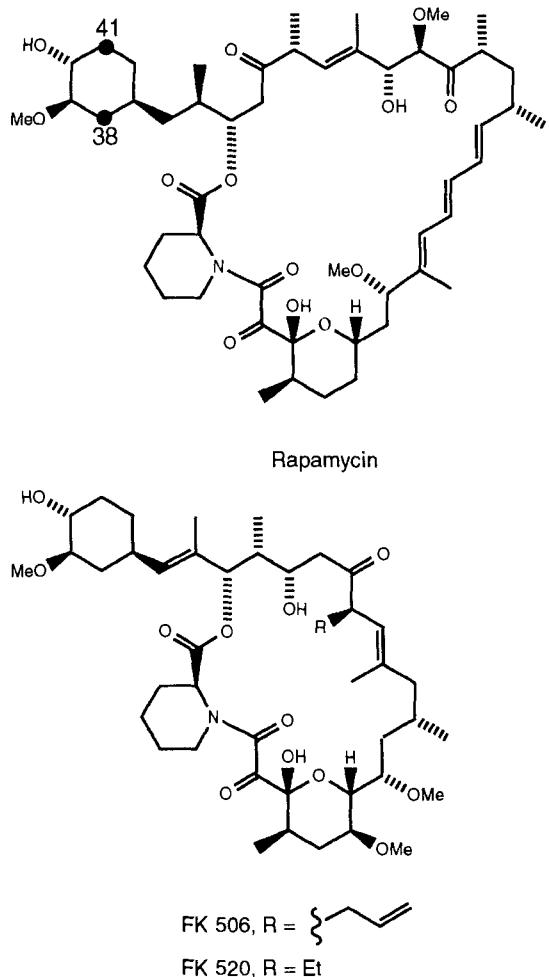


Die Startereinheit der Rapamycin-Polyketid-Synthase**

Philip A. S. Lowden, Günter A. Böhm,
James Staunton* und Peter F. Leadlay

Rapamycin, FK506 und FK520 sind strukturell verwandte Makrolide, die von Streptomykten produziert werden. Ihre stark immunsuppressiven Eigenschaften haben Chemiker zu



Totalsynthesen angeregt^[1] und Interesse an den molekularen Grundlagen der biologischen Aktivität dieser Verbindungen geweckt^[2]. Das therapeutische Potential einiger Analoga hat die Suche nach chemisch modifizierten Rapamycinen stimuliert^[3].

Fütterungsexperimente haben gezeigt, daß Rapamycin ein Polyketid ist^[4]. In jüngerer Zeit wurden große Fortschritte bei der Manipulation der Biosynthese von Polyketiden erzielt, und es ist nun möglich, unnatürliche Zwischenstufen zu produzie-

ren^[5]. Genaue Kenntnis der Rapamycinbiosynthese auf genetischer und enzymatischer Ebene wird die Voraussetzungen schaffen, um neue Rapamycinderivate durch Genmanipulation der beteiligten Enzyme zu erzeugen. Die vollständige DNA-Sequenz der Rapamycin-Polyketid-Synthase ist vor kurzem veröffentlicht worden^[6]. Ähnlich wie bei Erythromycin^[7] wird das Grundgerüst von Rapamycin von einer modularen Typ-I-Polyketid-Synthase (PKS) aufgebaut. Insgesamt 14 Kettenverlängerungsmodule sind in drei riesigen ($M = 660\text{--}1070\text{ kDa}$) multi-modularen Polypeptiden untergebracht. Die Module für den Beginn des Kettenaufbaus und die Freisetzung der Kette unterscheiden sich deutlich von denen der Erythromycin-PKS. Die Kettenfreisetzung wird von einem besonderen Multidomänen-enzym durchgeführt, das sowohl Pipocolat (2-Piperidincarbon-säure) einbaut als auch die Makrolactonisierung katalysiert^[6]. Vermutlich werden die ersten Schritte des Kettenaufbaus, um die es in dieser Veröffentlichung geht, ebenfalls deutlich anders als beim Erythromycin ausgeführt. Anstelle einer Acyl-Transferase und eines Acyl-Carrier-Proteins, die den ersten Baustein von der Thiolgruppe des CoA auf eine aktive Thiolgruppe der ersten Keto-Acyl-Synthase übertragen, enthält das Kettenstarter-Lademodul der Rapamycin-PKS eine Domäne, die einer Carbonsäure-CoA-Ligase (CL) ähnelt, und eine weitere, die vermutlich die Funktion einer Enoyl-Reduktase (ER) ausübt^[6]. Erneute Sequenzierung in unserem Labor hat ergeben, daß zwischen der ER- und der Keto-Acyl-Synthase-Domäne eine Domäne liegt, der vermutlich die Funktion eines Acyl-Carrier-Proteins zukommt.

Dem ungewöhnlichen Charakter des Kettenstarter-Lademoduls der Rapamycin-PKS entspricht der außergewöhnliche, substituierte Cyclohexanring am Beginn der Polyketidkette von Rapamycin, FK506 und FK520. Fütterungsexperimente mit ^{13}C -markierter Shikimisäure haben gezeigt, daß diese der Ursprung der Kohlenstoffatome des Cyclohexanringes in Rapamycin^[8] und FK520^[9] ist. Es konnte auch nachgewiesen werden, daß die O-Methylierung bei FK506 nach dem Aufbau des Makrolidringes erfolgt^[10]. Der Biosyntheseweg des ersten Bausteines könnte ausgehend von Shikimisäure **I** durch Wasserabspaltung und anschließende Reduktion zur Dihydroxycyclohexancarbonsäure **4** führen (Schema 1). **4** wird dann als Thioester aktiviert, um den Kettenaufbau einzuleiten. Dieser Weg ist demjenigen verwandt, der in *Alicyclobacillus acidocaldarius* zu den Cyclohexylfettsäuren^[11] und in *Streptomyces collinus* zu Ansatrienin A führt^[12]. Die frühen Stufen dieses Weges wurden auch für FK520 bestätigt^[9]. Ob aber die hier untersuchte Dihydroxycyclohexancarbonsäure **4** als Zwischenstufe auftritt, wurde bisher noch nicht untersucht.

Unser Ziel war es, vor Genmanipulationen der Rapamycin-PKS, durch In-vivo-Versuche herauszufinden, ob **4** tatsächlich die Startersäure ist. Die vermutete Vorstufe wurde mit vier ^2H -Atomen markiert (**4a**), da der Einbau dieser Verbindung zu leicht erkennbaren Veränderungen im Massenspektrum und einem charakteristischen $^2\text{H-NMR}$ -Spektrum führen sollte. Die Synthese baut auf Methoden auf, die von Ireland et al. und Corey et al.^[13] für die Synthese von FK506 entwickelt wurden (Schema 2). Die Kondensation von L-Äpfelsäure **5** mit Methylamin ergab das Imid **6**, das mit Acrylsäurechlorid zu **7** umgesetzt wurde. Diese Verbindung diente als Dienophil in einer TiCl_4 -katalysierten, asymmetrischen Diels-Alder-Reaktion mit Tetradeuteriobutadien (erhältlich durch thermische Zersetzung von käuflichem $2,2,5,5\text{-}^2\text{H}_4$ -Butadiensulfon), die nur ein Diastereoisomer des Diels-Alder-Adduktes **8** ergab. Nach Entfernung der chiralen Hilfsgruppe durch Behandlung mit Lithiumhydroxid und Wasserstoffperoxid wurde die markierte ($1R$)-Cyclohex-3-encarbonsäure **9** mit 84% ee erhalten. Die Hydroxy-

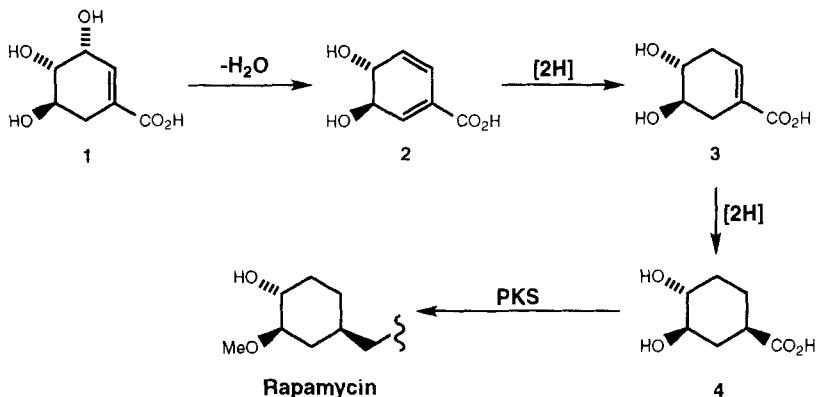
[*] Dr. J. Staunton, P. A. S. Lowden, Dr. G. A. Böhm

Department of Chemistry
University of Cambridge
Lensfield Road, Cambridge CB2 1EW (Großbritannien)

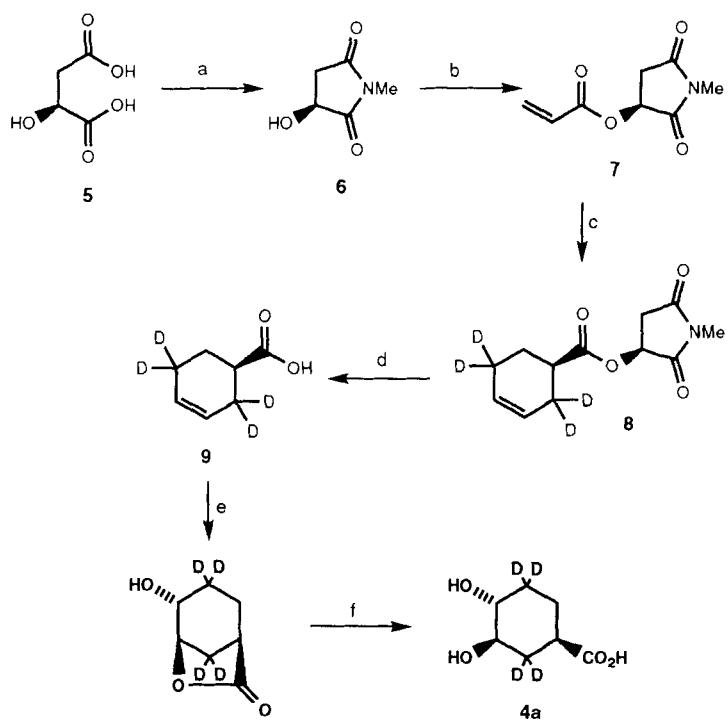
Telefax: Int. +1223/336913
E-mail: js24@cus.cam.ac.uk

Dr. P. F. Leadlay
Department of Biochemistry
University of Cambridge
Tennis Court Road, Cambridge CB2 1QW (Großbritannien)

[**] Diese Arbeit wurde vom Wellcome Trust gefördert. P.A.S.L. dankt dem Engineering and Physical Sciences Research Council für ein Stipendium.



Schema 1. Vorgeschlagener Biosyntheseweg von Shikimisäure 1 zur Rapamycin-Startereinheit 4.



Schema 2. Synthese der markierten Vorstufe 4a. a) 1. MeNH₂, 2. Erhitzen in Xylool (Rückfluß, 55%); b) Et₃N, Acrylsäurechlorid, -30 °C (56%); c) TiCl₄, ²H₄-Butadien, 0 °C (93%); d) LiOH, H₂O₂ (82%); e) 1. mCPBA, 2. Et₃N, 55 °C (60%); f) KOH, H₂O. THF (100%).

lactonisierung wurde durch Behandlung mit *meta*-Chlorperbenzoësäure (mCPBA) und Triethylamin erhalten. Die anschließende Hydrolyse ergab die ²H₄-Dihydroxycyclohexancarbonäsure 4a.

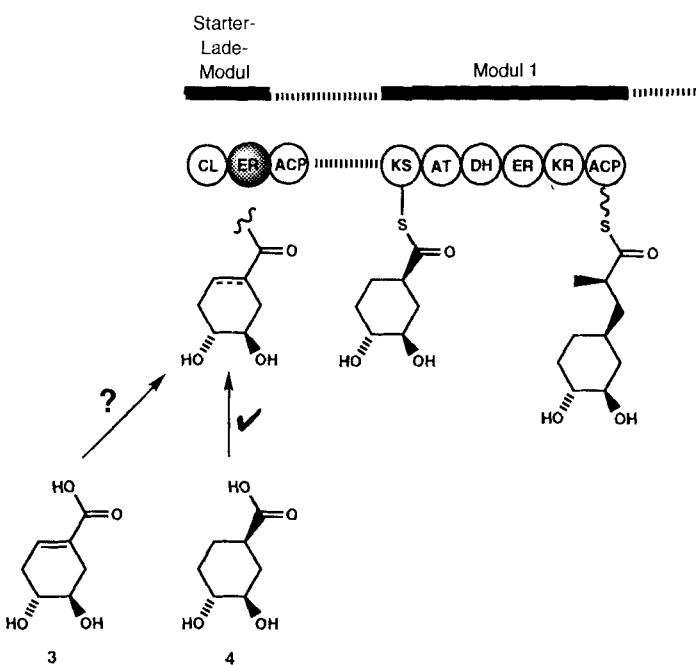
Die Verbindung wurde in zwei 0.5 mm Portionen, 24 h und 48 h nach Animpfung, an *Streptomyces hygroscopicus*-Kulturen (ATCC 29253, 1 L) verfüttert. Nach vier Tagen wurden die Mycelien geerntet, mit Methanol extrahiert und das erhaltene Rapamycin (0.01 mm) mit Umkehrphasen-HPLC gereinigt. Das Elektrospray-Massenspektrum des gereinigten Rapamycins zeigte die erwarteten Peaks bei 936.5 Da (Na-Addukt) und 952.5 Da (K-Addukt). Gleichzeitig enthielt das Spektrum die Peaks der vierfach mit Deuterium markierten Verbindung, die jeweils vier Masseneinheiten höher liegen. Diese Peaks wurden in Spektren von Extraktions unmarkierten Rapamycins nicht gefunden. Hochauflösende Massenspektrometrie des Peaks bei 940.5 Da bestätigte, daß es sich dabei um das Na-Addukt von Tetradeuteriorapamycin handelt. Der Vergleich der Peakintensitäten ergab, daß 44% des produzierten Rapamycins markiert

Tabelle 1. ²H-NMR-Daten des markierten Rapamycins in CHCl₃ bei 61.4 MHz. Chemische Verschiebungen (δ -Werte) sind relativ zum TMS-Signal angegeben. Die publizierten chemischen Verschiebungen beziehen sich auf die beiden Rotamere bezüglich der Amidbindung. Die Linienbreite betrug $\Delta\delta = 0.2$ –0.4.

δ gemessen	relative Intensität	Zuordnung	δ publiziert [14]
2.01	2	38-H (äq)	2.10, 2.09
		41-H (äq)	1.99, 1.97
1.26	1	41-H (ax)	1.33, 1.30
0.64	1	38-H (ax)	0.68, 0.64

waren. Das ²H-NMR-Spektrum der Verbindung konnte einem Rapamycin zugeordnet werden, in dem die erwarteten Positionen gleichmäßig mit Deuterium angereichert sind (Tabelle 1). Die NMR- und massenspektrometrischen Daten beweisen, daß der intakte Einbau der markierten Vorstufe an der erwarteten Stelle erfolgte. Die Wiederholung des Experiments in größerem Maßstab (3 L) ergab ähnliche Ergebnisse.

Der hohe Einbaugrad zeigt, daß 4a den natürlichen Starterbaustein ersetzen kann und deshalb ein Substrat für die CL-Domäne ist. Vermutlich wird 4a als Acyl-Adenylylat aktiviert, wie das von anderen Ligasen bekannt ist. Die Übertragung auf die Thiolgruppe der ersten Keto-Acyl-Synthase kann entweder direkt oder durch den 4'-Phosphopantethein-Arm der benachbarten ACP-Domäne erfolgen (Schema 3). Die Existenz einer der



Schema 3. Beziehung zwischen den Ergebnissen der Fütterungsexperimente und der Organisation der Rapamycin-Polyketid-Synthase (PKS). Dargestellt ist der N-Terminus des ersten Multienzyms mit der linearen Anordnung der aktiven Domänen. CL: Carbonsäure-CoA-Ligase, ER: Enoyl-Reduktase, ACP: Acyl-Carrier-Protein, KS: Keto-Acyl-Synthase, AT: Acyl-Transferase, DH: Dehydratase, KR: Keto-Reduktase.

Ligase benachbarten ER-Domäne legt den Schluß nahe, daß das normale Substrat der Ligase das ungesättigte Derivat 3 ist. Es ist denkbar, daß 3 vor der Aktivierung durch die CL-Domäne reduziert wird, was bedeuten würde, daß 4 das normale Substrat der CL wäre. Wird 3 jedoch vor der Reduktion aktiviert,

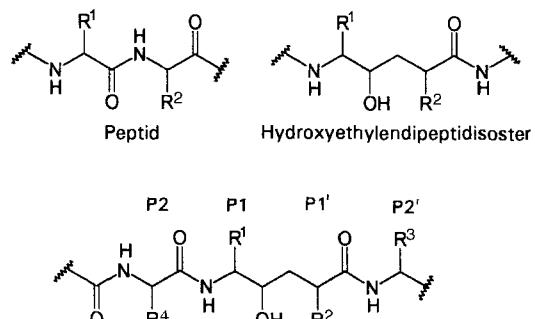
dann würde der Einbau von **4** auf eine nicht sehr hohe Selektivität der CL-Domäne hinweisen. Das wiederum würde bedeuten, daß die In-vivo-Erzeugung von Rapamycin-Analoga, die sich in der Startereinheit unterscheiden, möglich wäre.

Eingegangen am 15. April 1996 [Z 9031]

Stichworte: Biosynthesen · Polyketide · Rapamycin

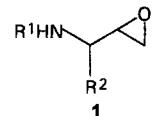
- [1] K. C. Nicolaou, A. D. Piscopio, P. Bertinato, T. K. Chakraborty, N. Minowa, K. Koide, *Chem. Eur. J.* **1995**, *1*, 318–333, zit. Lit.; A. B. Smith, S. M. Condon, J. A. McCauley, J. L. Leazer, J. W. Leahy, R. E. Maleczka, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5407–5408.
- [2] F. J. Dumont, Q. X. Su, *Life Sci.* **1995**, *58*, 373–395, zit. Lit.
- [3] J. I. Luengo, D. S. Yamashita, D. Dunnington, A. K. Beck, L. W. Rozamus, H.-K. Yen, M. J. Bossard, M. A. Levy, A. Hand, T. Newman-Tarr, A. Badger, L. Fauchette, R. K. Johnson, K. D'Alessio, T. Porter, A. Y. L. Shu, R. Heys, J. Choi, P. Kongsaeree, J. Clardy, D. A. Holt, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 471–481; H. Nishida, T. Sakakibara, F. Aoki, T. Saito, K. Ichikawa, T. Inagaki, Y. Kojima, Y. Yamauchi, L. H. Huang, M. A. Guadiliana, T. Kaneko, N. Kojima, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 657–666.
- [4] N. L. Paiva, A. L. Demain, M. F. Roberts, *J. Nat. Prods.* **1991**, *54*, 167–177.
- [5] S. Donadio, J. B. McAlpine, P. J. Sheldon, M. Jackson, L. Katz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 7119–7123; K. E. H. Wiesmann, J. Cortés, M. J. B. Brown, A. L. Cutter, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 583–589; C. M. Kao, G. Luo, L. Katz, D. E. Cane, C. Khosla, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9105–9106; R. McDaniel, S. Ebert-Khosla, D. A. Hopwood, C. Khosla, *Nature* **1995**, *375*, 549–554.
- [6] T. Schwecke, J. F. Aparicio, I. Molnár, A. König, L. E. Khaw, S. F. Haydock, M. Oliynyk, P. Caffrey, J. Cortés, J. B. Lester, G. A. Böhm, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7839–7843; J. F. Aparicio, I. Molnár, T. Schwecke, A. König, S. F. Haydock, L. E. Khaw, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Gene* **1996**, *169*, 9–16.
- [7] J. Cortés, S. F. Haydock, G. A. Roberts, D. J. Bevitt, P. F. Leadlay, *Nature* **1990**, *348*, 176–178; S. Donadio, M. J. Staver, J. B. McAlpine, S. J. Swanson, L. Katz, *Science* **1991**, *252*, 675–679.
- [8] N. L. Paiva, M. F. Roberts, A. L. Demain, *J. Ind. Microbiol.* **1993**, *12*, 423–428.
- [9] K. W. Wallace, K. A. Reynolds, K. Koch, H. A. I. McArthur, M. S. Brown, R. G. Wax, B. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11600–11601.
- [10] A. Shafiee, H. Motamed, T. Chen, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *225*, 755–764.
- [11] B. S. Moore, K. Poralla, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5267–5274.
- [12] B. S. Moore, H. Cho, R. Casati, E. Kennedy, K. A. Reynolds, U. Mocek, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5254–5266.
- [13] R. E. Ireland, T. K. Highsmith, L. D. Genas, J. L. Gleason, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5071–5073; E. J. Corey, H. Huang, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 5235–5238.
- [14] J. B. McAlpine, S. J. Swanson, M. Jackson, D. N. Whittier, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 688–690.

von Aspartat-Proteasen^[2] wie Renin^[3] oder der HIV-Protease^[4] synthetisiert. Neben den von Kempf^[5] entwickelten *C*₂-symmetrischen Hemmstoffen sind besonders die Hydroxyethylendipeptid-Isostere (HDI) von Interesse (Schema 1)^[4a].



Schema 1. Peptid und daraus abgeleitetes Hydroxyethylendipeptid-Isoster (oben) sowie verwendete P-Nomenklatur (unten).

Zur Herstellung dieser Verbindungen wurden seit den Pionierarbeiten von Szelke^[6] bereits einige Synthesewege erarbeitet^[7]. Bei einem gebräuchlichen Zugang wird das substituierte 2,3-Epoxypropylamin **1** als Schlüsselbaustein genutzt^[8, 9]. Im allgemeinen wird **1** aus Aminosäuren, z. B. über Aminoaldehyde^[10] als Zwischenstufen, synthetisiert. Die Substituenten in der P1-Position der HDI-Struktur werden in diesem Fall durch die eingesetzte Aminosäure festgelegt^[11]. Diese Limitierung schränkt die Vielfalt der Substituenten ein. Unpolare Reste in der P1-Position sind besonders vorteilhaft, um eine möglichst gute Paßform für das aktive Zentrum der Protease zu erhalten^[3a]. Ein variabler Zugang zu dem Schlüsselbaustein, der nicht durch die α -Substituenten der Aminosäuren begrenzt ist, bleibt daher gefragt. Wir stellen hier einen kurzen Weg zu einem leicht funktionalisierbaren, chiralen β -Aminoalkoholbaustein vor, mit dem in einfacher und variabler Weise unterschiedliche unpolare Reste in die P1-Position von HDIs eingebracht werden können. Dazu verwenden wir ein neues, nicht aus Aminosäuren abgeleitetes, kationisches β -Aminoalkoholäquivalent^[12].



Ausgehend von dem aus (*S*)-Äpfelsäure gut zugänglichen (*S*)-5-Chlormethyloxazolidin-2-on **2**^[13a] ((*R*)-5-Chlormethyloxazolidin-2-on ist aus (*R*)-Äpfelsäure erhältlich) kann durch elektrochemische Oxidation (quasi-geteilte Zelle; Graphit-Anode, Pt-Draht-Kathode; Stromdichte 50 mA cm^{-2} ; Leitsalz: Natriumbenzolsulfonat (0.1 M); Lösungsmittel: Methanol; $T = -10^\circ\text{C}$; $c(2) = 2.53\text{ mol L}^{-1}$; Ladungsmenge: 4.5 F mol^{-1}) (4*RS*,5*S*)-5-Chlormethyl-4-methoxyoxazolidin-2-on **3** mit einem *trans/cis*-Verhältnis von 5:1 in 76% Ausbeute erhalten werden^[13b]. **3** kann im 10-g-Maßstab hergestellt und bei 4°C ohne Zersetzung längere Zeit gelagert werden. Es ist als N,O-Acetal eine stabile Lagerform eines *N*-Acyliminium-Ions, das über die Chlormethylfunktion zusätzlich breit funktionalisierbar ist. Die Amidoalkylierung von **3** durch Methoxyaustausch mit unterschiedlichen Nucleophilen verläuft mit hoher Diastereoselektivität zu den entsprechenden *trans*-disubstituierten Oxazolidinonen **4** (Schema 2, Tabelle 1), den cyclischen Carbamaten der gesuchten β -Aminoalkohole.

Nach einfacher säulenchromatographischer Reinigung erhält man die *trans*-Isomere diastereomerenrein (GC). Die relative Konfiguration wurde durch NOE-Differenzspektroskopie bestimmt. Als Nucleophile wurden Cuprate, Dibenzoylmethan als Beispiel für eine CH-acide Verbindung sowie Allyltrimethylsilan

Ein neues chirales, kationisches β -Aminoalkoholäquivalent: variabler Zugang zu enantiomerenreinen Bausteinen für Hydroxyethylendipeptid-Isostere**

Karsten Danielmeier, Kerstin Schierle und Eberhard Steckhan*

Viele wichtige Peptidmimetica^[1] enthalten eine zentrale β -Aminoalkoholeinheit. Zahlreiche Verbindungen mit diesem Strukturmerkmal wurden in den letzten Jahren als Inhibitoren

[*] Prof. Dr. E. Steckhan, Dr. K. Danielmeier⁽⁺⁾, Dipl.-Chem. K. Schierle
Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität
Gerhard-Domagk-Straße 1, D-53121 Bonn
Telefax: Int. + 0228/73-5683
E-mail: steckhan@uni-bonn.de

[+] Neue Anschrift:
Bayer AG, Zentrale Forschung
D-51368 Leverkusen

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Ste 227/19-1), vom Fonds der Chemischen Industrie und von der BASF AG gefördert. K. D. dankt der Fritz-ter-Meer-, der Theodor-Laymann- und der Heinrich-Hörlein-Stiftung sowie dem Land Nordrhein-Westfalen für Stipendien.