

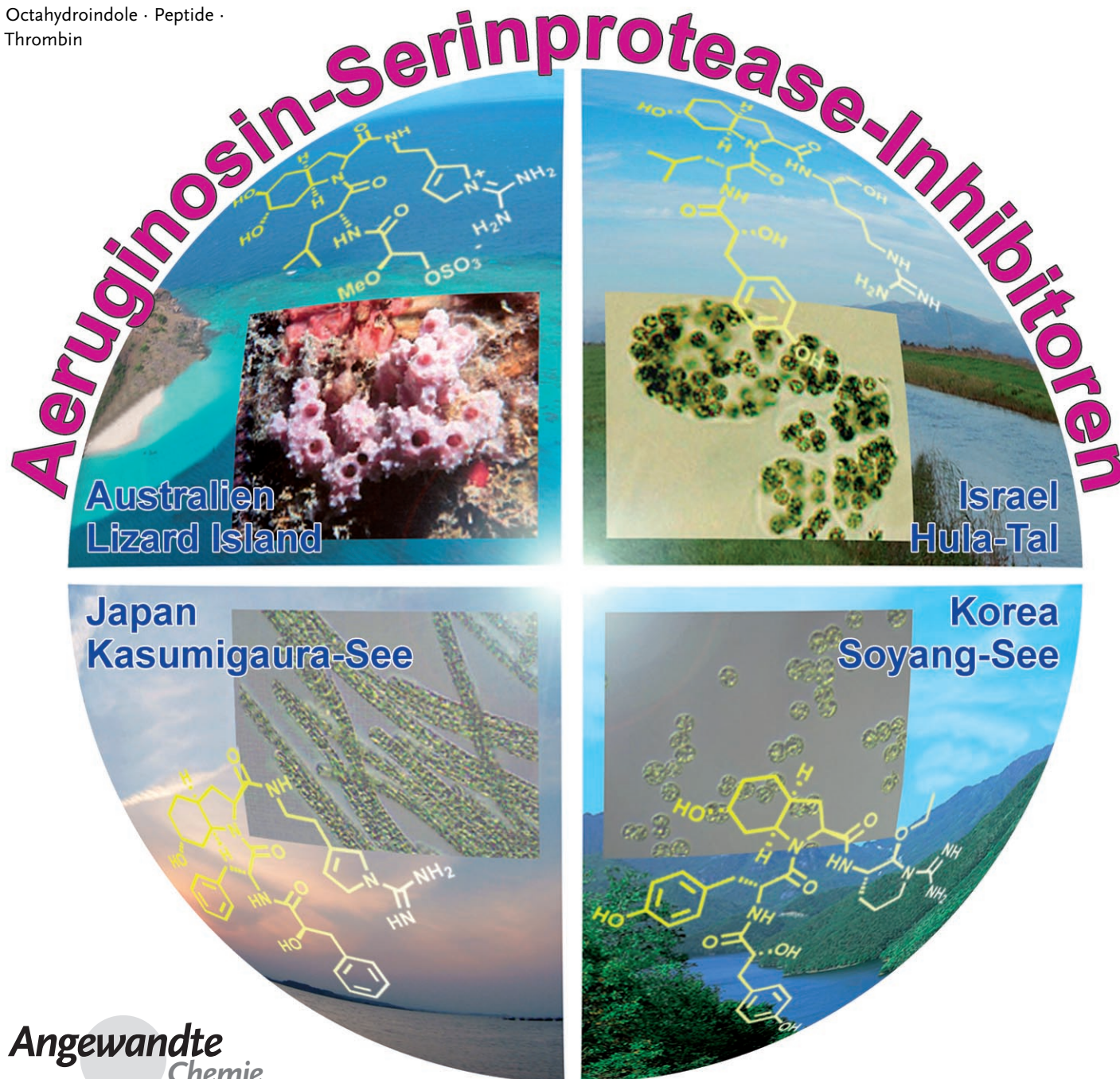
Serinprotease-Inhibitoren

Aeruginosine: Chemie und Biologie der Serinprotease-Inhibitoren

Karolina Ersmark, Juan R. Del Valle und Stephen Hanessian*

Stichwörter:

Inhibitoren · Naturstoffe ·
Octahydroindole · Peptide ·
Thrombin



Angewandte
Chemie

Die Aeruginosine wurden aus Meeresschwämmen und cyanobakteriellen Wasserblüten isoliert, die in phylogenetisch sehr unterschiedlichen und geographisch weit voneinander entfernten Gewässern vorkommen. Gemeinsam ist den Aeruginosinen eine zentrale Hydroxy- (oder Dihydroxy-)octahydroindolcarboxamid-Kerneinheit, an deren Carboxy- und Aminoende ungewöhnliche Aminosäuren zu einem linearen Peptid aufgereiht sind. Einige der Aeruginosine entfalten ausgezeichnete Serinprotease-Inhibitoraktivität *in vitro*, wofür drei wichtige pharmakophore Untereinheiten verantwortlich sind, die exakt angeordnet sein müssen: eine argininmimetische Untereinheit (P1) und zwei hydrophobe Reste an den Positionen P2 und P3, die bestimmte Wechselwirkungen eingehen können. In diesem Aufsatz bieten wir den ersten umfassenden Überblick über das chemische und biologische Verhalten der Aeruginosine. Besondere Aufmerksamkeit gilt dabei den Herkunftsorten der Substanzen, Strukturrevisionen und Totalsynthesen.

1. Einleitung

Schon seit langer Zeit dienen cyanobakterielle Wasserblüten als Quelle für biologisch interessante Sekundärmetaboliten.^[1–4] Ihr Name leitet sich von der Cyanfarbe der Algen ab, die diese Wasserblüten bilden. Enthaltene hepatotoxische cyclische Peptide wie die Microcystine^[5–7] und Nodularine^[8,9] sind die Hauptursachen für die gesundheitlichen Risiken beim Umgang mit den Blüten.^[10–12] Berichte über kontaminierte Wasservorräte und über die Vergiftung von Tierbeständen gaben Anlass, die von Frischwasser-Blualgen produzierten Substanzen näher zu untersuchen. Zu den interessantesten Ergebnissen gehört die Identifizierung einer neuen Klasse linearer Peptide, die als Aeruginosine bezeichnet wurden und die Inhibitoraktivität gegen Serinproteasen aufweisen. Im Rahmen von biologischen Screenings zur Identifizierung von Metaboliten, die von *Microcystis aeruginosa* produziert werden, gelang Murakami und Mitarbeitern 1994 die Isolierung von Aeruginosin 298A,^[13] einem Peptid, das zu einer neuen Klasse peptidischer Serinprotease-Inhibitoren gehörte. In den letzten zehn Jahren wurden dann weitere 20 Verbindungen isoliert, die strukturell und pharmakologisch mit Aeruginosin 298A verwandt sind. Einige von ihnen stammen von geographisch sehr unterschiedlichen Orten sowie von Quellen, deren Beziehung zur *Microcystis*-Wasserblüte unklar ist.

Die Aeruginosine inhibieren Serinproteasen unterschiedlich stark. Ihr Aktivitätsprofil kann durch eine hohe pharmakophore und strukturelle Homologie innerhalb der Familie erklärt werden. Fast alle Aeruginosine sind aus vier Untereinheiten aufgebaut: eine Hydroxy- oder Säuregruppe am N-Terminus, eine raumfüllende hydrophobe Aminosäure, als Kern ein 2-Carboxyperhydroindol und am C-Terminus eine Gruppe, die Guanidin enthält (Abbildung 1). Diese Anordnung von Struktur- und Funktionselementen ist die Grundlage für die Affinität zur katalytischen Bindungstasche

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	1221
2. Isolierung und Charakterisierung	1222
3. Biologische Aktivität	1226
4. Totalsynthesen	1230
5. Aeruginosin-Analoga	1238
6. Inhibitoren mit direkter Wirkung gegen Thrombin im klinischen Gebrauch	1239
7. Zusammenfassung und Ausblick	1239

2-Carboxy-6-hydroxyoctahydroindol (Choi)

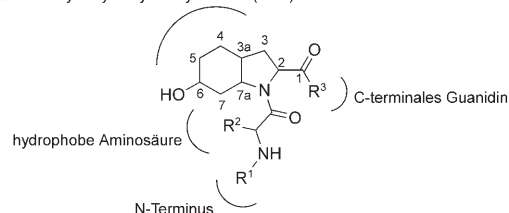


Abbildung 1. Allgemeine Struktur der Aeruginosine.

von Trypsin, Thrombin und anderen Serinproteasen aus der Blutgerinnungskaskade.

Die Aeruginosine sind wegen ihrer neuartigen Struktur und ihrer biologischen Aktivität auch interessant für die organische Synthese. Ungeachtet der stets identischen Anordnung von ähnlichen Untereinheiten wurden bei neu isolierten Aeruginosinen immer wieder zuvor unbekannte Aminosäuren und argininmimetische Untereinheiten entdeckt. Die

[*] Dr. K. Ersmark, Prof. S. Hanessian
Department of Chemistry
Université de Montréal
C.P. 6128, Station Centre-ville
Montréal, PQ, H3C 3J7 (Kanada)
Fax: (+1) 514-343-5728
E-Mail: stephen.hanessian@umontreal.ca
Prof. S. Hanessian
Department of Chemistry
University of California, Irvine
516 Rowland Hall
Irvine, CA 92697-2025 (USA)
Dr. J. R. Del Valle
Department of Chemistry and Biochemistry
New Mexico State University
1175 North Horseshoe Drive MSC 3C
Las Cruces, NM 88003 (USA)

meisten konzeptuell verschiedenen Syntheserouten zielten auf die Herstellung von Derivaten der 2-Carboxyperhydroindol-Kernstruktur. Bis zur heutigen Zeit ist die Totalsynthese von sieben Aeruginosinen gelungen; vier dieser Synthesen führten zur Revidierung der ursprünglich vorgeschlagenen Struktur.

Ziel dieses Aufsatzes ist es, einen Überblick über die chemischen und biologischen Eigenschaften der Aeruginosine zu geben. Nach einer Besprechung ihrer Isolierung und Charakterisierung folgt die Diskussion ihrer biologischen Aktivität sowie ihrer Synthese. Besondere Aufmerksamkeit gilt dabei neuen Methoden, die bei der Totalsynthese ausgewählter Aeruginosine zur Anwendung kamen.

2. Isolierung und Charakterisierung

Eine erstaunliche Quelle von Peptiden mit bemerkenswerter Struktur und biologischer Aktivität sind die toxischen

und nichttoxischen Stämme der Blaualgen, besonders die der Cyanobakterien der Gattung *Microcystis*. Die Suche nach den Gründen für die Toxizität der Algenblüten führte zur Isolierung von mehreren nichttoxischen Peptiden, die eine erhebliche Inhibitorwirkung gegen Serinproteasen ausüben. Unter diesen Peptiden waren auch die ersten bekannten Mitglieder der Aeruginosine.

Anfangs wurden die Aeruginosine als Naturstoffe eingeordnet, die das Cyanobakterium *Microcystis* produziert und die eine neue azabicyclische Aminosäure enthalten: das 2-Carboxy-6-hydroxyoctahydroindol (Choi), dessen allgemeine Struktur in Abbildung 1 zu sehen ist. Im Anschluss an die Isolierung des Thrombin- und Trypsin-Inhibitors Aeruginosin 298A (**1**)^[13] isolierte man aus Süßwasser-Cyanobakterien der Gattung *Oscillatoria* und auch aus Meeresschwämmen der Familie der *Dysideidae* lineare Peptide, die diesen Bicyclus enthalten und verwandte biologische Aktivität und Strukturmerkmale aufweisen. Trotz des unterschiedlichen Ursprungs haben sämtliche 21 hier vorgestellten Mitglieder der Aeruginosin-Familie die charakteristische 2-Carboxyperhydroindol-Kernstruktur mit *cis*-verknüpften Ringen und inhibieren fast alle *in vitro* Serinproteasen. Aus *Microcystis*-Kolonien wurden noch weitere Cyanopeptide identifiziert, die strukturell zu den Aeruginosinen gezählt werden, wie Aeruginosin 602, 670 und 678.^[14–17] Allerdings wurden diese Peptide, soweit wir wissen, bislang noch nicht vollständig charakterisiert und auch noch nicht auf ihre biologische Aktivität gegen Serinproteasen getestet. Aus diesem Grund werden sie hier nicht behandelt.

2.1. Aeruginosine aus *Microcystis aeruginosa*

In den frühen 1990er Jahren berichteten Murakami und Mitarbeiter^[18,19] von der Isolierung und Charakterisierung der neuartigen peptidischen Protease-Inhibitoren Microginin und Micropeptin A und B aus *Microcystis aeruginosa*. Gleich darauf folgte die Isolierung von Aeruginosin 298A (**2**) aus dem gleichen Cyanobakterium.^[13] 2D-NMR-spektroskopischen Studien zufolge enthält Aeruginosin 298A (**1**) vier Untereinheiten: Hydroxyphenylmilchsäure (Hpla), Leucin, einen Choi-Kern und ein reduziertes Arginin (Argol). In ihrem ersten Beitrag ordneten Murakami und Mitarbeiter^[13] auf der Grundlage von Studien zum Abbau und zur Derivatisierung des Säurehydrolysats von Aeruginosin 298A der Leucinamid-Untereinheit eine L-Konfiguration zu.

Tulinsky et al.^[20] publizierten 1998 die Kristallstruktur eines ternären Komplexes von **1**, gebunden an einen Hirugen-Thrombin-Komplex, bei einer Auflösung von 2.1 Å, was die Bestimmung der absoluten Konfiguration ermöglichte: Demnach hat die Hpla-Untereinheit eine D- und Leucin eine L-Konfiguration. Die stereogenen Zentren der 2-Carboxy-6-octahydroindol(Choi)-Aminosäure^[13] wurden als 2*S*,3*aS*,6*R*,7*aS* bestimmt, sodass die absolute Konfiguration L-Choi lautet, während die Argol-Untereinheit ebenfalls in L-Konfiguration vorliegt.

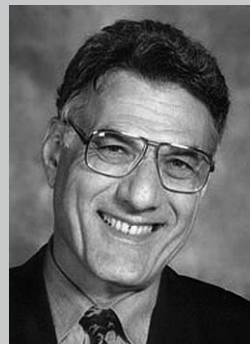
Aus der Kristallstruktur des ternären Komplexes ließen sich unerwartete Wechselwirkungen von **1** mit der Bindungstasche von Thrombin ablesen: Demnach besetzt das L-



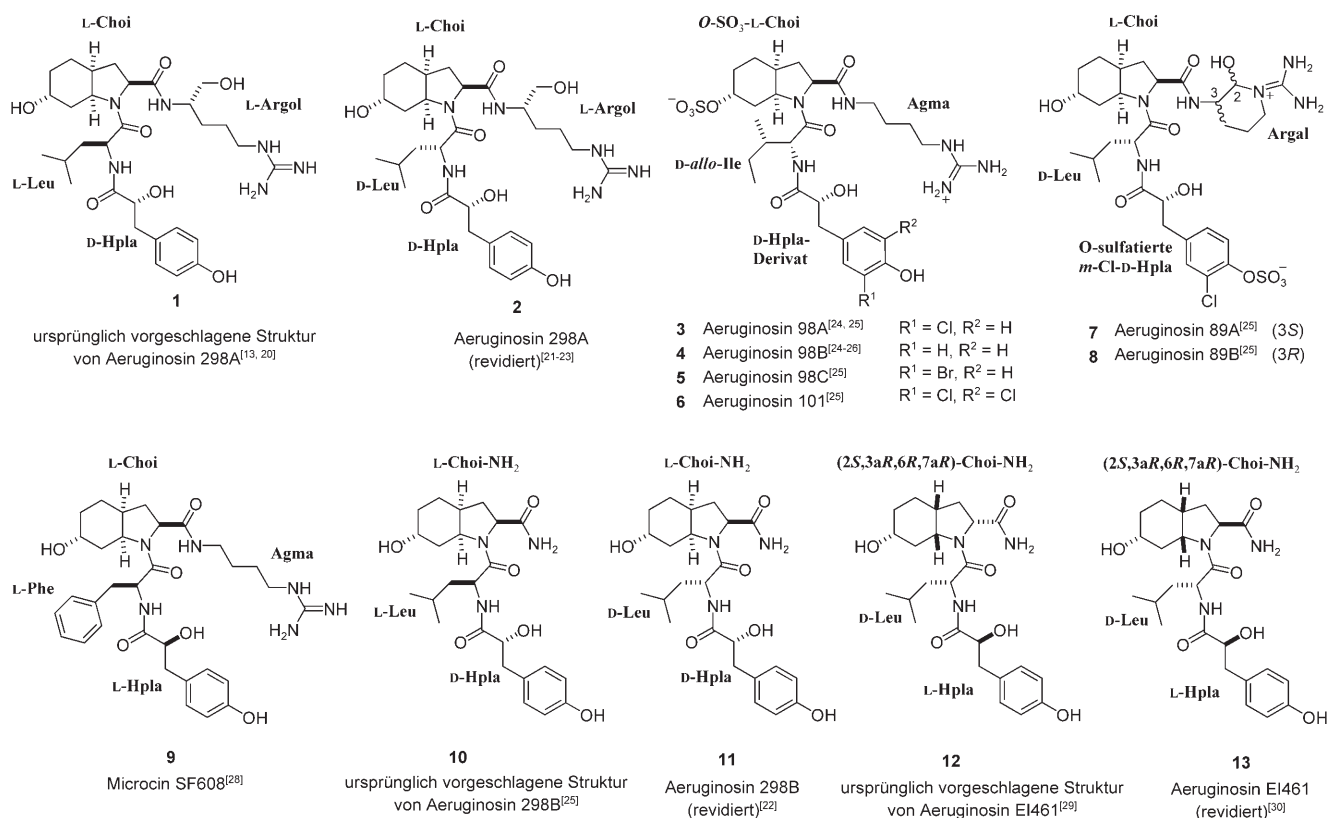
Karolina Ersmark erhielt 1999 den MSc an der Fakultät für Pharmazie der Universität Uppsala (Schweden). Im Jahr 2000 ging sie zu Anders Hallberg an das Institut für medizinische Chemie der Universität Uppsala und promovierte 2005 mit einer Doktorarbeit über „Design and Synthesis of Malarial Aspartic Protease Inhibitors“. Mit einem Postdoc-Stipendium der IF's Foundation for Pharmaceutical Research (Stockholm, Schweden) wechselte sie anschließend zu Professor Stephen Hanessian an die Université de Montréal (Kanada) und begann dort mit ihrer Forschung zu Aeruginosinen. Derzeit arbeitet sie bei Medivir (Schweden).



Juan R. Del Valle wurde 1977 in Milwaukee (USA) geboren. Er promovierte 2004 an der University of California, San Diego, bei Murray Goodman. Von 2004 bis 2006 war er Forschungsassistent bei Stephen Hanessian, wo er die Synthese von alkaloiden und Peptidnaturstoffen erforschte. Derzeit befasst er sich mit der Synthese von biologisch aktiven Peptidmimetika und Naturstoffen sowie der Entwicklung neuer Synthesemethoden. Er ist Assistant Professor für organische Chemie an der New Mexico State University.



Stephen Hanessian hat den Achaogen-Lehrstuhl am Department of Chemistry der Université de Montréal inne. Seit 2000 ist er außerdem Adjunct Professor für Chemie und pharmazeutische Wissenschaften an der University of California, Irvine, wo er den 2008 eingerichteten Studiengang „interdisciplinary MedChemPharm“ leiten wird. Stephen Hanessians Forschungsinteressen sind vielfältig und umfassen Naturstoffsynthese, medizinische Chemie, Methoden der organischen Synthese, Katalyse und asymmetrische Prozesse, molekulare Erkennung, Kohlenhydrate und Peptide sowie rechnergestützte Synthesen.



Leu trotz seiner mutmaßlichen L-Konfiguration die hydrophobe D-enantiomorphe S3-Tasche. Außerdem gibt es eine Wechselwirkung des Hpla-Rests mit der S3-Tasche, die eigentlich den L-Leucinrest beherbergen sollte. Diese Beobachtungen ließen die anfangs gemachten stereochemischen Zuordnungen zu Aeruginosin 298A wieder etwas zweifelhaft erscheinen. Diese Frage konnte erst beantwortet werden, als unabhängig voneinander die Arbeitsgruppen von Bonjoch^[21, 22] und Wipf^[23] die vorgeschlagene Struktur **1** infolge einer Totalsynthese revidierten (siehe revidierte Struktur **2**).

In den folgenden Jahren isolierten und charakterisierten Murakami und Mitarbeiter die Aeruginosine 98A (auch als Taihunisin bekannt), 98B, 98C und 101 (**3–6**) aus *Microcystis aeruginosa*.^[24, 25] Die Strukturen wurden durch 2D-NMR-Spektroskopie bestimmt, und die absoluten Konfigurationen wurden durch saure Hydrolyse des Peptids mit anschließender Derivatisierung und chiraler HPLC-Analyse mit Vergleichssubstanzen als Kontrolle ermittelt. Die absolute Konfiguration der Choi-Untereinheit wurde durch Derivatisierung und NMR-spektroskopische Analyse ermittelt. Die absolute Konfiguration von Aeruginosin 98B wurde durch die Röntgenstrukturanalyse eines ternären Hirugen-Thrombin-Komplexes bestimmt.^[26] Jede Struktur enthält einen D-Hpla-Rest, der bei den Aeruginosinen 98A, 98C und 101 am aromatischen Ring ein *meta*-Brom- oder Chloratom trägt. Alle vier Strukturen sind aus einer Kette von D-*allo*-Isoleucinrest (wobei die Seitenkette von *allo*Ile die entgegengesetzte Chiralität zu der von Ile hat), O-sulfatierter L-Choi-Kernuntereinheit und 4-Amidinobutylamid (Agmatin, Agma) aufgebaut.

Die Aeruginosine 89A (**7**) und 89B (**8**) wurden 1999 aus einem neuen *Microcystis-aeruginosa*-Stamm isoliert. Ihre Strukturen und absoluten Konfigurationen wurden so wie bei den schon beschriebenen Aeruginosinen ermittelt.^[25] Diese Peptide enthalten außer einem sulfatierten *meta*-Chlor-D-Hpla-Rest einen ungewöhnlichen C-terminalen Argininal-(Argal)-Rest. Wegen des Tautomerengleichgewichts der Argal-Einheit erwiesen sich die Trennung und stereochemische Zuordnung dieser Verbindungen als deutlich schwieriger. Daher wurden die Produkte des Peptidabbaus mit NaClO₂ oxidiert und die so entstehenden Arginine in Form ihrer Marfey-Derivate (d.h., vor dem Säulenauftrag wurden die Arginine mit dem chiralen Reagens 1-Fluor-2,4-dinitrophenyl-5-L-alaninamid oxidiert) durch HPLC analysiert.^[27] Aus den Befunden geht hervor, dass Aeruginosin 89A die L-Form und Aeruginosin 89B die D-Form von Argal enthält.

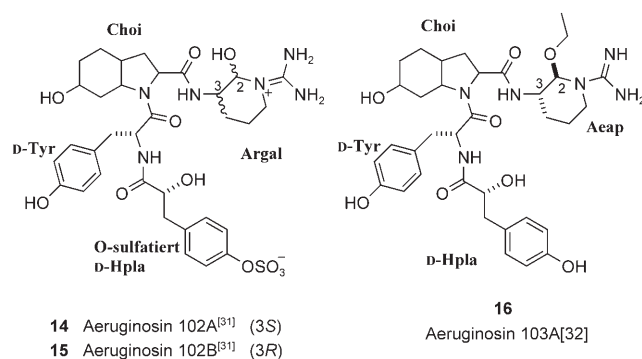
Im gleichen Jahr entdeckten Cameli und Banker^[28] während eines Screenings nach Protease-Inhibitoren aus einem nichttoxischen Stamm von *Microcystis aeruginosa* das Microcin SF608 (**9**). Eine Kombination von 2D-NMR-Spektroskopie und HPLC ermöglichte die vollständige Aufklärung der Struktur von Microcin SF608, die stark jener von Aeruginosin 298A gleicht. Microcin SF608 ist aus Agma-, L-Choi, L-Phe und L-Hpla-Untereinheiten aufgebaut. Der L-Phe-Rest in Microcin SF608 ist wohl eine Ausnahme, denn den Aminosäureresten aller anderen Aeruginosine wurde in den revidierten Strukturen eine D-Konfiguration zugeordnet.

Bei den beiden jüngst aus *Microcystis aeruginosa* isolierten Aeruginosinen liegt die Choi-Untereinheit in der gleichen Struktur vor, dagegen fehlen die sonst immer vorhandenen,

Guanidin enthaltenden C-terminalen Pharmakophore. Gemäß einer vollständigen Charakterisierung von Aeruginosin 298B^[25] (**11**) und EI461^[29] (**13**) sind die Peptide aus L-Hpla, D-Leu und einem C-terminalen Choi-Amid aufgebaut. Einer exakten Untersuchung von Kern-Overhauser-Effekt-(NOE)-Korrelationen des Choi-Amids von Aeruginosin EI461 zufolge ist das C6-Wasserstoffatom axial konfiguriert (H-6) und das Perhydroindol *cis*-anelliert. H-6 weist keine NOE-Korrelation zu den Wasserstoffatomen der Ringverknüpfung (H-3a und H-7a) auf, was eine unter den Aeruginosinen einzigartige Choi-Konfiguration andeutet. Ein Vergleich mit synthetischen 6 α - und 6 β -Isomeren von Boc-L-Choi-OMe lässt auf eine 2*S*,3*aR*,6*R*,7*aR*-Konfiguration schließen.^[30] Demnach verbleibt das Aeruginosin EI461 als einziger Aeruginosin-Naturstoff, bei dem H-2 in *anti*-Stellung zu H-3a und H-7a steht. Die ursprünglich vorgeschlagenen Strukturen von Aeruginosin 298B (**10**) und EI461 (**12**) wurden beide mithilfe einer Totalsynthese revidiert.^[22,30]

2.2. Aeruginosine aus *Microcystis viridis*

Drei neue Mitglieder der Aeruginosin-Familie wurden aus Kulturen des Süßwasser-Cyanobakteriums *Microcystis viridis* isoliert. Die Aeruginosine 102A (**14**) und 102B (**15**)



wurden 1996 durch ODS-HPLC-Trennung aus biologisch aktiven Extrakten isoliert.^[31] Wie auch bei Aeruginosin 89A und 89B ergab HPLC für beide Substanzen einen Satz von multiplen Peaks, die auch nach Trennung und erneuter Analyse bestehen blieben. Dies weist auf ein Tautomerengleichgewicht hin, das durch eine Argal-Untereinheit hervorgerufen wird. Aeruginosin 102A enthält den L-, 102B den D-Argal-Rest. Außerdem enthalten beide Verbindungen ein D-Hpla-Sulfat, D-Tyr sowie die Choi-Untereinheit. Die absolute Konfiguration der Choi-Untereinheiten der Aeruginosine 102A und 102B konnte zwar noch nicht bestimmt werden, aber NOE-Studien weisen auf eine relative Konfiguration hin, die mit derjenigen des L-Choi-Rests anderer Aeruginosine übereinstimmt.

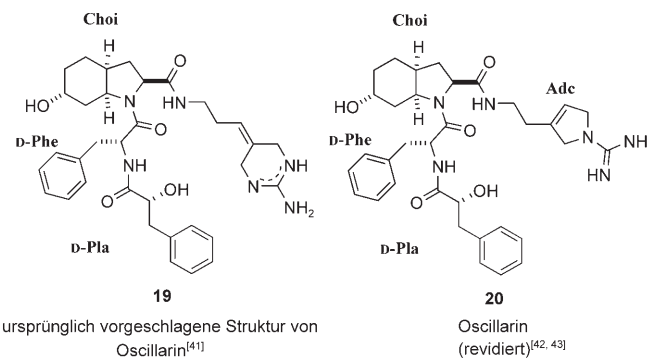
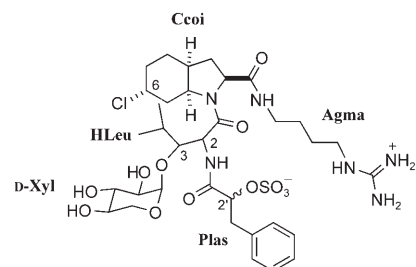
Zwei Jahre später wurde Aeruginosin 103A (**16**) isoliert und durch NMR-Spektroskopie und Peptidabbau analysiert.^[32] Die Derivatisierung der Hydrolysate ergab, dass **16** D-Hpla- und D-Tyr-Untereinheiten enthält. Durch 2D-NMR-Spektroskopie wurde ein Choi-Rest nachgewiesen, dessen

relative Konfiguration mit der des Choi-Rests der Aeruginosine 102A und 102B übereinstimmt. Die absolute Konfiguration dieser Untereinheit konnte allerdings nicht mit Sicherheit verifiziert werden.

Aeruginosin 103A enthält als Definitionsmerkmal ein cyclisches Ethylhemiaminal, das in die 1-Amidino-2-ethoxy-3-aminopiperidin(Aeap)-Untereinheit eingeschlossen ist. Die Kopplungskonstanten und NOE-Korrelationen des Aeap-Rests wurden dahingehend interpretiert, dass zwischen den axialen Wasserstoffatomen H-2 und H-4 sowie H-3 und H-5 eine *syn*-Beziehung besteht. Um die absolute Konfiguration von Aeap zu bestimmen, wurde Aeruginosin 103A mit CrO₃ in AcOH oxidiert, und anschließend wurden die Hydrolysate durch ODS-HPLC analysiert. Da ein L-Arg-Rest identifiziert wurde, konnte Aeap eine 1*R*,2*S*-Konfiguration zugeordnet werden.

2.3. Aeruginosine aus *Oscillatoria* sp.

1997 isolierten Murakami und Mitarbeiter^[33] zum ersten Mal Aeruginosine außerhalb der Gattung *Microcystis*. Das Cyanobakterium *Oscillatoria agardhii* wurde aus dem Kasumigaura-See in Japan gewonnen. Nach seiner Kultivierung wurden Extrakte mit signifikanter Inhibitoraktivität gegen Trypsin und Thrombin erhalten. Eine Reinigung durch HPLC an reverser Phase (RP-HPLC) ergab zwei zuvor unbekannte Aeruginosine, 205A (**17**) und 205B (**18**). Das charakteristische Isotopen- und Fragmentierungsmuster ließ auf ein Chloratom sowie eine Sulfatgruppe schließen. Mithilfe von 2D-NMR-Spektroskopie wurden fünf Untereinheiten folgender mutmaßlicher Strukturen identifiziert: Phenylmilchsäure-2-*O*-sulfat (Plas), 3-Hydroxyleucin (Hleu), 2-Carboxy-



6-chlorooctahydroindol (Ccoi), Agma und Xylopyranose (Xyl).

Zwar wurde anhand der NMR-Kopplungskonstante und durch NOE-Analyse für den Ccoi-Rest die relative Konfiguration bestimmt, aber die absolute Konfiguration konnte nicht sicher bestätigt werden. Die Hydrolyse der Peptide und Derivatisierung der Plas-Reste als Menthylester ergab eine L- und D-Plas-Konfiguration für die Aeruginosine 205A bzw. 205B. Den Hleu-Resten wurden durch Marfey-Analyse der Hydrolysate eine 2R,3S- bzw. 2S,3R-Konfiguration zugeordnet. Eine GC-Analyse an chiraler Säule der Abbauprodukte führte zur Zuordnung als D-Xylose.

Zur Zeit ihrer Entdeckung waren die Aeruginosine 205A und 205B die einzigen bekannten Glycopeptid-Aeruginosine und gehören zu den wenigen zuckerhaltigen Naturstoffen aus Cyanobakterien.^[1,2,34–38] Bei der Untersuchung ihrer Struktur wurden zwei neue Struktureinheiten entdeckt, nämlich Ccoi und Plas, und ein dritter Rest, Hleu, der unter Naturstoffen sehr selten ist.

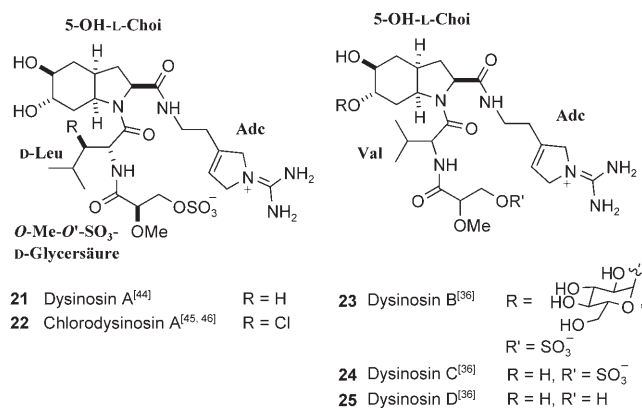
Die definitive Synthese des Ccoi-Kerns führte zu einer Diskussion über die Strukturen von Aeruginosin 205A und 205B.^[39] Ein Vergleich von NMR-Daten des synthetischen Ccoi und des Naturstoffs ergab eine Reihe von Unterschieden in den chemischen Verschiebungen, und zwar besonders in der Umgebung des Chloratoms. Beispielsweise verursacht das H-6-Methinproton im ¹H-NMR-Spektrum des synthetischen Ccoi ein Signal bei $\delta = 4.60$ ppm. Beim Naturstoff liegt jedoch das Signal dieses Protons bei $\delta = 3.83$ ppm. Da es auch bei den chemischen Verschiebungen im ¹³C-NMR-Spektrum erhebliche Abweichungen gibt, muss angenommen werden, dass sich das Chloratom von Aeruginosin 205A und 205B nicht am 2-Carboxyperhydroindol(Choi)-Kern befindet. Die Sulfatgruppe, die ursprünglich am Plas-Rest angenommen wurde, ist außerdem offenbar Bestandteil der α -Glycosid-Untereinheit.^[40]

Im gleichen Jahr der Veröffentlichung über die Isolierung der Aeruginosine **17** und **18** isolierten und charakterisierten Wissenschaftler der ehemaligen Boehringer Mannheim GmbH Oscillarin (**19**), das sie aus Algenkulturen von *Oscillatoria agardhii* (Universität Göttingen, ursprünglich aus dem Kasumigaura-See in Japan) gewonnen hatten.^[41] Die Struktur und die absolute Konfiguration wurden auf der Grundlage von NMR-Daten und einem teilweise gelösten Cokristallkomplex mit Trypsin bestimmt. Demzufolge ist Oscillarin aus D-Phenylmilchsäure (D-Pla), D-Phe, L-Choi und einer cyclischen, Guanidin enthaltenden P1-Untereinheit aufgebaut (siehe **19**). Die Struktur wurde später zu **20** revidiert, ohne an den Originaldaten etwas zu ändern.^[42]

Die Strukturrevision von Oscillarin (**20**) erfolgte anhand einer Totalsynthese. Bestätigt wurde die Struktur **20** durch eine hoch aufgelöste Röntgenstruktur eines Thrombin-Oscillarin-Komplexes. Demgemäß lag anstelle des ursprünglich vorgeschlagenen cyclischen Guanidins eine 1-(N-Amidino- Δ^3 -pyrrolino)ethyl-Untereinheit (Adc) vor.^[43] Dieses bemerkenswerte heterocyclische Adc-Motiv kommt auch in Dysinosinen^[36,44] (siehe Abschnitt 2.5) und in weiteren linearen Peptiden vor, die eine Azabicyclonon-Kerneinheit enthalten, darunter Suomilid^[37] sowie das kürzlich isolierte Banyasid A und B.^[38]

2.4. Aeruginosine aus Dysideidae-Schwämmen

In der Nähe von Lizard Island in North Queensland, Australien, wurde eine neue Schwammgattung und -art entdeckt, die zur Familie der *Dysideidae* gehört. Der Extrakt dieses Schwamms enthält einen peptidischen Thrombin-Inhibitor, der große Ähnlichkeit zu den Aeruginosinen aufweist. Dementsprechend ist das Dysinosin A (**21**), dessen Isolierung und Charakterisierung Quinn und Mitarbeiter 2002 beschrieben,^[44] ein funktionell neuartiges Aeruginosin aus einer anderen Weltregion.



Zur Strukturaufklärung von Dysinosin A wurde eine Kombination aus NMR-Spektroskopie und Abbaustudien eingesetzt, und die Konfigurationszuordnungen wurden durch die Kristallstruktur eines ternären Komplexes aus Dysinosin-A-Thrombin-Hirugen bestätigt.^[44] Dysinosin A enthält die gleiche Adc-Untereinheit wie Oscillarin. In der Perhydroindol-Kernstruktur von Dysinosin A gibt es eine zusätzliche Hydroxygruppe an der C5-Position in *trans*-axialer Orientierung. Bei den N-terminalen Resten handelt es sich um D-Leu und ein sulfatiertes Glycersäurederivat; letzteres wurde erstmals bei einem Aeruginosin nachgewiesen.

2003 isolierte und charakterisierte die ehemalige Pharmacia Corp. erstmals ein chloriertes Dysinosin-A-Derivat (**22**).^[45] Dieses Peptid, das hier als Chlordysinosin A bezeichnet wird, enthält offenbar ein 3-Chlorleucin (Cleu), eine bis dato in der Naturstoff-Literatur unbekannte Aminosäure. Durch NMR-spektroskopische und Abbaustudien konnte die Grundstruktur von **22** ermittelt werden, und die absolute Konfiguration wurde kürzlich über eine Totalsynthese und eine hochaufgelöste Kristallstruktur des Thrombinkomplexes bestätigt.^[46]

Drei zuvor unbekannte Aeruginosine wurden kürzlich aus Meeresschwämmen der Familie der *Dysideidae* isoliert. Die Dysinosine B, C und D (**23–25**)^[36] stammen alle aus *Lamellosysidea chlorea* und unterscheiden sich von Dysinosin A durch eine Substitution an der C6-Position sowie eine Hydroxygruppe an der Glycersäure. Außerdem enthalten diese Peptide an der Position des normalerweise enthaltenen Leu-Rests einen Val-Rest. So wie Aeruginosin 205A und 205B gehört auch Dysinosin B zu den Glycopeptid-Aeruginosinen.

3. Biologische Aktivität

Die biologische Aktivität der Aeruginosin-Naturstoffe wird hauptsächlich über ihre Inhibitorwirkung gegen Serinproteasen ausgedrückt (Tabelle 1). In manchen Fällen wurden auch andere Enzyme getestet, z.B. die Cysteinprotease Papain (Tabelle 1). Hohe Inhibitorwirkung zeigten die Naturstoffe gegen Serinproteasen mit trypsinartiger Substratspezifität. Diese Enzyme sind Bestandteil bei vielen wichtigen physiologischen Prozessen, und ihre Bedeutung in der Blutgerinnungskaskade ist gut erforscht.^[47,48] Die trypsinartigen Proteasen spalten, wie man weiß, Substanzen mit positiv geladenen Aminosäureresten in P1-Position. Das basische Arginin-Analogon am C-Terminus macht die Aeruginosine deshalb zu guten Kandidaten für den Einbau in das aktive Zentrum dieser Proteasen.

3.1. Inhibition von Faktoren der Gerinnungskaskade

Die Blutgerinnung läuft als komplexe Abfolge festgelegter Ereignisse ab, an der sowohl zelluläre Komponenten (d.h. Blutplättchen und Leukocyten) als auch Komponenten auf Proteinebene beteiligt sind (d.h. die Gerinnungsfaktoren und Cofaktoren). Zunächst aggregieren die Blutplättchen zu einem ersten Pfropf (primäre Hämostase), im Anschluss werden Gerinnungsfaktoren des Blutplasmas aktiviert, um Fibrin zu erzeugen, das die aggregierten Plättchen zu einem stabilen Fibrinpfpfropf verflechtet und verstärkt (sekundäre Hämostase).^[48–51] Die biochemische Gerinnungskaskade, die in der Herstellung von Fibrin mündet, läuft über zwei Reaktionswege ab, ein intrinsisches Kontakt-Aktivierungssystem und ein extrinsisches System von Gewebefaktoren (Ab-

bildung 2).^[48–51] Bei beiden Reaktionswegen erfolgt eine schrittweise Aktivierung von Proteasen. Die Wege vereinigen sich bei der Bildung von aktivem Thrombin, das als multifunktionelle Serinprotease^[52] die endgültige Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin bewirkt. Die Gerinnungskaskade wird durch positive Rückkopplungsmechanismen entlang beider Reaktionswege beschleunigt. Man geht mittlerweile davon aus, dass das extrinsische System, das über Gewebefaktoren gesteuert wird, den Hauptweg der Thrombinogenese bildet.^[51]

Die meisten Gerinnungsfaktoren sind trypsinartige Serinproteasen.^[48] Unter normalen physiologischen Bedingungen wird das Gerinnungssystem durch ein Antikoagulations- und ein Fibrinolyse-System im Gleichgewicht gehalten.^[53,54] Ein Ungleichgewicht dieser Mechanismen führt, je nachdem, welches System vorherrscht, zu Blutverklumpungen oder zum Bluten. Ein pathogenes Ungleichgewicht in Richtung Gerinnungssystem kann beim Menschen zu Thrombosen führen.

Die Thrombose und die damit einhergehenden Komplikationen sind die Hauptursachen für potenziell tödliche Herz-Kreislauf- und cerebrovaskuläre Erkrankungen.^[55] Derzeitige Antikoagulationstherapien wie die Verabreichung von Heparin und Cumarin haben nur enge therapeutische Zeitfenster, schwere Nebenwirkungen und/oder müssen parenteral verabreicht werden. Daher wurde die Entwicklung von neuen, direkt auf die Gerinnungsenzyme wirkenden Antikoagulantien intensiv erforscht.^[56–59] Die Tatsache, dass manche der Aeruginosine sehr gute Hemmwirkung gegen Blutgerinnungsfaktoren zeigen, macht sie damit als kleine Zielmoleküle bei der Suche nach neuen Antikoagulantien interessant, auch wenn sie für den direkten Einsatz beim Menschen zunächst nicht geeignet scheinen.

Tabelle 1: In-vitro-Inhibitoraktivität der Aeruginosine.

Verbindung	Enzym-IC ₅₀ [$\mu\text{g mL}^{-1}$] ^[a]						
	Thrombin	FVIIa	Trypsin	Plasmin	Chymotrypsin	Elastase	Papain
Aeruginosin 298A, 2 ^[13,25]	0.3	–	1.0	> 10	> 10	> 10	> 10
Aeruginosin 98A, 3 ^[24,25]	7.0	–	0.6	6.0	> 100	> 100	100
Aeruginosin 98B, 4 ^[24,25]	10.0	–	0.6	7.0	> 100	> 100	100
Aeruginosin 98C, 5 ^[25]	3.3	–	3.9	5.0	> 100	> 100	–
Aeruginosin 101, 6 ^[25]	3.2	–	3.0	3.3	> 100	> 100	–
Aeruginosin 89A, 7 ^[25]	0.03	–	0.4	0.02	> 10	> 10	> 10
Aeruginosin 89B, 8 ^[25]	0.05	–	6.6	0.46	> 10	> 10	> 10
Microcin SF608, 9 ^[28]	–	–	0.5	–	> 20.0	–	–
Aeruginosin 298B, 11 ^[25]	> 100	–	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
Aeruginosin EI461, 13 ^[29]	–	–	15% Inh. bei 45.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	–	0% Inh. bei 45.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	–	–
Aeruginosin 102A, 14 ^[25,31]	0.04	–	0.2	0.3	> 10	> 10	> 10
Aeruginosin 102B, 15 ^[25,31]	0.1	–	1.1	0.8	> 10	> 10	> 10
Aeruginosin 103A, 16 ^[32]	9.0	–	51.0	68.0	–	–	–
Aeruginosin 205A, 17 ^[33]	1.5	–	0.07	–	–	–	–
Aeruginosin 205B, 18 ^[33]	0.17	–	0.07	–	–	–	–
Oscillarin, 20 ^[41,43]	0.018*	2.5*[b]	0.024*[b]	> 260* (K)	–	–	–
Dysinosin A, 21 ^[46]	0.029*	0.206*	–	–	–	–	–
Chlordysinosin A, 22 ^[46]	0.0038*	0.026*	0.025*	–	–	–	–
Dysinosin B, 23 ^[36]	0.13* (K)	0.07* (K)	–	–	–	–	–
Dysinosin C, 24 ^[36]	0.34* (K)	0.077* (K)	–	–	–	–	–
Dysinosin D, 25 ^[36]	> 3.3* (K)	0.86* (K)	–	–	–	–	–

[a] Die in μM angegebenen IC₅₀- und K_i-Werte wurden in $\mu\text{g mL}^{-1}$ umgerechnet und durch einen Stern (*) markiert. [b] In unserem Labor produzierte, nicht publizierte IC₅₀-Werte. Freundliche Bereitstellung von AstraZeneca, Mölndal, Schweden.

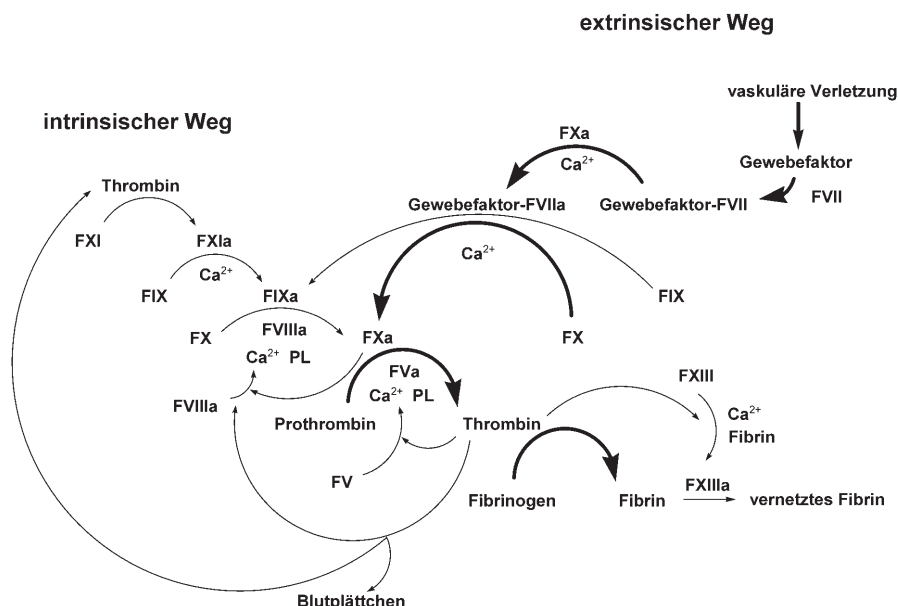


Abbildung 2. Die Blutgerinnungskaskade.^[51] Die aktiven Formen der Faktoren und Cofaktoren sind mit „a“ bezeichnet. F = Faktor, PL = Phospholipid.

Seine zentrale Bedeutung in der Blutgerinnungskaskade machte Thrombin zu einem vielversprechenden Zielenzym für die Entwicklung von Thrombosewirkstoffen. Einige Röntgenkristallstrukturen des Enzyms mit verschiedenen Inhibitoren wurden bereits gelöst und lieferten wichtige Informationen über die Wechselwirkung von Enzym und Inhibitor.^[60] Thrombin ist eine trypsinartige Serinprotease, die aus zwei durch Disulfidbrücken verbundenen Polypeptidketten besteht: A (36 Reste) und B (259 Reste).^[52] Die interessantesten Regionen im aktiven Zentrum von Thrombin, die für die Aeruginosin-Hemmstoffe infrage kommen, sind die S1-, S2- und D-S3-Positionen (Abbildung 3). Die auch als Spezifitätstasche bezeichnete S1-Unterregion ist durch einen Aspartatrest (Asp189) am „Taschenboden“ charakterisiert. Dieser Aspartatrest erkennt ionische Inhibitoren mit basischer P1-Seitenkette und geht mit ihnen ionische Wechselwirkungen ein. Thrombin unterscheidet sich von Trypsin durch einen Alaninrest in Position 190 der S1-Tasche, an der sich bei Trypsin ein Serin befindet.^[61] Die S1-Unterregion ist auch dem Oxyanion-Loch (den NH-Amidgruppen von Ser195 und Gly193 des Rückgrats) und der katalytischen Triade Ser195-His57-Asp102 eng benachbart. Bei der S2-Unterregion (auch: proximalen P-Tasche) von Thrombin handelt es sich um eine hydrophobe Tasche, die hauptsächlich aus Tyr60A und Trp60D der Insertionsschleife Tyr60A-Pro60B-Pro60C-Trp60D besteht.^[62,63] Die distale D-S3-Tasche ist ebenfalls hydrophob, allerdings größer als S2 und wird von den Seitenketten von Leu99, Ile174 und Trp215 gebildet. Diese Tasche, nach der Nomenklatur von Schechter und Berger^[64] die S4-Unterregion, wurde als D-S3-Unterregion neu definiert, da hier in der Röntgenstruktur des Komplexes mit D-Phe-Pro-Arg-Chlormethylketon (PPACK, Abbildung 3), einem prototypischen synthetischen Thrombin-Inhibitor, eine Bindung zu D-Phenylalanin vorliegt.^[65] Zusätzlich zu den genannten Regionen gibt es noch Wasserstoffbrücken zu mindestens einem der Ser214-Trp215-

Gly216-Reste gegenüber von der D-S3-Unterregion, die offensichtlich ebenfalls wichtig für die Inhibitorwirkung sind.^[56,58,63]

Der stärkste natürliche Inhibitor von Thrombin ist das Polypeptid Hirudin ($K_i = 20 \text{ fM}$).^[66] Hirudin, ein 65 Aminosäuren langes Peptid, kommt in den Speicheldrüsen des medizinischen Blutegels *Hirudo medicinalis* vor und wurde in den späten 1950er Jahren isoliert. An Thrombin bindet es bivalent, indem es sowohl mit dem aktiven Zentrum als auch mit der rückwärtigen „Fibrinogen bindenden Außenseite“ in Kontakt steht.^[67] Synthetische Thrombin-Inhibitoren werden im Allgemeinen auf Basis der D-Phe-Pro-Arg-Sequenz von PPACK hergestellt, die ihren Ursprung in den Spaltungsstellen von natürlichen Thrombin-substraten wie Fibrinogen hat.^[68] Die

allgemeine Struktur der Aeruginosine gleicht dieser Sequenz stark: eine hydrophobe D-Aminosäure, ein gespanntes bicy-

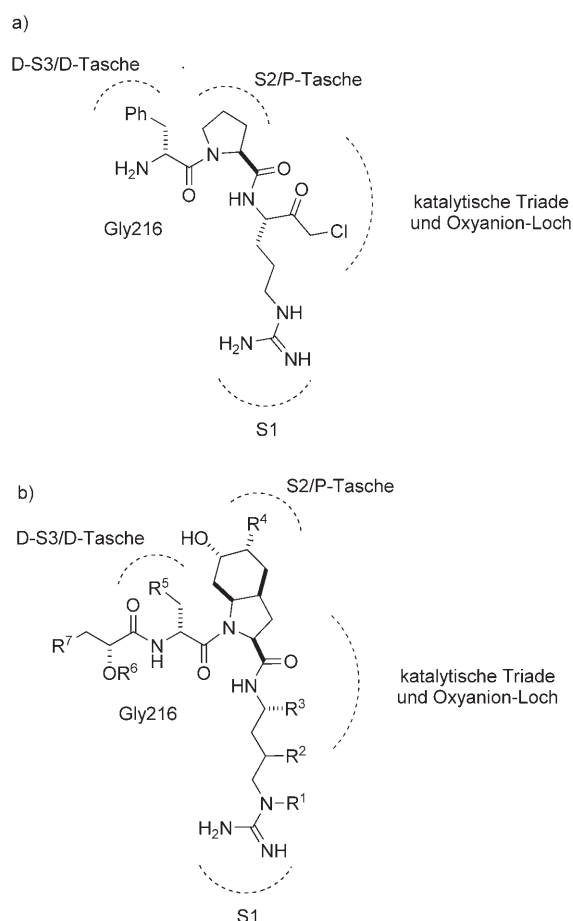


Abbildung 3. Aktives Zentrum von Thrombin in Verbindung mit a) dem D-Phe-Pro-Arg-analogen Inhibitor PPACK^[65] und b) den Aeruginosinen (abgeleitet aus den Röntgenkristallstrukturdaten).^[20,43,44,46]

clisches L-Prolin (Choi und OH-Choi) und eine Untereinheit, die ein basisches Arginin nachahmt.

Alle bekannten Aeruginosine außer Microcin SF608 und Aeruginosin EI461 wurden auf ihre Inhibitorwirkung gegen Thrombin getestet, wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist. Bislang wurden vier Röntgenkristallstrukturen von Thrombinkomplexen aufgeklärt: mit Aeruginosin 298A (1A2C),^[20] Dysinosin A (Abbildung 4a),^[44] Oscillarin (1RIW, Abbildung 4b)^[43] und Chlordysinosin A (2GDE, Abbildung 4c).^[46] Die erste veröffentlichte Kristallstruktur war ein Thrombinkomplex mit Aeruginosin 298A und wurde 1998 von Tulinsky und Mitarbeitern gelöst.^[20] Diese Struktur enthält in der D-S3-Unterregion für die P3-Leucin-Seitenkette einen ungewöhnlichen speziellen Bindungsmodus, der später durch das Vorliegen einer D- anstelle einer L-Konfiguration erklärt wurde.

In jüngerer Zeit wurde in den Kristallstrukturen von Thrombinkomplexen mit Dysinosin A,^[44] Oscillarin^[43] und Chlordysinosin A^[46] ein ähnlicher Bindungsmodus wie bei

Aeruginosin 298A entdeckt. Abbildung 3b zeigt schematisch den aus den vier veröffentlichten Kristallstrukturen abgeleiteten Bindungsmodus der Aeruginosine. Dieser Bindungsmodus ähnelt stark dem für PPACK (Abbildung 3a) und anderen ähnlichen Peptiden und entspricht einem antiparallelen β -Strang mit der Hauptkette (Gly216) im aktiven Zentrum von Thrombin. Aus der Röntgenstruktur des Chlordysinosin-A-Thrombin-Komplexes ergaben sich Unterschiede in der Position der Seitenketten von Glu192 und Arg173 verglichen mit den entsprechenden Positionen im Dysinosin-A-Thrombin-Komplex.^[46]

Die Aeruginosine wirken hemmend gegen Thrombin im mikro- bis nanomolaren IC_{50} -Wertebereich. Das wirkungsvollste bislang isolierte Aeruginosin ist Chlordysinosin A (Thrombin- IC_{50} = 0.0057 μ M (= 0.0038 μ g mL⁻¹ in Tabelle 1)). Essenziell für die Inhibitoraktivität gegen Thrombin scheint das basische P1-Arginin-Analogon zu sein. Aeruginosin 298B, das die gleiche Molekülstruktur wie Aeruginosin 298A hat, dem aber eine basische P1-Seitenkette fehlt, ist gegen Thrombin vollständig inaktiv (IC_{50} > 100 μ g mL⁻¹ in Tabelle 1).^[25] Gemäß den veröffentlichten Kristallstrukturen der Thrombinkomplexe von Aeruginosin 298A, Dysinosin A, Oscillarin und Chlordysinosin A ist die P1-Seitenkette tief in der S1-Spezifitätstasche vergraben und bildet mit der Guanidingruppe eine Salzbrücke über Wasserstoffbrücken zum Carboxylat von Asp189 (Abbildung 4a–c). Bei Aeruginosin 298A bildet außerdem die Argol-Hydroxygruppe mit der Seitenkette des katalytisch wirksamen His57 eine Wasserstoffbrücke.^[20] Im Allgemeinen haben Aeruginosine mit dem P1-Argal eine höhere Inhibitorwirkung in vitro als Aeruginosine mit P1-Argol oder Agmatin-Seitenkette (vgl. Aeruginosin 89A/B, 102A/B mit Aeruginosin 98A–C, 101, 205A/B, 298A, Tabelle 1). Dies zeigt, wie wichtig eine optimale P1-Seitenkette ist.^[25] Die Dysinosine sowie Oscillarin enthalten einen speziellen 1-(N-Amidino- Δ^3 -pyrrolino)ethyl-Rest als P1-Arginin-Analogon. Wird die cyclische fünfgliedrige Δ^3 -Pyrrolidin-Einheit von Oscillarin durch den ursprünglich vorgeschlagenen sechsgliedrigen Guanidin-Heterocyclus ersetzt, geht die Inhibitoraktivität gegen Thrombin vollständig verloren.^[43] Dies unterstreicht noch einmal, welche außerordentliche Bedeutung eine basische P1-Untereinheit mit der richtigen Orientierung hat, wenn ein hoher Grad an Thrombin-Inhibition in vitro erreicht werden soll.

Den Kristallstrukturen des Thrombinkomplexes von Aeruginosin 298A,^[20] Oscillarin,^[43] Dysinosin A^[44] und Chlordysinosin A^[46] zufolge ist das P2-Octahydroindol an der proximalen S2-Unterregion lokalisiert und geht dort Wechselwirkungen mit Tyr60A und Trp60D ein. Offenbar gibt es aber keine Wasserstoffbrücken zwischen der 6-Hydroxygruppe der Choi-Einheit oder den 5,6-Hydroxygruppen des Octahydroindols in OH-Choi mit dem aktiven Zentrum von Thrombin. Es wurde vorgeschlagen, den Octahydroindolkern für das bessere Verständnis der unterschiedlichen Selektivität für verschiedene Enzyme heranzuziehen. Sandler und Mitarbeiter^[26] spekulierten, dass die Trypsin-Selektivität des 6-O-sulfatierten Aeruginosin 98B darin begründet ist, dass die Sulfatgruppe im Fall von Thrombin in einer hydrophoben Tasche eingebettet ist – bei Trypsin weist diese Sulfatgruppe hingegen nach außen in das Lösungsmittel. Carroll und Mit-

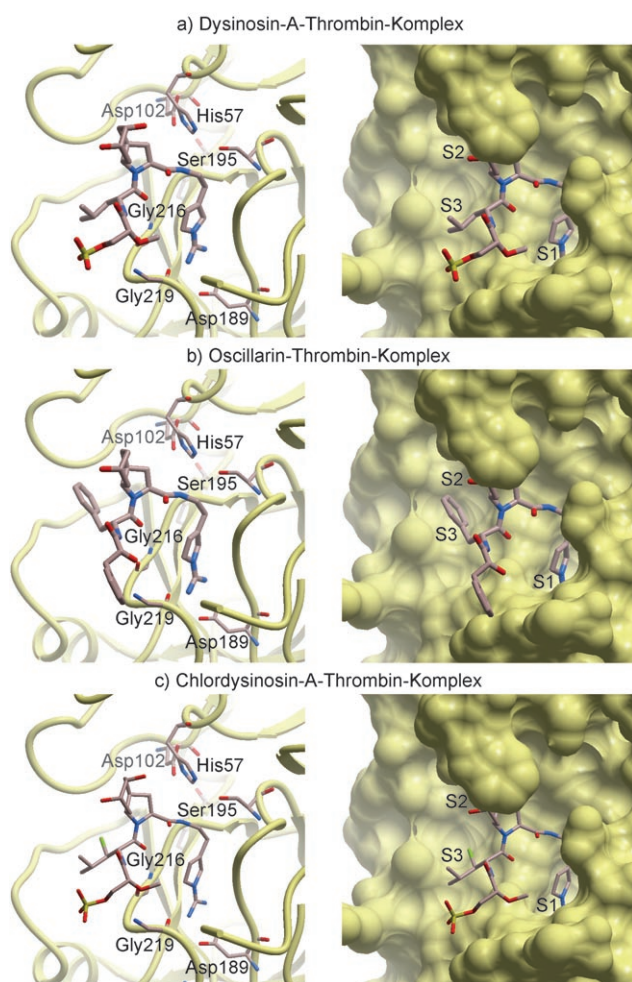


Abbildung 4. Aus Röntgenkristallstrukturdaten abgeleitete Darstellungen von Thrombinkomplexen mit Dysinosin A,^[44] Oscillarin (1RIW)^[43] und Chlordysinosin A (2GDE).^[46] grau C, rot O, blau N, gelb S, grün Cl. a)–c) Die für die jeweiligen Komplexe relevanten Aminosäuren im aktiven Zentrum: Banddiagramm- (links) und Connolly-Oberflächendarstellung (rechts) des Thrombinkomplexes mit Dysinosin A (a), Oscillarin (b), Chlordysinosin A (c).

arbeiter^[36] beobachteten zudem einen Abfall in der Selektivität zwischen Thrombin und FVIIa, wenn die Dysinosine eine 6-O-glycosidische Einheit enthalten. Sie schlugen daher vor, diese Region zur weiteren Untersuchung der Selektivität zwischen diesen beiden Enzymen näher zu betrachten (vgl. Dysinosin B mit Dysinosin A und C, Tabelle 1).

Die D-Aminosäuren der P3-Seitenkette der Aeruginosine besetzen die hydrophobe D-S3-Untereinheit in etwa wie das PPACK-D-Phenylalanin. Das Rückgrat des P3-P4-Teilstücks der Aeruginosine bindet an das Rückgrat des Gly216-Gly219-Strangs in antiparalleler β -Faltblatt-Konfiguration (Abbildung 4a–c). Das sehr aktive Chlordysinosin A, das sich von Dysinosin A nur durch ein Chloratom in β -Position der D-Leucin-Seitenkette unterscheidet, bindet an Thrombin in etwa wie Dysinosin A.^[46] Nur kleine Unterschiede in der Orientierung von wenigen Resten im aktiven Zentrum des Enzyms wurden beobachtet, nämlich von Arg173 und Glu192. Weder die Konformation der Leucin-Seitenkette noch die D-S3-Bindungsstelle des Proteins waren in der Kristallstruktur des Chlordysinosin-A-Komplexes anders (siehe Abbildung 4c). Die höhere Inhibitorwirkung resultiert möglicherweise aus einer besseren Ladungsverteilung, stärkeren hydrophoben Wechselwirkungen, einer besseren Einpassung des Chloratoms in die D-S3-Unterregion und einer Stabilisierung des χ^1 -Diederwinkels von Chlorleucin. Gestützt wird diese Hypothese einer konformativen Stabilisierung durch eine Simulation mit Molecular Dynamics.^[46] Außerdem wird wahrscheinlich durch die Bindung der chlor-substituierten P3-Seitenkette ein Wassermolekül freigesetzt, was einen Entropiegewinn mit sich bringt.

Einige der aktivsten Aeruginosine weisen an N-terminaler P4-Position eine saure Sulfatgruppe auf (z. B. Aeruginosin 89A/B, 102A/B, Dysinosin A–C und Chlordysinosin A; Tabelle 1). In der Kristallstruktur des Dysinosin-A-Thrombin-Komplexes geht diese saure Gruppe über mehrere Wasserstoffbrücken mit zwei Argininresten (Arg173 und Arg221) an der Oberfläche von Thrombin Wechselwirkungen ein.^[44] Da das desulfatierte Dysinosin D eine 10-mal niedrigere Aktivität gegen Thrombin als die sulfatierten Dysinosine A–C aufweist, trägt die P4-Sulfatgruppe vermutlich signifikant zur Bindung und zur Inhibitorwirkung bei.^[36] Allerdings hat Oscillarin, dem ebenfalls das P4-Sulfat fehlt, sogar eine noch höhere Inhibitorwirkung gegen Thrombin. Tatsächlich wurden keine Wechselwirkungen zwischen der terminalen P4-Phenylgruppe von Oscillarin und Thrombin in der Kristallstruktur gefunden (Abbildung 4b).^[43]

Außer Thrombin (FIIa) wurden noch weitere Faktoren der Gerinnungskaskade genauer untersucht. Unseres Wissens wurden bisher nur die Dysinosine und Oscillarin auf die Inhibition anderer Gerinnungsfaktoren als Thrombin untersucht (z. B. auf die Hemmung von Faktor VIIa und Faktor Xa; Tabelle 1). Bei einem Faktor-Xa-Assay von Chlordysinosin A und Dysinosin A wurden IC_{50} -Werte von 1.54 bzw. 5 μ M erhalten.^[46]

Noch ist keine Röntgenkristallstruktur eines Aeruginosins im Komplex mit Faktor VIIa bekannt, allerdings wird wegen der starken Homologie seines aktiven Zentrums zu demjenigen von Thrombin eine ähnliche Bindungsart angenommen.^[69,70] Wie bereits in diesem Abschnitt erwähnt, be-

einflusst nach Carroll und Mitarbeitern^[36] ein Zuckerrest am Octahydroindolkern – wie in Dysinosin B – die Selektivität zwischen FVIIa und Thrombin: Mit dieser Zuckereinheit steigt die Affinität für FVIIa etwas an (vgl. Dysinosin B mit Dysinosin A und C; Tabelle 1). Außerdem scheint eine N-terminale P4-Sulfatgruppe zur Bindung sowohl an Thrombin als auch an FVIIa beizutragen (vgl. Dysinosin D mit Dysinosin A–C; Tabelle 1).^[36] Zu dieser Beobachtung passt die schwache Aktivität von Oscillarin, das kein P4-Sulfat enthält, gegen FVIIa ($IC_{50} = 3.9 \mu$ M (= 2.5 μ g/mL in Tabelle 1)). Da gegen Thrombin dennoch eine hohe Aktivität vorliegt, ist die P4-Sulfatgruppe möglicherweise wichtiger für die FVIIa-Hemmung.

Chlordysinosin A weist unter allen Aeruginosinen die höchste Inhibitoraktivität gegen FVIIa auf ($IC_{50} = 0.039 \mu$ M (= 0.026 μ g/mL in Tabelle 1)).^[46] Der große Aktivitätsunterschied von Chlordysinosin A und Dysinosin A lässt darauf schließen, dass das P3-Chloratom die Bindung an FVIIa ähnlich positiv beeinflusst wie die an Thrombin.

3.2. Inhibition von Trypsin

Das Verdauungsenzym Trypsin wird häufig als Markerenzym für die Hemmung von trypsinartigen Serinproteasen eingesetzt. Eine Trypsinhemmung selbst ist möglicherweise interessant für die Behandlung von Krankheiten der Bauchspeicheldrüse wie der Pankreatitis.^[71] Im Jahr 1998 lösten Sandler und Mitarbeiter die Struktur eines Aeruginosin-98B-Trypsin-Komplexes.^[26] Erstaunlichstes Merkmal war, dass es keine Wechselwirkung zwischen Aeruginosin 98B und der katalytischen Triade von Trypsin (Ser195-His57-Asp102) gab. Damit könnte eine neue Inhibitor-Wirkungsweise gegen Serinproteasen vorliegen. Außer dieser Struktur ist bislang nur die teilweise gelöste Struktur eines im Komplex mit Trypsin kokristallisierenden Oscillarins bekannt, die die Boehringer Mannheim GmbH in einem Patent von 1997 veröffentlicht hat.^[42] Aeruginosin 98B bindet an Trypsin in etwa auf die gleiche Art wie die Aeruginosine in den Thrombin-Aeruginosin-Komplexen; seine Bindungsweise ähnelt stark derjenigen des Tripeptids D-Phe-Pro-Arg.^[72] Bei diesem Bindungstyp ist die basische P1-Seitenkette tief in der S1-Spezifitätstasche eingebettet, wo sie zwei starke Wasserstoffbrücken zum Carboxylat der Seitenkette von Asp189 bildet. Die Choi-Einheit befindet sich in der S2-Untereinheit, wobei die 6-O-Sulfatgruppe, die vielleicht hauptsächlich für die Selektivität für Trypsin gegenüber Thrombin verantwortlich ist,^[26] in die Lösungsumgebung hineinragt. Die D-*allo*Ile-Seitenkette in P3 liegt in der „Aryl-Bindungsstelle“ Trp215 und geht Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit Trp215 und Leu99 ein. Würde die Konfiguration von D-*allo*Ile zu L-Ile oder L-*allo*Ile geändert, käme es zu einer sterischen Behinderung zwischen der P3-Seitenkette und der Choi-Sulfatgruppe. Außerdem besteht zwischen dem Rückgrat von D-*allo*Ile und Gly216 eine antiparallele β -Faltblatt-Bindung. Über ein Wassermolekül in P4-Position, das auch in der Kristallstruktur von nicht komplexiertem Trypsin enthalten ist,^[73] kommt es zu einer Wechselwirkung der phenolischen Hydroxygruppe mit Cys220 und Ser146.

Die meisten Aeruginosine wurden auf ihre Inhibitorwirkung gegen Trypsin getestet (Tabelle 1). Nicht unerwartet war das Ergebnis, dass die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SARs) ähnlich sind wie bei der trypsinartigen Serinprotease Thrombin. Bis jetzt sind unter den natürlichen Aeruginosinen das Chlordysinosin A und Oscillarin am wirkungsvollsten, die beide IC_{50} -Werte gegen Trypsin von $0.037 \mu\text{M}$ aufweisen (0.025 bzw. $0.024 \mu\text{g mL}^{-1}$ in Tabelle 1). In Einklang mit der Substratpräferenz von Trypsin ist die Beobachtung, dass eine basische P1-Endgruppe für die Inhibition entscheidend zu sein scheint. Aeruginosin 298B, das keine basische P1-Gruppe trägt, ist gegen Trypsin inaktiv ($IC_{50} > 100 \mu\text{g mL}^{-1}$, Tabelle 1).^[25] Nach einem Vorschlag von Kodani und Mitarbeitern^[32] ist auch das raumfüllende Ethylhemiaminal von Aeruginosin 103A verantwortlich dafür, dass dieses Aeruginosin nur eine geringe Hemmwirkung gegen Trypsin zeigt ($IC_{50} = 51.0 \mu\text{g mL}^{-1}$, Tabelle 1). Laut Fukuta und Mitarbeitern^[74] könnte die unterschiedliche Trypsin-Hemmwirkung von Aeruginosin 298A und 102A an der P4-Sulfatgruppe liegen: Das aktivere Aeruginosin 102A enthält dieses Sulfat ($IC_{50} = 1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ für Aeruginosin 29A und $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ für Aeruginosin 102A, Tabelle 1).

3.3. Sonstige biologische Aktivitäten

Die Aeruginosine wurden auch auf ihre Aktivität gegen andere Zielenzyme getestet (Tabelle 1). Einige der natürli-

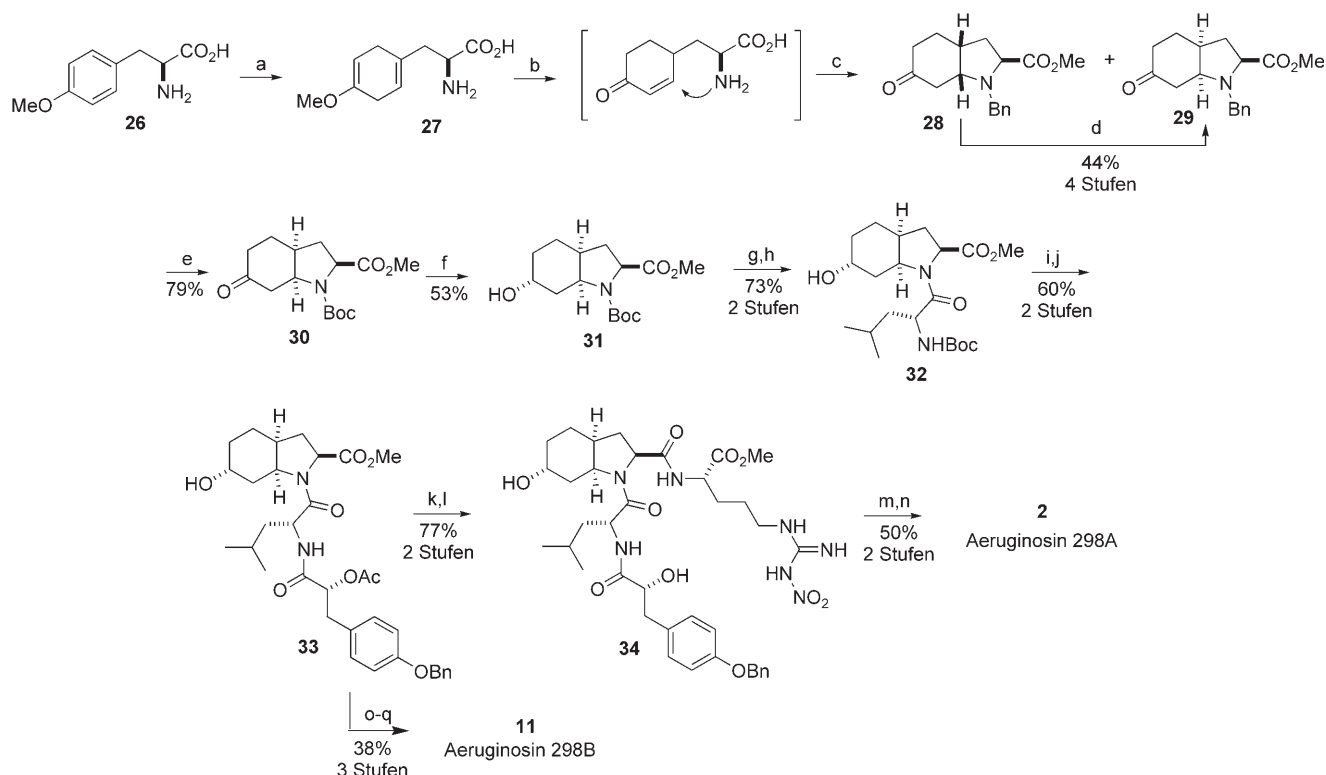
chen Aeruginosine inhibieren Plasmin, eine trypsinartige Serinprotease aus dem fibrinolytischen System (siehe Abschnitt 3.1). Plasmin ist wahrscheinlich auch bei der Angiogenese und Metastasenbildung bei Krebs im fortgeschrittenen Stadium beteiligt, was es zu einem möglichen Targetenzym für Tumortheraeutika macht.^[75] Als wirkungsvollster Plasmin-Inhibitor aus der Familie der Aeruginosine hat sich bislang Aeruginosin 89A herausgestellt ($IC_{50} = 0.02 \mu\text{g mL}^{-1}$, Tabelle 1).

Eine Inhibitorwirkung der Aeruginosine auf die Serinproteasen des Verdauungssystems Chymotrypsin und Elastase wurde bis jetzt noch nicht festgestellt (Tabelle 1). Ishida und Mitarbeiter^[25] testeten einige Aeruginosine auf ihre Wirkung gegen die Cysteinprotease Papain (Aeruginosin 89A/B, 102A/B, 98A/B und 298A/B, Tabelle 1), wobei aber nur in den Fällen von Aeruginosin 98A und 98B schwache Aktivitäten beobachtet wurden (in beiden Fällen IC_{50} -Werte von $100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Micocin SF608, das einzige auf seine Wirkung gegen die Metalloprotease Neprolysin getestete Aeruginosin, zeigte mit $20.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ keine Inhibition.^[28]

4. Totalsynthesen

4.1. Aeruginosin 298A und 298B

Der Isolierung von Aeruginosin 298A durch Murakami et al.^[13] 1994 folgte einige Jahre später die Röntgenkristall-



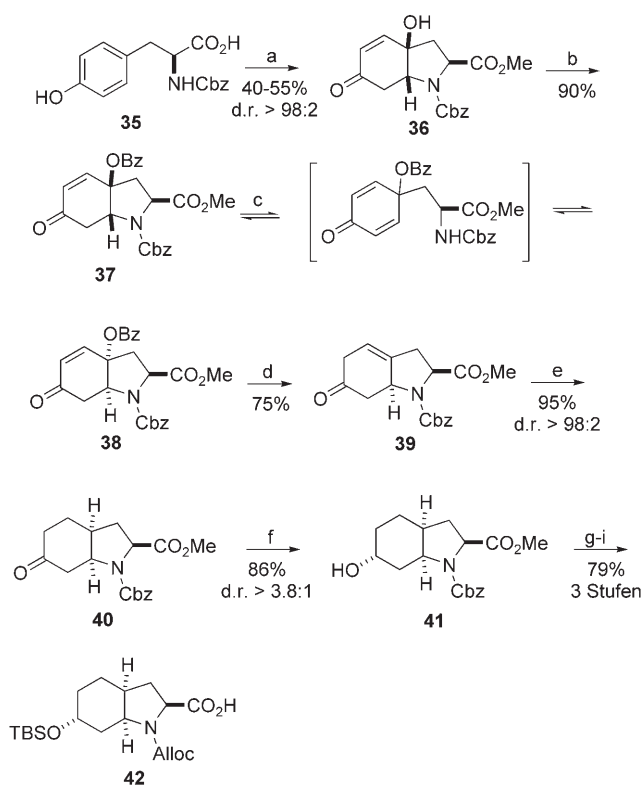
Schema 1. Die Synthese von Aeruginosin 298A nach Bonjoch et al. a) Li, NH_3 , THF/ $i\text{BuOH}$, -78°C ; b) MeOH, 7.5 N HCl, 35°C ; c) BnBr, NaHCO_3 , EtOH, 70°C ; d) MeOH, 8 N HCl, 65°C ; e) H_2 , Pd(OH) $_2$, Boc $_2\text{O}$, EtOAc; f) LS-Selectrid, THF, -78°C ; g) TFA, CH_2Cl_2 , 0°C ; h) Boc-D-Leu, BOP, NMM, CH_2Cl_2 ; i) TFA, CH_2Cl_2 , 0°C ; j) (O-Bn, O-Ac)-D-Hpla, BOP, NMM, CH_2Cl_2 ; k) 0.1 N LiOH/THF; l) L-Arg(NO $_2$)-OMe, BOP, NMM, DMF; m) LiBH_4 , THF; n) H_2 , Pd/C, EtOAc/MeOH, 6 N HCl, 1 atm; o) 0.1 N LiOH/THF; p) NH_4OH , PyBOP; q) H_2 , Pd/C.

struktur des an Hirugen-Thrombin gebundenen Naturstoffs.^[20]

Die absolute Konfiguration, die aus der Kristallstruktur erhalten wurde, diente als Grundlage für zwei Totalsynthesen. Ausgehend von L-Tyr(OMe)-OH entwickelten Bonjoch und Mitarbeiter^[76] eine effiziente Route zum L-Choi-Motiv [(2*S*,3*aS*,6*R*,7*aS*)-6-Hydroxyoctahydroindol-2-carbonsäure], das vielen Aeruginosinen eigen ist. Bei der ersten Totalsynthese von Aeruginosin 298A^[21] und 298B^[22] kam diese Methode zur Anwendung. Zuerst wurde über zwei Stufen der zentrale Azabicyclus hergestellt: durch Birch-Reduktion von **26** mit anschließender Säurespaltung des Enolethers sowie nachfolgender Michael-Addition des Amin-Nucleophils (Schema 1). Das daraus hervorgehende sekundäre Amin wurde direkt durch Zugabe von (Brommethyl)benzol in eine Isomerenmischung von **28** und **29** überführt. Diese Mischung wurde durch MeOH/wässr. 8*N* HCl ins thermodynamische Gleichgewicht gebracht, woraus das stabilere Isomer **29** mit 44 % Ausbeute aus **26** hervorging. Anschließend wurde das Intermediat **29** in **31** umgewandelt. Um zur gewünschten 6*R*-Konfiguration des Alkohols zu gelangen, mussten verschiedenste Reduktionsbedingungen für das Keton getestet werden. Eine optimale Selektivität in Richtung des 6*R*-Isomers (8:1) ergab dabei die Reduktion mit LS-Selectrid. Nach Fertigstellung des geschützten L-Choi-Derivats **31** konnten zum Aufbau von Aeruginosin 298A Standard-Peptid-Kupplungstechniken angewendet werden: Abspaltung der Boc-Schutzgruppe und BOP-vermittelte Kupplung an Boc-D-Leu-OH zum Dipeptid **32** mit 73 % Ausbeute. Nach dem gleichen Verfahren wurde auch die geschützte Hydroxyphenylmilchsäureeinheit eingeführt, die zuvor nach dem Verfahren von Wang et al. hergestellt worden war.^[77] Danach erfolgten die Hydrolyse des Methylesters und die Kupplung an L-Arg-(NO₂)-OMe-HCl, was die vollständige Vorstufe **34** ergab. Aus dieser wurde das Aeruginosin 298A schließlich durch Reduktion mit LiBH₄ mit anschließender Hydrogenolyse zur Entfernung der Schutzgruppen erhalten.

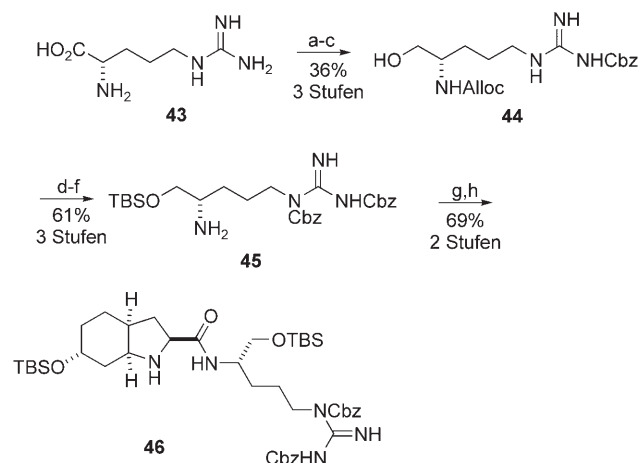
Bonjoch und Mitarbeiter^[21] waren die ersten, die Aeruginosin 298A gemäß der vorgeschlagenen Struktur synthetisierten, die auf der Grundlage der Kristallstrukturanalyse des ternären Komplexes eine L-Leu-Amid-Untereinheit enthalten sollte.^[20] Da das ¹H-NMR-Spektrum dieses Isomers **1** aber offensichtlich nicht mit dem des Naturstoffs übereinstimmte, wurde Aeruginosin 298A (**2**) nochmals gemäß einer revidierten Struktur, nämlich mit D-Leu, synthetisiert. Vor diesem Hintergrund stellten Bonjoch und Mitarbeiter^[22] auch aus **33** Aeruginosin 298B (**11**) her und bestätigten damit auch hier das Vorliegen einer D-Leu-Amid-Untereinheit.

Anders als die Arbeitsgruppe von Bonjoch, die eine Route über eine Tyrosin-Reduktion wählte, entwickelten Wipf und Mitarbeiter^[23] einen Reaktionsweg über eine Tyrosin-Oxidation, um zur Choi-Einheit zu gelangen, die sowohl bei den Aeruginosinen als auch bei anderen Alkaloidnaturstoffen vorkommt (Schema 2). Durch Zugabe von PhI(OAc)₂ und anschließende Behandlung mit Methanol/NaHCO₃ wurde **36** aus Cbz-L-Tyr-OH (**35**) mit einer Diastereoselektivität von d.r. > 98:2 gebildet. Wie beim Reaktionsweg über Tyrosin-Reduktion gelang der Erhalt der gewünschten Konfiguration der ringverknüpfenden Kohlenstoffatome durch



Schema 2. Die Synthese von Aeruginosin 298A nach Wipf et al. Synthese des L-Choi-Derivats **42**. a) PhI(OAc)₂, NaHCO₃, MeOH; b) Bz₂O, DMAP, Pyridin, CH₂Cl₂; c) NaHCO₃, DMSO, 90 °C; d) Zn-Staub, AcOH/THF, 65 °C; e) H₂, 5 % PtO₂, 10 % AcOH/EtOH, 0 °C; f) L-Selectrid, THF, -78 °C; g) TBSOTf, ImH, CH₂Cl₂; h) H₂, Pd/C, EtOH, dann AllocCl, Pyridin; i) LiOH, THF/H₂O, 40 °C.

die Einstellung eines thermodynamischen Gleichgewichts: Durch Ringöffnung zu einem Cyclohexadienon und anschließenden Ringschluss durch Michael-Reaktion wurde das benzylierte Derivat **37** in das stabilere Isomer **38** umge-

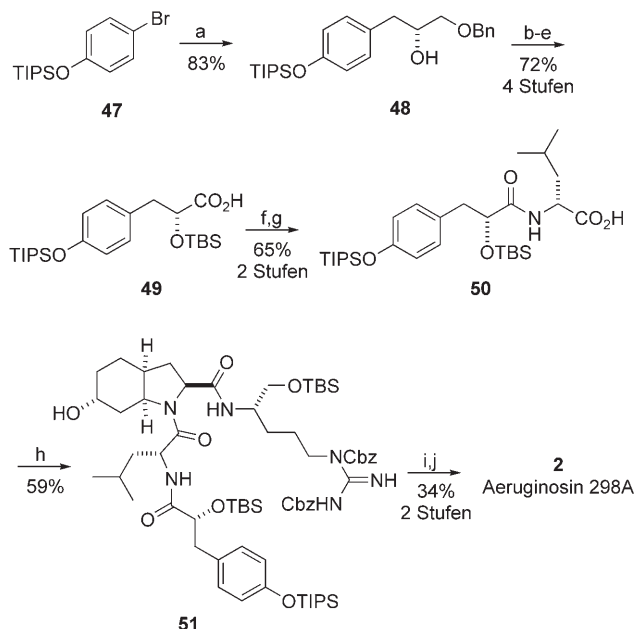


Schema 3. Die Synthese von Aeruginosin 298A nach Wipf et al. Synthese des Amids **46**. a) AllocCl, wässr. NaOH; b) CbzCl, wässr. NaOH, THF; c) IBCF, NMM, DMF, -20 °C, dann NaBH₄; d) TBSOTf, ImH, CH₂Cl₂; e) CbzCl, DMAP, K₂CO₃, DMF; f) Bu₃SnH, [Pd(PPh₃)₄], AcOH, CH₂Cl₂; g) **42**, FDPP, DIEA, CH₂Cl₂; h) Bu₃SnH, [Pd(PPh₃)₄], AcOH, THF.

wandelt. Die dabei in einem Verhältnis von 1.6:1 entstehenden Produkte wurden getrennt, und **38** wurde in 78% Ausbeute isoliert, was durch Recycling von wiedergewonnenem **37** möglich war. Anschließend wurde der Benzoatester mit Zn-Staub oder SmI_2 reaktiv entfernt und das entstehende β,γ -ungesättigte Keton **39** zum *cis*-verknüpften azabicyclischen Keton **40** hydriert. Die anschließende Reduktion der Ketofunktion mit L-Selectrid lieferte eine 3.8:1-Mischung von *exo*- und *endo*-Hydroxygruppen. Das Hauptprodukt **41** wurde als TBS-Ether geschützt, und nach Austausch der Cbz-Schutzgruppen mit Alloc und Spaltung des Methylsters wurde das Choi-Derivat **42** erhalten.

Das Argol-Fragment wurde aus L-Arg-OH (**43**) hergestellt, indem zuerst nacheinander die α -Amin- und Guanidingruppe geschützt wurden und anschließend die geschützte Aminosäure zum primären Alkohol **44** reduziert wurde (Schema 3). Eine Schutzgruppenmanipulation führte zu **45** in 22% Ausbeute ausgehend von Arginin. Das Choi-Argol-Fragment wurde durch eine Pentafluorphenylester-vermittelte Kupplung des Amins **45** an die Säure **42** in 69% Ausbeute erhalten. Die Abspaltung der Alloc-Gruppe unter Normalbedingungen ergab die Untereinheit **46**.

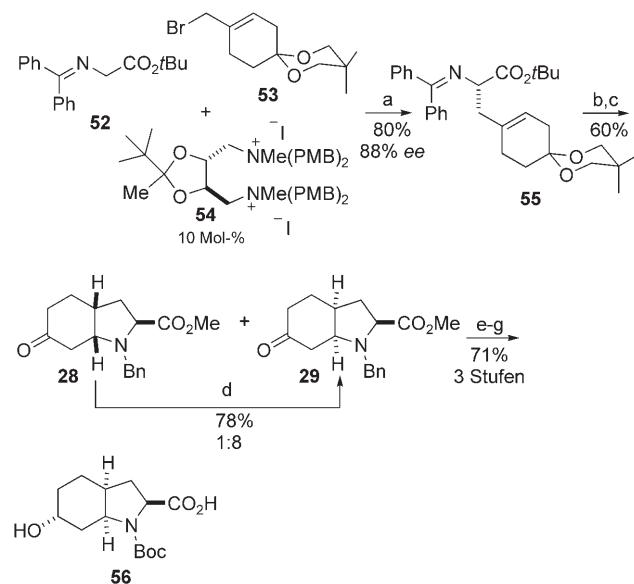
Schema 4 veranschaulicht die Synthese eines passend geschützten Hpla-Leu-Fragments und die abschließende Vereinigung mit **46** zu Aeruginosin 298A.^[23] Zur Herstellung der Hpla-Untereinheit wurde zunächst (*R*)-Benzylglycidol mit Arylcuprat zu **48** umgesetzt. Nach dem Schützen der Alkoholfunktion als TBS-Ether wurde der Benzylether durch Hydrogenolyse entfernt und der entstehende Alkohol zur Carbonsäure **49** oxidiert. Die Kupplung an D-Leu-OBn mit



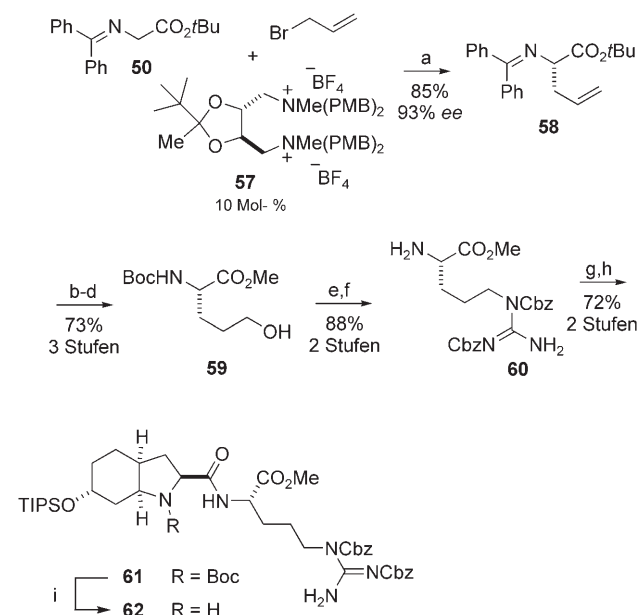
Scheme 4. Die Synthese von Aeruginosin 298A nach Wipf et al. Abschließende Syntheseschritte. a) $t\text{BuLi}$, $\text{CuBr}\cdot\text{SMe}_2$, THF, -78°C , dann (*R*)-Benzylglycidol, $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$, -45°C – -20°C ; b) TBSOTf, ImH , CH_2Cl_2 ; c) H_2 , Pd/C, EtOAc ; d) DMP, CH_2Cl_2 ; e) NaClO_2 , NaH_2PO_4 , 2-Methyl-2-buten, $t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$; f) L-Leu-OBn, DEPC, DIEA, CH_2Cl_2 ; g) H_2 , Pd/C, EtOH ; h) **46**, DEPBT, DIEA, CH_2Cl_2 ; i) wässr. HF; j) H_2 , Pd/C, EtOH .

anschließender Esterspaltung durch Hydrogenolyse ergab **50**. Die Fragmente **50** und **46** wurden in Gegenwart von DEPBT^[23,78,79] zum Zwischenprodukt **51** in 59% Ausbeute verknüpft. Nach Entfernen der Silyl- und Cbz-Schutzgruppen wurde Aeruginosin 298A (**2**) erhalten.

Shibasaki und Mitarbeiter^[74,80] wählten eine Syntheseroute zur L-Choi-Untereinheit, die Phasentransfer-katalysierte asymmetrische Alkylierungen umfasst (Schema 5).



Scheme 5. Die Synthese von Aeruginosin 298A nach Shibasaki et al. Synthese des L-Choi-Derivats **56**. a) $\text{CsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, Toluol/ CH_2Cl_2 (7:3), -70°C ; b) 4 N HCl, MeOH; c) BnBr, NaHCO_3 , EtOH ; d) konz. HCl; e) H_2 , Pd/C, Boc_2O ; f) LS-Selectrid, THF, -78°C ; g) wässr. LiOH/MeOH.

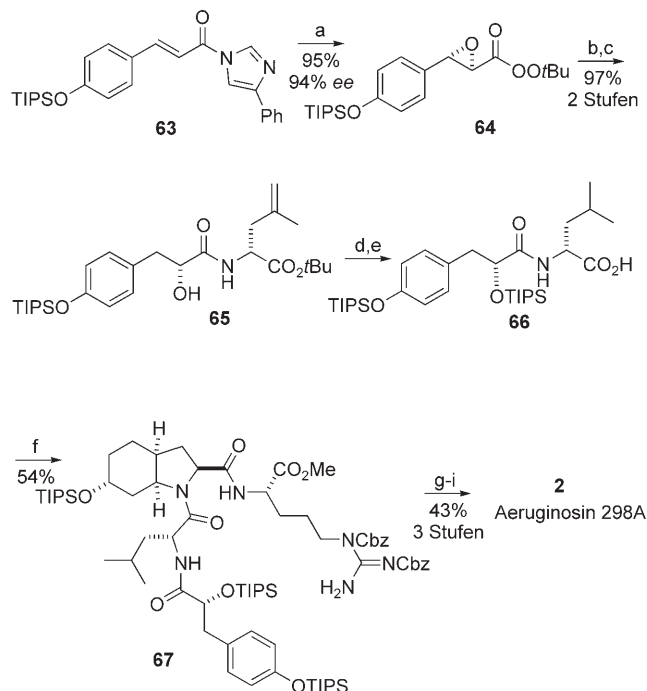


Scheme 6. Die Synthese von Aeruginosin 298A nach Shibasaki et al. Synthese des Fragments **62**. a) $\text{CsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, PhMe/ CH_2Cl_2 (7:3); b) HCl; c) Boc_2O , TEA; d) 9-BBN, dann H_2O_2 ; e) DEAD, PPh₃, Di-Cbz-Guanidin; f) *p*-TsOH; g) **56**, EDC, HOBt; h) TIPSOTf, DIEA; i) ZnBr_2 .

Vom Enolat des Glycinderivats **52** war bereits bekannt, dass es mit einer Reihe von Elektrophilen zu hoch enantiomerenreinen α -Aminosäuren reagieren kann.^[81] Zur Herstellung des Choi-Kerns von Aeruginosin 298A wurde zunächst das Enolat von **52** mit Bromid **53** in Gegenwart von 10 Mol-% **54** als Katalysator umgesetzt und auf diese Weise **55** in 80 % Ausbeute mit 88 % *ee* erhalten. Nach Entschützen der Ketalfunktion und sofortiger intramolekularer Michael-Addition entstanden die bicyclischen Ketone **28** und **29**, die nach der von Bonjoch und Mitarbeitern bereits beschriebenen Methode zu **56** umgewandelt wurden.^[22]

Die Synthese der L-Argol-Untereinheit durch asymmetrische Phasentransfer-Alkylierung ist in Schema 6 dargestellt. Auf diese Weise wurde die Allylglycin-Vorstufe **58** in ausgezeichneter Ausbeute mit hoher Enantioselektivität erhalten. Veränderungen an den funktionellen Gruppen führten zu **59**, das weiter zum Guanidin-Zwischenprodukt **60** umgewandelt wurde. Eine Peptidverknüpfung mit **56** ergab das geschützte L-Choi-Argal-Fragment **61** in 72 % Ausbeute. Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurde die Verbindung **62** erhalten.

Die Hpla-Untereinheit wurde durch asymmetrische Epoxidierung des Imidazolid **63** hergestellt (Schema 7).^[82] Der daraus entstehende Peroxyester **64** konnte durch einfaches Mischen mit D-4,5-Dehydroleucin-*OT*Bu zum Amid **65** verknüpft werden. Nach Reduktion der Doppelbindung durch katalytische Hydrogenierung, Schützen des Alkohols und Spaltung des *tert*-Butylesters entstand das Hpla-Leu-Fragment **66**. Die letzte Kondensation lieferte in Gegenwart von HATU **67** in 54 % Ausbeute bei minimaler Racemisierung

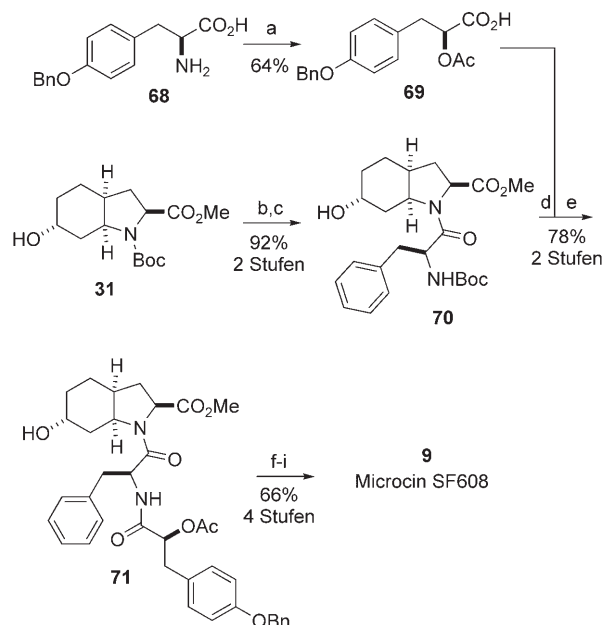


Scheme 7. Die Synthese von Aeruginosin 298A nach Shibasaki et al. Abschließende Syntheseschritte. a) *La*-(*S*)-Binol- $\text{PPh}_3=\text{O}$ (10 Mol-%), TBHP, MS (4Å), THF; b) D-4,5-Dehydroleucin-*OT*Bu, THF; c) H_2 , Pd/C; d) TIPSOtF, DIEA; e) TMSOTf; f) **62**, HATU, DIEA, CH_2Cl_2 ; g) LiBH_4 , THF; h) HF·Py; i) H_2 , Pd/C.

der Leu-Amid-Untereinheit (<5 %). Zuletzt wurde der Methyl ester entfernt, und Abspaltung der restlichen Schutzgruppen führte zu Aeruginosin 298A. Die Argol- und die Leu-Untereinheit sind zwar leicht aus verfügbaren chiralen Startmaterialien zugänglich, als besonders erfolgreich erwies sich die Phasentransfer-Alkylierung von Shibasaki et al. allerdings bei der Synthese von Aeruginosin-298A-Analoga, die nichtnatürliche Aminosäurereste enthalten.^[74]

4.2. Microcin SF608

Nun da der bicyclische L-Choi-Rest über eine reduktive Transformation ausgehend von Tyrosin zugänglich war (Schema 1), wendeten Bonjoch und Mitarbeiter^[83] diese Methode auch bei der Totalsynthese von anderen Aeruginosin-Peptiden an. Für die Synthese des Trypsin-Inhibitors Microcin SF608 wurde die Hpla-Untereinheit anders als oben beschrieben aufgebaut, und zwar durch Diazotierung des Tyr-Derivats **68** (Schema 8).^[83] Aufeinander folgende Kupplungen



Scheme 8. Die Synthese von Microcin SF608 nach Bonjoch et al.

a) *i*-C₅H₁₁ONO, AcOH, NaOAc; b) TFA, CH_2Cl_2 , 0°C; c) Boc-L-Phe-OH, PyBOP, NMM, CH_2Cl_2 ; d) TFA, CH_2Cl_2 , 0°C; e) PyBOP, NMM, CH_2Cl_2 ; f) 0.1 N LiOH, THF; g) Di-Boc-Agma, PyBOP, NMM, DMF; h) 6 N HCl, MeCN; i) H_2 , Pd/C.

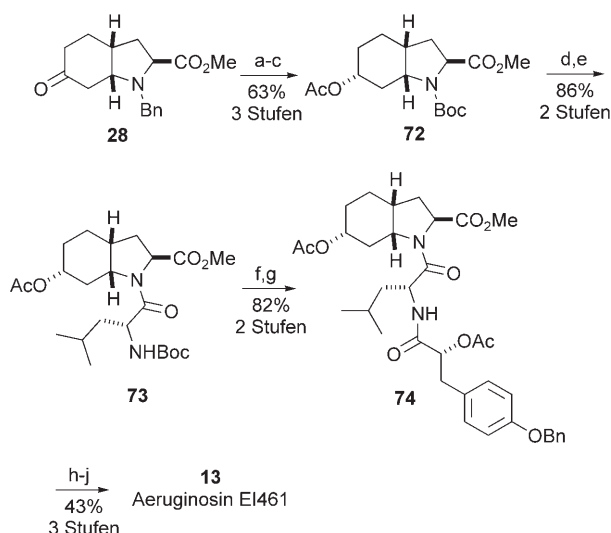
ausgehend vom Choi-Derivat **31** unter PyBOP-Vermittlung ergaben zuerst das Zwischenprodukt **70**. Dieses wurde um die Hpla-Untereinheit zur geschützten Vorstufe **71** erweitert. Zum Schluss wurden die Schutzgruppen entfernt, und Microcin SF608 (**9**) wurde in ausgezeichneter Ausbeute aus **70** erhalten.

Microcin SF608 zeigte interessanterweise bei der analytischen RP-HPLC zwei Peaks und im ¹H-NMR-Spektrum zwei Signalsätze. Als Grund für deren beobachtetes 3:1-Ver-

hältnis wurde eine ungewöhnlich langsame *cis-trans*-Rotationsisomerie um die Choi-Phe-Amidbindung genannt. Ein Muster der Differenzen zwischen der chemischen Verschiebung der H-2- und H-7a-Atome des *cis*- und *trans*-Rotamers von **9** und seinen Vorstufen bietet eine verlässliche Methode zur Ermittlung der relativen Konfiguration und der Rotationskonformation des Xaa-Choi-Dipeptidkerns der Aeruginosine.

4.3. Aeruginosin EI461

Bonjoch und Mitarbeiter^[30] verwendeten das vormalig unerwünschte Choi-Isomer **28** als Vorstufe für die Synthese des Kerns von Aeruginosin EI461. Bei diesem Aeruginosin stehen anders als bei den anderen Aeruginosinen die Wasserstoffatome an den Verknüpfungsstellen des Octahydroindolrings in *syn*-Stellung zum Methylester-Substituenten (Schema 9). Eine Reduktion der Ketofunktion von **28** mit

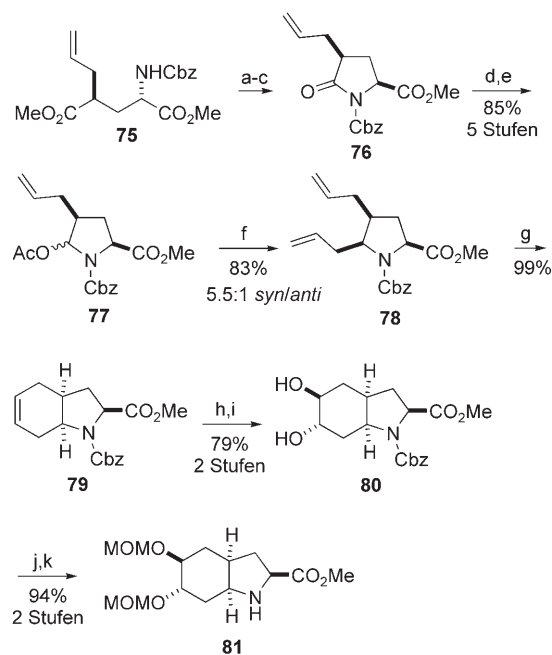


Schema 9. Die Synthese von Aeruginosin EI461 nach Bonjoch et al. a) NaBH_4 ; b) H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, Boc_2O ; c) Ac_2O ; d) TFA, CH_2Cl_2 , 0°C ; e) Boc-D-Leu , CH_2Cl_2 , PyBOP, NMM; f) TFA, CH_2Cl_2 , 0°C ; g) **69**, PyBOP, NMM, CH_2Cl_2 ; h) 0.1 N LiOH , THF; i) HOBT, EDC, NMM, THF, dann NH_4OH ; j) H_2 , Pd/C.

NaBH_4 und Schutzgruppenaustausch führte zum 3a,7a-diepi-L-Choi-Derivat **72** in 63 % Ausbeute. Der *N*-Boc-D-Leu-Rest wurde angehängt und die entstehende Verbindung um die Hpla-Untereinheit zum Aeruginosin EI461 erweitert. Die Gesamtausbeute betrug 19 % ausgehend von **28**. Aufgrund der Synthese von Aeruginosin EI461 (**12**) musste die ursprünglich vorgeschlagene Struktur, die den üblicheren *endo*-Methoxycarbonyl-Substituenten enthielt, revidiert werden. Um die ursprüngliche Falschzuordnung zu bestätigen, synthetisierten Bonjoch und Mitarbeiter **12** auch ausgehend vom Choi-Derivat **30**.^[30]

4.4. Dysinosin A

Für den Aufbau der azabicyclischen Choi-Kernstruktur der Aeruginosine wurde üblicherweise auf die asymmetrische Alkylierung und Tyrosin als chiraler Vorstufe zurückgegriffen. Hanessian und Mitarbeiter,^[84] die den wirkungsvollen Thrombin- und Faktor-VIIa-Inhibitor Dysinosin A herstellen wollten, entwickelten hingegen ein anderes Konzept zum Aufbau des Hydroxy-Choi-Restes, das auf einer *N*-Acyliminium-Alkylierung und einer Ringschlussmetathese beruht (Schema 10). Die (4*S*)-Allylglutamat-Vorstufe **75**, die sich



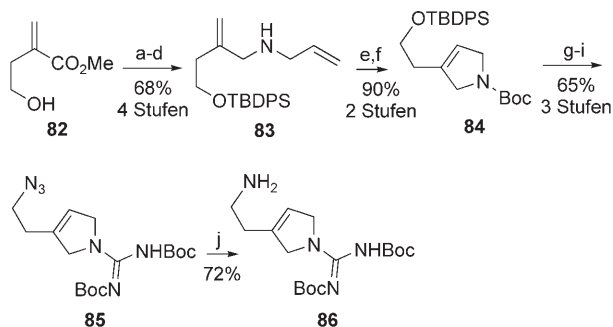
Schema 10. Die Synthese von Dysinosin A nach Hanessian et al. Synthese des Hydroxy-L-Choi-Derivats **81**. a) TFA, CH_2Cl_2 ; b) Toluol, Rückfluss; c) LHMDS, CbzCl, THF, -78°C ; d) LiBHET_3 , THF, -78°C ; e) Ac_2O , DMAP, CH_2Cl_2 ; f) $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$, Allyltributylstannan, Toluol, -78°C ; g) 1 Mol-% Grubbs-Katalysator der ersten Generation, CH_2Cl_2 , Rückfluss; h) *m*CPBA, CH_2Cl_2 ; i) kat. TFA, THF/ H_2O ; j) MOMCl, DIEA, CH_2Cl_2 ; k) H_2 , Pd/C, MeOH.

leicht und in hoher Ausbeute aus L-Glutaminsäure herstellen lässt,^[85] wurde dabei zuerst in das C4-substituierte Pyroglutamat **76** umgewandelt, was die *cis*-Stellung der beiden Substituenten festlegte. Anschließend wurde die Lactamfunktion mit Superhydrid (LiBHET_3) reduziert und das entstehende Hemiaminal zu **77** O-acetyliert (85 % Ausbeute). Eine umfassende Durchmusterung nach Lösungsmittel, Lewis-Säure und *N*-Schutzgruppe für die C5-Alkylierung des *N*-Acyliminiumions führte zu der optimalen Kombination von Allyltributylstannan und $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ in Toluol, die das *syn*-Diallyl-substituierte Prolinderivat **78** in 83 % Ausbeute mit einer Diastereoselektivität von 5.5:1 lieferte. Interessanterweise ergab das *N*-Boc-geschützte Derivat ein 1:2-Diastereomerenverhältnis zugunsten des unerwünschten *anti*-Isomers.

Eine Umsetzung von **78** mit dem Grubbs-Katalysator der ersten Generation^[86] in Dichlormethan unter Rückfluss lie-

ferte das bicyclische Alken **79**, das durch eine seitenselektive Epoxidierung und säurekatalysierte Öffnung mit wässriger Trifluoressigsäure in das diaxiale *trans*-Diol **80** überführt wurde. Nach einer Schutzgruppenmanipulation wurde das 5-Hydroxy-L-Choi-Derivat **81** in 44 % Gesamtausbeute aus **75** erhalten.

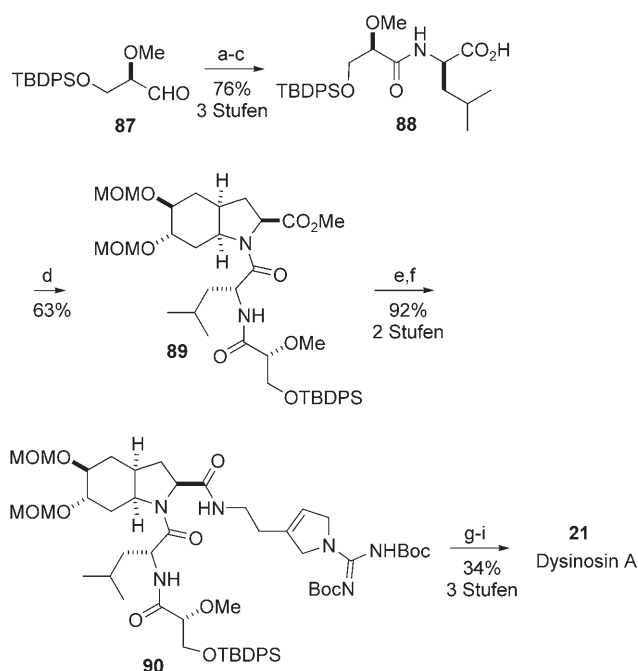
Außer der neuartigen dihydroxylierten Kernstruktur enthält Dysinosin A auch eine ungewöhnliche 1-(*N*-Amidino- Δ^3 -pyrrolino)ethyl(Adc)-Untereinheit als cyclische Entsprechung zum P1-Arginin. Die Synthese dieser Untereinheit ist in Schema 11 dargestellt. Zunächst wurde der bekannte Hy-



Schema 11. Die Synthese von Dysinosin A nach Hanessian et al. Synthese der Adc-Untereinheit. a) TBDPSCI, ImH, DMF; b) DIBAL-H, CH_2Cl_2 ; c) MsCl, NEt_3 , CH_2Cl_2 ; d) Allylamin, CH_2Cl_2 ; e) Boc_2O , NEt_3 , CH_2Cl_2 ; f) Grubbs-Katalysator der ersten Generation, CH_2Cl_2 ; g) TBAF, THF; h) PPh_3 , DEAD, $(\text{PhO})_2\text{P}(\text{O})\text{N}_3$, THF; i) TFA, CH_2Cl_2 , dann Di-*N*-Boc-triflylguanidin, NEt_3 ; j) PPh_3 , THF/ H_2O .

droxyester **82** in das Diallyl-Zwischenprodukt **83** umgewandelt und anschließend in einer Ringschlussmetathese mit dem Grubbs-Katalysator der ersten Generation umgesetzt. Dabei entstand **84** in hoher Ausbeute. Nach der Spaltung des TBDPS-Ethers wurde durch eine Mitsunobu-Reaktion eine Azidogruppe eingeführt und nach Abspaltung der Boc-Gruppe das Δ^3 -Pyrrolin erhalten.^[84] Eine Guanidinylierung mit dem Goodman-Reagens^[87] ergab **85**, das anschließend zum geschützten Adc-Derivat **86** in 28 % Gesamtausbeute ausgehend von **82** reduziert wurde.

Der endgültige Aufbau zum Dysinosin A ist in Schema 12 dargestellt. Hierbei wurde zunächst der Aldehyd **87**, der leicht aus D-Mannit zugänglich ist,^[88] oxidiert und die entstehende Carbonsäure mit D-Leu-OBn verknüpft. Hydrolyse des Benzylesters führte zu **88**. Die entscheidende Kupplung des Amins **81** an die Carbonsäure **88** verlief mit 63 % Ausbeute in Gegenwart von BOPCl. Hydrolyse des Esters und Kupplung mit der Adc-Untereinheit ergaben **90**. Die Abspaltung der TBDPS-Gruppe und die Sulfatierung des entstehenden Alkohols gelangen mit Dibutylzinnoxid als Aktivator.^[89,90] Nach einer sauren Schutzgruppenabspaltung und der Reinigung durch RP-HPLC wurde Dysinosin A erhalten. Diese erste Synthese von Dysinosin A bestätigte die Struktur des Naturstoffs und bot gleichzeitig einen effizienten Einstieg zu den neuartigen 5-Hydroxy-L-Choi- und Adc-Strukturmotiven.

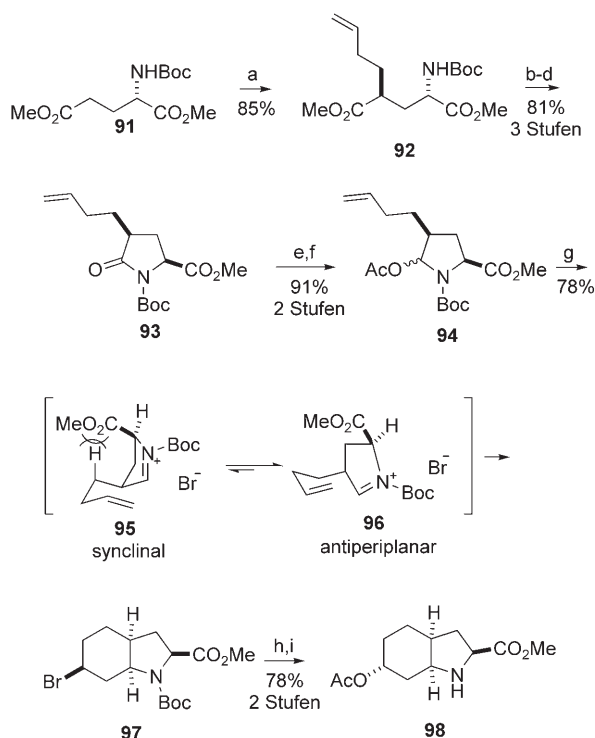


Schema 12. Die Synthese von Dysinosin A nach Hanessian et al. Abschließende Syntheseschritte. a) NaClO_2 , 2-Methyl-2-buten, NaH_2PO_4 , $t\text{BuOH}$; b) D-Leu-OBn, EDC, HOBT, CH_2Cl_2 ; c) H_2 , Pd/C, MeOH; d) **81**, BOPCl, DIEA, MeCN; e) LiOH, THF/ H_2O ; f) **86**, EDC, HOBT, CH_2Cl_2 ; g) TBAF, THF; h) $\text{SO}_3\cdot\text{Py}$, Bu_2SnO , CH_2Cl_2 ; i) TFA, CH_2Cl_2 , dann RP-HPLC.

4.5. Oscillarin

Wissenschaftler der ehemaligen Boehringer Mannheim GmbH beschrieben in einem Patent von 1996 erstmals die Struktur eines neuen Aeruginosins mit einer bis dahin unbekannten basischen P₁-Untereinheit und gaben der Verbindung den Namen Oscillarin (**19**).^[41] Die Totalsynthese von **19** durch Hanessian et al.^[43] brachte jedoch den Nachweis, dass die Struktur der P₁-Untereinheit nicht korrekt zugeordnet worden war.^[41] Ein zweites Patent von 1997 deckte die Δ^3 -Pyrrolin-Einheit von Dysinosin A als die wahre P₁-Untereinheit auf.^[42] Als Ansatz für die Synthese von Oscillarin verwendeten Hanessian und Mitarbeiter wiederum das *N*-Acyliminiumion als Basis für den Aufbau des Octahydroindol-Motivs. Damit bot die Totalsynthese und anschließende Strukturrevision von Oscillarin eine Plattform zur Entwicklung von Azonia-Prins-Halogencarbocyclisierungen auf dem Weg zum L-Choi-Rest und seinen Derivaten.^[43,91]

Wie in Schema 13 dargestellt, wurde bei der diastereoselektiven Alkylierung^[85] des Enolat-Dianions von **91** mit 3-Butenoltriflat das Zwischenprodukt **92** in hoher Ausbeute erhalten. Mit der gleichen Prozedur wie für Dysinosin A gelang die Cyclisierung dieses Zwischenprodukts zu **93** sowie dessen Umwandlung zum *O*-Acetylhemiaminal-Derivat **94**.^[84] Fünfminütige Inkubation mit SnBr_4 in CH_2Cl_2 bei -78°C reichte aus, um **94** zum bromierten bicyclischen Produkt **97** umzusetzen. Dass **97** in 78 % Ausbeute als einziges Isomer erhalten wurde, kann gemäß dem Modell des Übergangszustands **96** durch einen antiperiplanaren Angriff der Alkenkette an das Iminiumion begründet werden. Das al-

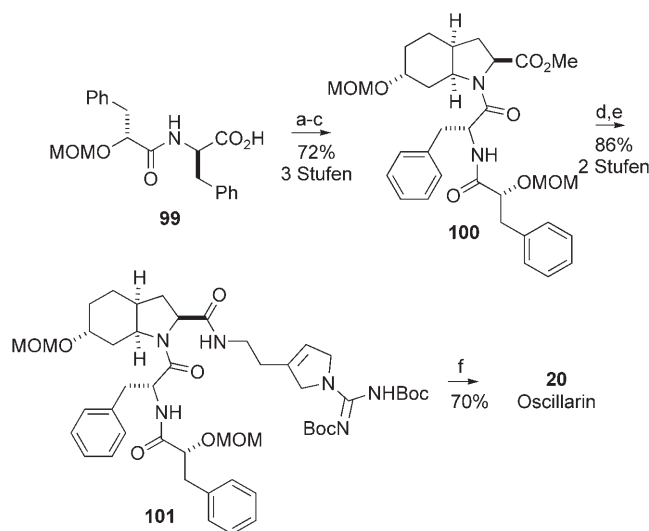


Scheme 13. Die Synthese von Oscillarin nach Hanessian et al. Azonia-Prins-Halogencarbocyclisierung zum L-Choi-Derivat **98**. a) LHMDs, THF, -78°C , dann 3-Butenoltriflat; b) TFA, CH_2Cl_2 ; c) Toluol, Rückfluss; d) Boc_2O , NEt_3 , DMAP, CH_2Cl_2 ; e) LiHBEt_3 , THF, -78°C ; f) Ac_2O , NEt_3 , DMAP, CH_2Cl_2 ; g) SnBr_4 , CH_2Cl_2 , -78°C , 5 min; h) Bu_4NOAc , Toluol, 50°C ; i) TFA, CH_2Cl_2 .

ternative Konformer **95** wird wahrscheinlich deshalb nicht gebildet, weil zum einen ein synclinaler Angriff eine ungünstigere Orbitalüberlappung bedeutet, zum anderen der Estersubstituent und das axiale H-4-Atom einander sterisch behindern könnten. Durch äquatoriales Abfangen des sich bildenden Carbokations durch Bromid wird **97** gebildet. Diese Hypothese wurde durch eine Studie über die sterischen und stereoelektronischen Auswirkungen unterschiedlicher nucleophiler Ketten bei verwandten Azonia-Prins-Halogencarbocyclisierungen untermauert.^[91] Durch Abspaltung des Bromids mit Tetrabutylammoniumacetat und Entfernung der Boc-Schutzgruppe wurde **97** in das passend geschützte L-Choi-Derivat **98** überführt.

Die Kupplung des Choi-Amins **98** an das Fragment **99** verlief mit hoher Ausbeute. Anschließend wurde das Acetat gespalten und mit einer MOM-Schutzgruppe unter Bildung von **100** versehen (Schema 14). Durch Hydrolyse des Esters und Kondensation mit der Adc-Untereinheit wurde schließlich das vollständig geschützte Oscillarin hergestellt, das nach Umsetzung mit wässriger HCl in THF und Reinigung durch RP-HPLC den reinen Naturstoff **20** als HCl-Salz ergab.

Die spektroskopischen Daten von **20** entsprachen vollständig denen des Naturstoffs. Wie erwähnt hatten Hanessian und Mitarbeiter^[43] Oscillarin in der ursprünglich vorgeschlagenen Struktur (**19**) synthetisiert, die eine sechsgliedrige Guanidinvariante anstelle der Adc-Untereinheit vorsieht. Beim Vergleich der biologischen Aktivitäten von **19** und **20**

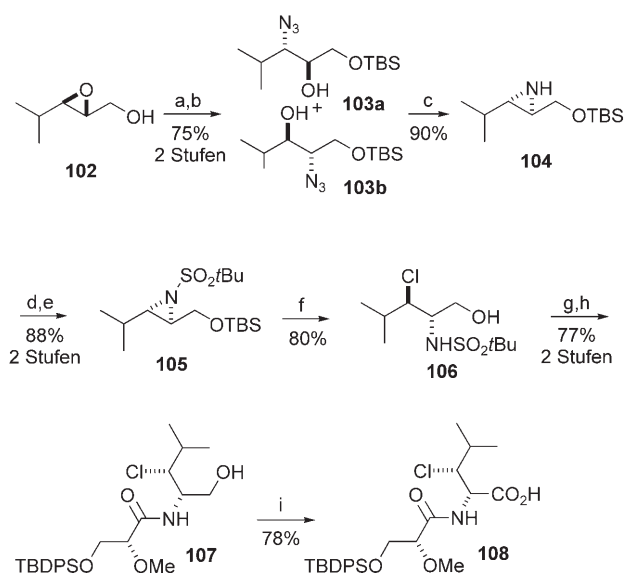


Scheme 14. Die Synthese von Oscillarin nach Hanessian et al. Abschließende Syntheseschritte. a) **98**, EDC, HOBT, CH_2Cl_2 ; b) NaOMe, MeOH; c) MOMCl, DIEA, CH_2Cl_2 ; d) LiOH, THF/ H_2O ; e) **86**, EDC, HOBT, NEt_3 , CH_2Cl_2 ; f) 6 N wässr. HCl, THF, dann RP-HPLC

zeigte sich, dass diese Struktur revidiert werden musste. Während **20** Thrombin wirkungsvoll hemmte ($\text{IC}_{50} = 28 \text{ nM}$ ($= 0.018 \mu\text{g mL}^{-1}$ in Tabelle 1)), zeigte **19** gegen dieses Enzym keinerlei Aktivität. Die revidierte Struktur von Oscillarin mit der Adc-Untereinheit wurde durch die Kristallstruktur des mit Thrombin komplexierten Cokristalls verifiziert (Abbildung 4b).

4.6. Chlordysinosin A

Zuletzt berichteten Hanessian und Mitarbeiter von der ersten Totalsynthese und Strukturbestimmung von Chlordysinosin A (**22**).^[46] Chlordysinosin A war erstmals, aber ohne jedwede stereochemische Zuordnung, von Wissenschaftlern der Firma Pharmacia in einem Patent von 2003 beschrieben worden.^[45] Ersten Strukturstudien zufolge unterschied sich Chlordysinosin A (**22**) von Dysinosin A (**21**) nur durch eine 3-Chlorleucinamid-Untereinheit an der Stelle von D-Leucin. Obwohl für **22** noch keine stereochemische Zuordnung vorlag, wies doch die Strukturähnlichkeit zu **21** auf eine analoge absolute Konfiguration hin. Die Konfiguration am neuen Stereozentrum, am C3-Atom der 3-Chlorleucin-Untereinheit, konnte jedoch nur durch Synthese aufgedeckt werden. Die Synthese des neuartigen 3-Chlorleucin-Fragments (Schema 15) begann mit dem bekannten Epoxyalkohol **102**, der durch eine asymmetrische Sharpless-Epoxidierung zugänglich war.^[92] Das Aziridin **104** wurde in drei Stufen hergestellt und als *tert*-Butylsulfonamid aktiviert.^[93] Es wurde eine Reihe von Bedingungen zur regioselektiven Spaltung des Aziridins getestet, wobei schließlich die Umsetzung von **105** mit $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ im Überschuss in Acetonitril unter Rückfluss zum 3-Chlorsulfonamid **106** führte und eine Regioselektivität von 10:1 ergab. Die Reaktion verlief mit 80% Ausbeute und umfasste die Entfernung der Silyl-Schutzgruppe. Die Struktur des kristallinen Produkts wurde rönt-

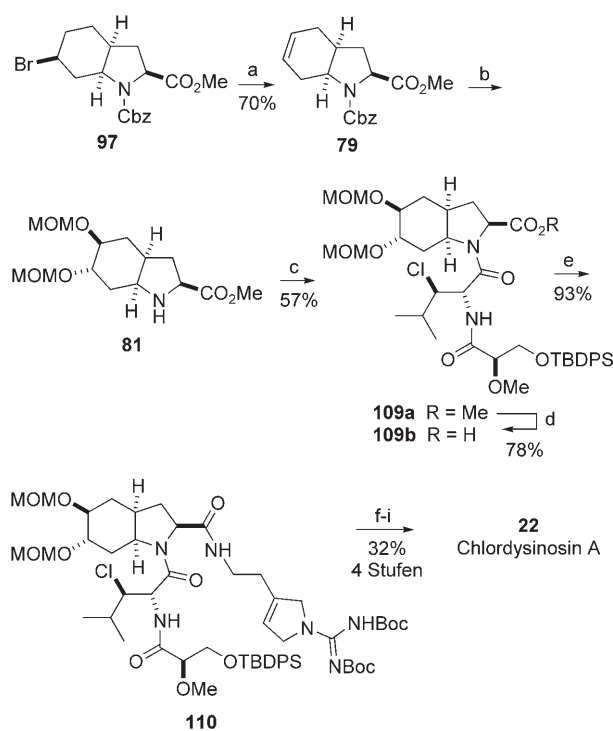


Schema 15. Die Synthese von Chlordysinosin A nach Hanessian et al. Synthese des 3-Chlorleucinfragments **108**. a) NaN_3 , NH_4Cl , Methoxyethanol, H_2O , Rückfluss; b) TBSCl , NEt_3 , DMAP, CH_2Cl_2 ; c) PPh_3 , MeCN , 50°C ; d) $t\text{BuSOCl}$, NEt_3 , CH_2Cl_2 ; e) $m\text{CPBA}$, CH_2Cl_2 ; f) 4.0 Äquiv. $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MeCN , 90°C , 72 h; g) 0.1 N TfOH in CH_2Cl_2 , Anisol; h) PyBOP , (*R*)-3-*tert*-Butyldiphenylsilyloxy-2-methoxypropionsäure, 2,6-Lutidin, CH_2Cl_2 ; i) 0.1 M H_5IO_6 /wasserhaltiges MeCN , katalytische Mengen CrO_3 , 0°C .

genographisch bestätigt. Interessanterweise verlief die CeCl_3 -vermittelte Spaltung der *N*-Toluolsulfonyl- und *N*-Trifluormethylsulfonylaziridine nur mit geringen (<2:1) Regioselektivitäten.^[94] Kürzlich beschrieben Bonjoch und Mitarbeiter^[95] eine alternative Methode, nach der ausgehend von β -Lactonen diastereomere 3-Chlorleucine erhalten werden können. Eine saure Abspaltung der *N*-Bus-Gruppe und Kupplung mit (*R*)-3-*tert*-Butyldiphenylsilyloxy-2-methoxypropionsäure in Gegenwart von PyBOP führten zu **107** in 77% Gesamtausbeute. Die Oxidation von **107** gelang schließlich mit H_5IO_6 und katalytischen Mengen CrO_3 ,^[96] nachdem zuvor verschiedene andere Methoden aufgrund der β -Eliminierung des Chlorids fehlgeschlagen waren.

Obwohl für den 5-Hydroxy-*L*-Choi-Kern von Dysinosin A schon eine Syntheseroute über eine RCM bekannt war, entschieden sich Hanessian und Mitarbeiter für eine intramolekulare *N*-Acyliminiumion-Halogencarbocyclisierung zur Synthese des Zwischenprodukts **79** (Schema 16).^[46] Dieses wurde hergestellt, indem **97**, das vorher durch Ringschlussmetathese eines Bisalken-Intermediats erhalten worden war, durch Erhitzen in reinem DBU dehydrohalogeniert wurde. Nach der in Abschnitt 4.4 beschriebenen vierstufigen Route für Dysinosin A^[84] wurde **79** zu **81** umgewandelt, um es für die Kupplung mit dem Chlorcarbonsäure-Fragment **108** vorzubereiten.

Im Verlauf der Synthese von Chlordysinosin A wurde immer deutlicher, dass wegen der Basenempfindlichkeit des chlorhaltigen Zwischenprodukts Reagentien und Methoden sehr sorgfältig gewählt werden mussten. Bei der Kondensation von **108** mit **81** ergaben Triethylamin oder Di-



Schema 16. Die Synthese von Chlordysinosin A nach Hanessian et al. Abschließende Syntheseschritte. a) Reines DBU, 80°C , 4 h; b) wie in Schema 10; c) **108**, DEPBT, 2,6-Lutidin, CH_2Cl_2 , 0°C , 4 h; d) 20 Äquiv. MeSnOH , 1,2-DCE, 75°C , 48 h; e) **86**, PyBOP , 2,6-Lutidin, CH_2Cl_2 , 0°C , 4 h; f) 0.3 M TBAF /THF, 0°C , 15 min; g) $\text{SO}_3 \cdot \text{Py}$, kat. Bu_2SnO , CH_2Cl_2 , 18 h, dann Wiederholung; h) 10% $\text{TFA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, RT, 6 h; i) präparative RP-HPLC.

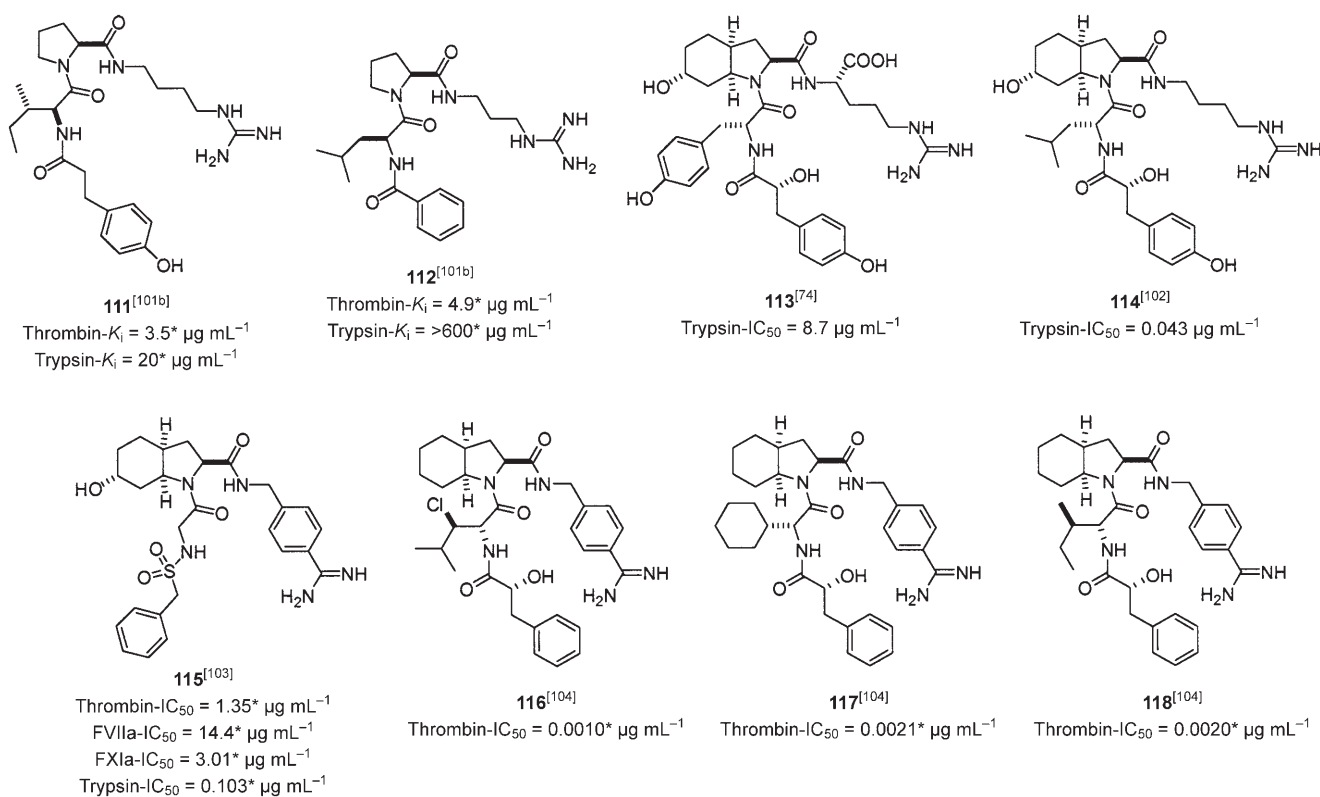
isopropylethylamin in Verbindung mit EDC/HOBt, HBTU/HOBt oder PyBOP erhebliche HCl -Eliminierungen und nur geringe Ausbeuten an Kupplungsprodukt. Nach Optimierung wurde **109** schließlich reproduzierbar mit 55–60% Ausbeute in Gegenwart von DEBPT ^[23,78,79] und 2,6-Lutidin bei 0°C hergestellt. Auch für die Hydrolyse des Methylesters **109a** mussten alkalische Bedingungen unbedingt vermieden werden. Bei Verwendung von Me_3SnOH im Überschuss in 1,2-Dichlorethan unter Rückfluss verlief die Spaltung des Esters glatt und lieferte ohne Dehydrochlorierung **109b** in 78% Ausbeute.^[97,98] Eine Amidkupplung an das Amin **86** führte in Gegenwart von PyBOP zu **110**.

Zum Schluss wurden der Silylether gespalten und der primäre Alkohol mit $\text{SO}_3 \cdot \text{Py}$ und Bu_2SnO in katalytischen Mengen sulfatiert (zweimal).^[89,90] Anschließend wurden mit 10% $\text{TFA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ sämtliche Schutzgruppen abgespalten. Nach RP-HPLC wurde reines Chlordysinosin A (**22**) aus **110** in 32% Ausbeute erhalten. Die spektroskopische Analyse des synthetischen **22** ergab eine vollständige Übereinstimmung mit den Daten des Naturstoffs, was die Struktur von Chlordysinosin A ebenso wie die Konfiguration des neuartigen (2*S*,3*R*)-3-Chlorleucinrests bestätigte. Eine Röntgenkristallstrukturanalyse des Thrombinkomplexes lieferte die abschließende Bestätigung für die Struktur- und Konfigurationszuordnungen, die während der Synthese getroffen worden waren (Abbildung 4c).

5. Aeruginosin-Analoga

Bislang gibt es noch kaum Ansätze zur Synthese von Aeruginosin-Analoga;^[74,99–104] in Schema 17 sind einige Beispiele für solche Analoga vorgestellt. Hauptsächlich wurden Aeruginosin 298A und 98B als Ausgangspunkte für die Synthese synthetischer Serinprotease-Inhibitoren vom Aeruginosin-Typ eingesetzt.^[74,99–104] Bei einer dieser Studien von Radau und Mitarbeitern^[99] wurde überraschenderweise ein Trypsin-Aktivator statt eines entsprechenden Inhibitors gefunden. Radau und Mitarbeiter^[99–101] setzten L-Prolin als Kernstruktur anstelle des präparativ anspruchsvolleren Choi ein. Erst kürzlich berichteten Radau und Mitarbeiter^[101b] von Analoga mit einer (bei der Wahl zwischen Thrombin und Trypsin) gegen Thrombin selektiven, wenn auch schwachen Inhibitorwirkung (**111** und **112**, Schema 17). Shibasaki und Mitarbeiter^[74] und später Takahashi und Mitarbeiter^[102] berichteten über ein Screening von Aeruginosin-298A-Analoga auf ihre Inhibitorwirkung gegen Trypsin. Beide Studien verdeutlichten noch einmal, wie wichtig die chemische Struktur der basischen P1-Untereinheit für die Inhibitorwirkung ist. Veränderungen in der P3- oder P4-Region wirkten sich weniger stark auf die Trypsin-Inhibition aus. Das von Shibasaki und Mitarbeitern^[74] synthetisierte Analogon **113** zeigte fast die gleiche Hemmwirkung gegen Trypsin wie die Hauptverbindung Aeruginosin 298A. Takahashi und Mitarbeiter^[102] fanden den starken Inhibitor **114**, der 300-mal aktiver als Aeruginosin 298A ist.

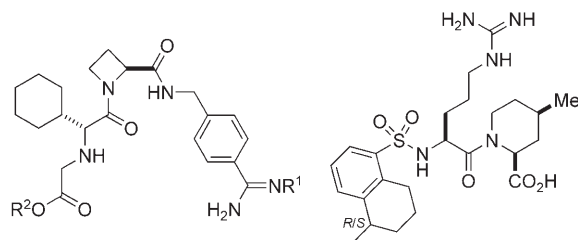
Hanessian und Mitarbeiter^[103] entwickelten jüngst Aeruginosin-Analoga, die an der P1-Position nichtnatürliches Benzamidin tragen. Dazu gehören auch Sulfamide wie **115** (Schema 17). Allerdings sind diese Verbindungen nur mäßig aktiv gegen Trypsin, Thrombin und andere Koagulationsfaktoren. In der Folge untersuchten Hanessian und Mitarbeiter^[104] die SARs in Bezug auf Thrombin eingehender, wobei sie sich auf den „Chloreffekt“ bei Chlordysinosin A konzentrierten. Außerdem testeten sie die jeweilige Bedeutung aller vier Aeruginosin-Untereinheiten. An der P1-Position erwies sich das nichtnatürliche Benzamidin dabei als günstigster Substituent, während die Größe und Form des P2-Choi-Kerns weniger Auswirkungen hatte. Die günstige Auswirkung des Chloreffekts in der P3-Position wurde bestätigt, wobei ähnliche Effekte mit anderen β -verzweigten P3-Seitenketten erzielt wurden, z. B. bei den β -Cyclohexyl- (**117**) und Isoleucin-Analoga (**118**), die Inhibitoraktivitäten gegen Thrombin von $IC_{50} = 0.002 \mu\text{g mL}^{-1}$ aufweisen. Ein N-terminales D-Pla war einfacheren Motiven überlegen, und die terminale Sulfatgruppe von Chlordysinosin A hatte nur geringen Einfluss auf die Thrombin-Inhibition. Nach unserem jetzigen Kenntnisstand ist das Analogon **116**, das keine 6-Hydroxygruppe, aber eine Benzamidin-P1-Einheit enthält, der bislang aktivste Thrombin-Inhibitor in vitro ($IC_{50} = 0.0010 \mu\text{g mL}^{-1}$, Schema 17). Nie und Mitarbeiter^[105] präsentierten die Synthese einer Choi-Variante mit Oxy substituenten am Ring, die von D-Glucose ausgeht; allerdings wurde nichts über ihre Inhibitoraktivität berichtet.



Schema 17. Aeruginosin-Analoga. Die in μM angegebenen IC_{50} - und K_i -Werte wurden in $\mu\text{g mL}^{-1}$ umgerechnet und mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

6. Inhibitoren mit direkter Wirkung gegen Thrombin im klinischen Gebrauch

Nicht lange nach der erfolgreichen Markteinführung des Thrombin-Inhibitors Melagatran (**119**)^[106] als oral bioverfügbares Prodrug Ximelagatran (**120**, Exanta)^[106] gegen Venen-



119^[106], Melagatran: R¹=H, R²=H
Thrombin-K_i= 0.36 μM

120^[106], Ximelagatran (Exanta): R¹=OH, R²=Et
(Prodrug)

121^[108], Argatroban
Thrombin-K_i= 0.039 μM

thrombose im Jahr 2004 musste die Substanz wieder zurückgezogen werden, da es Hinweise auf einen Anstieg der Leberenzyme gab.^[107] Argatroban (**121**), eine 64:36-Epimerenmischung am C-21-Atom ist dagegen nicht oral bioverfügbar und muss intravenös verabreicht werden.^[108] Derzeit ist es freigegeben zur Thrombosebehandlung bei Patienten, die an einer immunvermittelten Reaktion auf Heparin leiden, das am häufigsten als Antikoagulant eingesetzt wird. Neueren Übersichten^[109] zufolge befinden sich momentan mehrere synthetische Thrombin-Inhibitoren in verschiedenen klinischen Testphasen.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Dank ihrer grundlegenden Strukturmerkmale enthalten die Aeruginosine offensichtlich die für die Hemmung von trypsinartigen Serinproteasen benötigten Pharmakophore. Auch wenn derzeit bereits mehr als 20 natürliche Mitglieder der Aeruginosin-Familie isoliert worden sind, müssen noch weitere Verbindungen identifiziert werden, um die SARs kartieren zu können und wichtige Struktur motive für verschiedene biologische Aktivitäten ausfindig zu machen. Um erheblich leichter an neue Aeruginosin-Analoga zu gelangen, muss die Entwicklung von effizienten Methoden zur Synthese von Aeruginosinen fortgeführt werden. Ein weiteres wichtiges Untersuchungsgebiet sind die Strukturmuster, die für eine Selektivität zwischen verschiedenen humanen Enzymen verantwortlich sind.

Aus den Befunden der Enzymassays (Tabelle 1) geht hervor, dass unterschiedliche Strukturmerkmale für unterschiedliche Enzymtargets wichtig sind. Eine basische P1-Endgruppe scheint eine Voraussetzung für eine gute Wirksamkeit gegen die trypsinartigen Serinproteasen zu sein. Dass Aeruginosine gegen Chymotrypsin und Elastase inaktiv sind, kann an der speziellen Substratpräferenz dieser Enzyme liegen, die Peptide mit raumfüllenden hydrophoben bzw.

kleinen neutralen P1-Seitenketten bevorzugen. Ein Austausch der basischen P1-Untereinheit am Aeruginosin gegen eine hydrophobe Gruppe sollte daher einen Zugewinn an Inhibitoraktivität gegen diese Enzyme mit sich bringen. Die wesentliche Aufgabe der Octahydroindol-Kernuntereinheit scheint darin zu bestehen, die verschiedenen Teilstücke des Tetrapeptids an bestimmte räumliche Positionen zu lenken, was bewirkt, dass das Molekül seine bioaktive Konformation einnimmt. Entsprechend wurde auch eine Justierung der Octahydroindol-Substituenten vorgeschlagen, um eine Selektion zwischen Enzymen zu erreichen.^[26,36] Schon kleine Änderungen am P3-Substituenten des Aminosäurerestes beeinflussen die Affinität gegen die Koagulationsfaktoren enorm. Ein bestechendes Beispiel ist die bemerkenswerte Wirkung von Chlordysinosin A im Vergleich zum H-substituierten Dysinosin A (Tabelle 1). Welche Bedeutung die N-terminale Sulfatgruppe für die unterschiedliche biologische Aktivität genau hat, muss noch weiter untersucht werden.

Außer der Verbesserung der Aktivität und Selektivität gegen Serinproteasen^[110] ist auch die Bearbeitung anderer struktureller und pharmakologischer Aspekte nötig, um diese einzigartige Naturstoffklasse „arzneimittelfähiger“ zu machen.^[111] Die Perspektiven dieser anspruchsvollen Aufgabe sind dennoch nicht unbedingt schlecht, besonders, weil die Naturprodukte die gleichen Bindungsstellen wie die vollsynthetischen Thrombin-Inhibitoren besetzen.^[56–58,63,112–114] In diesem Sinne sollten sie einer Segmentkupplung im Rahmen einer strukturbasierten organischen Synthese^[115] zugänglich sein und so wirkungsvolle hybride Analoga mit vorteilhaften pharmakologischen Eigenschaften hervorbringen. Unsere Hoffnung ist, dass die Forschung auf diesem Gebiet zu sicheren und wirksamen Medikamenten für die Behandlung lebensbedrohlicher Thrombose-Erkrankungen und verwandter Leiden führen wird.

Abkürzungen

Adc	1-(N-Amidino-Δ ³ -pyrrolino)ethyl
Aeap	1-Amidino-2-ethoxy-3-aminopiperidin
Agma	4-Aminobutylguanidin
Alloc	Allyloxycarbonyl
Argol	Argininol
Argal	Argininal
9-BBN	9-Borabicyclo[3.3.1]nonan
Binol	1,1'-Bi-2-naphthol
Bn	Benzyl
Boc	tert-Butoxycarbonyl
BOP	Benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat
BOPCl	Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinsäurechlorid
Bus	tert-Butylsulfonyl
Bz	Benzoyl
Cbz	Benzyloxycarbonyl
Ccoi	2-Carboxy-6-chlorooctahydroindol
Choi	2-Carboxy-6-hydroxyoctahydroindol
Cleu	3-Chlorleucin
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en

1,2-DCE	1,2-Dichlorethan
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DEPBT	3-(Diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIBAL-H	Diisobutylaluminumhydrid
DIEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
EDC	1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid
FDPP	Pentafluorphenyldiphenylphosphinat
HBTU	Benzotriazol-1-yl- <i>N</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
Hleu	3-Hydroxyleucin
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
Hpla	Hydroxyphenylmilchsäure
IBCF	Isobutylchlorformiat
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration, die zu 50 % Inhibition führt
ImH	Imidazol
K _i	Inhibitionskonstante
LHMDS	Lithiumhexamethyldisilazid
L-Selectrid	Lithium-tri- <i>sec</i> -butylborhydrid
LS-Selectrid	Lithium-trisiamylborhydrid
<i>m</i> CPBA	<i>m</i> -Chlorperoxybenzoesäure
MOM	Methoxymethyl
MsCl	Methansulfonylchlorid
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NOE	Kern-Overhauser-Effekt
ODS-HPLC	Octadecylsilan-Hochdruckflüssigkeitschromatographie
OH-Choi	2-Carboxy-5,6-dihydroxyoctahydroindol
Pla	Phenylmilchsäure
Plas	Phenylmilchsäure-2- <i>O</i> -sulfat
PPACK	<i>D</i> -Phe-Pro-Arg-Chlormethylketon
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxytri(pyrrolidino)phosphoniumhexafluorophosphat
Py	Pyridin
RCM	Ringschlussmetathese
SAR	Struktur-Aktivitäts-Beziehung
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl
TBHP	<i>tert</i> -Butylhydroxyperoxid
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TFA	Trifluoressigsäure
TfOH	Trifluormethansulfonsäure
TIPS	Triisopropylsilyl
TMSOTf	Trimethylsilyltriflat

Wir danken NSERC und AstraZeneca für finanzielle Unterstützung und Dr. Michel Simard für die Röntgenkristallstrukturanalysen von Zwischenprodukten. Des Weiteren bedanken wir uns für die Unterstützung von AstraZeneca bei den biologischen Tests, dem Molecular Modeling, der Proteinkristallographie und die anregenden Diskussionen mit Ingemar Nilsson, Ola Fjellström, Niklas Blomberg und Yafeng Xue. Karolina Ersmark dankt der IF's Foundation for Pharmaceutical Research (Stockholm, Schweden) für ein Postdoc-

Stipendium. Wir danken Benoit Deschênes-Simard von der Arbeitsgruppe Hanessian für die Gestaltung des Titelbildes.

Eingegangen am 24. Dezember 2006

Online veröffentlicht am 12. Dezember 2007

Übersetzt von Dr. Roswitha Harrer, Krefeld

- [1] A. M. Burja, B. Banaigs, E. Abou-Mansour, J. G. Burgess, P. C. Wright, *Tetrahedron* **2001**, 57, 9347.
- [2] W. J. Gerwick, L. T. Tan, N. Sitachitta, Vol. 57 (Hrsg.: G. A. Cordell), Academic Press, San Diego, **2002**, S. 75.
- [3] H. Luesch, G. G. Harrigan, G. Goetz, F. D. Horgen, *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9, 1791.
- [4] M. Namikoshi, K. L. Rinehart, *J. Ind. Microbiol.* **1996**, 17, 373.
- [5] R. Lukkainen, K. Sivonen, M. Manikoshi, M. Färdig, K. L. Rinehart, S. I. Nimelä, *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, 59, 2204.
- [6] T. Sano, K. Kaya, *Tetrahedron* **1998**, 54, 463.
- [7] T. Sano, K. Beattie, G. A. Codd, K. Kaya, *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 851.
- [8] M. Namikoshi, B. W. Choi, R. Sakai, K. L. Rinehart, W. W. Carmichael, W. R. Evans, P. Cruz, M. G. H. Munro, J. W. Blunt, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 2349.
- [9] K. L. Rinehart, K.-I. Harada, M. Namikoshi, C. Chen, C. A. Harvis, M. G. H. Munro, J. W. Blunt, P. E. Mulligan, P. R. Beasley, A. M. Dahlem, W. W. Carmichael, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 8557.
- [10] W. W. Carmichael, *J. Appl. Bact.* **1992**, 72, 445.
- [11] W. W. Carmichael, V. Beasley, D. L. Bunner, J. N. Eloff, I. Falconer, P. Gorham, K.-I. Harada, T. Krishnamurthy, Y. Min-Juan, R. E. Moore, K. Rinehart, M. Runnegar, O. M. Skulberg, M. Watanabe, *Toxicon* **1988**, 26, 971.
- [12] W. W. Carmichael, *Sci. Am.* **1994**, 270, 78.
- [13] Isolierung von Aeruginosin 298A: M. Murakami, Y. Okita, H. Matsuda, T. Okino, K. Yamaguchi, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 3129.
- [14] M. Welker, M. Brunke, K. Preussel, I. Lippert, H. von Döhren, *Microbiology* **2004**, 150, 1785.
- [15] M. Welker, B. Marsalek, L. Sejnohová, H. von Döhren, *Peptides* **2006**, 27, 2090.
- [16] M. Lombardo, F. C. R. Pinto, J. M. S. Vieira, Y. R. Honda, A. M. C. Pimenta, M. P. Bemquerer, L. R. Carvalho, S. Kiyota, *Toxicon* **2006**, 47, 560.
- [17] D. A. Borau, N. Dragos, M. Welker, A. Bauer, A. Nicoara, K. Schirmer, *Toxicon* **2006**, 47, 925.
- [18] T. Okino, H. Matsuda, M. Murakami, K. Yamaguchi, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 501.
- [19] T. Okino, M. Murakami, R. Haraguchi, H. Munekeata, H. Matsuda, K. Yamaguchi, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 8131.
- [20] J. L. Rios Steiner, M. Murakami, A. Tulinsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 597.
- [21] Totalsynthese von Aeruginosin 298A: N. Valls, M. López-Canet, M. Vallribera, J. Bonjoch, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 11 248.
- [22] Totalsynthesen von Aeruginosin 298A und 298B: N. Valls, M. López-Canet, M. Vallribera, J. Bonjoch, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 3446.
- [23] Totalsynthese von Aeruginosin 298A: P. Wipf, J.-L. Methot, *Org. Lett.* **2000**, 2, 4213.
- [24] Isolierung von Aeruginosin 98A und 98B: M. Murakami, K. Ishida, T. Okino, Y. Okita, H. Matsuda, K. Yamaguchi, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 2785.
- [25] Isolierung von Aeruginosin 98C, 101, 298B, 89A und 89B: K. Ishida, Y. Okita, H. Matsuda, T. Okino, M. Murakami, *Tetrahedron* **1999**, 55, 10971.

- [26] B. Sandler, M. Murakami, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 595.
- [27] C. B'Hymmer, M. Montes-Bayon, J. A. Caruso, *J. Sep. Sci.* **2003**, 26, 7.
- [28] Isolierung von Microcin SF608: R. Banker, S. Carmeli, *Tetrahedron* **1999**, 55, 10835.
- [29] Isolierung von Aeruginosin EI461: A. Ploutno, M. Shoshan, S. Carmeli, *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 973.
- [30] Totalsynthese von Aeruginosin EI461: N. Valls, M. Vallribera, S. Carmeli, J. Bonjoch, *Org. Lett.* **2003**, 5, 447.
- [31] Isolierung von Aeruginosin 102A und 102B: H. Matsuda, T. Okino, M. Murakami, K. Yamaguchi, *Tetrahedron* **1996**, 52, 14501.
- [32] Isolierung von Aeruginosin 103A: S. Kodani, K. Ishida, M. Murakami, *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 1046.
- [33] Isolierung von Aeruginosin 205A und 205B: J. H. Shin, H. Matsuda, M. Murakami, K. Yamaguchi, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 1810.
- [34] J. B. Stewart, V. Bornemann, J. L. Chen, R. E. Moore, F. R. Caplan, H. Karuso, L. K. Larsen, G. M. L. Patterson, *J. Antibiot.* **1998**, 41, 1048.
- [35] J. L. Chen, R. E. Moore, G. M. L. Patterson, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 4360.
- [36] Isolierung von Dysinosin B, C und D: A. R. Carroll, M. S. Buchanan, A. Edser, E. Hyde, M. Simpson, R. J. Quinn, *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 1291.
- [37] K. Fujii, K. Sivonen, K. Adachi, K. Noguchi, Y. Shimizu, H. Sano, K. Hirayama, M. Suzuki, K. Harada, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 5529.
- [38] A. Ploutno, S. Carmeli, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 61, 575.
- [39] N. Valls, M. Vallribera, M. Font-Bardia, X. Solans, J. Bonjoch, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, 14, 1241.
- [40] N. Toyooka, A. Makazawa, T. Himiyama, H. Nemoto, *Heterocycles* **2003**, 59, 75.
- [41] Isolierung von Oscillarin: S. Konetschny-Rapp, H.-W. Krell, U. Martin, PCT WO96/11941, **1996** [*Chem. Abst.* **1996**, 124, 315175].
- [42] R. Engh, S. Konetschny-Rapp, H.-W. Krell, U. Martin, C. Tsaklakidis, PCT WO97/21725, **1997** [*Chem. Abst.* **1997**, 127, 122002].
- [43] Totalsynthese von Oscillarin: S. Hanessian, M. Tremblay, J. F. W. Petersen, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 6064.
- [44] Isolierung von Dysinosin A: A. R. Carroll, G. K. Pierens, G. Fechner, P. de Almeida Leone, A. Ngo, M. Simpson, E. Hyde, J. N. A. Hooper, S.-L. Boström, D. Musil, R. J. Quinn, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 13340. Unseres Wissens wurde die hier angegebene Röntgenkristallstruktur von Dysinosin-A-Thrombin-Komplexen nicht in der Proteindatenbank (PDB) hinterlegt.
- [45] Isolierung von Chlordysinosin A: G. H. Goetz, G. G. Harrigan, J. J. Likos, T. P. Kasten, PCT WO03/051831, **2003** [*Chem. Abst.* **2003**, 139, 47155].
- [46] Totalsynthese von Chlordysinosin A: S. Hanessian, J. R. Del Valle, Y. Xue, N. Blomberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10491.
- [47] T. J. Martin, *Highlights Bioorg. Chem.* **2004**, 239.
- [48] J. D. Kulman, E. W. Davie, *Encycl. Biol. Chem.* **2004**, 3, 457.
- [49] R. W. Colman, A. W. Clowes, J. N. George, J. L. Hirsch, J. V. Marder in *Overview of homeostasis*, 4. Aufl. (Hrsg.: R. W. Colman, J. L. Hirsch, J. V. Marder, A. W. Clowes, J. N. George), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, **2001**, S. 3.
- [50] B. Dahlbäck, *Lancet* **2000**, 355, 1627.
- [51] E. W. Davie, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 50819.
- [52] E. W. Davie, J. D. Kulman, *Semin. Thromb. Hemostasis* **2006**, 32, 3.
- [53] B. Dahlbäck, *J. Int. Med. Res.* **2005**, 257, 209.
- [54] J. J. Sidelmann, J. Gram, J. Jespersen, C. Kluft, *Semin. Thromb. Hemostasis* **2000**, 26, 605.
- [55] *The World Health Organization (WHO) Cardiovascular Disease (CVD): Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health*, WHO, **2003**.
- [56] R. E. Babine, S. L. Bender, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1359.
- [57] D. Leung, G. Abbenante, D. P. Fairlie, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 305.
- [58] S. Srivastava, L. N. Goswami, D. K. Dikshit, *Med. Res. Rev.* **2005**, 25, 66.
- [59] B. Turk, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, 5, 785.
- [60] Eine Recherche in der Proteindatenbank (PDB) für Thrombin ergab im November 2006 489 hinterlegte Strukturen.
- [61] B. A. Bhongade, V. V. Gouripur, A. K. Gadad, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 2773.
- [62] W. Bode, I. Mayr, U. Baumann, R. Uber, S. R. Stone, J. Hofsteenge, *EMBO J.* **1989**, 8, 3467.
- [63] W. C. Ripka, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, 1, 242.
- [64] I. Schechter, A. Berger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, 27, 157.
- [65] W. Bode, D. Turk, A. Karshikov, *Protein Sci.* **1992**, 1, 426.
- [66] S. R. Stone, J. Hofsteenge, *Biochemistry* **1986**, 25, 4622.
- [67] T. J. Rydel, A. Tulinsky, W. Bode, R. Huber, *J. Mol. Biol.* **1991**, 221, 583.
- [68] C. Kettner, E. Shaw, *Thromb. Res.* **1979**, 14, 969.
- [69] D. W. Banner, A. D'Arcy, C. Chène, F. K. Winkler, A. Guha, W. H. Konigsberg, Y. Nemerson, D. Kirchhofer, *Nature* **1996**, 380, 41.
- [70] D. Kirchhofer, D. W. Banner, *Trends Cardiovasc. Med.* **1997**, 7, 316.
- [71] Y. Nakayama, K. Senokuchi, H. Nakai, T. Obata, M. Kawamura, *Drugs Future* **1997**, 22, 285.
- [72] M. R. Wiley, N. Y. Chirgadze, D. K. Clawson, T. J. Craft, D. S. Gifford-More, N. D. Jonas, J. L. Olkowski, A. L. Schacht, L. C. S. Weir, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5, 2835.
- [73] W. Bode, P. Schwager, *J. Mol. Biol.* **1975**, 98, 693.
- [74] Y. Fukuta, T. Ohshima, V. Gnanadesikan, T. Shibuguchi, T. Nemoto, T. Kisugi, T. Okino, M. Shibasaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 5433.
- [75] A. Noël, C. Gilles, K. Bajou, L. Devy, F. L. Kebers, *Invasion Metastasis* **1997**, 17, 221.
- [76] Zur Verwendung von Tyrosinderivaten bei der Synthese von Octahydroindolen: J. Bonjoch, J. Catena, E. Isábal, M. López-Canet, N. Valls, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 1899.
- [77] Z. Wang, B. La, J. M. Fortunak, X.-J. Meng, G. W. Kabalka, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 5501.
- [78] C.-X. Fan, X.-L. Hao, Y.-H. Ye, *Synth. Commun.* **1996**, 26, 1455.
- [79] H.-T. Li, X.-H. Jiang, Y.-H. Ye, C.-X. Fan, T. Romoff, M. Goodman, *Org. Lett.* **1999**, 1, 91.
- [80] T. Ohshima, V. Gnanadesikan, T. Shibuguchi, Y. Fukuta, T. Nemoto, M. Shibasaki, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11206.
- [81] T. Shibiguchi, Y. Kukuta, Y. Akachi, A. Sekine, T. Ohshima, M. Shibasaki, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 9539.
- [82] T. Nemoto, H. Kakei, V. Gnanadesikan, S.-Y. Toskai, T. Ohshima, M. Shibasaki, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14544.
- [83] Totalsynthese von Microcin SF608: N. Valls, M. Vallribera, M. López-Canet, J. Bonjoch, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 4945.
- [84] Totalsynthese von Dysinosin A: S. Hanessian, R. Margarita, A. Hall, S. Johnstone, M. Tremblay, L. Parlanti, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 13342.
- [85] S. Hanessian, R. Margarita, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 5887.
- [86] S. T. Nguyen, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9858; Übersichten: a) R. H. Grubbs, *Tetrahedron* **2004**, 60, 7117; b) B. Schmidt, J. Hermanns, *Top. Organomet. Chem.* **2004**, 7, 223; c) S. J. Connon, S. Blechert, *Top. Organomet. Chem.* **2004**, 7, 93; d) T. M. Trnka, R. H. Grubbs, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 18; e) A. Fürstner, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 3140; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 3012.

- [87] K. Feichtinger, C. Zapf, H. L. Sings, M. Goodman, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 3804.
- [88] K. C. Nicolaou, A. D. Piscopio, P. Bertinato, T. K. Chakraborty, N. Minowa, K. Koide, *Chem. Eur. J.* **1995**, 1, 318.
- [89] A. Lubineau, R. Lemoine, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 8795.
- [90] W. J. Sanders, D. D. Manning, K. M. Koeller, L. L. Keissling, *Tetrahedron* **1997**, 53, 16391.
- [91] S. Hanessian, M. Tremblay, M. Marzi, J. R. Del Valle, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 5070.
- [92] C. G. Caldwell, S. S. Bondy, *Synthesis* **1990**, 34.
- [93] P. Sun, S. Weinreb, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 8604.
- [94] G. Sabitha, R. S. Babu, M. Rajkumar, C. S. Reddy, J. S. Yadav, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 3955.
- [95] N. Valls, M. Borregán, J. Bonjoch, *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 3701.
- [96] M. Zhao, J. Li, Z. Song, R. Desmond, D. M. Tschäen, E. J. J. Grabowski, P. J. Reider, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 5323.
- [97] K. C. Nicolaou, A. A. Estrada, M. Zak, S. H. Lee, B. S. Safina, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 1402; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 1378.
- [98] S. David, S. Hanessian, *Tetrahedron* **1985**, 41, 643.
- [99] G. Radau, D. Rauh, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 779.
- [100] G. Radau, J. Stürzebecher, *Pharmazie* **2002**, 57, 729.
- [101] a) G. Radau, S. Schermuly, A. Fritsche, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2003**, 336, 300; b) G. Radau, J. Gebel, D. Rauh, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2003**, 336, 372.
- [102] T. Doi, Y. Hoshina, H. Mogi, Y. Yamada, T. Takahashi, *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 571.
- [103] S. Hanessian, S. Guillemette, K. Ersmark, *Chimia* **2007**, 61, 361.
- [104] S. Hanessian, K. Ersmark, X. Wang, J. R. Del Valle, N. Blomberg, Y. Xue, O. Fjellström, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 3480.
- [105] X. Nie, G. Wang, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 8687.
- [106] D. Gustafsson, R. Bylund, T. Antonsson, I. Nilsson, J. E. Nyström, H. Eriksson, H. Bredberg, A. C. Teger-Nilsson, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, 3, 649.
- [107] Food and Drug Administration (FDA). Cardiovascular and Renal Drugs Advisory Committee September 10, 2004. Siehe: AstraZeneca press release <http://www.exanta.com/content3682.htm>.
- [108] M. Moledina, M. Chakir, P. I. Ghandi, *J. Thromb. Thrombolysis* **2001**, 12, 141.
- [109] a) G. Abbenante, D. P. Fairlie, *Med. Chem.* **2005**, 1, 71; b) E. Saiah, C. Soares, *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, 5, 1677; c) A. Schwienhorst, *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, 63, 2773.
- [110] Siehe z.B.: A. DiFenzo, A. Heine, U. Koert, G. Klebe, *Chem-MedChem* **2007**, 2, 297.
- [111] J. Owens, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, 6, 187.
- [112] R. M. Scarborough, A. Pandey, X. Zhang, *Annu. Rep. Med. Chem.* **2005**, 40, 85.
- [113] R. Pfau, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2003**, 6, 437.
- [114] P. E. J. Sanderson, A. M. Naylor-Olsen, *Curr. Med. Chem.* **1998**, 5, 289.
- [115] S. Hanessian, *ChemMedChem* **2006**, 1, 1300.