

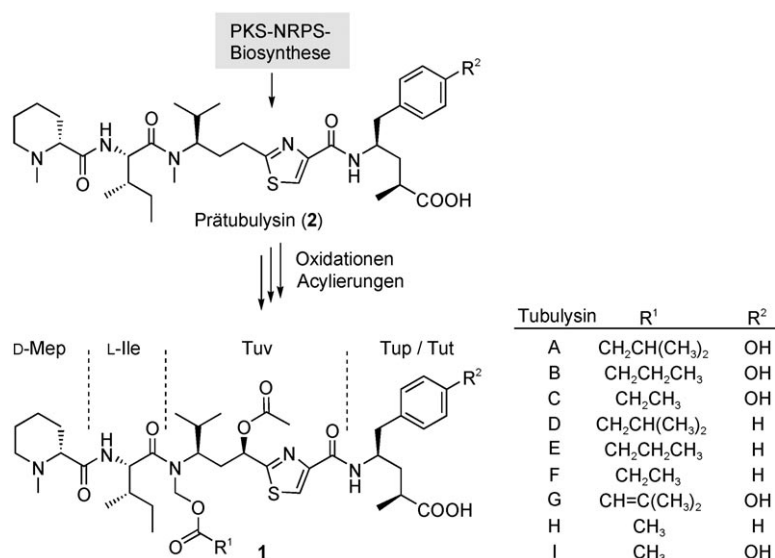
Prätubulysin, eine potente und synthetisch leicht zugängliche Vorstufe von Tubulysin aus *Angiococcus disciformis*

Angelika Ullrich, Yi Chai, Dominik Pistorius, Yasser A. Elnakady, Jennifer E. Herrmann, Kira J. Weissmann, Uli Kazmaier* und Rolf Müller*

Professor Heinz G. Floss zum 75. Geburtstag gewidmet

Die Tubulysine (**1**) sind eine Familie von insgesamt neun Sekundärmetaboliten (Schema 1), die von diversen Myxobakterienstämmen produziert werden, darunter *Angiococcus*

nylalanin oder Tyrosin, genannt Tubuphenylalanin (Tup) bzw. Tubutyrosin (Tut). Alle Tubulysine enthalten ferner eine Acetoxygruppe (in Tuv), unterscheiden sich jedoch in der Seitenkette des Bisacyl-*N,O*-Acetals (R^1). Deren Größe variiert von einer Acetylgruppe in den Tubulysinen H und I bis zu einer 3-Methylbutyratgruppe in den Tubulysinen A und D. Die Tubulysine gehören zu einer Handvoll von Naturstoffen, die mit dem eukaryotischen Zytoskelett interagieren, wobei sie die Polymerisation von Tubulin bereits im Pikomolbereich hemmen.^[2] Das Wachstum diverser Tumorzellen wird von ihnen 20- bis 100fach stärker gehemmt als von anderen Tubulinbindern wie den Epothilonen, Vinblastin oder Taxol. Dies macht sie zu interessanten Kandidaten für die Behandlung vor allem auch gegen mehrere Wirkstoffe resistenter Tumore (MDR-Tumore) und initiierte intensive Forschungen zur Chemie und Biologie dieser Verbindungsklasse. Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen an synthetischen Analoga von Tubulysin D,^[3-6] dem aktivsten Metaboliten, ergaben ein klares Bild, welche Strukturmerkmale für die biologische Aktivität essenziell sind, und führten zu Vorschlägen, wie sich die pharmakologischen Eigenschaften dieser Metabolite optimieren



Schema 1. Postulierter Verlauf der Biosynthese der neun bekannten Tubulysine A–I.

disciformis And48 und *Archangium gephyra* Ar315.^[1] Allen gemein ist eine lineare Tetrapeptidgrundstruktur, bestehend aus *N*-Methylpipecolinsäure (Mep), Isoleucin (Ile), der neuen Aminosäure Tubuvalin (Tuv) und einem verlängerten Phe-

lassen. So scheint eine Reihe von Strukturmodifikationen ohne signifikanten Einbruch der biologischen Wirkung toleriert zu werden. Beispielsweise lässt sich das labile *N,O*-Acylal problemlos durch einfache Alkylgruppen ersetzen.

Wir haben uns nun gezielt der Biosynthese der Tubulysine gewidmet, mit dem Ziel, neue Metabolite zu identifizieren, und der Option, Tubulysinderivate durch genetisches Engineering zugänglich zu machen.^[7] Im Folgenden berichten wir über die Struktur einer neuen Verbindung, Prätubulysin aus *A. disciformis*, die durch Fütterungsexperimente und hochauflösende Massenspektrometrie charakterisiert und durch Vergleich mit vollsynthetischem Material verifiziert wurde. Prätubulysin, das identisch ist mit einem bereits früher postulierten biosynthetischen Intermediat,^[7a] zeigt ähnlich hohe Tubulin abbauende Aktivität wie die deutlich komplexeren Tubulysine.

Die Sequenzierung des Tubulysinbiosynthese-Genclusters aus *A. disciformis*, dem Produzenten der Tubulysine D, E, F und H (Schema 1),^[1b] ergab, dass diese Metabolite durch ein Hybridsystem aus Polyketidsynthetasen (PKS) und nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) gebildet werden. Diese

[*] Dr. A. Ullrich,^[†] Prof. Dr. U. Kazmaier
Institut für Organische Chemie, Universität des Saarlandes
Postfach 151150, 66041 Saarbrücken (Deutschland)
Fax: (+49) 681-302-2409
<http://www.uni-saarland.de/fak8/kazmaier>
E-Mail: u.kazmaier@mx.uni-saarland.de

Y. Chai,^[†] D. Pistorius, Dr. Y. A. Elnakady, J. E. Herrmann,
Dr. K. J. Weissmann, Prof. Dr. R. Müller
Institut für Pharmazeutische Biotechnologie
Universität des Saarlandes
Postfach 151150, 66041 Saarbrücken (Deutschland)
Fax: (+49) 681-302-70202
<http://www.myxo.uni-saarland.de>
E-Mail: rom@mx.uni-saarland.de

[†] Diese Autoren waren gleichermaßen an dieser Arbeit beteiligt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200900406> zu finden.

Multienzym-Assemblierungslinie besteht aus fünf NRPS- und zwei PKS-Modulen.^[7a] Der etwa 40 kbp umfassende Gencluster codiert auch für eine Lysin-Cyclodeaminase (TubZ), die wahrscheinlich die Biosynthese von Pipecolinsäure dirigiert, der vermuteten Startereinheit für die Tubulysinbiosynthese.

Um die Beteiligung von *tubZ* an der Biosynthese zu beweisen, haben wir das Gen durch Insertionsmutagenese inaktiviert. Dadurch sollte die Bereitstellung von Pipecolinsäure beeinträchtigt und daher kein Tubulysin mehr produziert werden. Erstaunlicherweise wurde aber bei der anschließenden HPLC-MS-Analyse Tubulysin D in den Extrakten der Mutante And48-*tubZ*⁻ eindeutig nachgewiesen, wobei die Menge etwa 3 % der Wildtypproduktion entsprach.

Zusätzlich wurden gut nachweisbare Mengen eines neuen Metaboliten **2** (m/z 670.4; Abbildung 1) gefunden. Die Tubulysine E, F und H wurden nicht nachgewiesen. Dieses Ergebnis lässt in der Tat auf eine Beteiligung von TubZ bei der Pipecolinsäurebiosynthese schließen, allerdings muss angenommen werden, dass eine zweite Lysin-Cyclodeaminase-

aktivität in *A. disciformis* vorliegt. Zugabe von [D₈]-L-Valin zur Kultur des Produzenten und anschließende Analyse des Einbaumusters in **2** und Tubulysin D zeigte eindeutig die Verwandtschaft beider Moleküle (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen).

Hochauflösende Massenspektrometrie von **2** lieferte m/z 670.3987, was mit einer Summenformel C₃₆H₅₅N₅O₅S (ber. $[M + H]^+ = 670.4002$, $\Delta = -0.939$ ppm) in Einklang ist. Weil der neue Naturstoff die Struktur des bereits von uns vorhergesagten ersten enzymfreien Intermediats des Biosynthesewegs zu haben schien^[7a] – des von der PKS/NRPS gebildeten Tubulysinrückgrats ohne die vier oxidativen und acylierenden Post-Assemblierungsschritte –, nannten wir ihn Prä-tubulysin (**2**) (Schema 1). Bei einer erneuten Analyse von Extrakten des Wildtypen von *A. disciformis* And48 wurde ebenfalls Prä-tubulysin in geringer Menge nachgewiesen (Abbildung 1), was die Theorie stützt, dass **2** ein Biosyntheseintermediat ist. Wir gingen deshalb davon aus, dass Prä-tubulysin ein stabiles Analogon der komplexeren Tubulysine ist, das sich sehr gut für die weitere Evaluierung als Wirk-

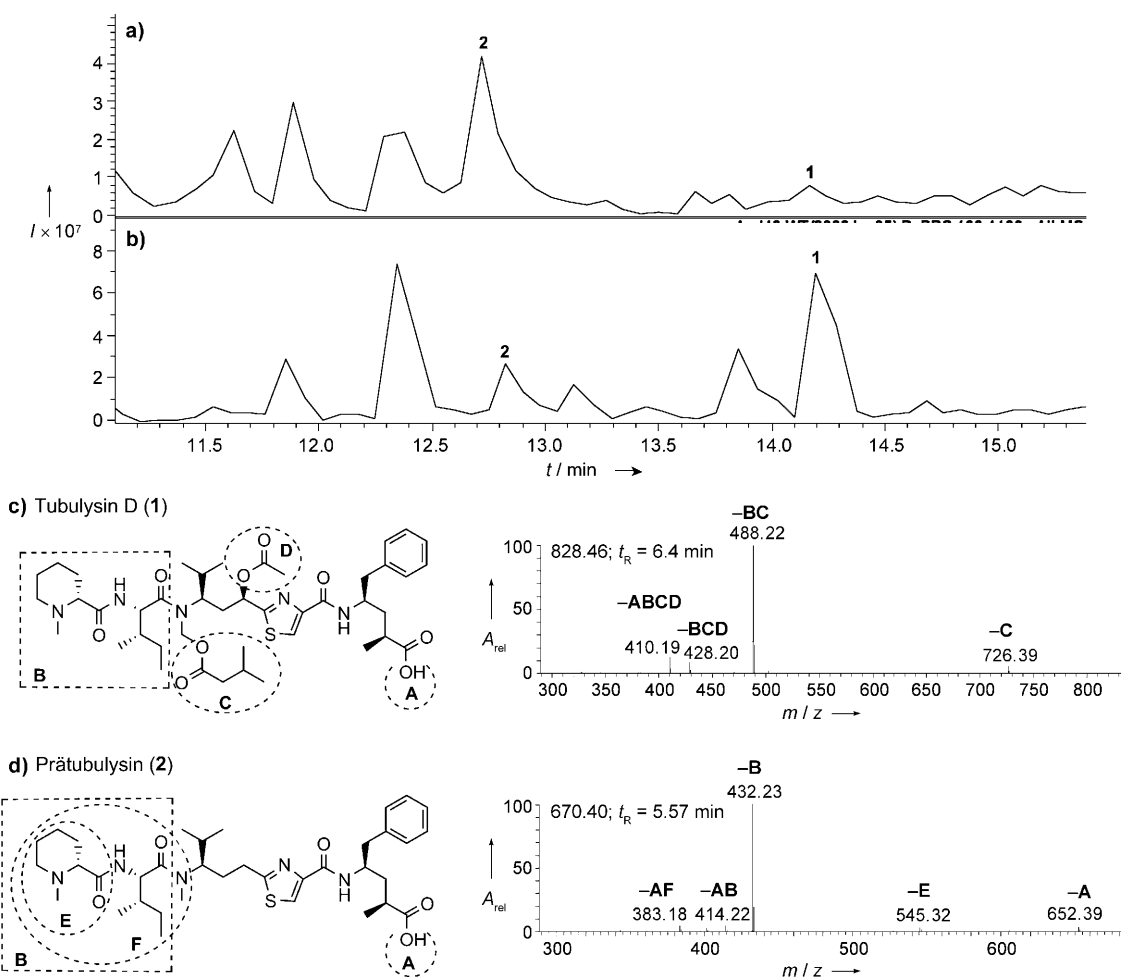
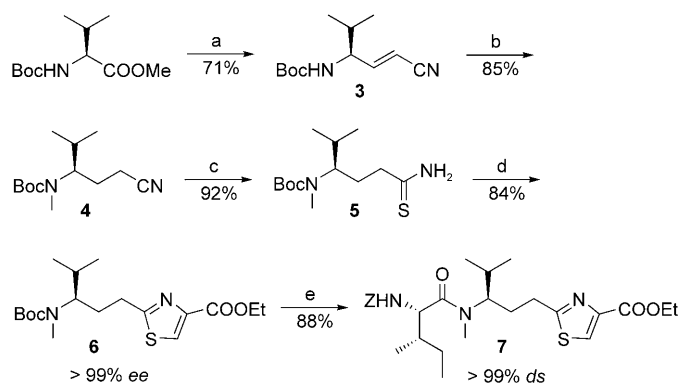


Abbildung 1. Identifizierung von Prä-tubulysin. a) HPLC-MS-Analyse (Basispeak-Chromatogramm (BPC)) der Mutante And48-*tubZ*⁻. Tubulysin D (**1**) und Prä-tubulysin (**2**) sind gekennzeichnet. b) HPLC-MS-Analyse (BPC) vom Extrakt der Wildtypzellen *A. disciformis* And48, ebenfalls mit Markierung von **1** und **2**. Vergleichende Analyse der MS²-Fragmentierungsmuster von **1** (c) und **2** (d). Vergleichbare Fragmente, die vom jeweiligen Metaboliten abgespalten werden, sind markiert. In den Massenspektren sind die Retentionszeiten und die Molekülmassen der Mutterionen angegeben. In den Formeln links sind die Fragmente gekennzeichnet, die bei der Bildung der Tochterionen abgespalten werden. Die Daten wurden mit einem Thermo-LTQ-Orbitrap-Hybrid-FT-Massenspektrometer erhalten.

stoffkandidat eignen sollte. Eine NMR-spektroskopische Bestätigung der Struktur von Prätubulylin gelang nicht, da selbst nach Anzüchten von 20 L Kulturvolumen von *A. disciformis* nicht genügend Substanz isoliert werden konnte. Deshalb wurde die Tandem-Massenspektrometrie (MS^2 - MS^6) eingesetzt, um die Struktur zu verifizieren, wobei die Fragmentierungsmuster mit denen von Tubulylin D verglichen wurden (die MS^2 -Daten sind in Abbildung 1 gezeigt). Die Fragmentierungsmuster zeigten allerdings wenig Ähnlichkeit, was vermuten lässt, dass die Acylgruppen in Tubulylin D entscheidenden Einfluss auf die Art der Fragmentierung haben. Die Analyse der hochaufgelösten Massen der Prätubulylinfragmente führte aber trotzdem zu eindeutigen Molekülformeln, die mit der vorhergesagten Struktur übereinstimmen (Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen).

Um unsere Biosynthesehypothese zweifelsfrei zu beweisen und die biologische Aktivität von Prätubulylin im Detail zu untersuchen, haben wir zusätzlich eine effiziente Synthese dieser Substanz entwickelt.^[8] Die Synthese der zentralen Ile-dTuv-Einheit (dTuv: Desacetoxytubuvalin) ist in Schema 2

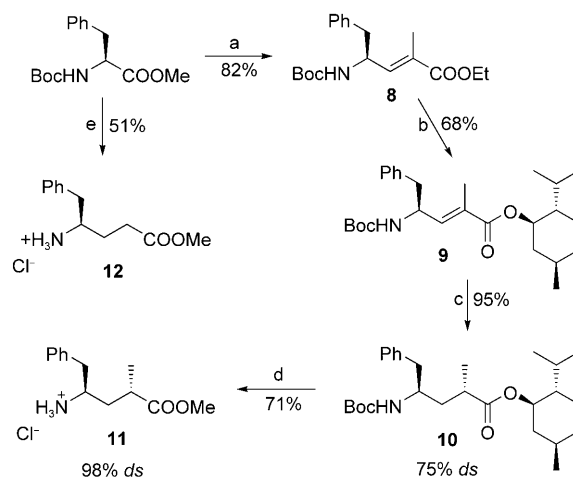


Schema 2. Synthese des Ile-dTuv-Fragments. Reagentien und Reaktionsbedingungen: a) 1. DibalH, Toluol, -78°C ; 2. $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CHCN}$; b) 1. H_2 , Pd/C, MeOH; 2. NaH, MeI, DMF, 0°C ; c) 1. $\text{BrCH}_2\text{COCOOEt}$, Aceton, -10°C ; 2. TFA_2O , Pyridin, CH_2Cl_2 , -30°C \rightarrow Raumtemperatur; d) 1. HCl, Dioxan, 0°C ; 2. Z-Ile, BEP (2-Brom-1-ethylpyridiniumtetrafluorborat),^[10] Diisopropylethylamin, CH_2Cl_2 , -10°C .

dargestellt. Ausgehend von *N*-Boc-geschütztem Valinester erhält man durch Dibal-Reduktion und In-situ-Wittig-Reaktion des dabei gebildeten Aldehyds das ungesättigte Nitril **3** in enantiomerenreiner Form. Katalytische Hydrierung und anschließende *N*-Methylierung zu **4** verliefen ebenfalls racemisierungsfrei. Die Nitrilfunktion wurde anschließend in das Thioamid **5** überführt, das einer Hantzschschen Thiazolsynthese unterworfen wurde. Dabei wurde mit Trifluoressigsäure (TFA₂O) das primär gebildete Hydroxythiazol-Intermediat in das Thiazol **6** umgewandelt. Das benötigte Dipeptid **7** wurde nach Spaltung der Boc-Schutzgruppe und Kupplung mit *Z*-Ile erhalten.

Trotz der vermeintlichen Einfachheit der Tup-Einheit ist die stereoselektive Einführung der α -Methylgruppe nicht trivial.^[5,9] Da unsere ersten Versuche – durch Enolat-Alkylierung – nicht erfolgreich waren, wandten wir uns dem pragmatischen Weg der katalytischen Hydrierung zu. Der

benötigte α,β -ungesättigte Ester **8** war einfach aus geschütztem Phe durch Dibal-Reduktion/Wittig-Olefinierung zugänglich (Schema 3). Auch bei dieser Eintopfreaktion wurde

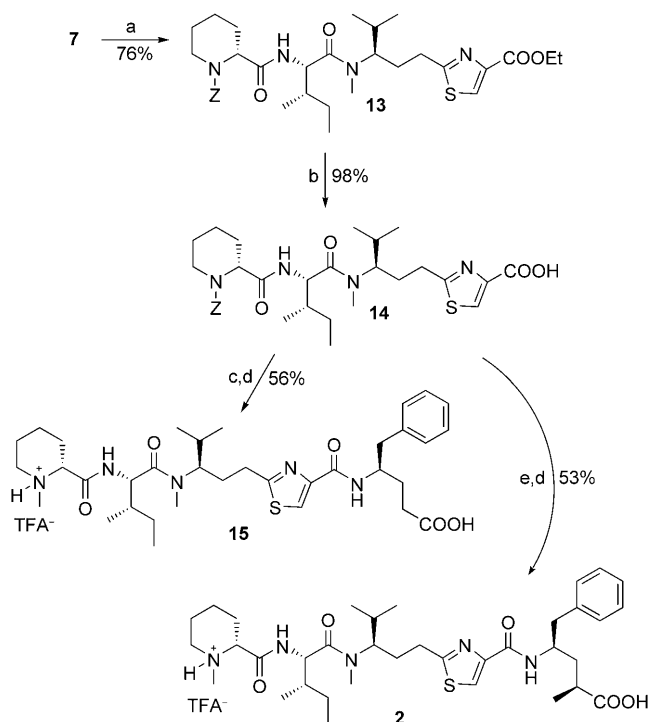


Schema 3. Synthese von Tup (**11**) und dTup (**12**). Reagentien und Reaktionsbedingungen: a) 1. DibalH, CH_2Cl_2 , -78°C ; 2. $\text{Ph}_3\text{P}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOEt}$; b) 1. NaOH, Dioxan, 80°C ; 2. Menthol, DCC, DMAP, Et_2O , 0°C ; c) H_2 , Pd/C, MeOH; d) 6 N HCl, 140°C ; 2. DMP, HCl_{kat} , MeOH, 50°C ; e) 1. DibalH, CH_2Cl_2 , -78°C ; 2. $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CHCOOEt}$; 3. H_2 , Pd/C, MeOH; 4. HCl, Dioxan, 0°C .

keinerlei Racemisierung beobachtet, wohingegen eine Isolierung und Reinigung des Aldehyds zu nahezu kompletter Racemisierung führte. Die katalytische Hydrierung von **8** ergab eine 2:1-Mischung der diastereomeren Tup-Derivate. Leider brachte die Hydrierung der freien Säure (wie von Wipf et al. beschrieben^[5]) oder des entsprechenden Allylkohols keine signifikante Verbesserung. Da Zanda et al. eine chromatographische Trennung der entsprechenden Menthylester beschrieben haben,^[9] überführten wir **8** in den Menthylester **9**. Dessen Hydrierung ergab eine Selektivität von 3:1 zugunsten des benötigten Diastereomers. Nach chromatographischer Diastereomerentrennung und Abspaltung der Schutzgruppen wurde **11** in enantiomerenreiner Form erhalten.^[9]

Um den Einfluss der Methylgruppe auf die biologische Aktivität zu überprüfen, stellten wir auch das Desmethylderivat (dTup) **12** her.^[10] An diesem vereinfachten Analogon erprobten wir auch die finalen Stufen unserer Synthese (Schema 4). Abspaltung der *Z*-Schutzgruppe vom Dipeptid **7** und anschließende Peptidkupplung mit geschütztem *D*-Pip ergab das Tripeptid **13**, das quantitativ zur freien Säure verseift werden konnte. Auch die Verknüpfung mit dTup (**12**) verlief problemlos. Die Synthesesequenz wurde durch Abspaltung der *Z*-Schutzgruppe, reduktive Methylierung der Pipicolinsäure und Verseifung des Esters zu Desmethylprätubulylin (**15**) vervollständigt. Nach demselben Schema wurde auch Prätubulylin (**2**) erhalten.

Die massenspektrometrischen Daten des biosynthetischen Prätubulylins stimmten völlig mit denen des synthetisierten **2** überein (Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen), was den Strukturvorschlag für das isolierte Material verifiziert. Zusätzlich waren die biologischen Aktivitäten des natürlichen und des synthetisierten Materials gegenüber humanen Leukämiezellen (HL-60) sehr ähnlich.



Schema 4. Synthese von Prätubulysin (**2**) und dem Desmethylderivat **15**. Reagentien und Reaktionsbedingungen: a) 1. HBr/HOAc; 2. Z-(D)-Pip, ClCOO*i*Bu, *N*-Methylmorpholin (NMM), THF, -20°C ; b) NaOH, Dioxan, 0°C ; c) **12**, ClCOO*i*Bu, NMM, THF, -20°C ; d) 1. HBr/HOAc; 2. $(\text{CH}_2\text{O})_n$, NaBH_3CN , MeOH; 3. NaOH, Dioxan, 0°C ; 4. TFAA, e) **11**, ClCOO*i*Bu, NMM, THF, -20°C .

Die HL-60-Zelllinien wurden auch herangezogen, um die Cytotoxizität von **2** und der synthetischen Variante **15** mit der von Tubulysin A (**1A**) und D (**1D**) zu vergleichen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Cytotoxizität der Tubulysine und ihrer Analoga im MTT-Assay (IC_{50} [ng mL^{-1}]).^[a]

Zelllinie	1A	1D	2	15
HL-60	0.01	0.006	0.03	0.39
L929	0.19	0.015	6.5	74
U937	0.003	0.0004	0.08	0.41

[a] Durchschnittswerte zweier Messungen, Inkubationszeit: 5 d.

Tubulysin D ist bekanntermaßen das toxischere der beiden Tubulysine, und seine Aktivität ist ungefähr sechsmal höher als die von Tubulysin A.^[2] Wie aufgrund früherer Struktur-Aktivitäts-Studien vermutet, ist **2** nur um den Faktor 3–5 weniger aktiv als die Tubulysine A und D, während das Entfernen der Methylgruppe (**15**) die Cytotoxizität auf ein Dreizehntel reduzierte. Basierend auf diesen Resultaten testeten wir unsere Verbindungen sowie die Tubulysine A und D an zwei weiteren Zelllinien, L929 (Bindegewebsfibroblasten der Maus) und U937 (humanes histiozytisches Lymphom). Sowohl **2** als auch **15** zeigten eine signifikante, wenn auch geringere Aktivität als die Tubulysine, wobei **2** durchweg die aktivere der beiden synthetischen Verbindungen ist.

Diese Daten ergänzen die anderer Gruppen^[3–6] hinsichtlich der Struktur-Aktivitäts-Beziehung. Die hohe biologische

Aktivität von Prätubulysin (**2**) zeigt, dass weder das *N,O*-Acetal noch die Acetoxygruppe von Tuv essenziell für eine hohe Cytotoxizität sind, wobei jedoch ein moderater Aktivitätsverlust (auf etwa ein Zehntel) gegenüber analogen Verbindungen mit Acetoxygruppen beobachtet wird. Aus dem Vergleich der Daten von **2** und dem Desmethylderivat **15** folgt, dass die Methylgruppe ebenfalls eine Aktivitätssteigerung, und zwar um den Faktor zehn, bewirkt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die komplexe Struktur der Tubulysine signifikant vereinfachen lässt, ohne dass dabei die biologische Aktivität drastisch einbricht. So ist Prätubulysin (**2**), das als biosynthetische Vorstufe der Tubulysine identifiziert wurde, zwar weniger aktiv als die Tubulysine A und D, es wirkt aber immer noch im Pikomolbereich. Dies sollte den Anstoß geben zum Design und zur Synthese neuer, vereinfachter und trotzdem potenter Analoga der Tubulysine als potentielle Antitumorgentien.

Eingegangen am 21. Januar 2009

Online veröffentlicht am 8. Mai 2009

Stichwörter: Myxobakterien · Naturstoffe · Nichtribosomale Peptidsynthetasen · Polyketidsynthasen · Tubulysine

- a) F. Sasse, H. Steinmetz, J. Heil, G. Höfle, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **2000**, 53, 879–885; b) H. Steinmetz, N. Glaser, E. Herdtweck, F. Sasse, H. Reichenbach, G. Höfle, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 4996–5000; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4888–4892.
- M. W. Khalil, F. Sasse, H. Lünsdorf, Y. A. Elnakady, H. Reichenbach, *ChemBioChem* **2006**, 7, 678–683.
- a) R. Balasubramanian, B. Raghavan, J. C. Steele, D. L. Sackett, R. A. Fecik, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 2996–2999; b) B. Raghavan, R. Balasubramanian, J. C. Steele, D. L. Sackett, R. A. Fecik, *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 1530–1533.
- a) A. W. Patterson, H. M. Peltier, F. Sasse, J. A. Ellman, *Chemistry* **2007**, 13, 9534–9541; b) A. W. Patterson, H. M. Peltier, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 4362–4369.
- a) P. Wipf, Z. Wang, *Org. Lett.* **2007**, 9, 1605–1607; b) Z. Wang, P. A. McPherson, B. S. Raccor, R. Balachandran, G. Zhu, B. W. Day, A. Vogt, P. Wipf, *Chem. Biol. Drug Res.* **2007**, 70, 75–86.
- a) A. Dömling, B. Beck, U. Eichelberger, S. Sakamuri, S. Menon, Q.-Z. Chen, Y. Lu, L. A. Wessjohann, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 7393–7397; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7235–7239; b) A. Dömling, W. Richter, *Mol. Diversity* **2005**, 9, 141–147.
- a) A. Sandmann, F. Sasse, R. Müller, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 1071–1079; b) S. C. Wenzel, R. Müller, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, 16, 594–606; c) H. B. Bode, R. Müller, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 33, 577–588; d) S. C. Wenzel, R. Müller, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, 24, 1211–1224.
- Die erste Totalsynthese von Tubulysin D beschrieben H. M. Peltier, J. P. McMahon, A. W. Patterson, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 16018–16019.
- a) M. Sani, G. Fossati, F. Huguenot, M. Zanda, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 3596–3599; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 3526–3529.
- a) P. Buchschacher, J.-M. Cassal, A. Fiirst, W. Meier, *Helv. Chim. Acta* **1977**, 60, 2747–2755; b) M. Nasopoulou, D. Georgiadis, M. Matziari, V. Dive, A. Yiotakis, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 7222–7228.