

Salinosporamide

DOI: 10.1002/ange.201000728

Salinosporamid-Naturstoffe: potente Inhibitoren des 20S-Proteasoms als vielversprechende Krebs-Chemotherapeutika

Tobias A. M. Gulder und Bradley S. Moore*

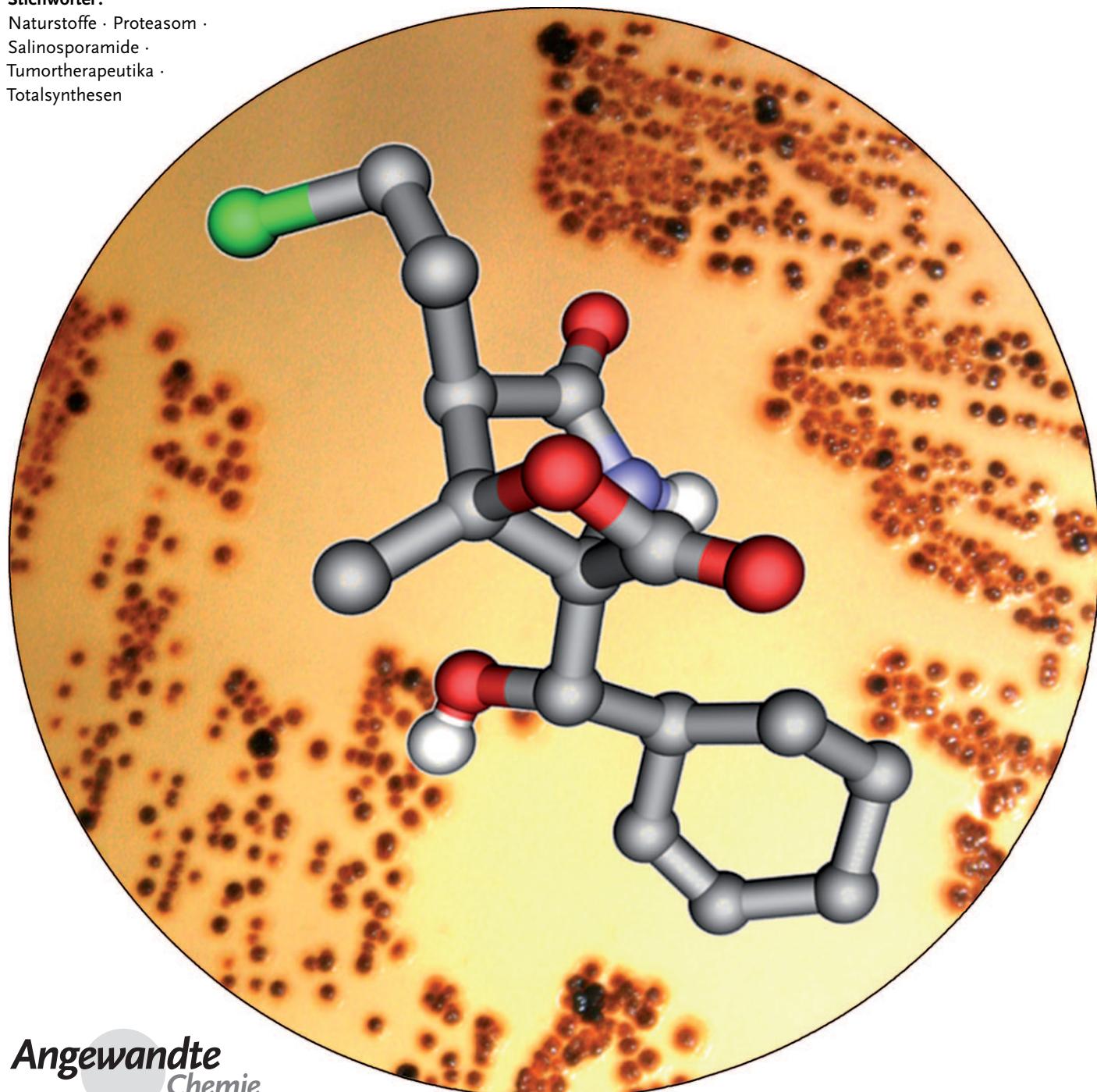
Stichwörter:

Naturstoffe · Proteasom ·

Salinosporamide ·

Tumorth erapeutika ·

Totalsynthesen



Angewandte
Chemie

Proteasominhibitoren entwickeln sich rasch zu potenten Behandlungsoptionen in der Krebstherapie. Einer der vielversprechendsten Wirkstoffkandidaten dieses Typs ist das Salinosporamid A aus dem Bakterium *Salinispora tropica*. Dieser marine Naturstoff hat einen komplexen, dicht funktionalisierten γ -Lactam- β -lacton-Pharmakophor, der für die irreversible Bindung zum Target, der β -Untereinheit des 20S-Proteasoms, verantwortlich ist. Klinische Studien der Phase I zur Behandlung von multiplem Myelom mit Salinosporamid A begannen nur drei Jahre nach dessen Entdeckung. Die starke biologische Aktivität und die faszinierende Struktur dieser Verbindung haben in den letzten Jahren intensive akademische und industrielle Forschungsarbeiten angetrieben, die zur Entwicklung von mehr als zehn Totalsynthesen, der Aufklärung des Biosyntheseweges und der Generierung vielversprechender Informationen zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen sowie onkologischer Daten geführt haben. Salinosporamid A ist daher ein faszinierendes Beispiel für das erfolgreiche Zusammenspiel von moderner Wirkstoffsuche und biomedizinischer Forschung, Medizinalchemie and Pharmakologie, Naturstoffanalyse und -synthese sowie Biosynthese und Bioengineering.

1. Einleitung

Naturstoffe haben eine lange Geschichte als Mittel zur Behandlung von menschlichen Erkrankungen.^[1] Unter den bekanntesten frühen Beispielen für Sekundärmetaboliten, die für die menschliche Gesundheit genutzt werden, finden sich Antibiotika wie die Penicilline,^[2] Cinchona-Alkaloide wie der Malariawirkstoff Chinin^[3] und Morphin,^[4] ein wirkungsvolles Schmerzmittel. Die Wichtigkeit dieser Moleküle für die Qualität des modernen Lebens machte sie sogar außerhalb der Welt der Wissenschaft und Medizin wohlbekannt. Trotz sinkendem Interesse großer pharmazeutischer Unternehmen an der Suche nach natürlichen Wirkstoffen ist die Bedeutung der Natur in momentan genutzten medizinischen Präparaten weiterhin beeindruckend hoch.^[5] Von besonderer Bedeutung sind natürliche Verbindungen im Bereich der Krebsbehandlung.^[6–8] Die meisten der etablierten Krebsmedikamente, die aus der Natur stammen, finden ihren Ursprung in Pflanzen (z.B. Vinblastin, Taxol und Camptothecin)^[9,10] sowie terrestrischen Mikroorganismen (z.B. Mitomycin und Doxorubicin).^[7] Die Erforschung des marinen Lebensraums hat in den letzten Jahren unzählige Antikrebsleitstrukturen hervorgebracht, die aus marinen Invertebraten, wie Schwämmen, Bryozoen, und Ascidien, isoliert wurden.^[11,12] Eine dieser Verbindungen, Ecteinascidin-743, wurde kürzlich zur klinischen Nutzung in Europa zugelassen.^[13] Die Entwicklung solcher strukturell komplexen marinen Metabolite als Wirkstoffe wird jedoch durch die begrenzte Verfügbarkeit ausreichender Mengen reinen Materials erschwert. Die Erkenntnis, dass viele dieser Verbindungen statt von den Originalquellen auch von Mikroorganismen erhalten werden könnten,^[14] schürte von Neuem das Interesse an der Untersuchung des Spektrums der Sekundärmetabolite der assoziierten mikro-

Aus dem Inhalt

| | |
|--|------|
| 1. Einleitung | 9535 |
| 2. Das Proteasom – ein validiertes Target in der Krebs-Chemotherapie | 9536 |
| 3. Entdeckung der Salinosporamidfamilie | 9538 |
| 4. Die Biosynthese von Salinosporamid A | 9539 |
| 5. Totalsynthesen von Salinosporamid A | 9542 |
| 6. Herstellung molekularer Diversität am Salinosporamid-Grundgerüst und Studien zum Wirkmechanismus | 9547 |
| 7. Salinosporamid A in der Krebstherapie | 9553 |
| 8. Schlussbemerkungen und Ausblick | 9553 |
| 9. Addendum (1. August 2010) | 9554 |

biellen Gemeinschaft chemisch überaus produktiver Makroorganismen. Dies führte zur Entdeckung einer Reihe interessanter mikrobieller Quellen für bedeutende Tumortherapeutika, z.B. Taxol produzierender endophytischer Pilze^[15] und potenzieller bakterieller Produzenten von Bryostatin 1.^[16] Darüber hinaus rücken obligat-marine Mikroorganismen in den Fokus von Naturstoff-Forschern.^[17–20] Solche Mikroorganismen beginnen sich gerade als nachhaltige Quellen für neuartige chemische Bausteine in akademischen Programmen zur Wirkstoffsuche zu entwickeln. Eine besonders reiche Quelle für solche Verbindungen sind obligat-

[*] Prof. Dr. B. S. Moore
 Scripps Institution of Oceanography
 und
 Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences
 University of California at San Diego
 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093-0204 (USA)
 Fax: (+1) 858-534-1305
 E-Mail: bsmoore@ucsd.edu
 bsmoore@ucsd.edu
 Homepage: <http://moorelab.ucsd.edu>
 Dr. T. A. M. Gulder
 Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie
 Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
 Gerhard-Domagk Straße 1
 53121 Bonn (Deutschland)

marine Bakterien der kürzlich beschriebenen Gattung *Salinispora*.^[21,22] Chemische Untersuchungen an dieser jungen Klasse mariner Bakterien führten zur Entdeckung mannigfaltiger neuer Sekundärmetaboliten, z.B. Cyanosporasid A (**1**),^[23] Saliniketal A (**2**)^[24] und Sporolid A (**3**; Abbildung 1).^[25] Der vielversprechendste Wirkstoffkandidat, der

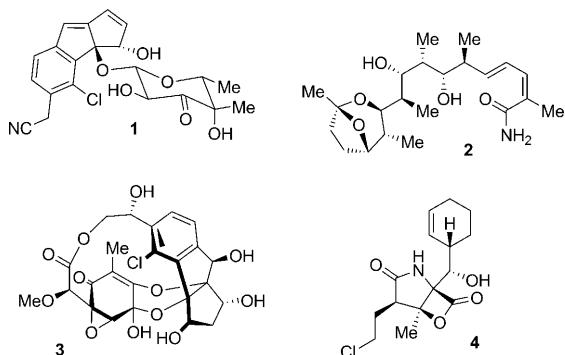


Abbildung 1. Auswahl strukturell neuartiger Naturstoffe, die aus marinen Actinomyceten der Gattung *Salinispora* isoliert wurden: Cyanosporasid A (**1**) aus *S. pacifica*; Saliniketal A (**2**) aus *S. arenicola*; Sporolid A (**3**) und Salinosporamid A (**4**) aus *S. tropica*.

aus diesen Actinomyceten stammt, ist der hochpotente Proteasominhibitor Salinosporamid A (**4**),^[26] ein Naturstoff, der von Fenical, Jensen und Mitarbeitern von der Scripps Institution of Oceanography in *Salinispora tropica* entdeckt wurde.^[27] Dieser Aufsatz beleuchtet die eindrucksvolle Geschichte der Entdeckung und der klinischen Entwicklung dieser neuen Klasse vielversprechender Tumorth erapeutika und gibt Einblicke in den Biosyntheseweg und die Totalsyntheserouten zu diesem niedermolekularen Wirkstoff. Zuvor jedoch besprechen wir die Funktion und Inhibition des 20S-Proteasoms, das kürzlich als Target zur Krebsbekämpfung validiert wurde.

2. Das Proteasom – ein validiertes Target in der Krebs-Chemotherapie

Die meisten der heutigen Tumorth erapeutika behindern direkt den Zellzyklus, entweder durch Wechselwirkung mit

Tubulin (z.B. Vinca-Alkaloide, Taxane und Epothilone) oder durch Hemmung von Topoisomerasen (z.B. Camptothecine und Anthracycline).^[28,29] Weitere Hauptangriffspunkte sind Histon-Desacetyl asen (HDACs), die wichtig zur Regulation der Genexpression sind, Protein-Kinasen, die essenziell für die funktionelle Veränderung von Zielproteinen durch Phosphorylierung sind, und das Hitzeschockprotein 90 (Hsp90), ein Chaperon, das entscheidend für die Erhaltung der Funktion vieler Zellsignalproteine ist.^[7] Mit der behördlichen Zulassung von Bortezomib (**5**; siehe Abbildung 2) im Jahr 2003^[30,31] hat das Proteasom in den letzten Jahren wachsende Aufmerksamkeit als weiteres Target erhalten.

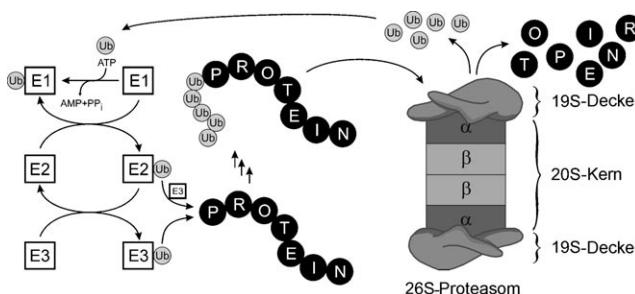
Das Proteasom ist verantwortlich für die nichtlysosomale intrazelluläre Proteolyse und komplementiert damit die Funktion der Lysosomen, die durch Endozytose gewonnene Proteine abbauen.^[32] Durch die Regulation von Homöostase und den Abbau vieler wichtiger Proteine ist das Proteasom eingebunden in die Kontrolle einer Vielfalt entscheidender zellulärer Prozesse, z.B. des Zellzyklus, der Signalweiterleitung, der Transkription, der Stressmeldung, der Zelldifferenzierung und der Apoptose.^[32,33] Proteine werden durch das Anbinden mehrerer Ubiquitin-Einheiten, die eine Polyubiquitinkette ergeben, zum Proteasom-vermittelten Abbau markiert.^[34] Die Bildung dieses Markers geschieht durch das Einwirken dreier unterschiedlicher Enzyme, E1–E3.^[35,36] Das Ubiquitin aktivierende Enzym E1 bindet Ubiquitin über eine Thioesterbindung in einer Adenosin-5'-triphosphat (ATP) verbrauchenden Reaktion (Schema 1).^[35] Das Substrat wird anschließend auf ein Ubiquitin konjugierendes Enzym E2 übertragen, das den Transfer des Ubiquitins entweder an ein Ubiquitin-Ligase-E3-gebundenes Proteinsubstrat (RING-Finger-Ligasen) oder zu einer Cystein-Einheit im aktiven Zentrum von E3 (HECT-Domänen-Ligasen) mit anschließender Anbindung an das Protein ermöglicht.^[34] Das Ubiquitin wird in den meisten Fällen mit einer ε-NH₂-Funktion eines Lysinrestes des Zielproteins oder (manchmal) mit dessen N-terminaler Gruppe konjugiert.^[34] Schrittweise Addition weiterer Ubiquitinreste an die vormals angebundene(n) Einheit(en) führt zur Bildung des Polyubiquitinmarkers. Das polyubiquitiinierte Substrat wird anschließend vom nachgelagerten 26S-Proteasom erkannt, einem großen Komplex aus mehreren Untereinheiten, der aus einem oder zwei 19S-Deckeln und einem 20S-Kern besteht.^[37] Die regulatorischen 19S-Deckel des Proteasoms erkennen das markierte



Bradley Moore ist Professor für Ozeanographie und Pharmazie an der University of California, San Diego. Er hat akademische Abschlüsse in Chemie der Universitäten von Hawaii (BSc 1988) und Washington (PhD 1994 bei Prof. H. G. Floss), war Postdoktorand bei Prof. J. A. Robinson an der Universität Zürich (1994–1995) und hatte Fakultätsstellen an den Universitäten von Washington (1996–1999) und Arizona (1999–2005) inne. Er erforscht und nutzt marine mikrobielle Genome, um neue Biosyntheseenzyme, Sekundärmetabolitwechselwege und Naturstoffe für die Wirkstoff-Forschung und -Entwicklung zu entdecken.



Tobias A. M. Gulder studierte Chemie an der Universität Würzburg (Diplom 2004) und promovierte bei Prof. G. Bringmann über Naturstoffanalyse und -synthese, wofür er den DECHEMA-Doktorandenpreis 2009 verliehen bekam. 2008 wechselte er zu Prof. Moore an die Scripps Institution of Oceanography (UCSD) als DAAD-gefördeter Postdoktorand und arbeitete dort an der Aufklärung und Nutzung mariner Naturstoff-Biosynthesewege. Mitte 2010 kehrte er, unterstützt durch ein Rückkehr-Stipendium des DAAD, nach Deutschland zurück, um am Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn unabhängige Forschungsarbeiten zu betreiben.



Schema 1. Mechanismus des Proteinabbaus durch das Ubiquitin-Proteasom-System. AMP = Adenosin-5'-monophosphat, PP_i = Diphosphat.

Proteine spalten die Ubiquitineinheiten ab und entfalten das Protein, um dessen Eintritt in den katalytischen 20S-Kern zu ermöglichen. Dieser besteht aus vier gestapelten Ringen, die in einer zylindrischen Struktur als zweifach-symmetrische $\alpha_7\beta_7\alpha_7$ -Untereinheiten angeordnet sind (Schema 1).^[38] Der Proteinabbau wird durch drei β -Untereinheiten, bestehend jeweils aus einem β -Ring, katalysiert. Die proteolytische Aktivität der Untereinheiten kann als Caspase- (β 1, CA-L), Trypsin- (β 2, T-L) und Chymotrypsin-ähnlich (β 5, CT-L) kategorisiert werden, und die Selektivität der Untereinheiten ist durch die Zusammensetzung der entsprechenden Bindungstaschen vorgegeben.^[39] Der Abbau des Zielproteins folgt allerdings demselben Mechanismus an jedem dieser proteolytischen Orte: Die Hydroxygruppe der Seitenkette der N-terminalen Threonineinheit (Thr1) wird durch Thr1NH₂ deprotoniert und ermöglicht anschließend die nucleophile Spaltung der Peptidbindung, was im Abbau des Proteins zu kleinen Peptidfragmenten resultiert.^[39] Die Inaktivierung dieses nucleophilen Prozesses durch niedermolekulare, elektrophile Verbindungen mit Affinität zu den Bindungstaschen des Proteasoms ermöglicht somit die Inaktivierung der proteolytischen Aktivität des kompletten Systems.

Die meisten heute bekannten Proteasominhibitoren sind kleine Peptide, die mit elektrophilen Gruppen ausgestattet sind, die durch nucleophilen Angriff der Thr1-Hydroxygruppe (Thr1O⁺) der katalytisch aktiven β -Untereinheiten eine kovalente Verknüpfung mit dem Proteasom ermöglichen.^[40] Geeignete Akzeptorfunktionen am Inhibitor sind Aldehyde, Vinylsulfone und Boronate. Aldehyde wie MG132 (6), das als biomedizinische Sonde zur Untersuchung der Funktion des Proteasoms genutzt wird,^[41] bilden ein Halbacetal mit dem Proteasom und sind daher relativ schwache, reversible Inhibitoren (Abbildung 2). Ein Austausch der Aldehydfunktion durch ein Vinylsulfon, der zu ZLVS (7) führt, oder durch ein Boronat, was MG262 (8) ergibt, macht diese Inhibitoren potenter und verbessert gleichzeitig ihre Selektivität für das Proteasom gegenüber anderen üblichen Proteasen.^[36,42] Dieser Selektivitäts- und Aktivitätsgewinn ermöglichte die Entwicklung des ersten von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) zugelassenen Proteasominhibitors, des Boronats Bortezomib (5, Velcade, PS-341). Wie die meisten anderen peptidischen Proteasominhibitoren dieses Typs weist **5** die höchste Affinität zur β 5-Untereinheit auf.^[40] Natürliche Pendants solcher Verbindungen umfassen Peptidaldehyde wie Leupeptin (*N*-Acetyl-Leu-Leu-Arginal) aus

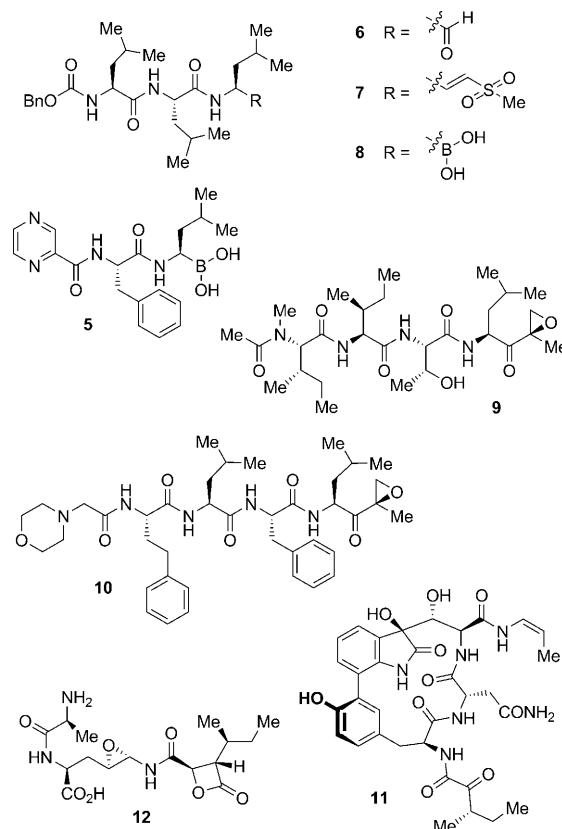
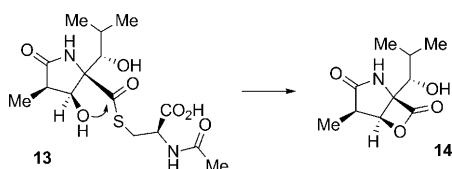


Abbildung 2. Auswahl Peptid-abgeleiteter synthetischer (5–8, 10) und natürlicher (9, 11–12) Proteasominhibitoren. Bn = Benzyl.

unterschiedlichsten Actinomycetenarten^[43] und α',β' -Epoxyketone wie das hochselektive Epoxomycin (9) aus *Streptomyces hygroscopicus*.^[44,45] Das von Epoxomycin abgeleitete synthetische Carfilzomib (10) befindet sich momentan in klinischen Phase-II-Tests zur Behandlung einer Serie unterschiedlicher Krebsarten.^[46] Andere peptidische Naturstoffe, die potente Inhibition des Proteasoms zeigen, sind das cyclische Peptid TMC-95A (11),^[47] eine Verbindung, die alle drei katalytisch aktiven β -Untereinheiten durch nichtkovalente Bindung inhibiert, und Peptide des Belactosintyps, z.B. Belactosint A (12).^[48] Dieses enthält eine cyclische β -Lactoneinheit, die als „chemical warhead“ („chemischer Gefechtskopf“: für den molekularen Wirkmechanismus einer Verbindung verantwortliche/essenzielle funktionelle Gruppe) auch in einer weiteren, neuartigen Klasse von Proteasominhibitoren dient, die durch eine bicyclische γ -Lactam- β -lacton-Kernstruktur charakterisiert ist.

Der erste nichtpeptidische natürliche Proteasominhibitor, der isoliert wurde, war Lactacystin (13) aus *Streptomyces* sp. OM-6519 (Schema 2).^[49] Zu den Struktureigenschaften von **13** zählt ein dicht funktionalisiertes, zentrales γ -Lactamsystem, das mit einer hydroxylierten iso-Butylseitenkette und einem N-acetylierten Cysteinrest ausgestattet ist, der als Thioester an den Molekülkern gebunden ist. Lactacystin (13) wurde ursprünglich in einem Screening-Programm gefunden, das auf die Entdeckung von Naturstoffen abzielte, die eine Neuritogenese zur möglichen Behandlung von Nerven-

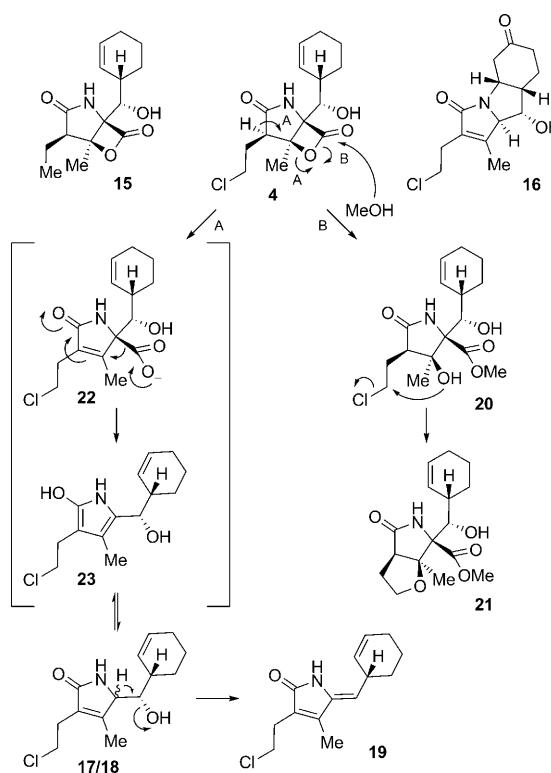


Schema 2. Nichtenzymatische Bildung von Omuralid (**14**) ausgehend von seiner Vorstufe, dem Naturstoff Lactacystin (**13**).

krankheiten wie Alzheimer induzieren.^[50] Für **13** wurde erst später gezeigt, dass es niedrige nanomolare inhibitorische Aktivität gegen die β5-Untereinheit des Proteasoms zeigt. Interessanterweise bildet **13** spontan intramolekular einen Lactonring durch Angriff der β-Hydroxygruppe des γ-Lactamrings unter Spaltung der Thioesterbindung unter gleichzeitigem Verlust von *N*-Acetylcystein.^[51] Das so entstandene *clasto*-Lactacystin-β-Lacton (**14**, Omuralid) ist das eigentlich bioaktive Molekül. Die Inaktivierung des Proteasoms durch **14** erfolgt durch intermolekularen Angriff von Thr1O^γ der β5-Untereinheit des Proteasoms am β-Lacton unter Öffnung des Rings und Bildung einer kovalenten Esterbindung.^[52] Diese Beobachtung zeigt eindeutig, dass sich das neuartige γ-Lactam-β-lacton-Strukturmotiv von **14** als gutes Leitmotiv zum selektiven Angriff an das Proteasom eignet.

3. Entdeckung der Salinosporamidfamilie

Die Familie der γ-Lactam-β-lacton-Naturstoffe wuchs 2003 durch die Entdeckung von Salinosporamid A (**4**) in *S. tropica*, das aus einem marinen Sediment vor den Bahamas isoliert wurde.^[27] Diese Verbindung teilt sich die Grundstruktur mit Omuralid (**14**), weist aber bedeutende Unterschiede im Substitutionsmuster auf: **4** hat einen ungewöhnlichen Cyclohexenylsubstituenten, eine Methylgruppe, die sich am β-Lactonsystem befindet, und eine Chlorethylseitenkette an der α-Position. Diese strukturellen Unterschiede führen zu einer signifikanten Verstärkung der Proteasominhibition von **4** im Vergleich zu jener von **14** gegen alle drei proteolytischen Untereinheiten des Proteasoms. Die ausgeprägte biologische Aktivität von **4**, mit IC₅₀-Werten im niedrigen nanomolaren Bereich, gab den Anlass zu einer genaueren Untersuchung des produzierenden Organismus, was eine Serie verwandter Verbindungen hervorbrachte, unter ihnen das Deschloranalogon Salinosporamid B (**15**), das tricyclische γ-Lactamana- logon Salinosporamid C (**16**) und eine Reihe Salinosporamid-A-abgeleiteter Zersetzungspprodukte **17–21** (Schema 3).^[53] Ein wahrscheinlicher Zersetzungsweg von **4** zu **17–19** beginnt mit der Spaltung des Lactons (entweder konzertiert, wie gezeigt, oder durch wässrige Hydrolyse des Lactons, gefolgt von Dehydratisierung), um Carboxylat **22** zu erhalten, das nach Decarboxylierung Pyrrol **23** ergibt, ein Tautomer der Diasteromere **17** und **18**. Weiterer Verlust von H₂O führt schließlich zu **19**. Die Bildung von **20** und **21** kann durch nucleophilen Angriff von MeOH am Lactonring zu **20** mit anschließender intramolekularer Bildung eines THF-Rings in **21** durch Verdrängung des Chlorsubstituenten erklärt werden. Interessanterweise ist eine ähnliche Reaktionss-



Schema 3. Strukturen und Bildungsmechanismen verschiedener Salinosporamid-artiger Verbindungen aus *S. tropica*.

quenz für die ausgeprägte biologische Aktivität von **4** verantwortlich; dabei wird der Inhibitor durch nucleophile Spaltung seines Lactonrings an Thr1O^γ des Proteasoms gebunden, wodurch die Bildung eines THF-Rings unter gleichzeitigem Verlust des Chlorsubstituenten initiiert wird. Der neu generierte cyclische Ether hindert effektiv hydrolytisch aktives H₂O an der Spaltung der Proteasom-Inhibitor-Esterbindung und führt damit zur irreversiblen Bindung von **4**. Dieser Wirkmechanismus wird detaillierter in Abschnitt 6 diskutiert.

Eine weitere Gruppe eng verwandter Sekundärmetaboliten, die von *S. tropica* produziert werden, wurde von Nereus Pharmaceuticals während der Reinigung von Multigramm-Mengen von **4** aus Fermentationen des Stammes in großem Maßstab identifiziert.^[54] Die meisten dieser Derivate wiesen Unterschiede an der C2-Seitenette auf, mit entweder kürzeren [wie in dem Methyl-substituierten Salinosporamid D (**24**)] oder längeren Ketten [wie im Propylanalogen Salinosporamid E (**25**)], oder sind Epimere [wie die Salinosporamide F–H (**26–28**); Abbildung 3]. Zudem wurden das C3-Ethyl-substituierte Salinosporamid I (**29**) und das Deshydroxyderivat Salinosporamid J (**30**) isoliert. Eine Substitution von NaCl durch NaBr in der Fermentationsbrühe ermöglichte bemerkenswerterweise die Produktion von Bromsalinosporamid (**31**). Inzwischen wurden die nahe verwandten γ-Lactam-β-lacton-Naturstoffe Cinnabaramid A–G (**32–38**) in einem terrestrischen *Streptomyces*-Stamm identifiziert.^[55] Die Cinnabaramide A–C (**32–34**) enthalten alle einen Hexylsubstituenten an C2 mit unterschiedlichen Oxygenierungsmustern an C5 und C12. Hydrolyse der β-Lactone von **32** und **33**

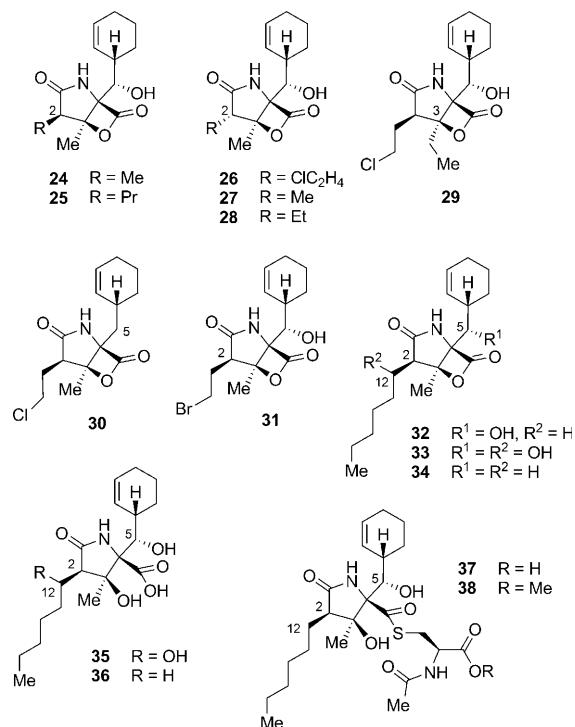


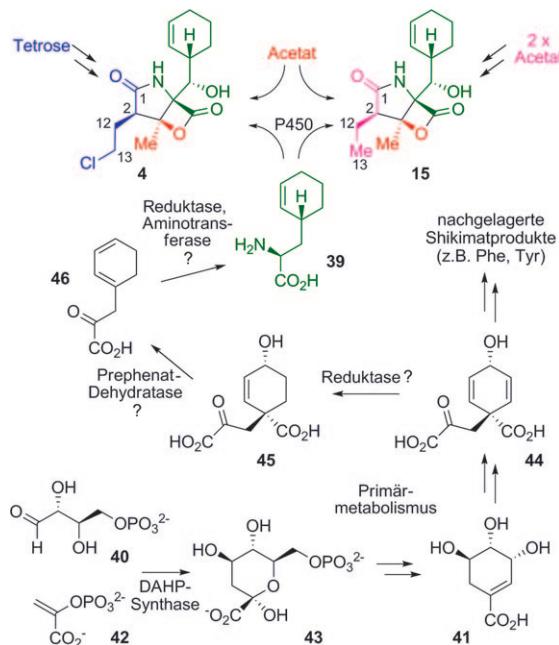
Abbildung 3. Strukturen weiterer Sekundärmetaboliten der Salinosporamidfamilie.

führt zu Cinnabaramid D (35) und E (36). Des Weiteren konnten zwei Thioesterderivate 37 und 38 der Stammverbindung 32 identifiziert werden. Interessanterweise zeigt Cinnabaramid A (32) trotz des fehlenden Chlorsubstituenten, der für die potente Aktivität von Salinosporamid A (**4**) verantwortlich ist, eine starke Inhibition des Proteasoms. Eine detailliertere Diskussion der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SARs) und deren Interpretation findet sich in Abschnitt 6.

4. Die Biosynthese von Salinosporamid A

Die starke Bioaktivität vieler γ -Lactam- β -lacton-Naturstoffe, zusammen mit ihren faszinierenden chemischen Strukturen, macht die Untersuchung ihrer Biosynthese höchst lohnenswert. Mehrere Fragen, vor allem zur Biosynthese von Salinosporamid A (**4**), mussten beantwortet werden, z.B. zum zeitlichen Ablauf und Mechanismus der Chlorierungsreaktion sowie zur Biosynthese des ungewöhnlichen Cyclohexenylrestes. Die Molekülstrukturen der isolierten Salinosporamidverbindungen ließen auf eine Biosynthese dieser Metabolite ausgehend von drei Bausteinen schließen: ein ungewöhnliches Cyclohexenyl-Alanin-Derivat **39**, Acetat (oder Propionat im Fall von **29**) und eine promisk eingebaute kurzkettige Carbonsäure, was zur Generierung der beobachteten Strukturdiversität des Substitutionsmusters an C2 führt. Anfangs wurde vermutet, dass die Einführung des Chlorsubstituenten in **4** durch eine späte oxidative Halogenierung von **15** erfolgt. Im Laufe von Fermentationsstudien bei Nereus Pharmaceuticals mit dem Ziel, den Titer des

pharmazeutisch relevanteren **4** zu erhöhen und die Bildung von **15** zu reduzieren, führte eine Fütterung von Buttersäure jedoch überraschenderweise zu einer verringerten Bildung von **4** bei erhöhter Produktion von **15**.^[56] Die Verwendung von [¹³C₄]Buttersäure offenbarte den Einbau dieses Bausteins lediglich in C1-C2-C12-C13 von **15**, während die mutmaßlich Acetat-abgeleitete Einheit C3-C14 in beiden Molekülen markiert war. Diese Beobachtung deutete unterschiedliche biosynthetische Ausgangspunkte für die C1-C2-C12-C13-Abschnitte von Salinosporamid A (**4**) und B (**15**) an. Weitere Belege für diesen unerwarteten Befund wurden bei gleichzeitigen, umfassenderen Studien mit Stabilisotopenmarkierung in unserem Labor erhalten.^[57] In einer Reihe von Experimenten mit [¹³C₂]Acetat, [¹⁻¹³C₁]Buttersäure und [¹³C₆]Glucose konnte eindeutig gezeigt werden, dass die C1-C2-C12-C13-Einheit von **4** von einer Tetrosevorstufe stammt, die biosynthetisch mit Erythrose-4-phosphat (**40**) verbunden ist, während diese Kohlenstoffatome in **15** aus zwei Acetateinheiten stammen, was konsistent mit einem Buttersäurederivat als Intermediat ist (Schema 4). Das Fütterungsexpe-



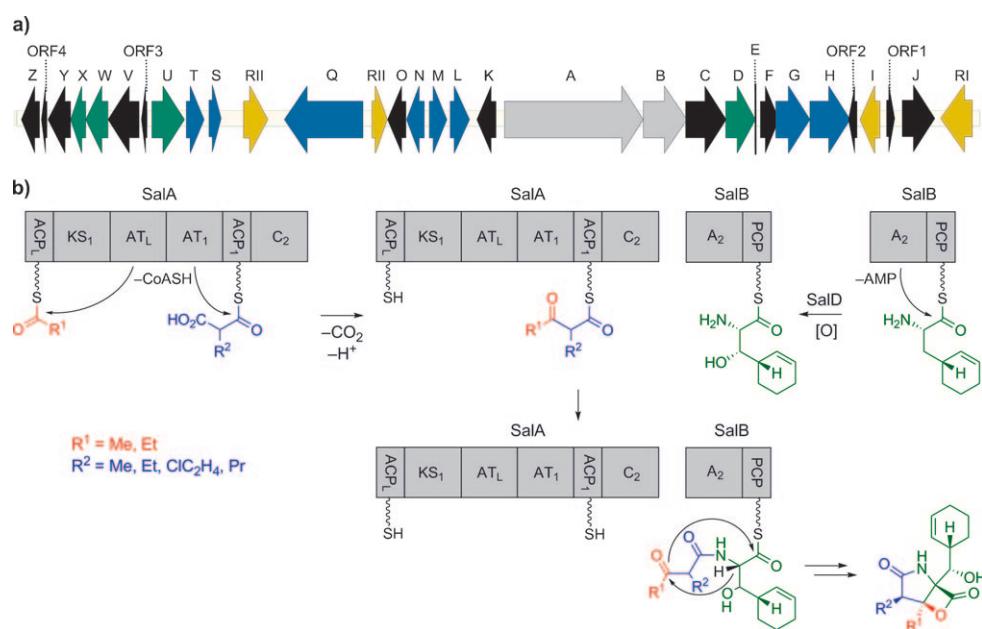
Schema 4. Befunde der Stabilisotopenmarkierungs-Experimente an **4** und **15** sowie vorgeschlagener Mechanismus der Bildung des ungewöhnlichen Aminosäurebausteins **39**.

periment mit [¹³C₆]Glucose zeigte zusätzlich, dass sich der Cyclohexenylrest gleichfalls von einer Tetroseeinheit ableitet. Es wurde daher angenommen, dass der nördliche Teil der Salinosporamide durch eine Abzweigung aus der Shikimatbiosynthese entsteht. Die beobachtete unsymmetrische Markierung der Cyclohexenylgruppe ließ hierbei eine Abzweigung der biosynthetischen Vorstufe der Salinosporamide von der Shikimatbiosynthese auf einer Stufe vor der Aromatisierung (die wiederum zu einer Randomisierung des Markierungsmusters, wie sie z.B. im Phenylalanin zu finden wäre, geführt hätte) vermuten. Diese Annahmen wurden durch

Verabreichung von [1,7-¹³C₂]Shikimisäure ([1,7-¹³C₂]-**41**) und [1-¹³C₁]Phenylalanin an *S. tropica* bestätigt. Wie erwartet wurde eine Markierung von **4** und **15** nur mit [1,7-¹³C₂]-**41**) erreicht. Eine denkbare Route zur Bildung des Aminosäurebausteins **39** würde demnach mit Phosphoenolpyruvat (**42**) und Erythrose-4-phosphat (**40**) starten, die durch das Einwirken einer DAHP-Synthase zu 3-Desoxy-D-arabinohexitulosonat-7-phosphat (**43**, DAHP) und nachfolgend weiter zu Shikimi- (**41**) und Prephensäure (**44**) über den Primärmetabolismus umgesetzt würden. **44** könnte anschließend zu **45** reduziert werden und nach decarboxylierender Dehydratisierung **46** ergeben. Abschließende

Reduktion und Transaminierung würden zu **39** führen, das nach oxidativer Einführung der Hydroxygruppe als Baustein für **4** und **15** fungiert.^[57]

Diese umfassenden Markierungsexperimente geben somit Aufschluss über den biosynthetischen Ursprung aller molekularen Bausteine von **4** und **15**. Insgesamt legten diese Befunde einen beispiellosen, gemischten PKS/NRPS-Pfad (PKS = Polyketid synthase, NRPS = nichtribosomal Peptid-Synthetase) zu den Salinosporamiden nahe, der sich vom Biosyntheseweg zu Lactacytin/Omuralid unterscheidet, der über eine PKS-unabhängige Kondensation von Valin-abgeleiteter 2-Methyl-3-oxopropionsäure (Methylmalonsäure-Semialdehyd) mit Leucin verläuft.^[58,59] Die Identifizierung des kompletten Salinosporamid-Biosynthese-Genclusters (*sal*) im Zuge der Sequenzierung des vollen, 5183331 Basenpaare großen Genoms des produzierenden Stammes *S. tropica* CNB-440 bestätigte die Schlussfolgerungen aus den Isotopenexperimenten.^[60,61] Das zentrale Element des 41 000 Basenpaare großen *sal*-Genclusters besteht aus dem für eine PKS codierenden Gen *salA* und dem für eine NRPS codierenden Gen *salB* (Schema 5a). Das bimodulare Genprodukt von *salA* enthält sechs Domänen – zwei Acyltransferasen (AT), zwei Acylcarrierproteine (ACP), eine Ketosynthase (KS) und eine Kondensationsdomäne (C) –, organisiert in einer nichtkanonischen Art und Weise: ACP_L-KS₁-AT_L-AT_I-ACP_I-C₂ (Schema 5b).^[60] Die Architektur der Domänen weicht somit von der typischer PKSs (AT_L-ACP_L-KS₁-AT_I-ACP_I) ab,^[62] ähnelt aber der Organisation, die man in einer Reihe myxobakterieller Megasynthetasen finden kann, z. B. bei der Biosynthese von Stigmatellin,^[63] Soraphen^[64] und Aurofuranon.^[65] Den benachbarten AT-Domänen wird die Selektion der PKS-Starter- (durch AT_L) und Verlängerungseinheiten (durch AT_I) sowie deren Anbindung an ACP_L bzw. ACP_I zugeschrieben (Schema 5b). Die durch KS₁ katalysierte

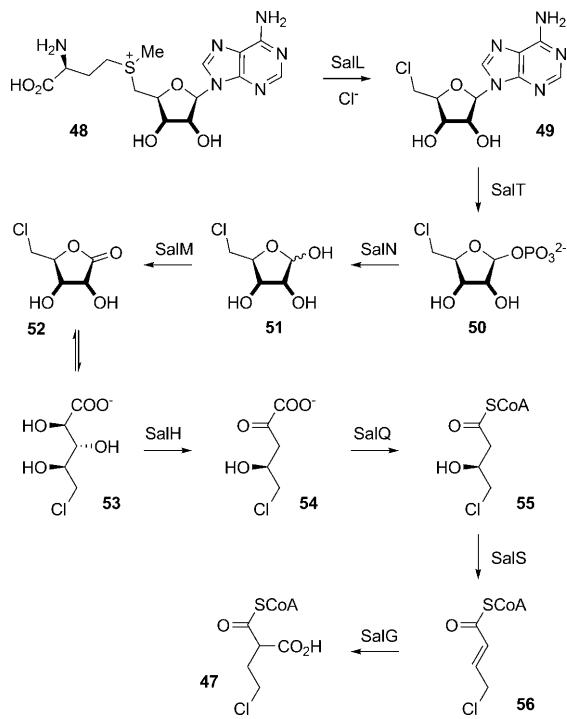


Schema 5. a) Organisation des Salinosporamid-Biosynthese-Genclusters (*sal*); b) vorgeschlagener Mechanismus des Aufbaus der Salinosporamide durch die PKS-NRPS-Maschinerie SalA-SalB.

Kondensation der PKS-Bausteine ergibt einen ACP_I-gebundenen β-Ketoester. Die zentrale Rolle des PKS-Gens *salA* in der Biosynthese der Salinosporamide wurde bestätigt durch seine gezielte Inaktivierung mithilfe von homologer Single-Crossover-Rekombination, nach welcher der resultierende Mutant keinerlei Salinosporamide mehr produzierte.^[66] Der Aminosäurebaustein **39** wird anschließend durch die Adenylierungsdomäne (A) ausgewählt und an das Peptidyl-carrierprotein (PCP) der SalB-Didomäne gebunden. PCP-gebundenes **39** wird nachfolgend durch die Cytochrom-P450-Hydroxylase SalD oxidiert. Die Verknüpfung der PKS- und der NRPS-abgeleiteten Vorstufen durch die C-terminale Kondensationsdomäne (C) führt zu einem PCP-gebundenen, linearen Intermediat, das nach Bicyclisierung und simultaner Freisetzung von der Synthetase einem noch unbekannten Prozess folgend die fertigen Salinosporamidmoleküle ergibt.

Die Strukturdiversität der Salinosporamidfamilie wird vor allem durch die gelockerte Substratspezifität der AT-Domänen von SalA verursacht. Während die Auswahl einer Acetat-Startereinheit durch AT_L zum typischen Methylsubstituenten an der C3-Position der Salinosporamide führt, wird durch das alternative Laden mit Propionat die Produktion des bisher einzigen isolierten C3-Ethylderivats, Salinosporamid I (**29**), ermöglicht. Die Promiskuität von AT_I ermöglicht wiederum die Bildung der beobachteten Variabilität des Substitutionsmusters an der C2-Position. Für den Aufbau von Salinosporamid A (**4**) baut AT_I die neuartige, halogenierte PKS-Verlängerungseinheit Chlorethylmalonyl-CoA (**47**; CoA = Co-enzym A) ein, die ausschließlich in der Salinosporamidfamilie vorkommt.^[66] Interessanterweise weist der *sal*-Cluster keine der vormals beschriebenen oxidativen Chlorinasen auf, enthält aber anstelle dessen das Gen *salL*,^[67] dessen Proteinprodukt eine 35-prozentige Identität der Aminosäuren im Vergleich mit der Fluorinase FlA aus *Streptomyces cattleya*

aufweist.^[68] FIA katalysiert die nucleophile Addition von Fluorid an S-Adenosyl-L-methionin (**48**, SAM) unter Verdrängung von L-Methionin, als erstem Schritt des Biosyntheseweges zum Säugetier toxin Fluoracetat und zum Antibiotikum 4-Fluorthreonin.^[68,69] Die In-vivo- und In-vitro-Charakterisierung von SalL belegte dessen Fähigkeit, stattdessen als Chlorinase auf **48** zu wirken, um so **49** zu ergeben (Schema 6).^[67] SalL nimmt zudem Bromid und Iodid als



Schema 6. Biosyntheseweg zur neuartigen Salinosporamid-A-PKS-Verlängerungseinheit Chlorehethylmalonyl-CoA (**47**) ausgehend von S-Adenosyl-L-methionin (**48**).

Substrate an und bildet so die entsprechenden Halogenadenosine, jedoch mit deutlich reduzierter Geschwindigkeit in vitro. Der Einbau von Fluorid ist allerdings wegen subtiler Umlagerungen in der Halogenbindungstasche, wie sie bei hochauflösten Kristallstrukturen von SalL und Mutanten des aktiven Zentrums beobachtet wurden, mit SalL nicht möglich. Zusammen mit der Fluorinase FIA^[68] und den kürzlich entdeckten SAM-Hydroxid-Adenosyltransferasen (duf-62)^[70-72] bildet SalL eine neue Klasse SAM metabolisierender Enzyme.^[73] Die Bildung von 5'-Chlor-5'-desoxyadenosin (**49**, 5-CIDA) initiiert eine komplexe Biosyntheseroute zu **47**, wobei alle dafür entscheidenden Gene im *sal*-Cluster zu finden sind (Schema 5a, blau eingefärbt), wie durch Gen-Inaktivierung und chemische Komplementierung aufgezeigt wurde.^[66] Der zweite Schritt auf diesem Pfad, die phosphorolytische Spaltung von **49** zu 5-Chlor-5-desoxy-D-ribose-1-phosphat (**50**, 5-CIRP), wird durch SalT ermöglicht, ein Homologes von FIB, das wiederum die entsprechende Reaktion am fluorierten Substrat in *S. cattleya* katalysiert.^[69]

Eine Abweichung vom etablierten Fluoracetatpfad wird erreicht durch Spaltung der Phosphatgruppe durch die

Phosphatase SalN über 5-Chlor-5-desoxy-D-ribose (**51**, 5-CIRP) mit nachfolgender Oxidation durch die Dehydrogenase/Reduktase SalM zu 5-Chlor-5-desoxy-D-ribono-1,4-lacton (**52**, CIRL) und schließlich 5-Chlorribonat (**53**, 5-CIRI). Das Dihydroxysäure-Dehydratase-Homologe SalH setzt **53** zu 5-Chlor-4-hydroxy-2-oxopentanoat (**54**) um, das oxidativ zu 4-Chlor-3-hydroxybutyryl-CoA (**55**) decarboxyliert und im Anschluss durch die mutmaßliche Dehydratase SalS zu 4-Chlorcrotonyl-CoA (**56**) reduziert wird. **56** wird weiter durch SalG umgesetzt. Dieses Enzym teilt sich > 60 % Sequenzidentität mit Crotonyl-CoA-Carboxylasen/Reduktasen (CCR), für die kürzlich gezeigt wurde, dass sie die direkte Bildung von Ethylmalonyl-CoA aus Crotonyl-CoA katalysieren.^[74,75] In-vitro-Studien haben gleichfalls ergeben, dass rekombinantes SalG als 5-Chlorcrotonyl-CoA-Carboxylase/Reduktase wirken kann und **56** in die Salinosporamid-A-spezifische PKS-Verlängerungseinheit **47** umwandelt.^[66]

Die In-vitro-Charakterisierung von SalG offenbarte, dass es das chlorierte Substrat **56** um einen Faktor von sieben gegenüber Crotonyl-CoA bevorzugt, was darauf schließen lässt, dass SalG vornehmlich **47** bildet, die PKS-Verlängerungseinheit, die zur Biosynthese von Salinosporamid A (**4**) nötig ist.^[66] Das *S.tropica*-Genom enthält ein zweites CCR-Gen (*Strop_3612*), für das daher vermutet wurde, dass es für die Biosynthese von Ethylmalonyl-CoA verwendet wird. Tatsächlich führte eine Inaktivierung von *Strop_3612* zu einer Verringerung der Bildung von Salinosporamid B (**15**) auf ungefähr 50 % der Menge des Wildtyps, während die Produktion von **4** nicht bedeutend beeinflusst wurde. Weitere Untersuchungen mit beiden *S.tropica*-CCR-Lösungsmutanten zeigten, dass die Produktion von Salinosporamid E (**25**) ausschließlich in den *salG*-losen Mutanten verlorengegangen ist.^[76] Dies lässt darauf schließen, dass SalG zur Produktion von 2-Alkylmalonyl-CoA-Substraten evolviert wurde, die größer als Ethylmalonyl-CoA sind. Durch eine Kombination von In-vitro- und In-vivo-Experimenten, bei denen die Bildung der neuartigen PKS-Verlängerungseinheiten Propyl-, 4-Brom- und 4-Fluormalonyl-CoA durch SalG nachgewiesen wurde, wurden diese Vermutungen bestätigt. Interessanterweise wurden 2-Alkenoate mit C₆-C₈-Ketten nicht von SalG als Substrate akzeptiert.^[76] Die Isolierung der Cinnabaramide **32-38**,^[55] deren Biosynthese den Einbau einer 2-Hexylmalonyl-CoA-Einheit erforderlich machen würde, deutet jedoch stark auf die Existenz von CCR-Homologen mit der Fähigkeit, längerkettige 2-Alkenyl-CoAs zu fassen, hin. Alternativ könnte der Biosyntheseweg zu längerkettigen 2-Alkylmalonaten in orthogonaler Weise stattfinden, etwa durch α-Carboxylierung von Fettsäuren, wie es bei der Biosynthese von Mycolsäure beobachtet wurde.^[77] Zusammenfassend wurde durch diese Untersuchungen eine Reihe vorher unbekannter PKS-Verlängerungseinheiten identifiziert, die durch reduktive Carboxylierung von α,β-ungesättigten Acyl-CoA-Thioestern CCR-vermittelt zugänglich sind – ein Mechanismus, der sich zum Bioengineering weiterer neuartiger Polyketide als nützlich erweisen könnte.^[66,76]

Im *sal*-Cluster finden sich außer den Genen, die an der Biosynthese der PKS-Verlängerungseinheit **47** beteiligt sind, sowie der PKS-NRPS-Maschinerie SalA-SalB auch viele der

Gene, die im Zusammenhang mit der Biosynthese von **39** stehen, die auf Basis von Markierungsexperimenten^[57] vorgeschlagen wurde (Schema 5a, grün eingefärbt). Diese Gene codieren für eine eigene DAHP-Synthase (*salU*), von der man annimmt, dass sie die Biosynthese der Aminosäure durch Bildung von **43** aus **40** und **42** startet, für ein Prephenatdehydratase-Homologes (*salX*), das wahrscheinlich die reduktive Decarboxylierung von **45** zu **46** katalysiert, und für eine Aminotransferase (*salW*), die die Aminogruppe während der Bildung der neuartigen nichtproteinogenen Aminosäure **39** aus **46** installieren könnte (siehe Schema 4).^[60] Ein vergleichbarer Pfad wurde kürzlich in *Bacillus subtilis* identifiziert, wo in ähnlicher Weise Tetrahydroxytyrosin als Teil der Biosynthese von Anticapsin produziert wird.^[78] Die Löschung von *salX* hob die Biosynthese aller Salinosporamide auf und ermöglichte die gerichtete mutagenetische Produktion einer Serie nichtnatürlicher Salinosporamid-Derivate (siehe Abschnitt 6.2).^[79,80] Die anscheinend fehlenden Enzyme (also diejenigen, die an der Bildung von **44** aus **43** beteiligt sind) sowie die beiden fehlenden Reduktasen wurden noch nicht identifiziert und könnten sich außerhalb des *sal*-Lokus befinden. Die Hydroxygruppe an der Seitenkette wird schließlich durch die P450-Hydroxylase SalD eingeführt, wie durch Inaktivierung des entsprechenden Gens und der daraus resultierenden Produktion von Salinosporamid J (**30**) nachgewiesen wurde; diese Oxidation findet, wie sich aufgrund anderer, biochemisch charakterisierter P450-Enzyme vermuten lässt,^[79] wahrscheinlich statt, während die Aminosäure **39** an die PCP-Domäne von SalB gebunden ist.

Zudem enthält der *sal*-Lokus Gene, die für die Regulation und Resistenz verantwortlich sind (Schema 5a, gelb eingefärbt), und eine Reihe von Genen mit diversen anderen Funktionen (Schema 5a, schwarz eingefärbt), darunter *salF*, das für eine Typ-II-Thioesterase codiert, die wahrscheinlich unerwünscht geladene Vorstufen vom PKS-NRPS-Modul abspaltet, sowie Gene, die wahrscheinlich beim Prozess der Bicyclisierung zum Endprodukt eine Rolle spielen. Die Funktionen dieser Gene und ihrer Proteinprodukte werden momentan in unserem Labor untersucht.

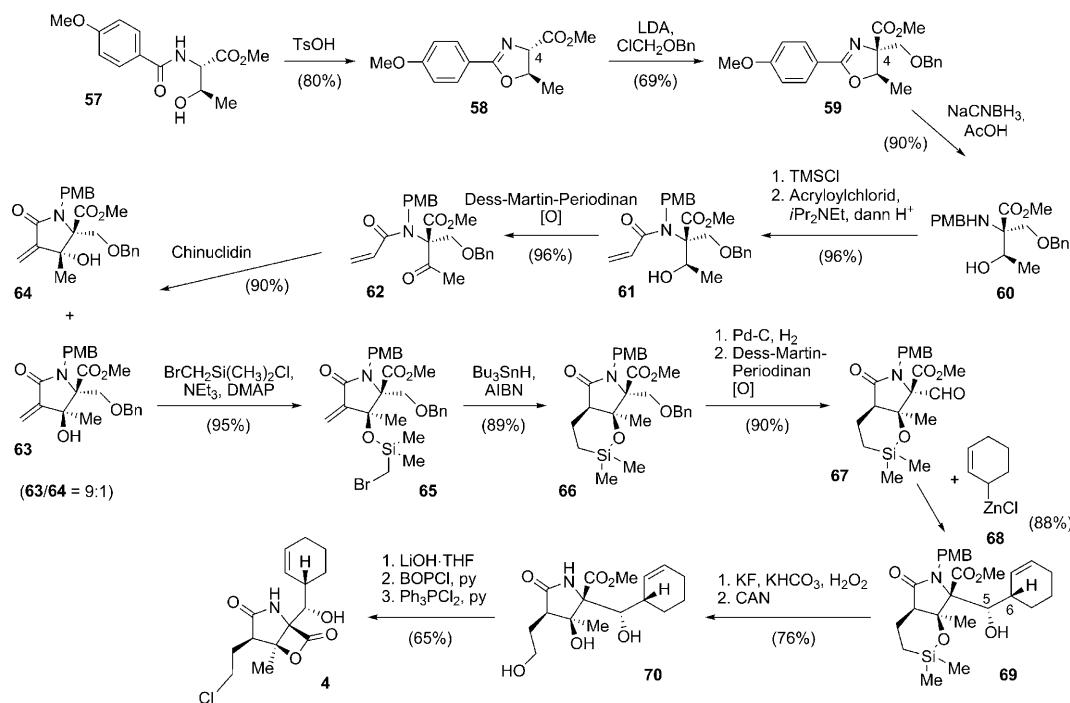
5. Totalsynthesen von Salinosporamid A

Die Salinosporamide haben wegen ihrer komplizierten Strukturen, die fünf benachbarte Stereozentren und ein komplexes bicyclisches Gerüst umfassen, enormes Interesse bei Synthetikern geweckt. Im Mittelpunkt steht dabei der Sekundärmetabolit Salinosporamid A (**4**) mit seiner ausgeprägten Inhibitorwirkung gegen das 20S-Proteasom und daraus resultierenden biomedizinischen Bedeutung. Die wichtigsten Merkmale aller totalsynthetischen Untersuchungen zu **4** sind in Tabelle 1 zusammengefasst und werden in diesem Abschnitt im Detail diskutiert.

Über die erste Totalsynthese von **4** wurde 2004 berichtet, nur ein Jahr, nachdem seine Struktur publiziert worden war.^[81] Dieser präparative Zugang nach Corey et al. setzte den Maßstab für spätere Synthesearbeiten vieler anderer Gruppen und wird hier daher, obwohl bereits in einem anderen Übersichtsartikel besprochen,^[82] im Detail diskutiert. Die Synthese startete mit dem (*S*)-Threoninderivat **57**, das zu Oxazolin **58** cyclisiert wurde (Schema 7).^[81] Das quartäre Stereozentrum an C4 wurde durch Alkylierung von **58** mit (Chlormethyl)benzylether installiert, was **59** ergab. Reduktive Spaltung des Oxazolinteils lieferte das N-PMB-Amin **60**, das nach vorübergehender In-situ-Schützung der sekundären Hydroxygruppe als TMS-Ether selektiv mit Acryloylchlorid unter Bildung von **61** N-acyliert wurde. Oxidation der Hydroxygruppe mit Dess-Martin-Periodinan lieferte das Keton **62**, den Schlüsselbaustein für den Aufbau des γ -Lactamrestes. Der Ringschluss erfolgte durch eine interne Baylis-Hillman-Aldolreaktion mit Chinuclidin als katalytischer Base und ergab ein 9:1-Gemisch der diastereomeren Lactame **63** und **64** zugunsten des gewünschten Diastereomers **63**. In einer späteren Arbeit entwickelte die Gruppe um Corey eine ungewöhnliche, hocheffiziente alternative Cyclisierung von **62** mit dem Kulinkovich-Reagens,^[83] die unter vollständiger diastereoselektiver Kontrolle zu **63** führte, bei zugleich deutlich verringerten Reaktionszeiten.^[84,85] Eine Silylierung von **63** mit (Brommethyl)dimethylsilylchlorid ergab **65**, das in einer Tri-*n*-butylzinnhydrid-vermittelten Radikalkettenreaktion cyclisiert wurde, was ausschließlich zum *cis*-verknüpften Lactam **66** führte. O-Debenzylierung und Oxidation des dabei entstehenden primären Alkohols ergaben den Aldehyd **67**, das Substrat für die darauf folgende stereoselektive Ein-

Tabelle 1: Totalsynthesen von Salinosporamid A (**4**).

| Gruppe | Jahr | Stufen (Ausbeute) | wichtige Merkmale |
|---------------------------|--------------|--|--|
| E. J. Corey | 2004 | 17 Stufen ausgehend von 57 (13.6 %) | kürzeste stereoselektive Route; höchste chemische Ausbeute und bester <i>ee</i> -Wert; Entwicklung von Schlüsselschritten, die auch bei späteren Synthesen Verwendung fanden |
| S. J. Danishefsky | 2005 | 28 Stufen ausgehend von 71 (1.8 %) | regioselektive Lactonringöffnung mit einer Selenspezies; kationische Halb-acetal-Selenocyclisierung zum Aufbau der C4-Konfiguration |
| G. Pattenden | 2006 | 14 Stufen ausgehend von 82 (9.6 %) | Synthese von racemischem 4 ; biomimetische, diastereoselektive, Säure-katalisierte Cyclisierung des γ -Lactamrings |
| D. Romo | 2007 | 7 Stufen ausgehend von 89 (3.3 %) | Synthese von racemischem 4 ; kürzester Ansatz; biomimetische Bicyclisierungsreaktion; auch zur Synthese von 32 verwendet |
| Nereus Pharma | 2007 | 18 Stufen ausgehend von 96 (0.8 %) | intramolekulare Aldocyclisierung zum Aufbau dreier Stereozentren; neue Methode zur Einführung des Cyclohexenylrestes |
| S. Hatakeyama S. Omura | 2008 2008 | 21 Stufen ausgehend von 101 (3.5 %) 36 Stufen ausgehend von 106 (2.0 %) | Conia-En-Reaktion als Schlüsselschritt bei der γ -Lactambildung früher, stereoselektiver Aufbau des Cyclohexenylrestes |



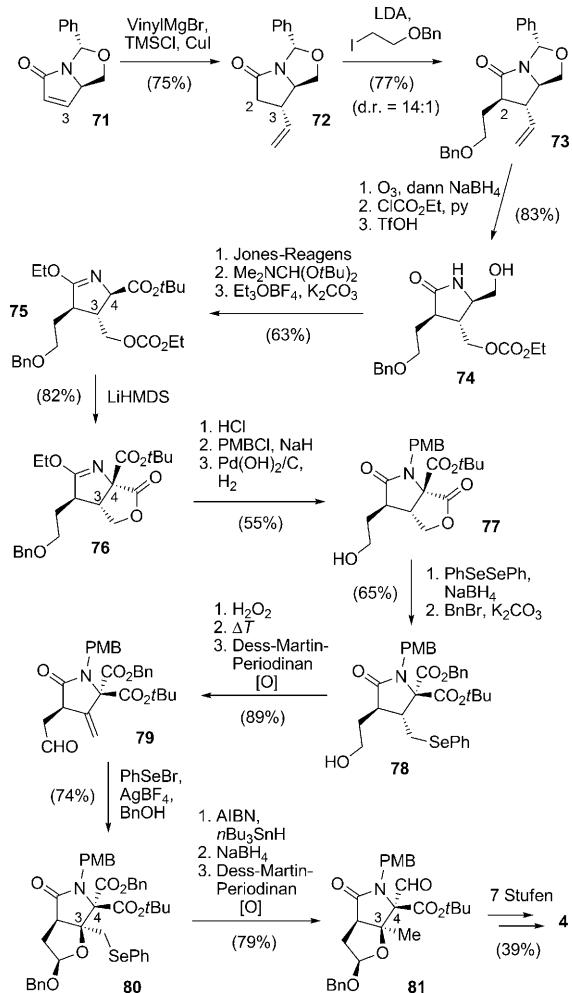
Schema 7. Totalsynthese von Salinosporamid A (**4**) durch die Corey-Gruppe. AIBN = 2,2'-Azobisisobutyronitril, Bn = Benzyl, BOP = 1-Benzotriazolyloxytris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat, CAN = Cerammoniumnitrat, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, LDA = Lithiumdiisopropylamid, PMB = *para*-Methoxybenzyl, py = Pyridin, TMS = Trimethylsilyl, Ts = Toluol-4-sulfonyl (Tosyl).

führung der Salinosporamidseitenkette. Die Addition von 2-Cyclohexenylzinkchlorid (**68**)^[81,86] an die Aldehydfunktion in **67** ermöglichte das Anbringen des Cyclohexenylrestes mit beeindruckender Kontrolle über die neu entstehenden Stereozentren an C5 und C6 (20:1 zugunsten von **69**). Eine anschließende Tamao-Fleming-Oxidation und CAN-vermittelte N-Entschützung resultierten im Triol **70**, das durch Verseifung des Methylesters, Lactonbildung und abschließenden OH-Cl-Austausch in den Naturstoff **4** umgewandelt wurde. Zusammengefasst erhält man mit der Synthese von Corey et al. **4** in beeindruckenden 16.5 % Ausbeute und mit hoher Stereokontrolle ausgehend von **57**.^[81] Die Syntheseroute besticht durch die zurückhaltende Verwendung von Schutzgruppen und das Fehlen jeglichen Schutzgruppenwechsels während der Sequenz. Welch großen Einfluss einige der Synthesemethoden hatten, die im Laufe dieser Arbeit entwickelt wurden, – vor allem die Installation des Cyclohexenylrestes und die späte Einführung des Chlorsubstituenten – wird deutlich durch ihre immer wiederkehrende Verwendung in späteren Synthesen von **4** durch andere Gruppen (siehe die weiteren Synthesen in diesem Aufsatz).

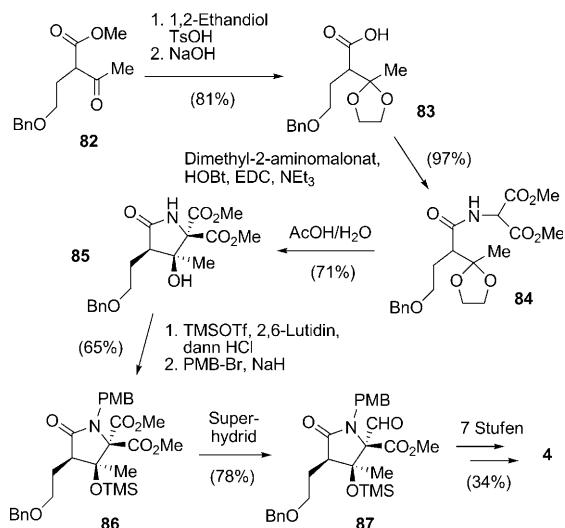
Ein völlig unterschiedlicher Ansatz zum stereoselektiven Aufbau der Stereozentren am γ -Lactamring von **4** wurde von Danishefsky und Endo verfolgt.^[87] Ausgehend vom literaturbekannten, aus dem chiralen Pool stammenden Pyroglutamatderivat **71** wurde der C3-Substituent durch 1,4-Addition eines Vinylcuprats eingeführt, was ausschließlich Verbindung **72** ergab (Schema 8). Eine anschließende Alkylierung von **72** führte zur diastereoselektiven (14:1) Anbringung der C2-Seitenkette in **73**. Ozonolyse, Carbonatbildung und Entfernung des N,O-Acetals lieferten den primären Alkohol **74**, der

durch Oxidation, Esterbildung und Behandlung mit Meerwein-Salz in den Imidatester **75** überführt wurde. Das quartere Stereozentrum an C4 wurde elegant durch interne Acylierung mit dem an C3 befindlichen Ethylcarbonat eingeführt, was **76** lieferte. Saure Entschützung des γ -Lactams, gefolgt von N-PMB-Schützung und hydrogenolytischer Spaltung der O-Benzylgruppe ergab Alkohol **77**. Der Lactonring wurde mit einem Phenylseleniumanion geöffnet und die freigesetzte Säuregruppe zu **78** benzyliert, das durch Selenidoxidation/-eliminierung und Dess-Martin-Oxidation in **79** überführt wurde. Die anschließende Acetal-vermittelte kationische Cyclisierung durch Umsetzen von **79** mit Phenylselenylbromid und AgBF_4 ermöglichte die Bildung des Stereozentrums an C3 mit perfekter Stereokontrolle. Das Produkt **80** wurde radikalisch deselenenyliert, was zur gewünschten Methylgruppe an C3 führte, und der Benzylester an C4 chemoselektiv in den Aldehyd **81** umgewandelt. Ausgehend von **81** wurde die Synthese von **4** in sieben weiteren Stufen, einschließlich der von Corey et al. entwickelten Cyclohexenylzinkaddition und Lactonisierungs-Chlorierungs-Sequenz, abgeschlossen.

Eine erste biosynthetisch inspirierte Route zu racemischen **4** wurde von Pattenden et al. 2006 präsentiert (Schema 9).^[88,89] Das Ausgangsmaterial dieser Synthese, der α -substituierte β -Ketoester **82**,^[90] ist strukturell sehr nahe mit den PKS-Verlängerungseinheiten verwandt, die die Natur bei der Biosynthese von **4** nutzt. Schützen der Ketogruppe von **82** und Verseifung des Methylesters ergaben die Säure **83**, die mit Dimethyl-2-aminomalonat zum Amid **84** gekuppelt wurde. **84** ähnelt dem vorgeschlagenen PKS-NRPS-Intermediat aus der Salinosporamidbiosynthese (siehe Schema 5 b).



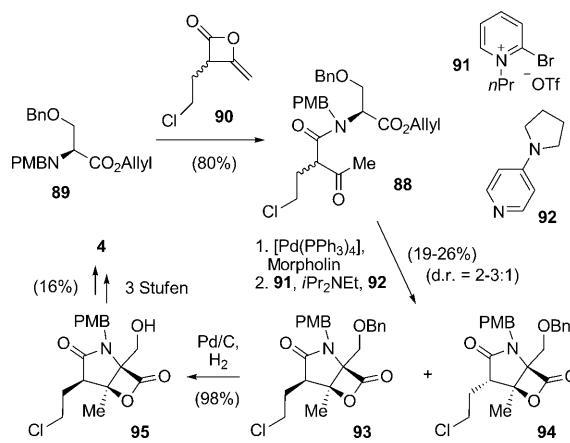
Schema 8. Syntheseroute zu Salinosporamid A (**4**) nach Danishefsky und Endo. HMDS = Hexamethyldisilazanid, TfOH = Trifluormethansulfonsäure.



Schema 9. Von Pattenden et al. entwickelte, erste biomimetische Totalsynthese von racemischem Salinosporamid A [*rac*-(**4**)]. EDC = *N'*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimid, HOEt = 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol.

Saures Entfernen des Dioxolans löste eine biomimetische, intramolekulare Cyclisierung zum γ -Lactam **85** als einzigem Diastereomer aus. Bildung des TMS-Ethers an der neu entstandenen tertiären Hydroxygruppe mit nachfolgender PMB-Schützung des Amids ergab **86** und ebnete den Weg zur chemoselektiven Reduktion der gewünschten Methylesterfunktion, um so Aldehyd **87** zu ergeben. Ausgehend von diesem Punkt wurde die Synthese von racemischem **4** in sieben weiteren Stufen in Analogie zur Synthese von Corey et al. beendet.

Eine weitere, noch kürzere biomimetische Synthese von racemischem **4** wurde kurz darauf von Romo et al. publiziert.^[91] In dieser Route wurde das bicyclische Gerüst von **4** in einem einzigen Schritt ausgehend von der leicht zugänglichen, linearen Vorstufe **88** generiert, die wiederum aus der Reaktion des orthogonal geschützten *N*-PMB-Serinallyesters **89** mit dem Heteroketendimer *rac*-**90** in einem einzigen Schritt erhalten worden war (Schema 10).^[91] Anders als bei

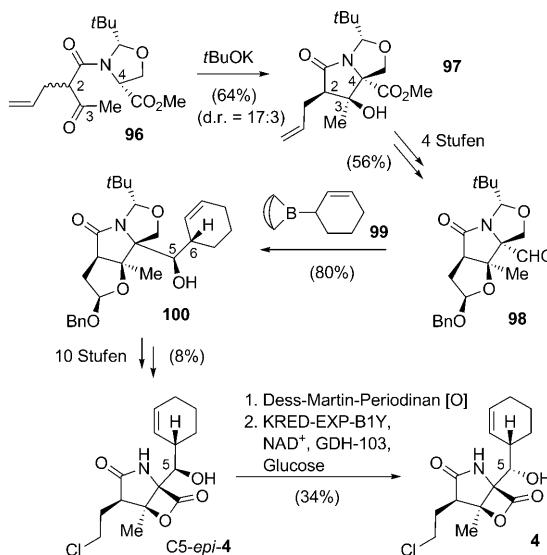


Schema 10. Kurze, biomimetische Totalsynthese von racemischem Salinosporamid A [*rac*-(**4**)] nach Romo et al.

allen vorher beschriebenen Routen wurde der Chlorsubstituent bereits auf einer frühen Synthesestufe eingeführt. Milde Spaltung des Allylesters schuf die Voraussetzungen zur Bicyclisierung mithilfe von 2-Brom-1-isopropylpyridiniumtriflat (**91**) und 4-Pyrrolidinopyridin (**92**, 4-PPY) zu einem Diastereomerengemisch (d.r. = 2–3:1) der gewünschten γ -Lactam- β -lactone **93** und **94**, zugunsten des Isomers mit der relativen Konfiguration, die in **4** zu finden ist. Reduktive Entfernung der *O*-Benzylschutzgruppe in **93** ermöglichte die Anreicherung des gewünschten Diastereomers **95** (auf 6:1–10:1) nach Reinigung. Die Synthese von *rac*-**4** wurde durch Oxidation des primären Alkohols zum Aldehyd, Addition von Coreys Cyclohexenylzinksubstrat **68** und abschließende N-Entschützung vollendet. Es ist wichtig anzumerken, dass die Addition von **68** mit geringerer Diastereoselektivität (d.r. = 3:5:1) ab lief als in anderen Synthesen, die auf dieser Methode fußten. Allerdings beobachteten auch Danishefsky und Endo eine verringerte Diastereoselektivität bei Verwendung von nicht *N*-geschützten Substraten,^[87] was die starke Substrat-abhängigkeit dieser Additionsreaktion zeigt. Obwohl die Synthese von Romo et al. den Nachteil relativ geringer che-

mischer Ausbeuten und Enantiomerenüberschüsse in den Schlüsselschritten aufweist, ist diese äußerst kurze und innovative Route über eine biomimetische Bicyclisierung äußerst beachtenswert. Zudem wurde dieser Ansatz auch für die erste und bislang einzige Totalsynthese racemischen Cinnabaramids A (**32**) verwendet.^[91]

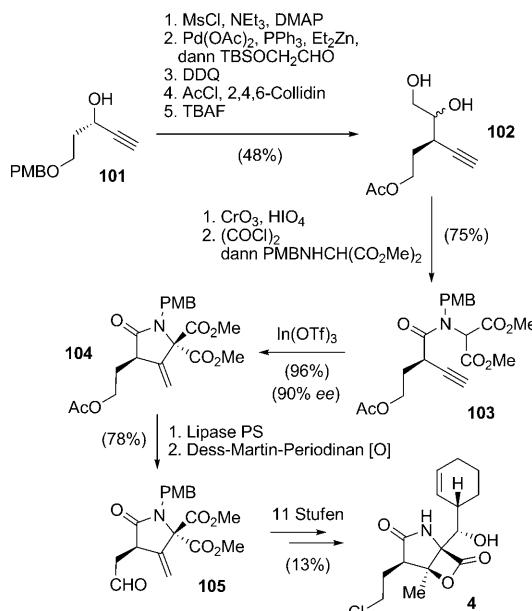
Nereus Pharmaceuticals präsentierte die erste totalsynthetische Route zu **4**, die eine leicht unterschiedliche Methodik zur Einführung des Cyclohexenylrestes als bei Corey et al. nutzte.^[92] Des Weiteren folgte der Aufbau der Stereozentren des γ -Lactamrings einer neuartigen Strategie. Dafür wurde die entscheidende Vorstufe, das β -Ketoamid **96**, einer intramolekularen Aldolreaktion unterzogen, die sich das Konzept der Selbstregenerierung von Stereozentren^[93] nach Seebach et al. zunutze machte; dies lieferte das Oxazolidin- γ -lactam **97**, das bereits alle benötigten Stereozentren enthielt (Schema 11). **97** wurde in d.r. = 17:3 erhalten und durch Kristallisation in das reine, gewünschte Enantiomer überführt. Bemerkenswerterweise war dieser Schritt (und alle vorangegangenen Umsetzungen, die hier nicht gezeigt werden) skalierbar auf die Herstellung von 100 g **97**. Eine Serie von Oxidations-/Reduktionsschritten lieferte den Aldehyd **98**, der zunächst nach der Cyclohexenylzinkmethode von Corey et al. umgesetzt wurde. Allerdings ergab die Reaktion in diesem Fall ein *anti*-Additionsprodukt mit unerwünschter Konfiguration an C5 und C6. Die Einführung der Seitenkette gelang schließlich unter Anwendung der Allylborierungschemie nach Brown und Kramer: also Kupplung von **98** mit B-2-Cyclohexen-1-yl-9-borabicyclo[3.3.1]nonan (**99**),^[94] was zum erwarteten *syn*-Additionsprodukt **100** führte, in diesem Fall jedoch mit der korrekten Konfiguration an C6. Nach einigen Transformationen funktioneller Gruppen, darunter Lactonbildung und OH-Cl-Austausch nach Corey et al., und Veränderungen von Schutzgruppen musste noch die unerwünschte Konfiguration im erhaltenen C5-*epi*-Salinosporamid A (C5-*epi*-**4**) korrigiert werden. Dies gelang durch



Schema 11. Totalsynthetischer Zugang zu Salinosporamid A (**4**) von Nereus Pharmaceuticals. NAD⁺ = Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form).

Oxidation von C5-*epi*-**4** zu Keto-Salinosporamid und anschließende stereoselektive Reduktion. Der Reduktions schritt stellte sich als höchst problematisch heraus, da keine der getesteten Synthesemethoden in zufriedenstellenden Ausbeuten zum gewünschten Produkt **4** führte. Das Ziel wurde schließlich durch enzymatische Reduktion mit der NADH-abhängigen Ketoreduktase KRED-EXP-B1Y und Glucose-Dehydrogenase (GDH) zur In-situ-Cofaktor-Re generation erreicht.^[92,95]

Eine neuartige Route zum γ -Lactamteil von **4** über eine Indium-katalysierte Conia-En-Reaktion^[96] im Schlüsselschritt wurde von Hatakeyama und Mitarbeitern entwickelt (Schema 12).^[97] Der chirale Propargylalkohol **101**^[98] wurde in einer fünfstufigen Sequenz in das Diol **102** überführt. Oxidation von **102** und Aktivierung der dadurch entstehenden Carbonsäure als Säurechlorid, gefolgt von Kondensation mit Dimethyl-2-(PMB-amino)malonat, ergab die Schlüsselvorstufe **103**. Bei der nachfolgenden Säulenchromatographie ging **103** bereits unter teilweiser Cyclisierung in eine nicht trennbare 72:28-Mischung von **103** und dem erwünschten Produkt **104** über. Eine In(OTf)₃-vermittelte Conia-En-Reaktion dieses Gemisches ergab eine vollständige Umsetzung zum γ -Lactam **104** mit 90% ee. Die beobachtete hohe Enantiomerenreinheit von **104** lässt auf eine Kieselgel-induzierte Conia-En-Reaktion während der Aufarbeitung von **103** schließen, da eine Cyclisierung über das achirale Allenylamid ansonsten zu einem Verlust der Enantiomerenreinheit geführt hätte. Wegen der Instabilität von **104** unter basischen Bedingungen wurde die Acetylschutzgruppe mild durch eine Lipase entfernt und der freigesetzte primäre Alkohol anschließend zum Aldehyd **105** oxidiert. **105** ist nahezu identisch zu Danisheskys Intermediat **79**, mit dem einzigen Unterschied in den Esterfunktionen (zweimal Methyl in **105** ge-

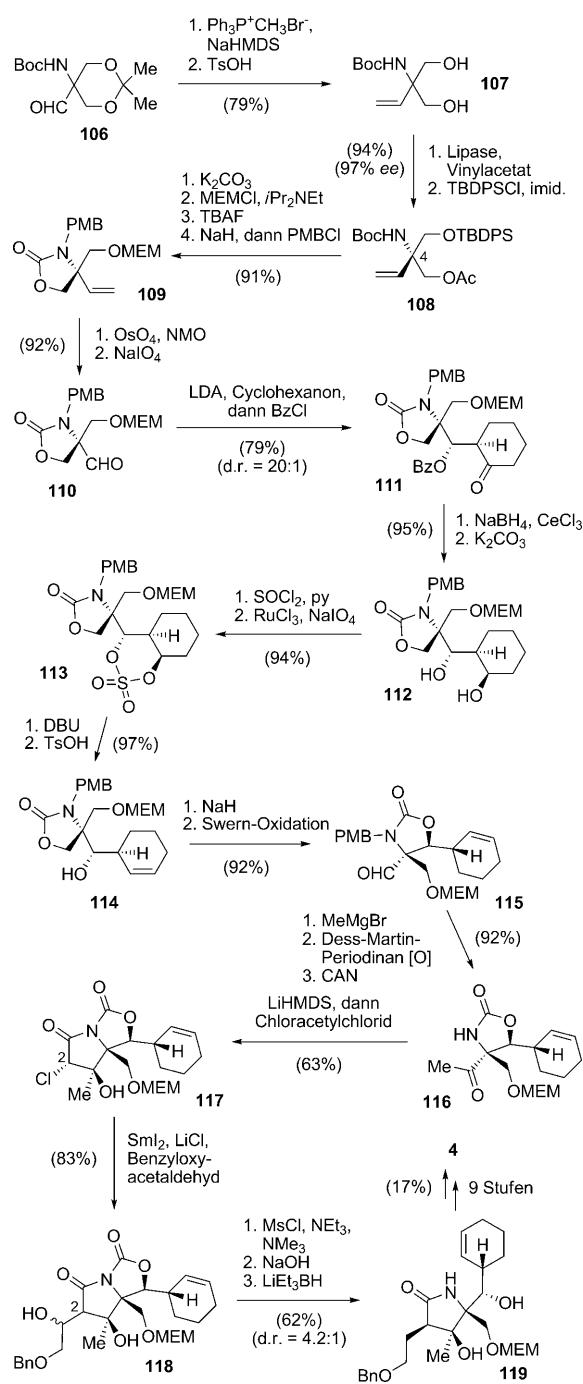


Schema 12. Totalsynthese von Salinosporamid A (**4**) nach Hatakeyama et al. DDQ = 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-1,4-benzochinon, Ms = Methansulfonyl (Mesyl), TBAF = Tetrabutylammoniumfluorid, TBS = *tert*-Butyldimethylsilyl.

genüber *tert*-Butyl und Benzyl in **79**; siehe Schema 8), und wurde über eine ähnliche Route in den Naturstoff **4** überführt.

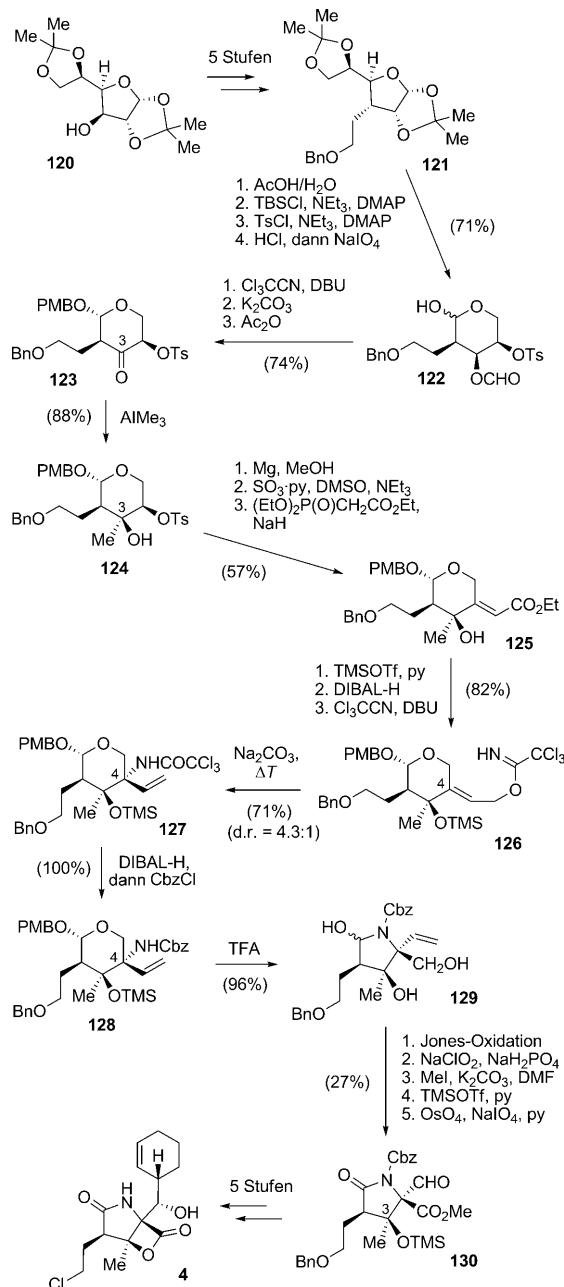
Ein gänzlich unterschiedlicher Ansatz zum Aufbau von Salinosporamid A (**4**), mit einer stereoselektiven Synthese des Cyclohexenrings auf einer frühen Stufe der Synthese, wurde von Omura et al. präsentiert.^[99] Ausgehend von Aldehyd **106**^[100] ergaben Wittig-Olefinition und Entschützung das Diol **107**, das durch eine Lipase-katalysierte enzymatische Desymmetrisierung gefolgt von O-Silylierung in 97% ee in den chiralen Baustein **108** überführt wurde (Schema 13). **108** enthält bereits das spätere quartäre Stereozentrum C4 von **4**. Umschützung des *O*-Acetats zum *O*-MEM-Ether, Entfernung der TBDPS-Schutzgruppe, intramolekulare Carbamierung und *N*-PMB-Schützung ergaben **109**, das oxidativ in den Aldehyd **110** überführt wurde. Der folgende Schlüsselschritt führte eine Cyclohexanongruppe stereoselektiv durch eine LDA-vermittelte, chelatkontrollierte Aldolreaktion ein. In-situ-O-Benzylierung der entstandenen sekundären Hydroxygruppe ergab das Benzoat **111** mit d.r. = 20:1. Die benötigte Überführung des Cyclohexanon in den erwünschten Cyclohexenrest erwies sich als schwierig und erforderte eine Serie von Reaktionen: Luche-Reduktion und Solvolyse ergaben das Diol **112**, das in zwei Stufen in das Sulfat **113** umgewandelt wurde. Eine Umsetzung von **113** mit DBU und anschließende Reaktion der entstehenden *O*-Sulfonsäure mit TsOH lieferten das Cyclohexen **114**, das zum Erhalt von Aldehyd **115** in einer intramolekularen Transcarbamierung und einer Swern-Oxidation umgesetzt wurde. Addition von Methylmagnesiumbromid, Dess-Martin-Oxidation und *N*-PMB-Entschützung lieferten **116**. Der γ -Lactamrest wurde anschließend durch N-Acetylierung von **116** und intramolekulare Aldolreaktion installiert, was isomerenreines **117** ergab. Die noch fehlende C2-Seitenkette wurde als nächstes eingebaut. Dazu wurde **117** in einer SmI₂-vermittelten Reformatsky-Reaktion mit Benzoyloxyacetaldehyd zu **118** umgesetzt. Da die direkte Desoxygenierung von **118** nicht zum Erfolg führte, wurde die Entfernung der unerwünschten Hydroxygruppe durch Mesylierung und Eliminierung über ein intermediäres Alken realisiert, das mit einem moderaten d.r.-Wert von 4.2:1 diastereoselektiv zum γ -Lactam **119** reduziert wurde. Der Naturstoff **4** wurde ausgehend von **119** in neun weiteren Stufen erhalten, die vor allem Schutzgruppenmanipulationen sowie Coreys Methodik für den β -Lactonringschluss und die Einführung des Chlorsubstituenten umfassen.^[99]

Eine weitere Methode zum Aufbau des γ -Lactamteils von Salinosporamid A (**4**) publizierten kürzlich Chida et al. im Rahmen einer formalen Totalsynthese von **4**.^[101] Dabei wurde die chirale Information aus einem geschützten Furanosederivat **120** erhalten,^[102,103] das in fünf Stufen in das Benzoat **121** überführt wurde (Schema 14). Nach einer Reihe von Umschüttungsreaktionen und einer Glycolspaltung zur Pyranose **122** wurden die anomere Hydroxygruppe als *O*-PMB- β -Glycosid geschützt, die *O*-Formylgruppe hydrolysiert und der freigesetzte sekundäre Alkohol zum Keton **123** oxidiert. Dies ermöglichte eine substratkontrollierte, hoch stereoselektive Einführung des quartären Stereozentrums an der späteren C3-Position unter Bildung von **124**. Entfernung der *O*-Ts-



Schema 13. Totalsynthese von **4** nach Omura et al. mit einer frühen Einführung des Cyclohexenylrestes. Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, Bz = Benzoyl, DBU = 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en, imid. = Imidazol, MEM = (2-Methoxyethoxy)methyl, NMO = 4-Methylmorpholin-N-oxid, TBDPS = *tert*-Butyldiphenylsilyl.

Gruppe und Oxidation des dabei entstehenden Alkohols ermöglichen eine Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion zur selektiven Synthese des Alkens **125**. O-Silylierung, Reduktion des Ethylesters und Einführung des Trichloracetimidats ergaben **126**, die Schlüsselvorstufe zur Generierung des quartären Stereozentrums an C4, die wiederum durch Overman-Umlagerung von **126** verwirklicht wurde, die zu **127** mit



Schema 14. Synthese von **4** nach Chida et al., ausgehend von einer aus D-Glucose erhaltenen Vorstufe **120**. Cbz = Benzyloxycarbonyl, DIBAL-H = Diisobutylaluminiumhydrid, TFA = Trifluoressigsäure.

moderatem d.r. = 4.3:1 führte. Austausch der *N*-Trichloracetylgruppe gegen eine *N*-Cbz-Schutzgruppe lieferte **128**. Die Reaktion von **128** mit wässriger TFA ermöglichte die Umlagerung zum gewünschten γ -Lactam **129**. Eine zweistufige Oxidation, gefolgt von der Herstellung des Methylesters, *O*-TMS-Schützung der tertiären Hydroxygruppe an C3 und oxidativer Spaltung der exocyclischen Doppelbindung, ergab den Aldehyd **130**. Der Naturstoff **4** konnte nun in fünf weiteren Stufen gemäß der von Corey et al. ausgearbeiteten Vorschrift erhalten werden.

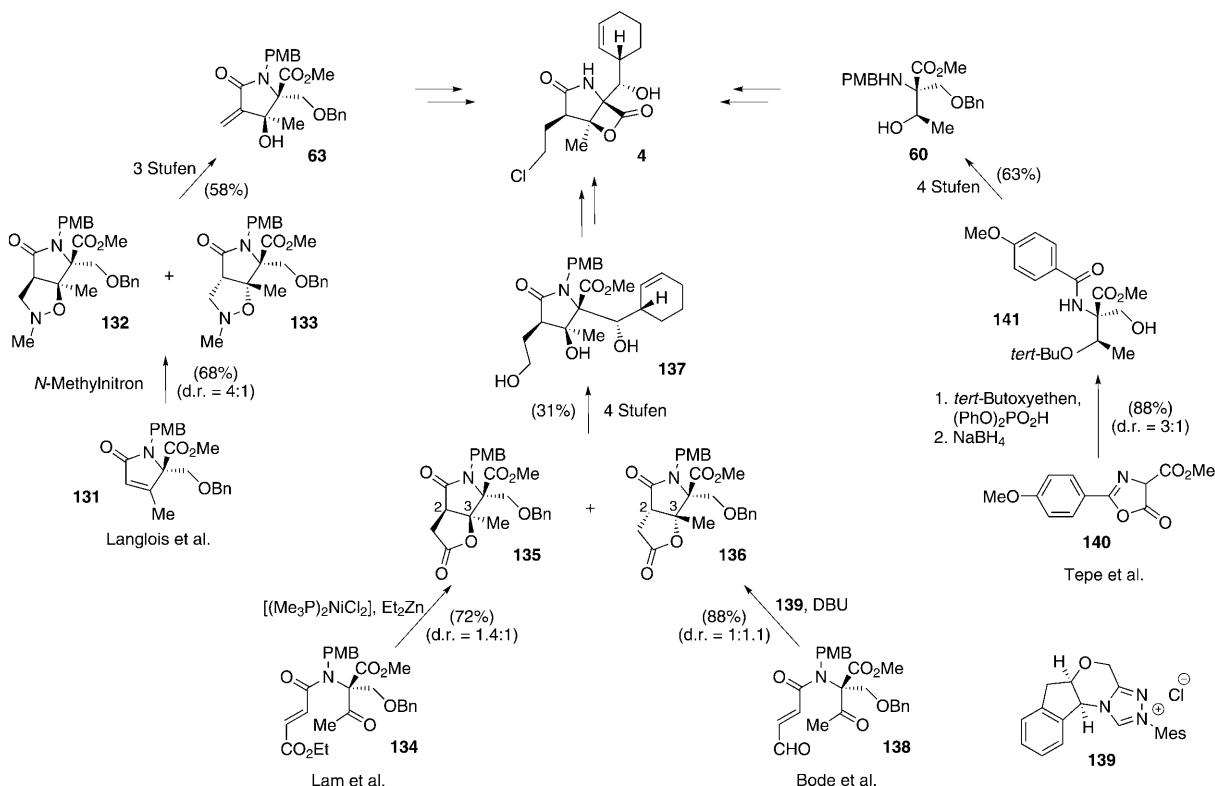
Einige weitere Gruppen haben sich gleichfalls mit formalen Totalsynthesen von Salinosporamid A (**4**) beschäftigt

und diverse Syntheserouten zu Verbindungen ausgearbeitet, die Intermediaten des Synthesewegs von Corey et al. gleichen. Langlois et al. generierten die Chiralität am γ -Lactamsystem durch eine regioselektive *N*-Methylnitron-Cycloaddition (Schema 15).^[104,105] Dieser Schritt wurde mit dem Pyrrolinon **131** ausgeführt und ergab die diastereomeren Cycloadditionsprodukte **132** und **133** in 54 bzw. 14% Ausbeute. Das Produkt mit der erwünschten Konfiguration, **132**, wurde in zwei weiteren Stufen und 58% Ausbeute in Coreys Intermediat **63** überführt. Lam et al. verwendeten eine Nickel-katalysierte, reduktive Aldolcyclisierung/Lactonisierung, um den Lactamteil von **4** durch C2-C3-Bindungsknüpfung aufzubauen, strategisch ähnlich der Corey-Synthese.^[106] Im Schlüsselschritt dieser Route wurde das Substrat **134**, das dem Intermediat **62** des Corey-Pfads ähnelt und in einer vergleichbaren Art und Weise hergestellt wurde, mit [(Me₃P)₂NiCl₂] und Et₂Zn als Katalysator bzw. Reduktionsmittel zu den Pyrrolinonen **135** und **136** in 72 % Ausbeute und einem Verhältnis von 1.4:1 zugunsten des erwünschten Produktes **135** cyclisiert. Dieses wurde in vier weiteren Stufen in das späte Intermediat **137** der Corey-Synthese überführt. Bode und Struble gelang die Entwicklung einer durch ein N-heterocyclisches Carben katalysierten, intramolekularen Lactonisierung zur Herstellung des Intermediats **135** von Lam et al.^[107] Die Cyclisierung der Schlüsselvorstufe **138** wurde unter Verwendung von DBU und Katalysator **139** erreicht und ergab eine Mischung aus **135** und **136** in 88 % Ausbeute und einem Verhältnis von 1:1.1 zugunsten des unerwünschten Diastereomers. Des Weiteren erarbeiteten Tepe und Moseley eine Oxazolin-vermittelte En-Reaktion beginnend mit der Umsetzung von **140** zu **141** (88 % Ausbeute, d.r. = 3:1), die in das (hier racemische) Amin **60** der Corey-Synthese überführt wurde.^[108]

Die beeindruckende Zahl verschiedener Ansätze und die Kreativität der zahlreichen Synthesemethoden, die zum Aufbau des komplexen Gerüstes von Salinosporamid A (**4**) entwickelt wurden, sind Belege für die Einzigartigkeit dieses niedermolekularen Wirkstoffes. Der Wunsch zur Aufklärung des molekularen Wirkmechanismus von **4** sowie der Strukturmerkmale, die zu seiner überlegenen biologischen Aktivität gegenüber derjenigen anderer γ -Lactam- β -lacton-Proteasominhibitoren führen, gaben den Anlass zu eingehenden Untersuchungen von Mechanismus und Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SARs).

6. Herstellung molekularer Diversität am Salinosporamid-Grundgerüst und Studien zum Wirkmechanismus

Um den einzigartigen Mechanismus der Proteasominhibition von **4** gänzlich zu verstehen, wird eine detaillierte Diskussion des molekularen Wirkmechanismus der Salinosporamide benötigt (Schema 16). Dieser Prozess wurde durch Röntgenkristallstrukturstudien von **4** und **15** in Komplex mit dem Proteasom sehr gut beleuchtet.^[109] Im ersten Schritt der Inhibition spaltet Thr1O^γ die Lactonringe von **4** oder **15** und bildet auf diese Weise ein Salinosporamid-Proteasom-Addukt, vergleichbar zum Wirkmechanismus durch kova-

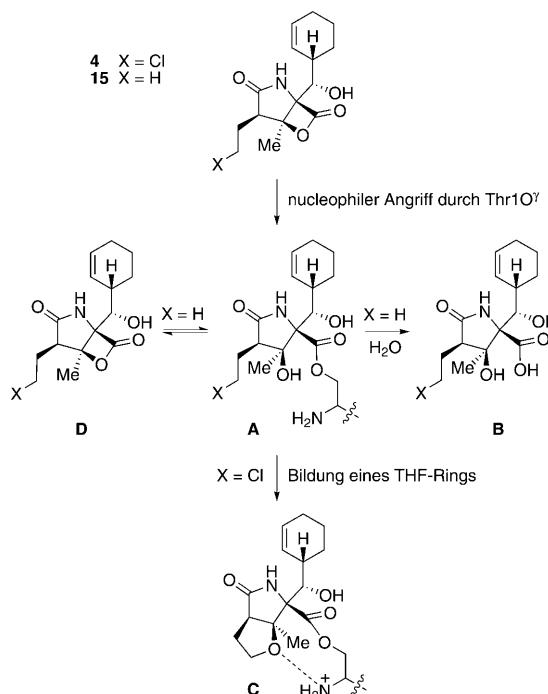


Schema 15. Diverse Zugänge anderer Arbeitsgruppen zu Intermediateen aus der Totalsynthese von **4** nach Corey et al. Mes = 2,4,6-Trimethylphenyl.

lente Anbindung des Inhibitors an das Protein, wie er zuvor für andere Moleküle gezeigt wurde,^[39] z. B. für das strukturell nahe verwandte Omuralid (**14**).^[110] Im Fall von **14** und **15** verdrängt der freigesetzte tertiäre Alkohol Wassermoleküle im aktivem Zentrum des Proteasoms und erschwert dadurch eine unverwünschte Verseifung der Protein-Inhibitor-Esterbindung (**A**→**B**). Das Molekülgerüst von **4** ermöglicht dagegen eine Sekundärreaktion: Katalysiert durch eine De-protonierung der tertiären Hydroxygruppe von **4** durch Thr1NH₂ führt eine nucleophile Verdrängung des Chlorsubstituenten der Seitenkette durch das entstandene Alkoholat zur intramolekularen Bildung eines THF-Rings (**C**). Die Bildung dieses cyclischen Ethers löst gleichfalls eine Verdrängung von hydrolytisch aktiven Wassermolekülen aus, verhindert aber zudem die erneute Bildung des β-Lactons von **4** (**D**) sowie jegliche katalytische Beteiligung des jetzt vollständig protonierten Thr1NH₃⁺ an der Esterspaltung.^[109] Diese Anordnung führt zu einer festen und irreversiblen Bindung des Inhibitors an das Proteasom. Folgerichtig ist die biologische Aktivität von **15** (in dem gegenüber **4** lediglich das Chloratom und damit der zusätzliche Schutz der Esterbindung nach Bildung des cyclischen Ethers fehlt) bedeutend geringer.^[111]

Die gegenüberliegende Seite der Protein-Inhibitor-Esterbindung wird durch den Cyclohexenylring (P1) der Sali-nosporamide in der S1-Bindungstasche und durch das Proteinrückgrat selbst vor Hydrolyse sterisch abgeschirmt. Zusätzlich zu diesem schützenden Effekt des P1-Restes führen wahrscheinlich günstige Wechselwirkungen dieses Molekülteils mit hydrophoben Resten in der S1-Tasche zu einer er-

höhten Verweildauer der Salinosporamide im aktiven Zentrum des Proteasoms. Diese zusätzliche Bindung trägt zur ausgeprägteren biologischen Aktivität dieser Verbindungen als bei anderen γ -Lactam- β -lactonen, wie **14**, bei und könnte



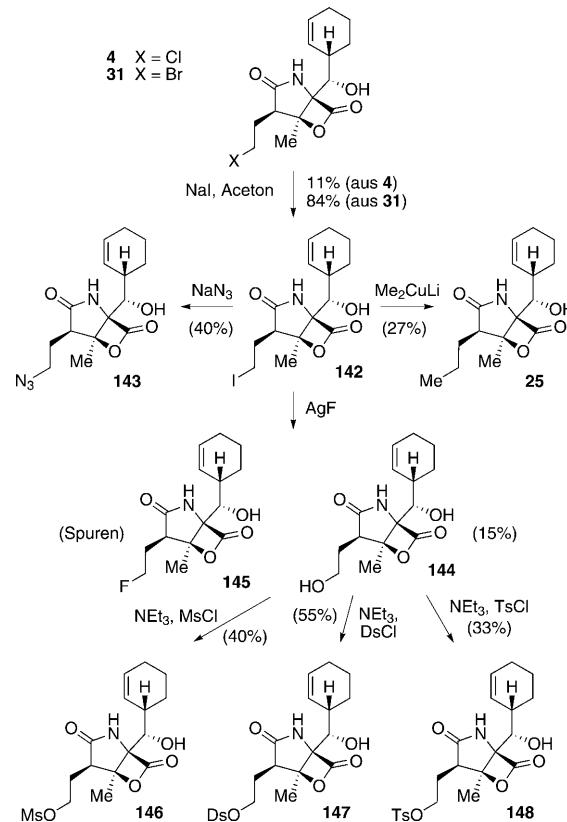
Schema 16. Molekularer Mechanismus der Bindung/Abspaltung von 4 und 15 an das/vom Proteasom.

der Grund für die beobachtete Inhibition aller drei Proteasomuntereinheiten sein. Diese durch kristallographische Studien gewonnenen, wertvollen mechanistischen Einblicke,^[109] die zuvor lediglich auf Basis orientierender SAR-Daten vorhergesagt worden waren,^[111] lassen somit darauf schließen, dass Strukturveränderungen der C2- und C5-Substituenten der Salinosporamid-Grundstruktur für die Untersuchung von SARs am nützlichsten sind.

6.1. Auswirkungen von Strukturveränderungen an C2 auf die biologische Aktivität der Salinosporamide

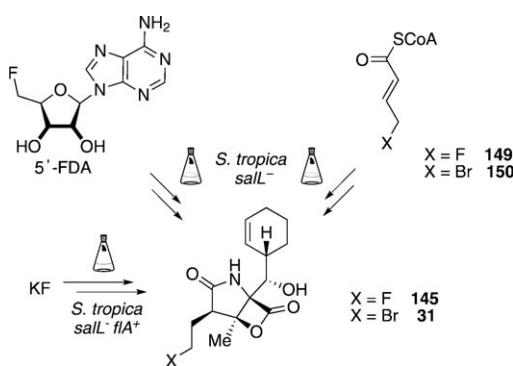
Zu den von *S. tropica* produzierten Salinosporamiden mit unterschiedlich substituierter C2-Position zählen das aktivste Salinosporamid – Salinosporamid A (**4**) –, sein Deschloranalog Salinosporamid B (**15**) sowie die Methyl- und Ethylsubstituierten Derivate D (**24**) und E (**25**).^[27,53,54] Des Weiteren können die C2-Epimere F–H (**26–28**) von **4**, **15** und **25** isoliert werden. Wie in Abschnitt 3 beschrieben, kann gezielte Biosynthese genutzt werden, um die Bildung von Bromsalinosporamid **31** zu bewirken.^[54,112] Zur weiteren Vergrößerung der Diversität des C2-Substituenten sowie zur Untersuchung der Auswirkungen einer Substitution des mechanisch entscheidenden Chloratoms in **4** nutzte Nereus Pharmaceuticals mehrere (semi-)synthetische Manipulationen, um unterschiedliche Halogen- und Nicht-Halogenabgangsgruppen (leaving groups, LGs) sowie Nicht-Abgangsgruppen in das Salinosporamidgerüst einzuführen (Schema 17).^[111,113] Die Umsetzung von **4** oder **31** unter Finkelstein-Bedingungen ermöglichte die Produktion von Iodsalinosporamid A (**142**), dem zentralen Intermediat für weitere Modifikationen der C2-Position. Die Reaktion von **142** mit NaN_3 führte zum Azid **143**. Das Propylderivat Salinosporamid E (**25**), das zur Zeit der ersten SAR-Untersuchungen noch nicht entdeckt worden war, wurde durch Addition von Lithiumdimethylcuprat an **142** erhalten. Die Bildung des Hydroxy-substituierten **144** wurde durch Umsetzung von **142** mit NaOH erreicht, allerdings in nur geringen Ausbeuten (nicht gezeigt). Eine effizientere Route zu **144** wurde bei Versuchen zur Herstellung des fluorierten Analogons **145** aus **142** unter Verwendung von AgF entdeckt. Während unter diesen Bedingungen nur Spuren von **145** erhalten wurden, entstand **144** in 15 % Ausbeute. Mit **144** in den Händen war der Weg zur Herstellung der entsprechenden mesylierten, dansylierten und tosylierten Derivate **146–148** geebnet. **148** wurde zudem durch Totalsynthese erhalten.^[113] Selbst nach Tests einer großen Bandbreite unterschiedlicher Bedingungen gelang keine Verbesserung der Syntheseroute zu dem interessantesten halogenierten Derivat, **145**, das wegen der schlechten Abgangsgruppeneigenschaften von Fluor und der positiven Wirkung von eingeführtem Fluor auf medizinische Wirkstoffe^[114] als interessanter Zusatz für die SAR-Untersuchungen gilt.

Noch vor den Syntheseversuchen wurde in unserem Labor ein mutasynthetischer Zugang zu Fluorsalinosporamid (**145**) erforscht. Vorherige Experimente, in denen eine gezielte Biosynthese von **145** in *S. tropica* durch Austausch von NaCl im Produktionsmedium gegen NaF angestrebt worden



Schema 17. Semisynthese von C2-Analoga der Salinosporamide. $\text{Ds} = 5\text{-}($ Dimethylamino)-1-naphthalinsulfonyl (Dansyl).

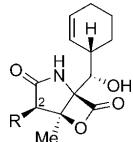
war, hatten eine toxische Wirkung von Fluor auf das Bakterium gezeigt.^[112] Des Weiteren zeigten In-vitro-Experimente mit der für den Biosyntheseweg spezifischen Chlorinase *Sall*, dass Fluorid von diesem Enzym nicht als Substrat akzeptiert wird.^[67] Diese Hürden wurden durch genetische Manipulation des Produzentenstammes überwunden.^[115] Löschung des für die Chlorinase *Sall* codierenden Gens im *sal*-Biosynthese-Gencluster, die den ersten Schritt (**48** → **49**) auf dem Chlorierungsweg zu **4** katalysiert (siehe Schema 6), verhinderte die Produktion von Salinosporamid A (**4**) im Mutantenstamm. Eine chemische Komplementierung der Fermenationsbrühe mit synthetischem 5'-Fluordesoxyadenosin (5'-FDA),^[116] dem fluorierten Analogen des Intermediats 5'-CDA (**49**; siehe Schema 6) im Chlorierungspfad,^[66] ermöglichte die Produktion von **145** durch Fermentation (Schema 18).^[115] Dies demonstrierte die Flexibilität der nachgeschalteten biosynthetischen Transformationen in Bezug auf den Einbau von Fluor in das Salinosporamidgerüst. Ähnliche Resultate wurden auch durch Ergänzung von Fermentationen des *sall*[−]-Mutanten mit den Analoga 4-Fluorcroton- (**149**) oder 4-Bromcrotonsäure (**150**) des späteren Chlorierungspfades zur Herstellung von **145** bzw. **31** erhalten.^[76] Vor kurzem gelang der chromosomal Austausch des Chlorinasegens *salL* in *S. tropica* durch das Fluorinasegen *fLa* aus *S. cattleya*, wodurch ein gentechnisch manipulierter Organismus mit der Fähigkeit zur direkten Produktion von **145** in Gegenwart eines anorganischen Fluoridsalzes entstand.^[117]



Schema 18. Methoden zur Produktion von **145** und **31** durch genetische Manipulationen an *S. tropica* und chemische Komplementierung der entsprechenden Mutantenstämme.

Die Analyse der biologischen Aktivitäten aller Derivate der C2-Seitenkette lieferte eine Reihe wichtiger Erkenntnisse. Im Allgemeinen zeigten alle Salinosporamide dieselbe Reihenfolge in der Stärke der Inhibition der Proteasom-Untereinheiten nach CT-L > T-L > CA-L (Tabelle 2).^[111,113]

Tabelle 2: Salinosporamidanaloga mit veränderten C2-Substituenten: biologische Aktivität gegen das 20S-Proteasom des Kaninchens.^[a]



| R | Inhibition des 20S-Proteasoms des Kaninchens [nM] | | | |
|------------|---|--------------------|---------------------|-------------------|
| | CT-L ^[b] | T-L ^[b] | CA-L ^[b] | |
| 4 | C ₂ H ₄ Cl | 2.6 ± 0.2 | 21 ± 3 | 430 ± 60 |
| 145 | C ₂ H ₄ F | 9.2 ± 10.2 | ND ^[c] | ND ^[c] |
| 31 | C ₂ H ₄ Br | 2.6 ± 0.4 | 14 ± 2 | 290 ± 60 |
| 142 | C ₂ H ₄ I | 2.8 ± 0.5 | 13 ± 3 | 410 ± 230 |
| 146 | C ₂ H ₄ OMs | 4.3 ± 0.8 | 65 ± 8 | 870 ± 32 |
| 147 | C ₂ H ₄ ODs | 3.0 ± 0.5 | 12 ± 2.3 | 90 ± 11 |
| 148 | C ₂ H ₄ OTs | 2.4 ± 0.4 | 9.9 ± 0.2 | 127 ± 5 |
| 26 | epi-C ₂ H ₄ Cl | 330 ± 20 | 2500 ± 500 | > 20000 |
| 143 | C ₂ H ₄ N ₃ | 7.7 ± 2.5 | 210 ± 40 | 560 ± 60 |
| 144 | C ₂ H ₄ OH | 14.0 ± 1.5 | 1200 ± 150 | 1200 ± 57 |
| 24 | CH ₃ | 7.5 ± 0.6 | 370 ± 44 | 460 ± 49 |
| 15 | C ₂ H ₅ | 26 ± 6.7 | 610 ± 35 | 1200 ± 110 |
| 25 | C ₃ H ₇ | 24 ± 5 | 1100 ± 200 | 1200 ± 200 |

[a] Die Ermittlung der biologischen Aktivität gegen die drei proteolytischen Untereinheiten erfolgte durch Inkubation des mit Inhibitor vorbehandelten Proteasoms mit fluorogenen Substraten mit hoher Affinität für eine bestimmte Untereinheit (Suc-LLVY-AMC für CT-L, Z-LLE-AMC für C-L, Bz-VGR-AMC für T-L) und anschließende Quantifizierung der Menge des proteolytisch abgespaltenen AMC (7-Amino-4-methylcumarin).^[111,113,115,118] [b] CA-L = Caspase-artige Aktivität, T-L = Trypsin-artige Aktivität, CT-L = Chymotrypsin-artige Aktivität. [c] Nicht bestimmt.

Verbindungen mit einer guten Abgangsgruppe an C2 (also Cl, Br, I, OM_s, OD_s, OT_s) wiesen die stärkste Inhibition aller Untereinheiten auf. Die Größe der LG beeinflusste nicht die Hemmwirkung. Dies kann durch die große, offene Kavität der S2-Bindungstasche im Proteasom erklärt werden,^[109] die leicht große Gruppen wie Tosyl- oder Dansylgruppen auf-

nehmen kann. Vielmehr zeigten das Dansylat **147** und das Tosylat **148** verstärkte Aktivität bei T-L- und CA-L-Inhibitionstests, was auf günstige Wechselwirkungen dieser großen Substituenten in den entsprechenden Bindungstaschen schließen lässt. Bemerkenswerterweise zeigte **26**, das C2-Epimer von **4**, eine ca. 100-fach abgeschwächte Aktivität, ein Beleg für die Wichtigkeit der natürlichen Konfiguration an C2 für die Bildung des THF-Rings und für die gesamte Passform des Inhibitors im aktiven Zentrum des Proteasoms.

Die nächsteffizienteste Gruppe von Proteasominhibitoren (zwei- bis dreimal weniger aktiv als **4** im CT-L-Assay) umfasst die Fluor- (**145**), Azido- (**143**) und Methyl-funktionalisierten Analoga (**24**) mit schlechten/keinen LG-Eigenschaften. Die Ethyl- (**15**), Hydroxyethyl- (**144**) und Propyl-substituierten Derivate (**25**) waren ungefähr 5–10-mal weniger effiziente CT-L-Inhibitoren als **4**. Die Abnahme der Aktivität dieser nicht-LG-substituierten Derivate gegenüber jener des Methylanalogons **24** lässt sich dadurch erklären, dass Bewegungen der längeren Seitenkette im aktiven Zentrum einen zunehmend destabilisierenden Effekt auf Bindungswchselwirkungen ausüben.^[109] Des Weiteren sind nicht-LG-Derivate im Allgemeinen wesentlich weniger cytotoxisch in Zell-basierten Assays (nicht gezeigt).^[111,113]

Interessant ist hier, dass die Cinnabaramide trotz fehlender LG an der C2-Seitenkette starke Inhibitoren des humangen 20S-Proteasoms im nanomolaren Bereich sind.^[55] Dies stellt die Wichtigkeit einer Rückbildung des β-Lactons zur Abspaltung von Nicht-LG-Inhibitoren vom aktiven Zentrum des Proteasoms infrage (siehe Schema 16, **D**). Des Weiteren deutet es auf eine mechanistische Relevanz des Hexylsubstituenten an der C2-Position dieser Moleküle hin, die noch untersucht werden muss.

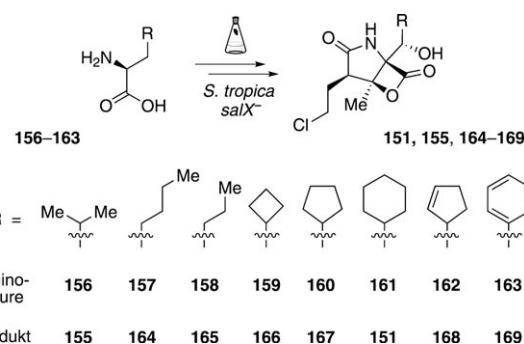
Von besonderem Interesse unter allen C2-Derivaten ist das fluorierte **145**. Auswasch-Assays mit Proteasom-gebundenem **145** zeigten eine Wiederherstellung der Proteasomaktivität, was auf eine reversible Art der Bindung schließen lässt.^[115] Ähnliche Resultate wurden durch Dialyse von Proteasom-Inhibitor-Komplexen erzielt.^[113] Während Nicht-LG-Substrate in diesen Assays im Laufe der Zeit erwiesenermaßen entfernt wurden – was letztlich zu einer kompletten Wiederherstellung der Proteasomaktivität führt – und LG-haltige Analoga ihre Hemmwirkung beibehalten, erlangte mit **145** behandeltes Proteasom seine Aktivität teilweise zurück. Eine Erklärung für diese Beobachtung lieferten kristallographische Studien.^[119] Eine Analyse der β5-Untereinheit des Proteasoms nach einstündigem Einweichen des Kristalls zeigte **145** an das Protein über eine Esterbindung gebunden, allerdings mit noch intakter Fluorethylseitenkette. Dennoch schien der Inhibitor für eine folgende Verdrängung des Fluorosubstituenten perfekt im aktiven Zentrum ausgerichtet zu sein: die Fluorethyl-Seitenkette in einer klar definierten Position, mit der tertiären Hydroxygruppe im Van-der-Waals-Abstand zur C2-Seitenkette, Thr1NH₂ innerhalb des Abstands für die Bildung einer Wasserstoffbrücke zur Hydroxygruppe und dem Fluoratom in räumlicher Nähe zu einem Netz aus Wassermolekülen, die eine Rolle bei der Solvatisierung von Fluorid nach der Fluoreliminierung spielen könnten.^[119] Kristalle zeigten nach 24-stündigem Einweichen tatsächlich eine komplette Verdrängung des Fluoratoms

unter Bildung eines THF-Rings, analog zu den Derivaten mit guter LG am C2-Substituenten. Die Wiederherstellung der Proteasomaktivität nach Umsetzen mit **145** kann daher durch konkurrierende, teilweise hydrolytische Abspaltung (oder erneute β -Lactonbildung) des noch fluorierten Inhibitors vom Protein, ermöglicht durch die nur langsame Fluorverdrängung, erklärt werden. Der cyclisierte, THF enthaltende Anteil des Komplexes trägt hingegen zur teilweise anhaltenden Hemmwirkung (sogar nach Dialyse) bei.

Die SAR-Daten für die C2-Analoga der Salinosporamidfamilie bestätigten eindeutig, dass Abgangsgruppen an der Ethylseitenkette mechanistisch wichtig sind und zur anhaltenden Inhibition des Proteasoms führen.^[113] Die Beobachtungen bei Fluarsalinosporamid (**145**) belegen ferner, dass Veränderungen an dieser Position eine Feinabstimmung von Inhibitionspotenzial und -dauer ermöglichen. Dies könnte nützlich für das Design neuartiger Salinosporamidverbindungen mit definierten pharmakologischen Eigenschaften sein, die eine Feineinstellung der Wirkung des entsprechenden Inhibitors auf dem Proteasom nachgelagerte Prozesse ermöglichen.

6.2. Auswirkungen von Strukturveränderungen an C5 auf die biologische Aktivität der Salinosporamide

Anders als die C2-Position trägt die C5-Position in allen natürlichen Salinosporamiden den gleichen Substituenten, einen Cyclohexenylrest. Des Weiteren sind semisynthetische Veränderungen wegen der hohen Reaktivität des Lactonsystems dieser Substanzklasse nur begrenzt möglich, was den Zugang zu SAR-Daten einschränkt. Eine kleine Reihe von C5-Derivaten konnte jedoch durch Manipulation der Cyclohexenyldoppelbindung generiert werden (Schema 19).^[111] Eine katalytische Hydrierung dieser Position ergab das vollständig gesättigte Cyclohexylanalogon **151**. Eine Oxidation der Doppelbindung mit *m*CPBA führte zu einem Gemisch der Epoxide **152** und **153** (d.r. = 1:11), und die anschließende Öffnung des Epoxidrings in **153** mit HCl ergab das Chlorhydrin **154**. Zusätzlich machten Corey et al. den Salinosporamid-Omuralid-Hybrid Antiprotealid (**155**; Schema 20), der

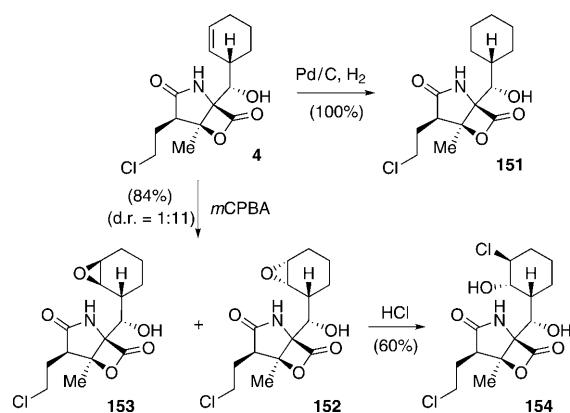


Schema 20. Herstellung einer fokussierten Bibliothek von Salinosporamid-C5-Analoga durch Gen-Inaktivierung in Kombination mit Mutasynthese.

einen Isopropylrest an C5 trägt, durch eine Totalsynthese zugänglich.^[85]

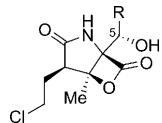
Ein direkter Ansatz zur Generierung einer fokussierten Bibliothek von C5-Derivaten wurde unter Anwendung einer Kombination aus Gen-Inaktivierung und Mutasynthese entwickelt (Schema 20).^[79,80] Zur Unterbindung der Produktion der natürlichen Aminosäurevorstufe, und damit auch aller bekannten Salinosporamide aus *S. tropica*, sollte ein für diese Biosynthese spezifisches Gen aus der Cyclohexenylalanin-Biosynthese gelöscht werden. Das Gen der Wahl war das für das Prephenat-Dehydrogenase-Homologe codierende *salX*, von dessen Proteinprodukt angenommen wird, dass es Dihydroprephensäure **45** in **46** umwandelt (siehe Schema 4). Die chemische Analyse von Extraktten des *salX*-Mutantenstammes offenbarte nicht nur den erwarteten, vollständigen Verlust der Produktion aller bekannten Salinosporamide, sondern auch das Vorhandensein eines Metaboliten, der im Wildtypstamm vorher nicht gefunden worden war.^[79] Für diesen neuen Sekundärmetaboliten konnte gezeigt werden, dass es sich um Antiprotealid (**155**) handelt, das durch den Einbau eines Leucinbausteins in das Salinosporamidgerüst entsteht. **155** wurde später als Minderkomponente auch in großmaßstäblichen Fermentationen von *S. tropica* gefunden.^[120] Das Auftreten von **155** demonstrierte die Flexibilität der *sal*-Biosynthesemaschinerie, Aminosäuren einzubauen, die nicht der natürlichen Vorstufe entsprechen, und schuf damit die Voraussetzungen für systematische Untersuchungen zur In-vivo-Substratflexibilität. Chemische Komplettierung von Kulturen des *S.-tropica-salX*-Mutantenstammes mit einer Reihe nichtcyclischer Alkyl- (**156–158**), alicyclischer (**159–162**) und aromatischer Aminosäuren (**163**) führte tatsächlich zur Produktion einer kleinen Bibliothek von Salinosporamid-C5-Analoga, welche die entsprechenden Substituenten trugen (**151**, **155**, **164–169**).^[79,80]

Ein Vergleich der Daten zur Proteasominhibition durch diese Verbindungen zeigte, dass alicyclische C5-Analoga generell aktiver sind als lineare (Tabelle 3).^[79,80] Unter den Cycloalkylderivaten **151**, **166** und **167** scheint der Cyclopentylrest in **167** einen idealen Kompromiss zwischen sterischer Abstoßung und günstigen hydrophoben Wechselwirkungen in der S1-Bindungstasche zu bieten, wie sich aus dem 10- bzw. 3-fachen Aktivitätsverlust im Cyclobutylanalogon **166** bzw. Cyclohexylanalogon **151** schließen lässt. Es wurde daher



Schema 19. Semisynthese von Salinosporamid-C5-Analoga. *m*CPBA = meta-Chlorperbenzoësäure.

Tabelle 3: Salinosporamid-Analoga mit veränderten C5-Substituenten: biologische Aktivität gegen das [a] Hefe- und [b] Kaninchen-20S-Proteasom.^[c]



| R | CT-L [nM] |
|---------------------------------------|--|
| 4 Cyclohex-2-enyl | 1.9 ± 0.2 ^[a] 2.6 ± 0.2 ^[b] |
| 168 Cyclopent-2-enyl | 2.2 ± 0.1 ^[a] |
| 151 Cyclohexyl | 27.5 ± 3.7 ^[a] |
| 167 Cyclopentyl | 9.3 ± 1.6 ^[a] |
| 166 Cyclobutyl | 93.4 ± 4.3 ^[a] |
| 164 Butyl | 132 ± 19 ^[a] |
| 155 Isopropyl | 101 ± 15 ^[a] |
| 165 Propyl | 245 ± 38 ^[a] |
| 152 (2S,3R)-Epoxycyclohexyl | 6.3 ± 0.6 ^[b] |
| 153 (2R,3S)-Epoxycyclohexyl | 91 ± 8 ^[b] |
| 154 (3S)-Chlor-(2S)-Hydroxycyclohexyl | 8200 ± 3000 ^[b] |
| 169 Phenyl | 1029 ± 419 ^[a] |

[c] Die Ermittlung der biologischen Aktivität erfolgte durch Inkubation des mit Inhibitor vorbehandelten Proteasoms mit einem fluorogenen Substrat (Suc-LVY-AMC), das Selektivität für CT-L-Aktivität aufweist, und anschließende Quantifizierung der Menge des proteolytisch abgespaltenen AMC.^[79, 80, 118]

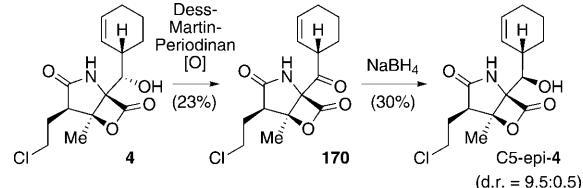
angenommen, dass bei Einführung eines Cyclopentenylrestes in die Salinosporamid-Grundstruktur die biologische Aktivität höher als jene von **4** sein sollte. Tatsächlich zeigt **168** die gleiche Wirksamkeit bei der Proteasominhibition, kombiniert mit einer leicht erhöhten Cytotoxizität in Zell-basierten Assays (nicht gezeigt).^[80] In der Gruppe der nichtcyclischen, Alkyl-substituierten Derivate zeigte das verzweigte Antiprotealid (**155**) die stärkste Proteasominhibition (50-fach niedriger als **4**). Die 2–3-fach verringerte Wirksamkeit seines Propylanalogons **165** könnte durch destabilisierende Bewegungen der flexibleren Seitenkette erklärt werden, die in der Butylverbindung **164** durch zusätzliche Van-der-Waals-Kräfte der längeren Kohlenstoffkette innerhalb der S1-Bindungstasche teilweise kompensiert werden. Die Einführung eines aromatischen C5-Restes, wie in **169**, führte zu einem deutlichen Verlust an biologischer Aktivität. Dies ist in Einklang mit vorherigen SAR-Studien zu Analoga des Omuralids (**14**)^[121] und ist erklärbar durch die starre, planare Anordnung des Phenylrings, der sich nicht der Form der S1-Bindungstasche anpassen kann und damit Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit dem Protein verhindert. Eine Oxidation der Doppelbindung von **4** unter Bildung des (2S,3R)-Epoxycyclohexylderivats **152** wurde gut toleriert, während die biologische Aktivität des 2R,3S-konfigurierten Analogons **153** stark verringert war (3- bzw. 45-fach reduziert gegenüber der Aktivität von **4**).^[111] Grund hierfür könnte eine sterische Abstoßung zwischen dem Epoxid in **153** (mit dem Sauerstoffatom auf der gegenüberliegenden Seite im Vergleich zur Situation in **152**) und dem Protein sein. Diese Annahme wurde durch die 4000-fache Abschwächung der Aktivität von **154** bestätigt, in dem sich der noch größere Chlorsubstituent

auf derselben Molekülseite wie die Epoxygruppe in **153** befindet.^[111]

Mit Ausnahme des Cyclopentenylderivats **168**^[80] wiesen alle C5-Analoga eine niedrigere biologische Aktivität als die Ausgangsverbindung **4** auf. Da der C5-Rest entscheidend für günstige Wechselwirkungen mit der S1-Bindungstasche im Proteasom ist, könnten Veränderungen an dieser Position allerdings zu unterschiedlichen Selektivitäten des neuen Inhibitoren für die drei proteolytischen Einheiten dieses Proteins führen. Diese Hypothese muss noch überprüft werden, könnte sich aber als nützlich für das Design von Inhibitoren mit Affinität für eine bestimmte katalytische Untereinheit erweisen.

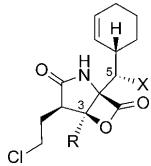
6.3. Weitere Veränderungen der Salinosporamid-Grundstruktur

Veränderungen der Substituenten R und X an C3 bzw. C5 (siehe Tabelle 4) der natürlichen Salinosporamid-Familie sind selten. Das einzige bekannte C3-Analogon, der Naturstoff **29**, trägt eine größere Ethylseitenkette an dieser Position.^[54] Des Weiteren kann das nichthydroxylierte Derivat **30** in kleinen Mengen in Extrakten von *S. tropica* gefunden werden. Die Ausbeute an **30** kann durch Löschung des für die Cytochrom-P450-Hydroxylase codierenden Gens *salD* stark erhöht werden.^[79] Außer diesen beiden Metaboliten wurde das C5-Ketoanalogon **170** durch Oxidation von **4** produziert (Schema 21). Erneute Reduktion von **170** bei niedrigen Temperaturen ergab ein Diastereomerengemisch der sekundären Alkohole C5-*epi*-**4** und **4** im Verhältnis 9.5:0.5.^[111]



Schema 21. Semisynthese von X-Analoga von **4**.

Die biologischen Daten der C3-R- und C5-X-Analoga von **4** offenbarten, dass Strukturveränderungen an keiner dieser beiden Positionen toleriert werden. Die Entfernung der C5-Hydroxygruppe in **30** führte zu einer 10–20-fachen Herabsetzung der Proteasominhibition (Tabelle 4).^[79, 111] Die Aktivität des oxidierten Derivats **170** war sogar noch deutlich geringer, und der epimere Alkohol C5-*epi*-**4** zeigte keinerlei Proteasominhibition mehr.^[111] Diese Beobachtungen können durch Komplex-stabilisierende Wasserstoffbrücken zwischen der C5-OH-Gruppe in **4** und dem Proteasom erklärt werden, wie sie bei röntgenkristallographischen Untersuchungen zu sehen waren.^[109] Diese Wechselwirkungen fehlen in **30** und werden durch unvorteilhafte sterische Abstoßung des Sauerstoffatoms in **170** und vor allem in C5-*epi*-**4** mit dem Proteinpfeilgrat ersetzt. Das C3-Ethylderivat **29** zeigte gleichfalls eine 1000-fach verringerte Aktivität; dies kann sterischen Konflikten der Ethylgruppe zugeschrieben werden, die in

Tabelle 4: C3-R- und C5-X-Salinosporamidanaloga: biologische Aktivität gegen das [a] Hefe- und [b] Kaninchen-20S-Proteasom.^[c]

| | R/X | CT-L [nM] |
|-----------------|--------------------|--|
| 4 | Me/OH | 1.9 ± 0.2 ^[a] 2.6 ± 0.2 ^[b] |
| 30 | Me/H | 20.8 ± 0.8 ^[a] 52 ± 2 ^[b] |
| 170 | Me/O | 8200 ± 600 ^[b] |
| C5-epi-4 | Me/ <i>epi</i> -OH | > 20 000 ^[b] |
| 29 | Et/OH | 2100 ± 100 ^[b] |

[c] Siehe Fußnote [c] in Tabelle 3.

Richtung einer kleinen Proteintasche zeigt, die lediglich Wasserstoff- oder Methylsubstituenten aufnehmen kann.^[109]

Zusammenfassend lassen die für die Salinosporamide erhaltenen SAR-Daten darauf schließen, dass Substitutionen an der Ethylseitenkette an C2 die Entwicklung neuartiger Derivate mit veränderter Dynamik der Proteasominhibition ermöglichen. Zudem könnten Änderungen an der C5-Position für die Produktion neuer Analoga mit definierter Selektivität für eine bestimmte Proteasomuntereinheit genutzt werden. Dennoch konnte die biologische Aktivität des stärksten natürlichen Inhibitors, **4**, durch diese Untersuchungen nicht entscheidend verbessert werden. Dies deutet auf das exzellente Design dieses niedermolekularen Proteasominhibitors durch die Natur hin, in dem jedes einzelne Atom strategisch platziert ist und so seinen Beitrag zur Gesamtaktivität der Verbindung leistet. Salinosporamid A (**4**) dient daher als eines der wenigen neuen Beispiele genuiner Naturstoffe, die völlig ohne chemische Optimierung die klinische Testphase erreichten.

7. Salinosporamid A in der Krebstherapie

Salinosporamid A (**4**) wird momentan von Nereus Pharmaceuticals unter dem Namen NPI-0052 (Marizomib) als neuer Wirkstoff zur Behandlung von Krebserkrankungen entwickelt.^[26,122] Trotz der großen Anzahl an totalsynthetischen Routen zu **4** (siehe Abschnitt 4) wird die Verbindung nach wie vor durch Fermentation der natürlichen Quelle *S. tropica* gewonnen. Die ursprünglichen Kulturbedingungen von *S. tropica* zur Gewinnung von **4**^[27] mussten jedoch angepasst werden, um die Produktion größerer Mengen in ausreichender Qualität zur Anwendung am Menschen zu ermöglichen. Die Optimierung der Produktionsstiere wurde in einer Vielzahl von Studien untersucht,^[112,123–126] und aus diesen resultierten 1) die Etablierung einer XAD-Harz-basierten (XAD = ein hydrophobes, vernetztes, Polystyrol-Co-polymer-Adorbens) Fermentationsvorschrift,^[127] die hilft, Ausbeuteverluste aufgrund der Instabilität von **4** in wässrigen Medien^[128] zu verhindern, 2) die Entdeckung effizienterer

Produzentenorganismen durch Stamm-Screening und -Selektion sowie 3) die Entwicklung des ersten im Industriemaßstab durchgeführten salinen Fermentationsprozesses nach den „Current Good Manufacturing Practice“ (cGMP)-Richtlinien. Zusammengenommen ergaben diese Versuche zur verstärkten Produktion von **4** einen ungefähr 100-fachen Zuwachs an isoliertem **4** und stellten damit einen Prozess zur Verfügung, der zur biotechnologischen Produktion im Industriemaßstab und zur klinischen Evaluierung von **4** geeignet ist.^[26,122]

Wegen der bereits nachgewiesenen Wirksamkeit des Proteasominhibitors Bortezomib (**5**) gegen multiples Myelom^[129,130] wurde Salinosporamid A (**4**) zunächst in Multiples-Myelom-Heterotransplantationsmodellen in der Maus getestet.^[131] Eine weitere biologische Evaluierung von **4** in einer Serie nichtklinischer Studien führte mittlerweile zu einer Bewertung seines Potenzials gegen multiples Myelom,^[131,132] die Waldenström-Krankheit,^[133] akute lymphatische und myeloische Leukämie,^[134] chronische lymphatische Leukämie^[135] sowie Darm-^[136] und pankreatisches Karzinom,^[137] und Non-Hodgkin-Lymphome.^[138] Über die so bestätigte Aktivität von **4** als Einzelwirkstoff gegen feste Tumoren und hämatologische Malignitäten hinaus wurde auch nachgewiesen, dass **4** das Potenzial hat, in Kombination mit anderen Chemotherapeutika und biologischen Präparaten deren Wirkung zu erweitern,^[134,136,137,139] insbesondere wenn es zusammen mit niedrig dosiertem **5** angewendet wird.^[132,133] Weitere aktuelle Studien lassen auf eine inhibierende Wirkung von **4** auf die NF-κB-Aktivierung^[140] und damit auf die Störung des NF-κB-Snail-RKIP-Netzwerks in Tumoren durch **4** schließen,^[141,142] was sich als nützlich erweisen könnte, um Resistenzen von Tumorzellen gegen konventionelle Tumortherapeutika aufzuheben. All diese Daten sprechen für ein hohes Potenzial von **4** für den Einsatz gegen eine Reihe humaner Krebserkrankungen. Momentan wird Salinosporamid A (**4**) in Dosisescalationsstudien in einer Serie von klinischen Phase-I-Studien als Einzelwirkstoff gegen multiples Myelom, feste Tumoren oder Lymphome evaluiert.^[26,122]

8. Schlussbemerkungen und Ausblick

Die erst 2003 erfolgte Isolierung von Salinosporamid A (**4**) war eine historische Entdeckung, die bereits entscheidend zur Grundlagen- und angewandten Forschung im Rahmen der Suche nach natürlichen Wirkstoffen beigetragen hat. Im Vordergrund standen dabei zunächst die schnelle vorklinische Entwicklung und der Eintritt von **4** in klinische Studien am Menschen als ein vielversprechendes Tumortherapeutikum mit neuartigem Mechanismus der Proteasominhibition. Aus diesen Forschungen resultierten viele Neuentdeckungen, unter anderem die ersten onkologischen Untersuchungen zu einem Naturstoff aus marinen Bakterien, die erste GMP-Produktion eines Naturstoffs durch saline Fermentation eines marinen Mikroorganismus und die erste Beschreibung eines irreversiblen Proteasominhibitors, der auf einem γ-Lactam-β-lacton-Gerüst beruht. Die Evaluierung der Biosynthese der Salinosporamidfamilie führte ferner zu neuen und unerwar-

teten Entdeckungen, wie neuartigen biochemischen Chlorierungs- und Polyketidsynthesereaktionen, die wiederum neue Methoden zum Bioengineering von Derivaten ergaben, darunter die erste genetische Generierung eines Fluormetaboliten. Die Totalsynthesen der Salinosporamide demonstrieren die Kreativität der Synthetiker, die eine große Zahl von Routen zum Aufbau dieser dicht funktionalisierten Verbindungen entwickelten.

Noch bleibt abzuwarten, ob sich Salinosporamid A letztlich als Tumortherapeutikum in der Klinik durchsetzen wird, allerdings sind Proteasominhibitoren wie die Salinosporamide auch vielversprechend im Einsatz gegen andere Erkrankungen, wie etwa Entzündungen,^[143] Milzbrand,^[144] Tuberkulose^[145] und Malaria.^[146] Weitere pharmakologische Forschungen mit den Salinosporamiden werden helfen, die Bedeutung des Proteasoms als Angriffsziel im Zusammenhang mit diesen Krankheiten zu ermitteln. Weitere Aufgaben und Chancen warten im Bereich der Biosynthese der Salinosporamide, wo es noch unzählige unbeantwortete Fragen gibt: Wie wird die neuartige bicyclische γ -Lactam- β -lacton-Grundstruktur produziert? Wie wird der Biosyntheseweg reguliert, und kann er gentechnisch verändert werden, um erhöhte biosynthetische Titer zu erzielen? Welche Rolle spielt die *sal*-spezifische Proteasom- β -Untereinheit SalI, und ist sie an einem Mechanismus zur Proteasomresistenz in Bakterien beteiligt? In präparativer Hinsicht: Können neue Ansätze entwickelt werden, die die vorhandenen Methoden zur Herstellung von Salinosporamid A (**4**) derart verbessern, dass sie eine alternative Quelle zu GMP-Material dieses Wirkstoffes zur Verfügung stellen? All diese Fragen verlangen nach kreativen Antworten.

9. Addendum (1. August 2010)

Während der Erstellung dieses Manuskripts publizierten Romo et al. eine enantioselektive Version ihrer biomimetischen Route, die in Schema 10 gezeigt wurde. Der Schlüsseelschritt dieser beeindruckend kurzen, neunstufigen Totalsynthese von **4** enthält die Bicyclisierung einer enantiomerreinen, linearen Vorstufe (die durch chromatographische Auftrennung des 1:1-Diastereomerengemisches dieser Verbindung erhalten wurde) unter Konfigurationserhalt, vermittelt durch eine A^{1,3}-Spannung.^[147] Auch Nereus Pharmaceuticals entwickelte eine weitere Totalsynthese von **4**, die auf ihren früheren Syntheseerfahrungen beruht. In dieser Arbeit wurden die Stereozentren an C2 und C3 von **4** durch regio- und stereoselektive Epoxidierung einer Vorstufe mit C2-C3-Doppelbindung eingeführt, gefolgt von einer regioselektiven reduktiven Öffnung des Epoxidrings.^[148] Zudem wurden weitere Studien zur Pharmakodynamik von **4** in menschlichen Plasmazytom-Heterotransplantationsmodellen in der Maus^[149] sowie Untersuchungen zu möglichen Kombinationstherapien von **4** mit Lenalidomid^[150] veröffentlicht.

Wir danken Dr. Tanja Gulder für wertvolle Diskussionen. Die Arbeiten zur Biosynthese und zum Bioengineering der Salinosporamid-Metaboliten im Labor von B.S.M. werden großzügig durch Mittel der NIH, vom NCI (CA127622) und durch

ein Postdoktoranden- sowie ein Rückkehr-Stipendium des DAAD für T.A.M.G. unterstützt.

Eingegangen am 6. Februar 2010
Online veröffentlicht am 6. Oktober 2010

- [1] J. Li, J. C. Vederas, *Science* **2009**, *325*, 161.
- [2] R. Bentley, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *36*, 775.
- [3] T. S. Kaufman, E. A. Rúveda, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 876; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 854.
- [4] P. R. Blakemore, J. D. White, *Chem. Commun.* **2002**, 1159.
- [5] D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461.
- [6] G. M. Cragg, D. J. Newman, *Phytochem. Rev.* **2009**, *8*, 313.
- [7] G. M. Cragg, P. G. Grothaus, D. J. Newman, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 3012.
- [8] C. Bailly, *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *77*, 1447.
- [9] A. Amin, H. Gali-Muhtasib, M. Ocker, R. Schneider-Stock, *Int. J. Biomed. Sci.* **2009**, *5*, 1.
- [10] K. K. Dholwani, A. K. Saluja, A. R. Gupta, D. R. Shah, *Indian J. Pharmacol.* **2008**, *40*, 49.
- [11] D. J. Newman, G. M. Cragg, *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 1693.
- [12] T. F. Molinski, D. S. Dalisay, S. L. Lievens, J. P. Saludes, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, *8*, 69.
- [13] C. Cuevas, A. Francesch, *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 322.
- [14] G. M. König, S. Kehraus, S. F. Seibert, A. Abdel-Lateff, D. Müller, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 229.
- [15] B. Guo, Y. Wang, X. Sun, K. Tang, *Appl. Biochem. Microbiol.* **2008**, *44*, 136.
- [16] S. Sudek, N. B. Lopanik, L. E. Waggoner, M. Hildebrand, C. Anderson, H. Liu, A. Patel, D. H. Sherman, M. G. Haygood, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 67.
- [17] L. T. Tan, *Phytochemistry* **2007**, *68*, 954.
- [18] A. T. Bull, J. E. M. Stach, *Trends Microbiol.* **2007**, *15*, 491.
- [19] P. G. Williams, *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 45.
- [20] T. A. M. Gulder, B. S. Moore, *Curr. Opin. Microbiol.* **2009**, *12*, 252.
- [21] W. Fenical, P. R. Jensen, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 666.
- [22] P. R. Jensen, P. G. Williams, D.-C. Oh, L. Zeigler, W. Fenical, *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 1146.
- [23] D.-C. Oh, P. G. Williams, C. A. Kauffman, P. R. Jensen, W. Fenical, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1021.
- [24] P. G. Williams, R. N. Asolkar, T. Kondratyuk, J. M. Pezzuto, P. R. Jensen, W. Fenical, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 83.
- [25] G. O. Buchanan, P. G. Williams, R. H. Feling, C. A. Kauffman, P. R. Jensen, W. Fenical, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2731.
- [26] W. Fenical, P. R. Jensen, M. A. Palladino, K. S. Lam, G. K. Lloyd, B. C. Potts, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2175.
- [27] R. H. Feling, G. O. Buchanan, T. J. Mincer, C. A. Kauffman, P. R. Jensen, W. Fenical, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 369; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 355.
- [28] D. G. I. Kingston, *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 507.
- [29] S. Nobili, D. Lippi, E. Witor, M. Donnini, L. Bausi, E. Mini, S. Capaccioli, *Pharmacol. Res.* **2009**, *59*, 365.
- [30] R. Z. Orlowski, D. J. Kuhn, *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 1649.
- [31] S. Meiners, A. Ludwig, V. Stangl, K. Stangl, *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 309.
- [32] A. L. Goldberg, *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 12.
- [33] A. L. Goldberg, *Nature* **2003**, *426*, 895.
- [34] A. Ciechanover, *Neurology* **2006**, *66*, S7.
- [35] C. M. Pickart, *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 503.
- [36] M. Verdoes, B. I. Florea, G. A. van der Marel, H. S. Overkleft, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 3301.
- [37] D. Fuchs, C. Berges, C. Naujokat, *Biol. Unserer Zeit* **2008**, *38*, 168.
- [38] M. Groll, R. Huber, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2003**, *35*, 606.
- [39] L. Borissenko, M. Groll, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 687.

- [40] B. S. Moore, A. S. Eustáquio, R. P. McGlinchey, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 434.
- [41] K. B. Kim, C. M. Crews, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2600.
- [42] L. Huang, C. H. Chen, *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 931.
- [43] T. Aoyagi, S. Miyata, M. Nanbo, F. Kojima, M. Matsuzaki, M. Ishizuka, T. Takeuchi, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1969**, *22*, 558.
- [44] L. Meng, R. Mohan, B. H. B. Kwok, M. Elofsson, N. Sin, C. M. Crews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10403.
- [45] M. Groll, K. B. Kim, N. Kairies, R. Huber, C. M. Crews, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1237.
- [46] D. J. Kuhn, Q. Chen, P. M. Voorhees, J. S. Strader, K. D. Shenk, C. M. Sun, S. D. Demo, M. K. Bennet, F. W. B. van Leeuwen, A. A. Chanan-Khan, R. Z. Orłowski, *Blood* **2007**, *110*, 3281.
- [47] Y. Koguchi, J. Kohno, M. Nishio, K. Takahashi, T. Okuda, T. Ohnuki, S. Komatsubara, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 105.
- [48] A. Asai, A. Hasegawa, K. Ochiai, Y. Yamashita, T. Mizukami, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 81.
- [49] S. Omura, K. Matsuzaki, T. Fujimoto, K. Kosuge, T. Furuya, S. Fujita, A. Nakagawa, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 117.
- [50] S. Omura, T. Fujimoto, K. Otoguro, K. Matsuzaki, R. Moriguchi, H. Tanaka, Y. Sasaki, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 113.
- [51] G. Fenteany, R. F. Standaert, W. S. Lane, S. Choi, E. J. Corey, S. L. Schreiber, *Science* **1995**, *268*, 726.
- [52] M. Groll, C. R. Berkers, H. L. Ploegh, H. Ovaa, *Structure* **2006**, *14*, 451.
- [53] P. G. Williams, G. O. Buchanan, R. H. Feling, C. A. Kauffman, P. R. Jensen, W. Fenical, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6196.
- [54] K. A. Reed, R. R. Manam, S. S. Mitchell, J. Xu, S. Teisan, T.-H. Chao, G. Deyanat-Yazdi, S. T. C. Neuteboom, K. S. Lam, B. C. M. Potts, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 269.
- [55] M. Stadler, J. Bitzer, A. Mayer-Bartschmid, H. Müller, J. Benet-Buchholz, F. Gantner, H.-V. Tichy, P. Reinemer, K. B. Bacon, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 246.
- [56] G. Tsueng, K. A. McArthur, B. C. M. Potts, K. S. Lam, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *75*, 999.
- [57] L. L. Beer, B. S. Moore, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 845.
- [58] A. Nakagawa, S. Takahashi, K. Uchida, K. Matsuzaki, S. Omura, A. Nakamura, N. Kurihara, T. Nakamatsu, Y. Miyake, K. Take, M. Kainoshio, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5009.
- [59] S. Takahashi, K. Uchida, A. Nakagawa, Y. Miyake, M. Kainoshio, K. Matsuzaki, S. Omura, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 1015.
- [60] D. W. Udwyar, L. Zeigler, R. N. Asolkar, V. Singan, A. Lapidus, W. Fenical, P. R. Jensen, B. S. Moore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 10376.
- [61] K. Penn, C. Jenkins, M. Nett, D. W. Udwyar, E. A. Gontang, R. P. McGlinchey, B. Foster, A. Lapidus, S. Podell, E. E. Allen, B. S. Moore, P. R. Jensen, *ISME J.* **2009**, *3*, 1193.
- [62] C. Hertweck, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4782; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4688.
- [63] N. Gaitatzis, B. Silakowski, B. Kunze, G. Nordsiek, H. Blöcker, G. Höfle, R. Müller, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 13082.
- [64] J. Ligon, S. Hill, J. Beck, R. Zirkle, I. Molnár, J. Zawodny, S. Money, T. Schupp, *Gene* **2002**, *285*, 257.
- [65] B. Frank, S. C. Wenzel, H. B. Bode, M. Scharfe, H. Blöcker, R. Müller, *J. Mol. Biol.* **2007**, *374*, 24.
- [66] A. S. Eustáquio, R. P. McGlinchey, Y. Liu, C. Hazzard, L. L. Beer, G. Florova, M. M. Alhamadsheh, A. Lechner, A. J. Kale, Y. Kobayashi, K. A. Reynolds, B. S. Moore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 12295.
- [67] A. S. Eustáquio, F. Pojer, J. P. Noel, B. S. Moore, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 69.
- [68] C. Dong, F. Huang, H. Deng, C. Schaffrath, J. B. Spencer, D. O'Hagan, J. H. Naismith, *Nature* **2004**, *427*, 561.
- [69] F. Huang, S. F. Haydock, D. Spiteller, T. Mironenko, T.-L. Li, D. O'Hagan, P. F. Leadley, J. B. Spencer, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 475.
- [70] H. Deng, C. H. Botting, J. T. G. Hamilton, R. J. M. Russel, D. O'Hagan, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5437; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5357.
- [71] H. Deng, S. A. McMahon, A. S. Eustáquio, B. S. Moore, J. H. Naismith, D. O'Hagan, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2455.
- [72] A. S. Eustáquio, J. Härlé, J. P. Noel, B. S. Moore, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2215.
- [73] H. Deng, D. O'Hagan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 582.
- [74] T. J. Erb, I. A. Berg, V. Brecht, M. Müller, G. Fuchs, B. E. Alber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 10631.
- [75] T. J. Erb, V. Brecht, G. Fuchs, M. Müller, B. E. Alber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 8871.
- [76] Y. Liu, C. Hazzard, A. S. Eustáquio, K. A. Reynolds, B. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10376.
- [77] R. Gande, L. G. Dover, K. Krumbach, G. S. Besra, H. Sahm, T. Oikawa, L. Eggeling, *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 5257.
- [78] S. A. Mahlstedt, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2010**, *49*, 912.
- [79] R. P. McGlinchey, M. Nett, A. S. Eustáquio, R. N. Asolkar, W. Fenical, B. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7822.
- [80] M. Nett, T. A. M. Gulder, A. J. Kale, C. C. Hughes, B. S. Moore, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6163.
- [81] L. R. Reddy, P. Saravanan, E. J. Corey, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6230.
- [82] M. Shibasaki, M. Kanai, N. Fukuda, *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 20.
- [83] O. G. Kulinkovich, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2597.
- [84] L. R. Reddy, J.-F. Fournier, B. V. S. Reddy, E. J. Corey, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2699.
- [85] L. R. Reddy, J.-F. Fournier, B. V. S. Reddy, E. J. Corey, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8974.
- [86] H. Miyake, K. Yamamura, *Chem. Lett.* **1992**, *21*, 507.
- [87] A. Endo, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8298.
- [88] N. P. Mulholland, G. Pattenden, I. A. S. Walters, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2845.
- [89] N. P. Mulholland, G. Pattenden, I. A. S. Walters, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2782.
- [90] M. Lee, D. H. Kim, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 913.
- [91] G. Ma, H. Nguyen, D. Romo, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2143.
- [92] T. Ling, V. R. Macherla, R. R. Manam, K. A. McArthur, B. C. M. Potts, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2289.
- [93] D. Seebach, A. R. Sting, M. Hoffmann, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2881; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2708.
- [94] G. W. Kramer, H. C. Brown, *J. Organomet. Chem.* **1977**, *132*, 9.
- [95] R. R. Manam, V. R. Macherla, B. C. M. Potts, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 2537.
- [96] J. M. Conia, P. Le Perche, *Synthesis* **1975**, 1.
- [97] K. Takahashi, M. Midori, K. Kawano, J. Ishihara, S. Hatakeyama, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6340; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6244.
- [98] Y. Kiyotsuka, J. Igarashi, Y. Kobayashi, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2725.
- [99] T. Fukuda, K. Sugiyama, S. Arima, Y. Harigaya, T. Nagamitsu, S. Omura, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4239.
- [100] H. Ooi, N. Ishibashi, Y. Iwabuchi, J. Ishihara, S. Hatakeyama, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 7765.
- [101] T. Momose, Y. Kaiya, J.-i. Hasegawa, T. Sato, N. Chida, *Synthesis* **2009**, 2983.
- [102] A. Rosenthal, L. B. Nguyen, *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 1029.
- [103] G. W. J. Fleet, K. James, R. J. Lunn, C. J. Mathews, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3057.
- [104] V. Caubert, N. Langlois, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 4473.
- [105] V. Caubert, J. Massé, P. Retailleau, N. Langlois, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 381.
- [106] I. V. Margalef, L. Rupnicki, H. W. Lam, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 7896.
- [107] J. R. Struble, J. W. Bode, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 4957.
- [108] R. A. Mosey, J. J. Tepe, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 295.

- [109] M. Groll, R. Huber, B. C. M. Potts, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5136.
- [110] M. Groll, L. Ditzel, J. Löwe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik, R. Huber, *Nature* **1997**, *386*, 463.
- [111] V. R. Macherla, S. S. Mitchell, R. R. Manam, K. A. Reed, T.-H. Chao, B. Nicholson, G. Deyanat-Yazdi, B. Mai, P. R. Jensen, W. F. Fenical, S. T. C. Neuteboom, K. S. Lam, M. A. Palladino, B. C. M. Potts, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3684.
- [112] K. S. Lam, G. Tsueng, K. A. McArthur, S. S. Mitchell, B. C. M. Potts, J. Xu, *J. Antibiot.* **2007**, *60*, 13.
- [113] R. R. Manam, K. A. McArthur, T.-H. Chao, J. Weiss, J. A. Ali, V. J. Palombella, M. Groll, G. K. Lloyd, M. A. Palladino, S. T. C. Neuteboom, V. R. Macherla, B. C. M. Potts, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6711.
- [114] K. Müller, C. Faeh, F. Diederich, *Science* **2007**, *317*, 1881.
- [115] A. S. Eustáquio, B. S. Moore, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4000; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3936.
- [116] T. D. Ashton, P. J. Scammells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3361.
- [117] A. S. Eustáquio, D. O'Hagan, B. S. Moore, *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 378.
- [118] Y. Kimura, M. Takaoka, S. Tanaka, H. Sassa, K. Tanaka, B. Polevoda, F. Sherman, H. Hirano, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 4635.
- [119] M. Groll, K. A. McArthur, V. R. Macherla, R. R. Manam, B. C. Potts, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5420.
- [120] R. R. Manam, V. R. Macherla, G. Tsueng, C. W. Dring, J. Weiss, S. T. C. Neuteboom, K. S. Lam, B. C. Potts, *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 295.
- [121] E. J. Corey, W.-D. Z. Li, *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1.
- [122] K. S. Lam, G. K. Lloyd, S. T. C. Neuteboom, M. A. Palladino, K. M. Sethna, M. A. Spear, B. C. Potts in *Natural Product Chemistry for Drug Discovery* (Hrsg.: A. D. Buss, M. S. Butler), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2010**, S. 355.
- [123] G. Tsueng, K. S. Lam, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *78*, 821.
- [124] G. Tsueng, S. Teisan, K. S. Lam, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *78*, 827.
- [125] G. Tsueng, K. S. Lam, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *80*, 873.
- [126] G. Tsueng, K. S. Lam, *J. Antibiot.* **2009**, *62*, 213.
- [127] G. Tsueng, K. S. Lam, *J. Antibiot.* **2007**, *60*, 469.
- [128] N. Denora, B. C. M. Potts, V. J. Stella, *J. Pharm. Sci.* **2007**, *96*, 2037.
- [129] P. F. Bross, R. Kane, A. T. Farrell, S. Abraham, K. Benson, M. E. Brower, S. Bradley, J. V. Gobburu, A. Goheer, S.-L. Lee, J. Leighton, C. Y. Liang, R. T. Lostritto, W. D. McGuinn, D. E. Morse, A. Rahman, L. A. Rosario, S. L. Verbois, G. Williams, Y.-C. Wang, R. Pazdur, *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 3954.
- [130] P. G. Richardson, B. Barlogie, J. Berenson, S. Singhal, S. Jagnath, D. Irwin, S. V. Rajkumar, G. Srkalovic, M. Alsina, R. Alexanian, D. Siegel, R. Z. Orlowski, D. Kuter, S. A. Limentani, S. Lee, T. Hideshima, D.-L. Esseltine, M. Kauffman, J. Adams, D. P. Schenkein, K. C. Anderson, *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 2609.
- [131] D. Chauhan, L. Catley, G. Li, K. Podar, T. Hideshima, M. Velankar, C. Mitsiades, N. Mitsiades, H. Yasui, A. Letai, H. Ovaa, C. Berkers, B. Nicholson, T.-H. Chao, S. T. C. Neuteboom, P. Richardson, M. A. Palladino, K. C. Anderson, *Cancer Cell* **2005**, *8*, 407.
- [132] D. Chauhan, A. Singh, M. Brahmandam, K. Podar, T. Hideshima, P. Richardson, N. Munshi, M. A. Palladino, K. C. Anderson, *Blood* **2008**, *111*, 1654.
- [133] A. M. Roccaro, X. Leleu, A. Sacco, X. Jia, M. Melhem, A.-S. Moreau, H. T. Ngo, J. Runnels, A. Azab, F. Azab, N. Burwick, M. Farag, S. P. Treon, M. A. Palladino, T. Hideshima, D. Chauhan, K. C. Anderson, I. M. Ghobrial, *Blood* **2008**, *111*, 4752.
- [134] C. P. Miller, K. Ban, M. E. Dujka, D. J. McConkey, M. Munsell, M. Palladino, J. Chandra, *Blood* **2007**, *110*, 267.
- [135] S. Ruiz, Y. Krupnik, M. Keating, J. Chandra, M. Palladino, D. McConkey, *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 1836.
- [136] J. C. Cusack, Jr., R. Liu, L. Xia, T.-H. Chao, C. Pien, W. Niu, V. J. Palombella, S. T. C. Neuteboom, M. A. Palladino, *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 6758.
- [137] C. M. Sloss, F. Wang, R. Liu, L. Xia, M. Houston, D. Ljungman, M. A. Palladino, J. C. Cusack, Jr., *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 5116.
- [138] S. Baritaki, E. Suzuki, K. Umezawa, D. A. Spandidos, J. Berenson, T. R. Daniels, M. L. Penichet, A. R. Jazirehi, M. Palladino, B. Bonavida, *J. Immunol.* **2008**, *180*, 6199.
- [139] C. P. Miller, S. Rudra, M. J. Keating, W. G. Wierda, M. Palladino, J. Chandra, *Blood* **2009**, *113*, 4289.
- [140] K. S. Ahn, G. Sethi, T.-H. Chao, S. T. C. Neuteboom, M. M. Chaturvedi, M. A. Palladino, A. Younes, B. B. Aggarwal, *Blood* **2007**, *110*, 2286.
- [141] S. Baritaki, K. Yeung, M. Palladino, J. Berenson, B. Bonavida, *Cancer Res.* **2009**, *69*, 8376.
- [142] S. Baritaki, A. Chapman, K. Yeung, D. A. Spandidos, M. Palladino, B. Bonavida, *Oncogene* **2009**, *28*, 3573.
- [143] P. J. Elliot, T. M. Zollner, W.-H. Böhncke, *J. Mol. Med.* **2003**, *81*, 235.
- [144] G. Tang, S. H. Leppla, *Infect. Immun.* **1999**, *67*, 3055.
- [145] G. Lin, D. Li, L. P. S. de Carvalho, H. Deng, H. Tao, G. Vogt, K. Wu, J. Schneider, T. Chidawanyika, J. D. Warren, H. Li, C. Nathan, *Nature* **2009**, *461*, 621.
- [146] J. Prudhomme, E. McDaniel, N. Ponts, S. Bertani, W. Fenical, P. Jensen, K. Le Roch, *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2335.
- [147] H. Nguyen, G. Ma, D. Romo, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 4803.
- [148] T. Ling, B. C. Potts, V. R. Macherla, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3882.
- [149] A. V. Singh, M. A. Palladino, G. K. Lloyd, B. C. Potts, D. Chauhan, K. C. Anderson, *Br. J. Haematol.* **2010**, *149*, 550.
- [150] D. Chauhan, A. V. Singh, B. Ciccarelli, P. G. Richardson, M. A. Palladino, K. C. Anderson, *Blood* **2010**, *115*, 834.