

Vereinigung von chemischer Synthese und Biosynthese: ein neues Kapitel in der Totalsynthese von Naturstoffen und Naturstoffbibliotheken

Andreas Kirschning* und Frank Hahn*

Metabolisches Engineering · Mutasyntese ·
Naturstoffe · Semisynthese · Totalsynthese

1. Einleitung

„The synthetic chemist who is developing a useful drug has two objectives: to make it more efficiently, and to synthesize, by minor structural alterations, analogues which may have more useful properties. I wish to examine here the question whether the chemist can, in principle, manipulate the processes of production of antibiotics by fungi with the same objectives in view.“

Diese bemerkenswerte Aussage von A. J. Birch aus dem Jahr 1963^[1] war vor einem halben Jahrhundert noch eine Vision. Birch, der 1995 verstarb, wäre jedoch heutzutage hochofrend zu sehen, wie die chemische Synthese durch Techniken ergänzt wird, die eine Manipulation der Biosynthesewege ermöglichen, um Analoga von wirkstofffähigen Naturstoffen zu erzeugen.

Man muss anmerken, dass Naturstoffe über die letzten Jahrzehnte, abgesehen von wenigen Gegenbeispielen wie dem Epithilonderivat ZK-EPO (**1**)^[2] oder Eribulin (**2**)^[3] einen Großteil ihres Reizes für die pharmazeutische Industrie verloren haben. Das erstgenannte Beispiel ist das Ergebnis eines totalsynthetischen Programms der Schering AG (jetzt Bayer AG), das initiiert wurde, um einen vom Epithilon abgeleiteten, anticancerogenen Kandidaten für klinische Studien zu entwickeln. Das zweite Beispiel ist ein vereinfachtes Derivat von Halichondrin B, einem Sekundärmetaboliten des marinen Schwamms *Halichondria okadai*. Eribulin (**2**) wurde durch Totalsynthese hergestellt (entwickelt durch Eisai Co., Ltd) und Ende 2010 in Form seines Mesylats von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) für die Behandlung von Brustkrebs im Endstadium zugelassen.^[4] Die Entwicklung beider Naturstoffderivate hat die Stärke und Überlegenheit der Totalsynthese demonstriert, wenn neue Analoga eines Naturstoff-Leitmotivs auf flexibelste Art und Weise hergestellt werden sollen. Dieses

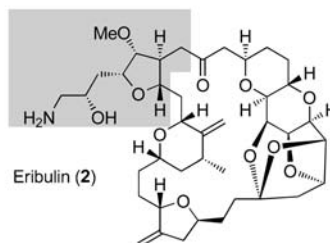
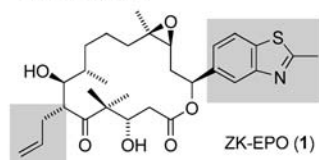
Vorgehen ist (derzeitig) nur sehr schwer mit biologischen Ansätzen zu realisieren.

Diese Beispiele sind rar, hauptsächlich weil die Komplexität vieler Naturstoffe eine große Hürde für den Einsatz der Totalsynthese ist, um entweder ausreichende Mengen für klinische Anwendungen bereitzustellen oder um Substanzbibliotheken für das Studium von Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR) zu erzeugen. Üblicherweise werden strukturell komplexe und klinisch relevante Naturstoffe entweder aus biologischen Quellen oder durch Fermentation, möglicherweise mit daran angeschlossener Modifizierung durch Semisynthese, gewonnen. Ein berühmtes und klassisches Beispiel für einen klinisch breit eingesetzten Naturstoff ist das Antibiotikum Erythromycin A (**3**). Es ist aus Überproduzentenstämmen von *Streptomyces erythreus* (heute *Saccharopolyspora erythraea*) zugänglich. Das Tumorthapeutikum Taxotere (**4**) ist ein semisynthetisch zugängliches Derivat von Paclitaxel,^[5] das, ausgehend von geeignet geschütztem 10-Desacetylbaccatin III, durch Einführung der veränderten Esterseitenkette an C13 erhalten wird. 10-Desacetylbaccatin III ist eine biosynthetische Vorstufe von Paclitaxel (aus der pazifischen Eibe *Taxus brevifolia*) und kann aus verschiedenen pflanzlichen Quellen, wie den Blättern von *Taxus baccata* (der europäischen Eibe), gewonnen werden.^[6]

Wegen ihrer komplexen Strukturen werden Naturstoffe und Analoga, wie die in Abbildung 1 gezeigten, üblicherweise über eine hochkonvergente Syntheseroute synthetisiert. Eine solche Strategie minimiert die Zahl der linearen Stufen. Dem gegenüber steht die Natur, die ausgeprägt lineare Mehrstufen-Biosynthesen für z. B. Peptide, Polyketide und Terpene entwickelt hat. Es lässt sich spekulieren, warum dies der Fall ist. Kurz gesagt war die Natur zurückhaltend, komplett neue Biosynthesewege oder Biotransformationen zu entwickeln. Sie verließ sich lieber auf etablierte, iterative Prozesse und verfeinerte diese anschließend durch zusätzliche, „dekorierte“ Stufen. Die Iteration und das Hinzufügen von Stufen führen letztlich zu längeren linearen Sequenzen. So verlässt sich die Natur auf eine Art kontinuierlichen Durchflussprozess, der auf „steady state“-Konzentrationen aller Biosyntheseintermediate basiert.^[7] Diese werden schnell prozessiert und sind daher nur in geringsten Mengen vorhanden, wie

[*] Prof. Dr. A. Kirschning, Dr. F. Hahn
Institut für Organische Chemie und Biomolekulares-
Wirkstoffzentrum (BMWZ), Leibniz Universität Hannover
Schneiderberg 1B, 30167 Hannover (Deutschland)
E-Mail: andreas.kirschning@oci.uni-hannover.de
frank.hahn@oci.uni-hannover.de

I. Beispiele von medizinisch wichtigen Naturstoffderivaten, die durch Totalsynthese erhalten wurden



II. Beispiele von medizinisch relevanten Naturstoffen, die durch Fermentation und/oder durch Semisynthese mit einer natürlichen Vorstufe erhalten wurden

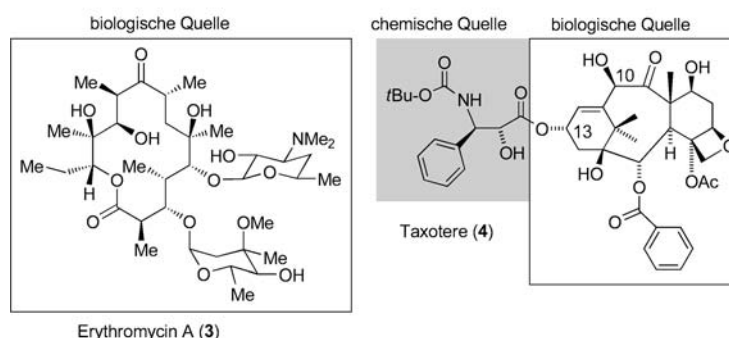


Abbildung 1. Schering's Epothilonderivat 1^[2] (ZK-EPO; synthetische Veränderungen in Bezug auf Epothilon sind grau markiert); Eribulin (2)^[3] wird in industriellem Maßstab hergestellt (der grau hinterlegte Bereich zeigt die strukturelle Vereinfachung bezüglich Halichondrin B); Erythromycin A (3) und Taxotere (4; die semisynthetische Veränderung in Bezug auf den ursprünglichen Naturstoff Paclitaxel ist grau markiert).

beispielhaft an der Biosynthese von Ansamitocin P3 (6) aus 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (AHBA, 5) erläutert (Schema 1).^[8] Im Unterschied dazu vertraut der Synthesechemiker auf diskontinuierliche Prozesse, sodass außer für beispielsweise Dominoreaktionen alle Intermediate in stöchiometrischen Mengen hergestellt und isoliert werden müssen. Da die Aufarbeitung oft mit dem Verlust von Material einhergeht, sind kurze, konvergente Synthesen sehr erwünscht. Dies ist sicherlich keine Einschränkung bei der Biosynthese. Erst kürzlich ermöglichte die Einführung von kontinuierlichen Prozessen auf Basis von miniaturisierten Durchflussreaktoren zum Portfolio des Synthesechemikers,^[9] Mehrstufensynthesen auf der Natur ähnliche Weise durchzuführen, ohne die Intermediate stöchiometrisch zu isolieren. Ley et al. demonstrierten dies bei der Synthese von (*rac*)-Oxomaritidin (9) auf elegante Art und Weise.^[10]

Durch das tiefere Verständnis der Biosynthesewege von komplexen Sekundärmetaboliten und die Entwicklung von molekularbiologischen Methoden, die ermöglichen, Biosynthesewege auf genetischer Ebene zu manipulieren,^[11] ist die Totalsynthese von Naturstoffen und deren Analoga flexibler geworden und könnte wieder vermehrt eine Rolle bei der Entwicklung von Wirkstoffen spielen, besonders wenn die genetisch manipulierte Biosynthese mit der chemischen Synthese kombiniert wird.^[12] In diesem Kurzaufsatz entwickeln wir eine konzeptionelle Sichtweise auf präparative Hybridstrategien, bei denen chemische und biologische Methoden flexibel vereint werden, sodass ein eher Totalsynthese-artiger, linearer Zugang zu Analoga von komplexen Naturstoffen geschaffen wird.

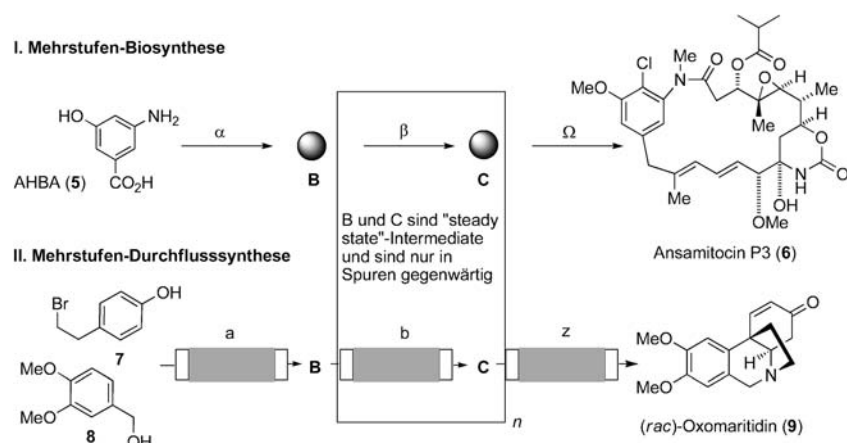
Um die verschiedenen (möglichen) Optionen für die Nutzung eines Hybridkonzepts leichter erfassen zu können,



Frank Hahn studierte Chemie in Karlsruhe, Bonn und Paris und erhielt sein Diplom im Jahr 2005 von der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Er setzte seine Arbeiten im Rahmen einer Promotion mit Priv.-Doz. Ute Schepers und Prof. Stefan Bräse fort und erhielt seinen Abschluss im Jahr 2008. Während eines Postdoktorats bei Prof. Peter F. Leadlay an der University of Cambridge (Großbritannien) erforschte er Biosynthesewege von Polyketidnaturstoffen. Seit 2011 hat er die Position eines Nachwuchsgruppenleiters am Institut für Organische Chemie der Leibniz Universität Hannover inne.



Andreas Kirschning studierte an der Universität Hamburg und an der Southampton University (Großbritannien) und promovierte 1989 in Hamburg bei Prof. Ernst Schauermann. Im Anschluss forschte er, gefördert durch ein Feodor Lynen-Forschungsstipendium der Alexander von Humboldt-Stiftung, als Postdoktorand bei Prof. Heinz G. Floss an der University of Washington (Seattle, USA). 1991 begann er seine eigenständige Forschung an der TU Clausthal und beendete die Habilitation 1996. Im Jahr 2000 wechselte er an die Leibniz Universität Hannover und ist seitdem geschäftsführender Direktor am dortigen Institut für Organische Chemie.



Schema 1. Die Biosynthese von Ansamitocin P3 (**6**) und die mehrstufige Durchflusssynthese von (*rac*)-Oxomaritidin (**9**) sind verwandte Synthesekonzepte (α - Ω = Enzyme; a-z = Reagentien/Katalysatoren; B, C = Intermediate der Synthese oder Biosynthese; *n* = Zahl der Stufen).

schlagen wir eine einfache Klassifizierung gemäß Abbildung 2 vor. Da sich dieses hauptsächlich auf Synthesestrategien konzentriert, verwenden wir die beiden Abkürzungen: CHEM und BIO. CHEM bezieht sich auf eine chemische Synthese oder eine partielle chemische Synthese, während BIO eine (partielle) Biosynthese oder eine Biotransformation beschreibt. Prinzipiell gibt es zwei Wege, um solche Transformationen zu erreichen: Der eine fußt auf der Verfütterung einer Vorstufe an einen geeigneten Produktionsstamm oder einen Knock-out-Stamm, der zumindest Teile der funktionellen Biosynthesemaschinerie aufweist. Das Fermentationsprodukt kann dann durch Extraktion isoliert werden. Alternativ lassen sich die Enzyme von Interesse heterolog

überexprimieren und in vitro mit den Vorstufenmolekülen umsetzen.

In diesem Zusammenhang ist eine BIO-CHEM-Synthese einfach die semisynthetische Derivatisierung eines Startmaterials, das aus einer natürlichen Quelle oder durch Fermentation gewonnen wurde. Taxotere (**4**) wird beispielsweise durch solch ein BIO-CHEM-Verfahren gewonnen. Neue Naturstoffanaloga werden nach einem BIO-CHEM-BIO-Ansatz erhalten, indem das Endmolekül der Semisynthese mithilfe einer enzymatischen Biotransformation oder eines Fermentationsprozesses modifiziert wird. Im Wesentlichen ähneln solche Totalsynthesen eher den linearen Strategien, die die Natur im Laufe der Evolution entwickelt hat.^[13]

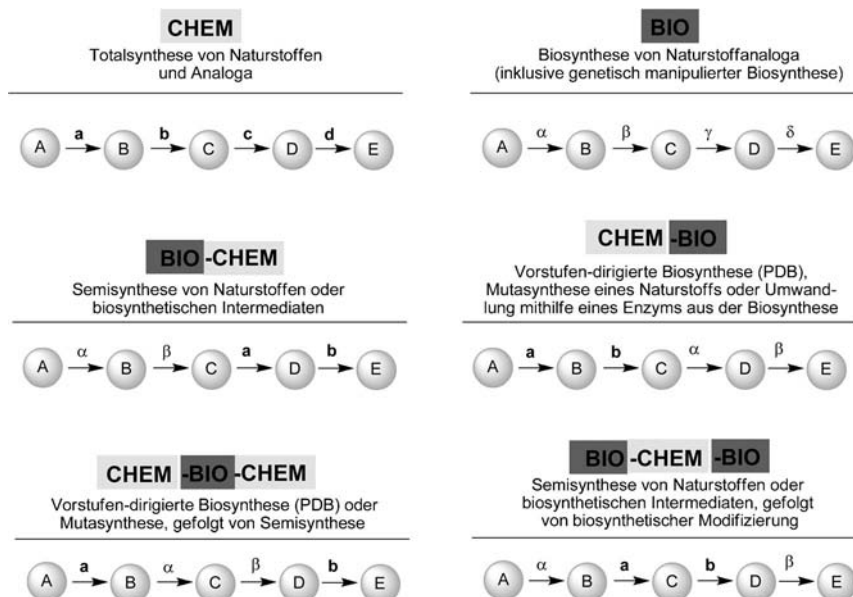


Abbildung 2. Klassifizierung von „totalsynthetischen“ Zugängen zu Naturstoffanaloga und Bibliotheken, die auf chemischen und biologischen Methoden sowie deren Kombinationen basieren (hier dargestellt sind ausgewählte Kombinationen, andere wie BIO-BIO-CHEM sind ebenfalls vorstellbar; siehe auch Schema 9). a–d = chemische Reagentien oder Katalysatoren; α - δ = Enzyme; A = Ausgangsmaterial; B–D = synthetische und/oder biosynthetische Intermediate; E = Naturstoff oder Derivat.^[13]

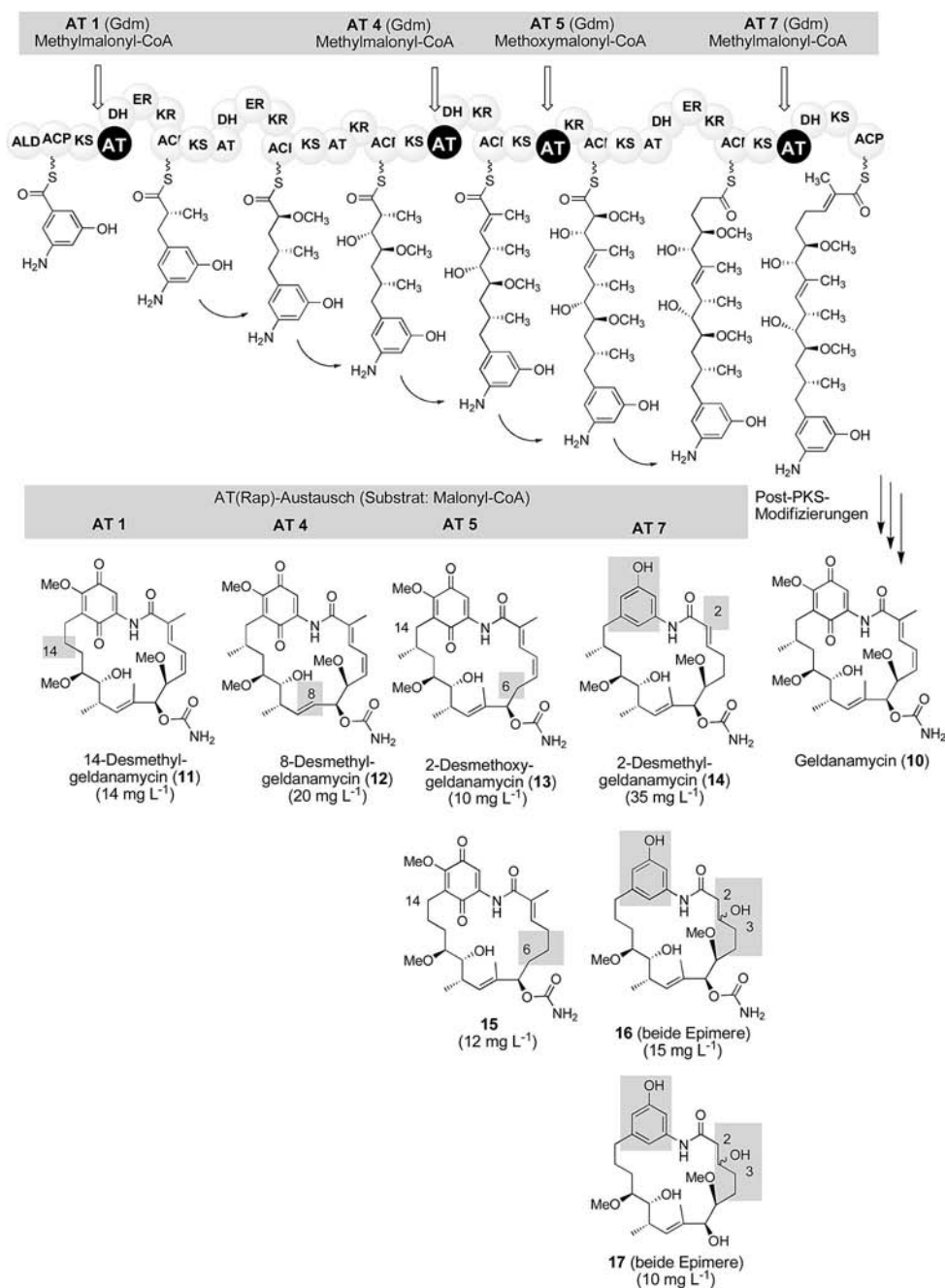
2. Schlüsselaspekte für CHEM-BIO-Konzepte – eine präparative Perspektive

Bevor wir Beispiele für totalsynthetische Hybridansätze zur Herstellung von Naturstoffanaloga diskutieren, wollen wir drei Anforderungen hervorheben, die für den Syntheschemiker alltäglich sind und die auch an den Biosyntheseteil gestellt werden sollten:

1. Der gewählte Naturstoff sollte entweder außergewöhnliche, pharmazeutisch relevante biologische Aktivität aufweisen oder alternativ als Werkzeug für zellbiologische Untersuchungen fungieren können. Der große Aufwand, eine komplexe Strategie an der Schnittstelle zwischen

Synthesechemie und biologischer Synthese zu verfolgen, muss sich lohnen. Dies kann sehr mühsam sein.

2. Der gewählte Naturstoff sollte strukturell so komplex sein, dass ein kombinierter, chemisch-biologischer Ansatz einer chemischen Totalsynthese für den raschen Zugang zu neuen Derivaten klar überlegen ist.
3. In allen Fällen muss das biologische Hilfsmittel, beispielsweise eine Fermentation oder eine Enzymtransformation, ausreichende Mengen des gewünschten Metaboliten, sei es ein Endprodukt oder ein Intermediat, zur weiteren Funktionalisierung bereitstellen. Zur Abgrenzung von reinen Biosynthesestudien umfasst diese Anforderung explizit, dass die spektroskopische Charakteri-



Scheme 2. Geldanamycinderivate 11–17, ermöglicht durch Acyltransferase(AT)-Substitutionen in der Gdm-Polyketidsynthese (Nummern entsprechen den PKS-Modulen; Flächen in Grau zeigen Strukturunterschiede zu 10).

sierung des Produktes den Standards für die Endprodukte erfolgreicher chemischer Totalsynthesen entspricht.

In der Folge werden ausgewählte und veranschaulichende Beispiele von Hybridtechniken vorgestellt, die die prinzipiellen präparativen Voraussetzungen erfüllen und die die Leistungsfähigkeit dieser Syntheseansätze demonstrieren.

3. Manipulation der Biosynthese (BIO)

Sehr elegante Studien zur genetischen Manipulation der Geldanamycin-Polyketidsynthase (GdmPKS) wurden von Kosan Biosciences, Inc. durchgeführt.^[14] Geldanamycin (**10**) ist ein polyketidisches Macrolactam-Antibiotikum und eine Leitstruktur für die Entwicklung neuer Tumortheraeutika, die das Chaperon Hsp90 adressieren.^[15]

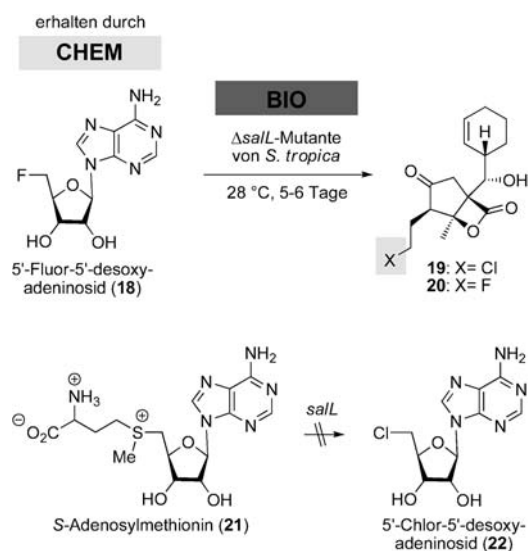
Genetische Manipulationen des Geldanamycinclusters in *Streptomyces hygroscopicus* ermöglichten es, neue Geldanamycinderivate zu generieren, denen selektiv Methyl- oder Methoxygruppen in der Ansakette fehlen. Die Erzeugung dieser Fermentationsprodukte gelang durch genetische Substitution der Acyltransferase(AT)-Domänen in sechs verschiedenen GdmPKS-Modulen, die normalerweise Methylmalonyl oder Methoxymalonyl-CoA akzeptieren, durch entsprechende Malonyl-AT-Domänen der Rapamycin-PKS.^[16] Vier dieser Manipulationen führten zur Produktion der neuen 2-Desmethyl-, 6-Desmethyl-, 8-Desmethyl- und 14-Desmethylgeldanamycinderivate **11–14**, des γ,δ -gesättigten **15** sowie der Hydratisierungsprodukte **16** und **17** (Schema 2). Die Ausbeuten waren hinreichend für die vollständige chemische Charakterisierung sowie für biologische Testungen. Derartige genetische Manipulationen sind äußerst interessant für eine kombinierte Anwendung mit der chemischen Synthese.

4. CHEM-BIO (Mutasyntese)

Ein Beispiel für ein BIO-CHEM-Produkt ist Taxotere (**4**; Abbildung 1). Der umgekehrte Fall, CHEM-BIO, ist die klassische Vorstufen-dirigierte Biosynthese (PDB) oder deren modernere Variante, die Mutasyntese. Diese erfordert die Erzeugung von Blockmutanten eines Produzenten, in denen die Bildung eines Biosynthese-Startbausteins unterbunden ist. Zufüttern von chemisch präparierten Derivatbausteinen, kurz Mutasyntonen, zur Blockmutante führt zu neuen Metaboliten.^[12]

Ein aktuelles Beispiel für die Herstellung von Fluorderivat **20** des hochwirksamen, marinen Proteasominhibitors Salinosporamid **19** ist in Schema 3 gezeigt.^[17] Moore und Mitarbeiter blockierten die biosynthetische Chlorierung von S-Adenosylmethionin (SAM) und unterbanden so die Bildung von Chlorid **22**. Komplementierung von 3 L einer Fermentationskultur der $\Delta salL$ -Mutante mit 30 mg 5'-Fluor-5'-desoxyadenosin (**18**) lieferte 1.5 mg L⁻¹ des Fluorderivates **20**.

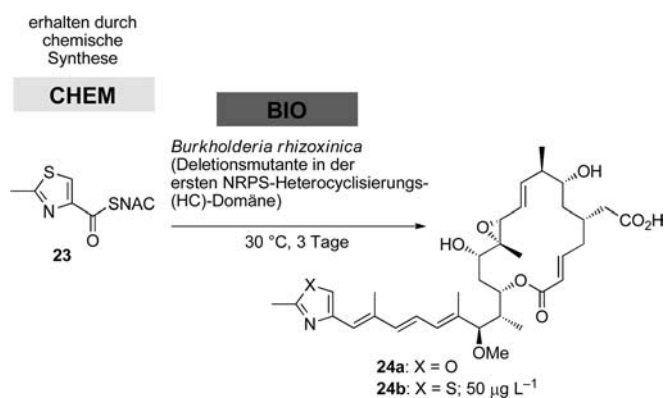
Biosynthetisch betrachtet handelt es sich beim Rhizoxin (**24a**) um einen von einem PKS-NRPS-Komplex (NRPS = nichtribosomale Peptidsynthase) in *Burkholderia rhizoxinica* gebildeten Sekundärmetaboliten, der eine außerordentliche



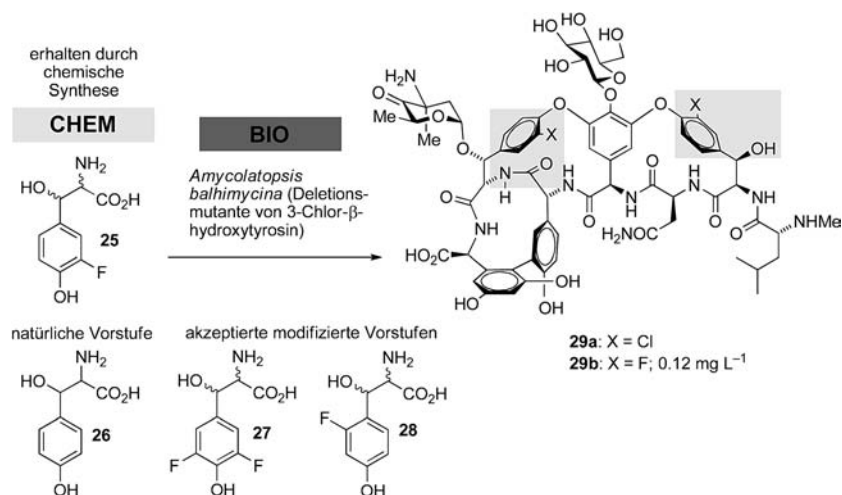
Schema 3. Deletion in *salL*, einem für die ungewöhnliche Chlorinase codierenden Gen, und mutasyntetische Bildung von Fluorsalinosporamid **20**.

Cytotoxizität aufweist. Hertweck et al. konstruierten eine teilweise Deletionsmutante von *rhiA*, einem *rhi* PKS-NRPS-Modul.^[18] Dieses beherbergt das Lademodul wie auch Teile der Oxazol bildenden Einheit. Die Mutante produzierte nach Supplementierung mit dem N-Acetylcysteaminderivat **23** das Thiazolderivat **24b** in einer Ausbeute von 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Interessanterweise führte der Austausch von Sauerstoff gegen Schwefel zu einer erhöhten Einbaurrate (Schema 4).

Das nichtribosomal synthetisierte Glycopeptid Balhimycin (**29a**; X = Cl) ist ein Derivat des klinisch wichtigen Antibiotikums Vancomycin. Süßmuth, Wohlleben und Mitarbeiter verwendeten verschiedene Blockmutanten des Actinomyceten *Amycolatopsis balhimycina*, des Produzenten von Balhimycin. Neben anderen Deletionsmutanten^[19] verwendeten sie eine, die in der Biosynthese von β -Hydroxytyrosin (**26**) blockiert war. Verfütterungen der mit dem Baustein verwandten, fortgeschrittenen Fluorderivate **25**, **27** und **28** führten zu mehreren neuen Vancomycin-abgeleiteten Fluorderivaten, die in den C- und E-Ringen modifiziert waren



Schema 4. Mutasyntetische Bildung des Thiarhizoxins **24b**. SNAC = N-Acetylcysteamin.

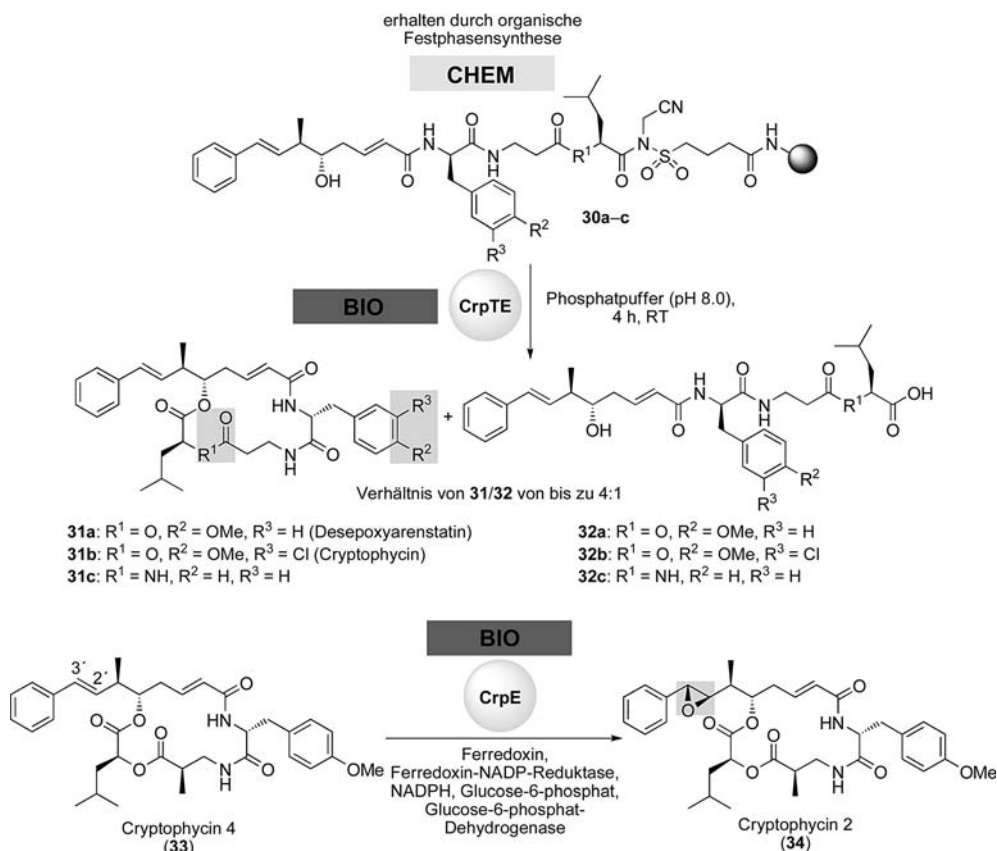


Schema 5. Mutasynthetische Herstellung neuer Fluorbalhimycinderivate.^[19,20]

(Schema 5).^[20] Beachtenswerte semisynthetische Ansätze zu neuen Vancomycinderivaten zielten in erster Linie auf die periphere Zuckereinheit. Die mutasynthetische Herstellung des fluorierten Balhimycinderivates **29b** zeigt, dass die Mutasynthese die Semisynthese ergänzt, die bisher keine einfachen Strukturveränderungen im tricyclischen Aglyconrückgrat von Balhimycin ermöglichte.

5. CHEM-BIO (enzymatische Transformation)

Die Anwendung von heterolog exprimierten Enzymen aus den späten Stadien der Biosynthesewege von Sekundärmetaboliten bietet einen alternativen Zugang zu Naturstoffen und ihren Derivaten.^[21] Präparativ wertvolle enzymatische Transformationen sind chemo- und regioselektive Cyclisierungen, inklusive Makrocyclisierungen, Glycosidierungen,



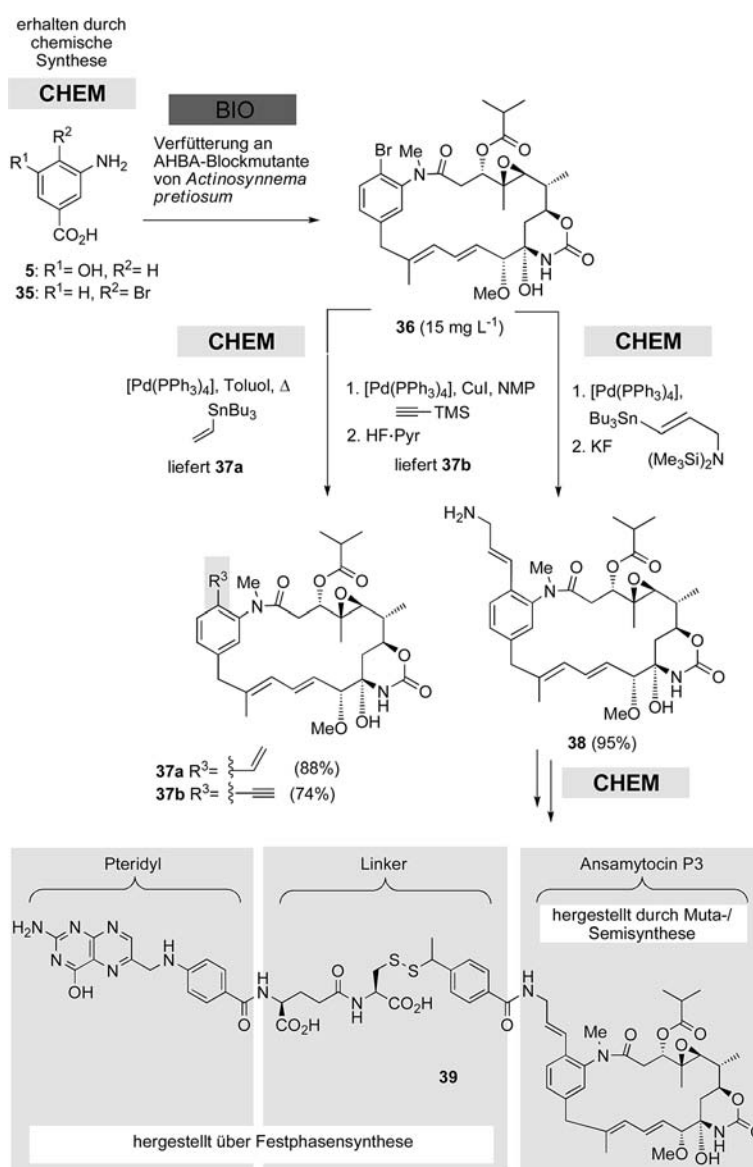
Schema 6. CrpTE katalysiert die Makrocyclisierung der immobilisierten Polyketid-Peptid-Vorstufen **30** zu den Desepoxycryptophycinen **31**. Epoxidierung des strukturell verwandten Cryptophycins **33** durch CrpE führt zu Cryptophycin **34**.^[23]

Redoxreaktionen, Halogenierungen, Alkylierungen und Acylierungen.

Diskrete Enzyme sind dabei besser für präparative Anwendungen geeignet als solche, die Teil eines Megaenzym wie einer PKS sind.^[22] In diesem Zusammenhang akzeptiert die letztgenannte Gruppe von Enzymen Substrate, die von vorherigen Modulen angereicht werden, sodass die katalytische Effizienz normalerweise niedriger und in größerem Maße abhängig von Protein-Protein-Wechselwirkungen ist. Das Gleiche gilt für die Substraterkennung. Die Natur hat diese Strategie unter evolutionärem Druck entwickelt, um den katalytischen Durchsatz zu optimieren. Trotzdem sind beide Gruppen von Enzymen potenziell wertvolle Werkzeuge für den Naturstoffchemiker.

Cryptophycine sind potente Inhibitoren der Tubulinpolymerisation und weisen eine hohe Aktivität gegen multiresistente Tumorzelllinien auf. Ihre Rückgrate werden von einem PKS-NRPS-Hybridmultienzymkomplex biosyntheti-

siert. Daran schließen sich zum Endprodukt führende Modifizierungen durch mehrere Tailoring-Enzyme an. Einige davon wurden durch In-vitro-Assays im analytischen Massstab charakterisiert.^[23] 2007 berichteten Seufert et al. von der Nutzung der Cryptophycin-Thioesterase (CrypTE) für die Cyclisierung von immobilisierten *seco*-Vorstufen.^[24] Drei Derivate von Desepoxycryptophycin wurden in Milligramm-Mengen (5 mg von **31a**, 6 mg von **31b**, 12 mg von **31c**) durch die Inkubation von **30** mit CrpTE in Phosphatpuffer hergestellt, gefolgt von extraktiver Aufarbeitung und Trennung durch präparative HPLC (Schema 6). Erstaunlicherweise war CrpTE in der Lage, Substrate zu cyclisieren, die über einen Sulfonamid-Linker auf einem Poly(ethylenglycol)-poly(*N,N*-dimethylacrylamid)(PEGA)-Harz immobilisiert waren, um 16-gliedrige Makrocyclen zu erhalten. Dies zeigt das enorme Potenzial von makrocyclisierenden Enzymen in der Synthese von Naturstoffanaloga. Die Kombination von Festphasensynthese und biosynthetischer Transformation könnte eine



Schema 7. Kombinierte Muta-/Semisynthese der Ansamycin-P3-Derivate **37a**, **b** und **38** sowie des Ansamycin-Folsäure-Konjugats **39** unter Verwendung einer AHBA-Blockmutante von *A. pretiosum*. NMP = *N*-Methylpyrrolidon, TMS = Trimethylsilyl.

vielseitig anwendbare und konkurrenzfähige Strategie für die Generierung von PKS-NRPS-Bibliotheken werden.

Die biologische Aktivität von Cryptophycinen mit β -Epoxidfunktion in der 2',3'-Position ist mehr als 100-mal höher als die des α -Epoxids und des *trans*-Styrolanalogs.^[23c] Innerhalb der Cryptophycin-Biosynthese wird dieser offenbar entscheidende Epoxidierungsschritt durch die P450-abhängige Epoxidase CrpE realisiert.^[23d] Ding et al. zeigten, dass CrpE diesen finalen Epoxidierungsschritt zu Cryptophycinen mit breiter Substrattoleranz durchführt, was die durch HPLC-MS-Analyse bestätigte Synthese von nichtnatürlichen Derivaten ermöglicht.^[23c] Cryptophycin 4 (**33**) wurde im Großmaßstab in das verwandte β -Epoxid Cryptophycin 2 (**34**) mit einem Umsatz von >75% umgesetzt.^[23d] Die In-situ-Tandemreaktion von SNAC-*seco*-Cryptophycin 4 mit CrpTE und CrpE führte ausschließlich zu Cryptophycin 2 (**34**), ohne dass das intermediäre Cryptophycin 4 (**33**) gereinigt werden musste. Aus Sicht der chemischen Synthese vereinfachen enzymatische Makrocyclisierung und stereoselektive Epoxidierung die abschließenden Stufen der Cryptophycintotalsynthese drastisch.

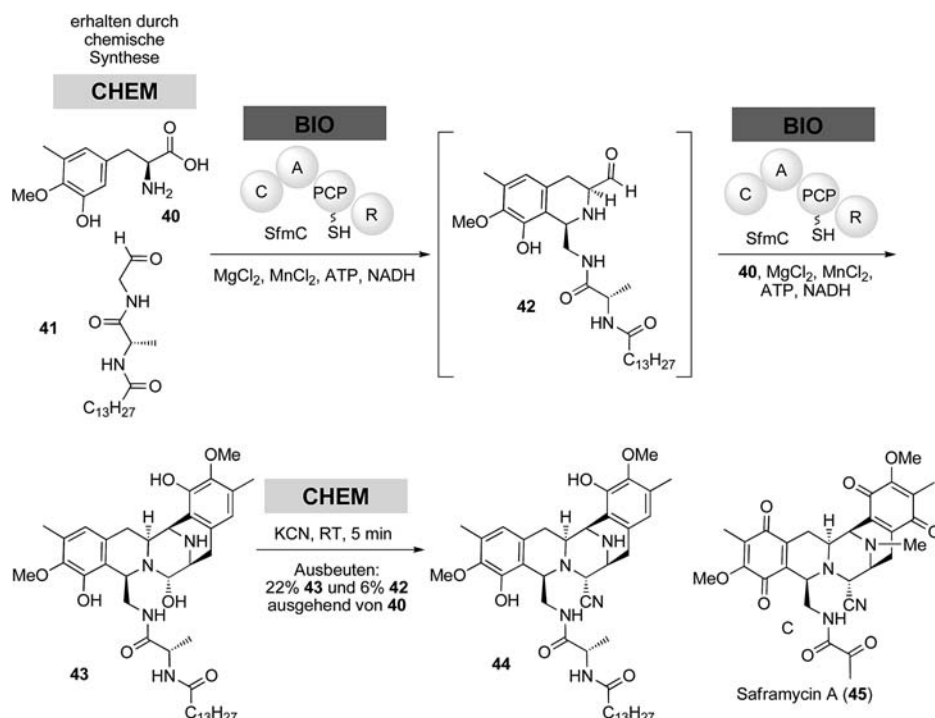
6. CHEM-BIO-CHEM

Als methodische Erweiterung zur Herstellung von Naturstoffanaloga kann die Mutasyntese dazu dienen, gezielt chemisch interessante funktionelle Gruppen einzuführen, die sich für weitere semisynthetische Veränderungen eignen. Dieser CHEM-BIO-CHEM-Ansatz vergrößert die Möglichkeiten zu Erzeugung struktureller Diversität enorm.

Ein illustratives Beispiel beruht auf der Mutasyntese mit einer Mutante von *Actinosynnema pretiosum*, dem Produzenten von Ansamitocin-P3 (**6**), der in der Biosynthese von 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (**5**, AHBA) blockiert ist.^[25] Die Ansamitocine gehören zu den cytotoxischsten bekannten polyketidischen Naturstoffen, mit IC_{50} -Werten von 10^{-3} bis 10^{-7} $\mu\text{g mL}^{-1}$ gegen verschiedene Krebszelllinien. Wegen ihrer außergewöhnlichen Potenz finden sie seit Kurzem erneut starkes Interesse für Phase-I-Studien in Verbindung mit der Verwendung als „Gefechtsköpfe“ („warheads“) in Target-orientierten Antikörperkonjugaten.^[26]

Durch Supplementierung von Kulturen der *A.-pretiosum*-Mutante mit 3-Amino-4-brombenzoesäure ist das Bromansamitocinderivat **36** zugänglich, das als Kupplungspartner in verschiedenen Palladium-katalysierten Stille- und Sonogashira-Kupplungen fungierte (Schema 7).^[27] Die Leistungsfähigkeit der kombinierten Muta-/Semisynthese-strategie wird in der fünfstufigen semisynthetischen Modifizierung des Bromids **36** offensichtlich, durch die das krebstherapie-spezifische Ansamitocin-Folsäure-Konjugat **39** erhalten wurde. Dieses und weitere über diese Route erhaltenen Konjugate zeigten Target-Spezifität für die Membran-gebundenen Folsäurerezeptoren entsprechender Krebszelllinien.^[28]

Koketsu et al. untersuchten die Funktion des ungewöhnlichen NRPS-Moduls SfmC in der Biosynthese von Saframycin (**45**; Schema 8).^[29] In Gegenwart von Adenosintriphosphat (ATP) und der reduzierten Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) wurde holo-SfmC mit dem Tyrosinderivat **40** und dem Dipeptidylaldehyd **41**, die beide durch chemische Synthese erhalten worden waren, inkubiert und so die Saframycinvorstufe **43** erhalten, die an-



Schema 8. Das ungewöhnliche NRPS-Modul SfmC ist in der Lage, die Gerüststruktur von Saframycin (**45**) durch die Katalyse zweier aufeinanderfolgender Pictet-Spengler-Reaktionen aufzubauen; die Synthese wird durch eine chemische Transformation vervollständigt (C = Kondensationsdomäne, A = Adenylierungsdomäne, PCP = Peptidyl-Carrier-Protein, R = Reduktionsdomäne).^[29]

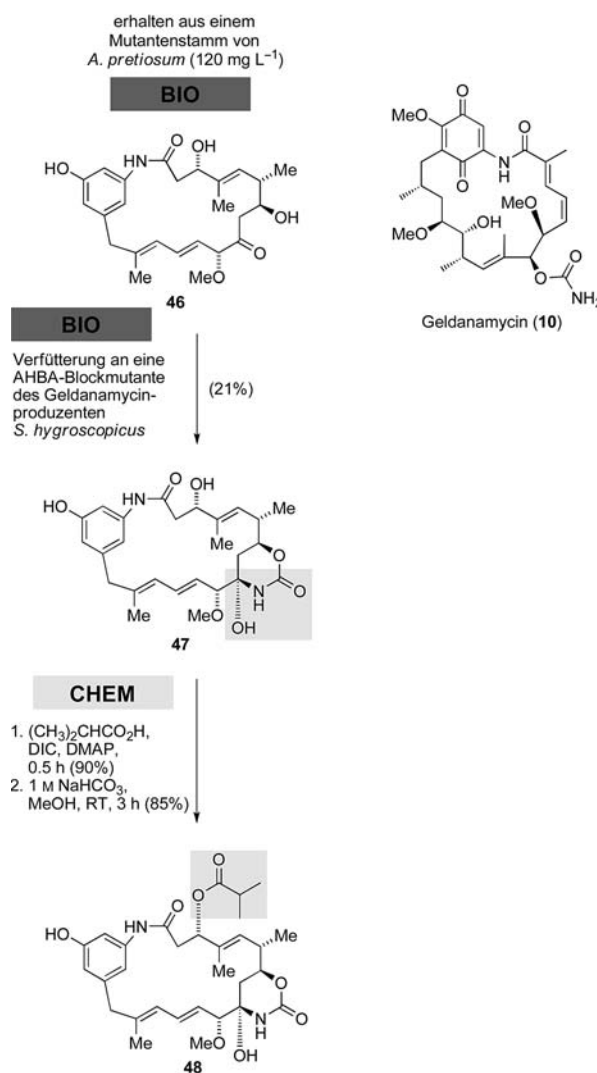
schließlich chemisch in ausreichenden Mengen in **44** überführt wurde. **44** fungierte als fortgeschrittenes Intermediat in den abschließenden Stufen der Synthesen von Saframycin (**45**) sowie von strukturell verwandten Alkaloiden mit ähnlichen Grundstrukturen, wie Ecteinasidin ET-743 und Phthalasidin Pt-650 und davon abgeleiteten Derivaten.^[30]

7. BIO-BIO-CHEM

Die Reihenfolge von chemischer Synthese und Biosynthese kann von der CHEM-BIO-CHEM- auch in die BIO-BIO-CHEM-Variante umgewandelt werden. Ein Beispiel aus diesem Bereich ist Proansamitocin (**46**), das Fermentationsprodukt eines Mutantenstammes vom Ansamitocinproduzenten *A. pretiosum*, dessen Chlorinase und Carbamoyltransferase genetisch blockiert wurden. Diese Manipulation resultiert im kompletten Abbruch aller Post-PKS-Transformationen (Schema 9).^[31] Wurde Proansamitocin an die AHBA-Blockmutante von *S. hygroscopicus*, dem Produzenten des Hsp90-Inhibitors Geldanamycin (**10**),^[32] verfüttert, fand die Carbamoylierung an C7 statt und lieferte das Proansamitocinderivat **47**. Eine kurze, semisynthetische Sequenz ermöglichte das selektive Einführen der Isobutyrateitenkette an C3 und die Bildung des cytotoxischen Ansamitocinderivats **48**. Dies ist ein Beispiel dafür, dass Blockmutanten von verschiedenen Naturstoffproduzenten in eine Synthesesequenz eingebunden werden können.

8. CHEM-BIO-BIO

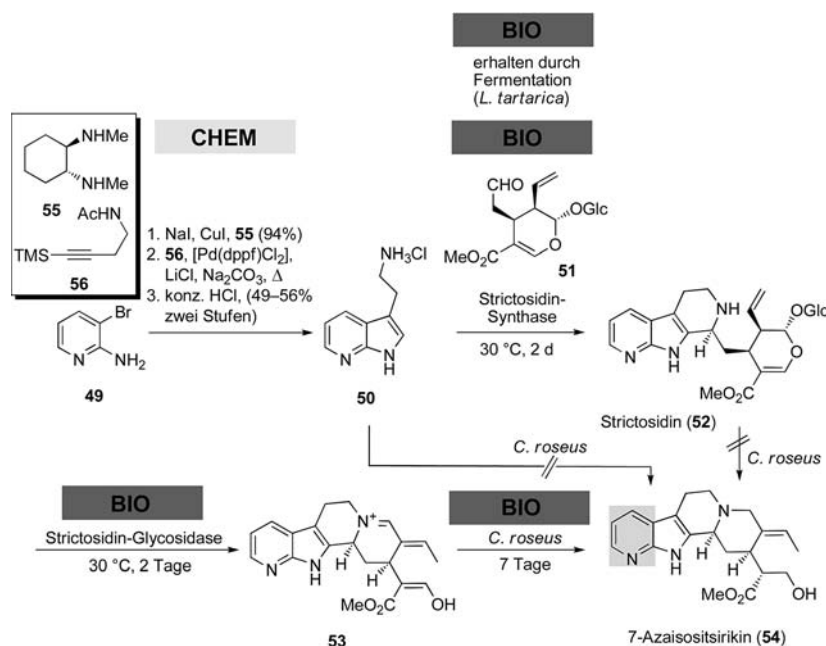
Ein elegantes Beispiel aus dem Feld der gemischten Terpen-Alkaloid-Synthese, das auf einer chemischen Synthese mit nachfolgender zweistufiger, enzymatischer Transformation und einer Fermentation fußt, ist in Schema 10 zusammengefasst.^[33] Das 7-Azatryptamin **50**, durch chemische Synthese aus dem Pyridylbromid **49** präpariert, wurde einer zweistufigen Biotransformation unterzogen, die die beiden rekombinant erzeugten Enzyme Stricdosidin-Synthase und Stricdosidin-Glycosidase nutzt und über das Intermediat **52** die fortgeschrittene Vorstufe **53** liefert.^[34] Die Stricdosidin-synthase benötigt Secologanin (**51**) als Substrat, das durch Fermentation erhalten wurde.^[34a,b] Schließlich wurde das Iminiumion **53** an pflanzliche Zellkulturen von *Catharanthus roseus* unter Bildung des neuen 7-Azaisositsirikin (**54**) verfüttert. Das Produkt wurde spektroskopisch vollständig charakterisiert. Die HPLC-MS-Analyse deutete auch auf das Vorhandensein vieler weiterer Azaanaloga des natürlich vorkommenden Alkaloids im Extrakt hin, die aber wegen zu geringer Mengen nicht charakterisiert wurden. Die Verfütterung der synthetischen Vorstufe **50** oder des glycosylierten Produktes **52** allein lieferte keine neuen Fermentationsprodukte. Dies unterstreicht die Leistungsfähigkeit der gewählten Kombination aus chemischer Synthese, Enzymkatalyse und Fermentation.



Schema 9. Der BIO-BIO-CHEM-Zugang zum Ansamitocin-P3-Derivat **48** unter Verwendung zweier genetisch manipulierter Stämme von *A. pretiosum* und *S. hygroscopicus*, gefolgt von selektiver Einführung der Esterseitenkette an C3.^[31] DIC = *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid, DMAP = 4-(Dimethylamino)pyridin.

9. Ausblick

Dieser Kurzaufsatz ist weit davon entfernt, vollständig zu sein, und erhebt auch nicht den Anspruch, dies zu sein. Wir wählen illustrative Beispiele aus der Perspektive des Synthesechemikers, die den enormen Aufwand an Molekularbiologie und Enzymologie vernachlässigt, der notwendig ist, um die biologischen Werkzeuge, seien es nun Blockmutanten oder individuelle Enzyme, zugänglich zu machen. Weitergehende Forschung in diesem Bereich wird danach streben, die Bereitstellung der vorgestellten Hilfsmittel zu erleichtern und damit die Hürde verringern, sie in ausgewählten Fällen für die Totalsynthese einzusetzen. In Zukunft werden nicht nur neue Kombinationen der Chemie sowohl mit In-vitro- als auch In-vivo-Biotransformationen möglich sein. Durch Verfeinerungen der Spezifität und Selektivität der Biotransformations-Werkzeuge könnte deren Anwendung außerhalb ihres origi-



Schema 10. Synthese von **54**, einem Azaderivat von Isositsirikin, durch eine zweistufige enzymatische Biotransformation und Fermentation der 7-Azatriptaminvorstufe **53** (Glc = D-Glucosyl).^[33] dppf = 1,1'-Bis(diphenylphosphanyl)ferrocen.

nären Biosyntheseweges zu einer Sammlung generell verwendbarer Synthesehilfsmittel führen.

Durch ein tieferes Verständnis der Biosynthesewege von komplexen Sekundärmetaboliten und die Entwicklung von Methoden auf Grundlage molekularbiologischer Manipulationen der Biosynthesewege auf genetischer Ebene wird die Totalsynthese von Naturstoffen und deren Analoga flexibler und kann so möglicherweise wieder eine Rolle bei der Wirkstoffentwicklung spielen. Besondere Bedeutung hat hierbei die Kombination aus „manipulierter“ Biosynthese und chemischer Synthese. Es dauerte ein halbes Jahrhundert, bis diese Möglichkeiten realisierbar wurden, aber Birchs Synthesevision ist noch immer jung und hält großartige Zukunftsaussichten bereit.

Eingegangen am 19. Oktober 2011

Online veröffentlicht am 22. März 2012

- [1] A. J. Birch, *Pure Appl. Chem.* **1963**, 7, 527–538.
- [2] U. Klar, B. Buchmann, W. Schwede, W. Skuballa, J. Hoffmann, R. B. Lichtner, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 8110–8116; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7942–7948.
- [3] *Anticancer agents from natural products* (Hrsg.: M. J. Yu, Y. Kishi, B. A. Littlefield in D. J. Newman, D. G. I. Kingston, G. M. Cragg), Washington DC, Taylor & Francis, **2005**.
- [4] Totalsynthese von Halichondrin B: T. D. Aicher, K. R. Buszek, F. G. Fang, C. J. Forsyth, S. H. Jung, Y. Kishi, M. C. Matelich, P. M. Scola, D. M. Spero, S. K. Yoon, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3162–3164.
- [5] K. C. Nicolaou, W. M. Dai, R. K. Guy, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 38–69; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 15–44.
- [6] J. N. Denis, A. E. Green, D. Guénard, F. Guéritte-Voegelein, L. Mangatal, P. Potier, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 5917–5919.
- [7] P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, Wiley, Chichester, **2009**, ISBN 978-0-470-74167-2.
- [8] a) T.-W. Yu, L. Bai, D. Clade, D. Hoffmann, S. Toelzer, K. Q. Trinh, J. Xu, S. J. Moss, E. Leistner, H. G. Floss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 7968–7973; b) P. Spiteller, L. Bai, G. Shang, B. J. Carroll, T.-W. Yu, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14236–14237.
- [9] J. Wegner, S. Ceylan, A. Kirschning, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 4583–4592.
- [10] I. R. Baxendale, J. Deelay, C. M. Griffiths-Jones, S. V. Ley, S. Saaby, G. K. Tranmer, *Chem. Commun.* **2006**, 2566–2568.
- [11] a) K. J. Weissman, P. F. Leadlay, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, 3, 925–936; b) C. T. Walsh, *ChemBioChem* **2002**, 3, 124–134; c) H. G. Menzella, C. D. Reeves, *Curr. Op. Microbiol.* **2007**, 10, 238–245.
- [12] a) S. Weist, R. D. Süssmuth, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 68, 141–150; b) A. Kirschning, F. Taft, T. Knobloch, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 3245–3259; c) K. Weissman, *Trends Biotechnol.* **2007**, 25, 139–142.
- [13] Zur Vereinfachung sind die Synthesekonzepte in linearer Weise gezeigt. Sicher gilt für die chemische Synthese, dass diese Strategie, wie im Text erläutert, nicht immer vorteilhaft ist.
- [14] K. Patel, M. Piagentini, A. Rascher, Z. Q. Tian, G. O. Buchanan, R. Regentin, Z. Hu, C. R. Hutchinson, R. McDaniel, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 1625–1633.
- [15] a) P. Workman, *Curr. Cancer Drug Targets* **2003**, 3, 297–300; b) L. Neckers, K. Neckers, *Expert Opin. Emerging Drugs* **2005**, 10, 137–149; c) L. Whitesell, S. L. Lindquist, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, 5, 761–772.
- [16] T. Schewecke, J. F. Aparicio, I. Molnar, A. König, L. E. Khaw, S. F. Haydock, M. Oliynyk, P. Caffrey, J. Cortes, J. B. Lester, G. A. Böhm, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 7839–7843.
- [17] A. S. Eustáquio, B. S. Moore, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 4000–4002; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 3936–3938.
- [18] B. Kusebauch, N. Brendel, H. Kirchner, H.-M. Dahse, C. Hertweck, *ChemBioChem* **2011**, 12, 2284–2288.
- [19] S. Weist, C. Kittel, D. Bischoff, B. Bister, V. Pfeifer, G. J. Nicholson, W. Wohlleben, R. D. Süssmuth, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 5942–5943.

- [20] a) R. D. Süssmuth, W. Wohlleben, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *63*, 344–350; b) S. Weist, B. Bister, O. Puk, D. Bischoff, S. Pelzer, G. J. Nicholson, W. Wohlleben, G. Jung, R. D. Süssmuth, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3531–3534; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3383–3385.
- [21] J. D. Mortison, D. H. Sherman, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7041–7051.
- [22] P. Bernhardt, S. E. O'Connor, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 35–42.
- [23] a) Z. Q. Beck, C. C. Aldrich, N. A. Magarvey, G. I. Georg, D. H. Sherman, *Biochemistry* **2005**, *44*, 13457–13466; b) Z. Q. Beck, D. A. Burr, D. H. Sherman, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1373–1375; c) Y. Ding, W. H. Seufert, Z. Q. Beck, D. H. Sherman, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5492–5498; d) N. A. Magarvey, Z. Q. Beck, T. Golakoti, Y. Ding, U. Huber, T. K. Hemscheidt, D. Abelson, R. E. Moore, D. H. Sherman, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 766–779.
- [24] W. Seufert, Z. Q. Beck, D. H. Sherman, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 9458–9460; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9298–9300.
- [25] A. Kirschning, K. Harmrolfs, T. Knobloch, *C. R. Chim.* **2008**, *11*, 1523–1543.
- [26] a) C. A. Ladino, R. V. Chari, L. A. Bourret, N. L. Kedersha, V. S. Goldmacher, *Int. J. Cancer* **1997**, *73*, 859–864; b) I. Niculescu-Duvaz, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2010**, *12*, 350–360; c) J. R. Junutula, K. M. Flagella, R. A. Graham, K. L. Parsons, E. Ha, H. Raab, S. Bhakta, T. Nguyen, D. L. Dugger, G. Li, E. Mai, G. D. Lewis Phillips, H. Hiraragi, R. N. Fuji, J. Tibbitts, R. Vandlen, S. D. Spencer, R. H. Scheller, P. Polakis, M. X. Sliwowski, *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 4769–4778; d) J. A. Reddy, E. Westrick, H. K. Santhapuram, S. J. Howard, M. L. Miller, M. Vetzal, I. Vlahov R. V. Chari, V. S. Goldmacher, C. P. Leamon, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 6376–82.
- [27] F. Taft, M. Brünjes, H. G. Floss, N. Czempinski, S. Grond, F. Sasse, A. Kirschning, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1057–1060.
- [28] F. Taft, K. Harmrolfs, I. Nickeleit, A. Heutling, M. Kiene, N. Malek, F. Sasse, A. Kirschning, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 880–886.
- [29] K. Koketsu, K. Watanabe, H. Suda, H. Oguri, H. Oikawa, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 408–410.
- [30] C. Cuevas, M. Perez, M. J. Martín, J. L. Chicharro, C. Fernández-Rivas, M. Flores, A. Francesch, P. Gallego, M. Zarzuelo, F. de La Calle, J. García, C. Polanco, I. Rodríguez, I. Manzanares, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2545–2548.
- [31] S. Eichner, F. Taft, T. Knobloch, K. Harmrolfs, A. Kirschning, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 776–781; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 752–757.
- [32] S. Eichner, H. G. Floss, F. Sasse, A. Kirschning, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1801–1805.
- [33] H. Y. Lee, N. Yerkes, S. E. O'Connor, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 1225–1229.
- [34] a) E. McCoy, M. C. Galan, S. E. O'Connor, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2475–2478; b) G. Kinast, L. F. Tietze, *Chem. Ber.* **1976**, *109*, 3640–3645; c) P. Bernhardt, N. Yerkes, S. E. O'Connor, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4166–4168; d) P. Bernhardt, S. E. O'Connor, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 7118–7120; e) P. Bernhardt, A. R. Usera, S. E. O'Connor, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 4400–4402; f) N. Yerkes, J. X. Wu, E. McCoy, M. C. Galan, S. Chen, S. E. O'Connor, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3095–3098.