

Engineering von Thiopeptiden: ein multidisziplinärer Weg zu neuen Wirkstoffen

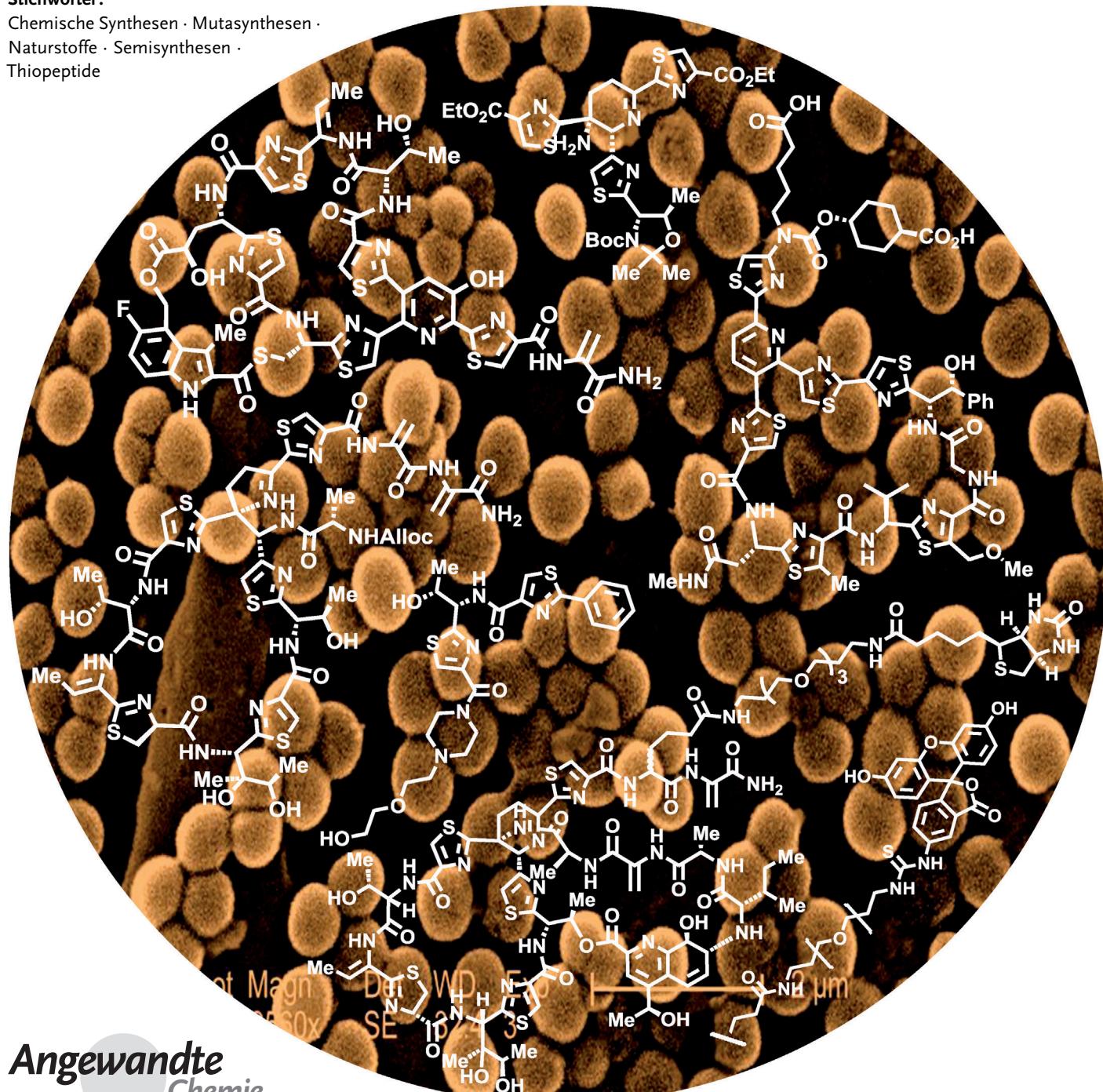
Xavier Just-Baringo, Fernando Albericio und Mercedes Álvarez*

Stichwörter:

Chemische Synthesen · Mutasynthesen ·

Naturstoffe · Semisynthesen ·

Thiopeptide



Durch jüngste Entwicklungen auf dem Gebiet der Thiopeptid-Antibiotika-Analoga konnten einige der Limitierungen dieser natürlich vorkommenden Substanzen überwunden werden. Chemische Synthesen, semisynthetische Derivatisierungen und die Umgestaltung von Biosynthesewegen haben unabhängig voneinander zu sich ergänzenden Modifikationen verschiedener Thiopeptide geführt. Einige der so gewonnenen neuen Substanzen zeigen verbesserte Wirkprofile, und das nicht nur als Antibiotika, sondern auch als Antimalaria- und Antikrebswirkstoffe. Der planerische Entwurf neuartiger Moleküle auf der Grundlage von Thiopeptidgerüsten stellt sich als die einzige Strategie für die volle Nutzung des großen Potenzials, das sie *in vitro* zeigen, dar. Hier stellen wir die wichtigsten Ergebnisse auf dem Gebiet der Herstellung von Thiopeptidanalogen vor und diskutieren, wie die unterschiedlichen Ansätze sich zu einer multidisziplinären Strategie zusammenführen lassen.

1. Einführung

Thiazolylpeptide (Thiopeptide)^[1,2] sind eine immer weiter wachsende Familie von Antibiotika^[3] aus Gram-positiven Bakterien, die infolge ihrer herausragenden biologischen Wirkprofile die Aufmerksamkeit zahlreicher Forschungsgruppen auf sich gezogen haben. Sie zeigen in nanomolarer Konzentration Wirkung gegen eine Vielzahl Gram-positiver Bakterienstämme, darunter auch Problemkeime wie Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) oder Penicillin-resistenter *Streptococcus pneumoniae* (PRSP). Hinzu kommen weitere interessante Eigenschaften wie eine Antimalaria- und Antikrebswirkung. Die Angehörigen dieser Naturstoffklasse lassen sich anhand ihres azolsubstituierten zentralen stickstoffhaltigen Sechsringen leicht erkennen und in verschiedene Verbindungsreihen einteilen (Abbildung 1 und 4). Weitere

Aus dem Inhalt

1. Einführung	6721
2. Verschiedenartige Ansätze zur Erzeugung von Thiopeptidanalogen	6722
3. Zusammenfassung und Ausblick	6733

charakteristische Merkmale dieser Naturstoffe sind das Vorhandensein wenigstens eines Makrocyclus und eines Molekül-„Schwanzes“ variabler Länge, die jeweils mit stark modifizierten Aminosäureresten ausgestattet sind, in der Hauptsache mit cyclisierten und/oder dehydratisierten Cys-, Ser- und Thr-Einheiten. Das große

Potenzial neuer Wirkweisen von Thiopeptiden hat das Augenmerk vieler Forschergruppen auf sich gezogen, die deren Totalsynthesen^[2,4-11] sowie ihre Strukturen, biologische Wirkungen und Biosynthese untersuchten.^[12,13] Es ist heute wohlbekannt, dass Thiopeptide durch Modifikation eines ribosomal synthetisierten linearen Präpeptids entstehen, das durch eine Reihe von Enzymen posttranslational bearbeitet wird. Diese Enzyme werden von einer gemeinsamen Gengruppe („gene cluster“) codiert. Thiopeptide hemmen das Wachstum Gram-positiver Bakterien durch Blockade der Proteinbiosynthese am Ribosom (Abbildung 2). Sie bewerkstelligen das auf zweierlei Weise, abhängig vor allem von Größe ihres Makrocyclus: Thiopeptide mit einem 26-gliedrigen Makrocyclus wie Thiostrepton,^[14] Nocathiacin I^[15] oder die Thiocilline^[16] bewirken den Zerfall des Ribosom/L11-Proteinkomplexes und verhindern die korrekte Wirkung des Elongationsfaktors G (EF-G), der nun nicht mehr den 23S-rRNA/Protein-L11-Komplex zu binden vermag. Solche, die wie GE2270 A^[17] oder die Thiomuracine^[18] einen 29-gliedri-

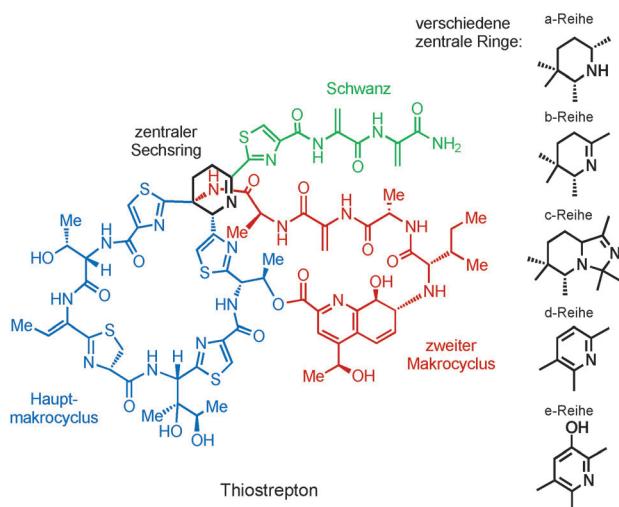


Abbildung 1. Wichtige Bereiche von Thiopeptidmolekülen und ihre Klassifizierung in unterschiedliche Reihen auf der Grundlage des zentralen Sechsringes.

[*] X. Just-Baringo, Prof. F. Albericio, Prof. M. Álvarez
Institut für Biomedizinische Forschung
Wissenschaftspark Barcelona, Universität Barcelona
Baldri Reixac 10, 08028 Barcelona (Spanien)
und
CIBER-BBN, Zentrum für Bioengineering,
Biowerkstoffe und Nanomedizin
08028 Barcelona (Spanien)
E-Mail: Mercedes.alvarez@irbbarcelona.org
Homepage: <http://www.pcb.ub.edu/fama/htm/home.htm>
Prof. F. Albericio
Abteilung für Organische Chemie, Universität Barcelona
08028 Barcelona (Spanien)
und
School of Chemistry and Physics, University of KwaZulu-Natal
4000-Durban (Südafrika)
Prof. M. Álvarez
Organisch-Chemisches Laboratorium, Fakultät für Pharmazie
Universität Barcelona
08028 Barcelona (Spanien)

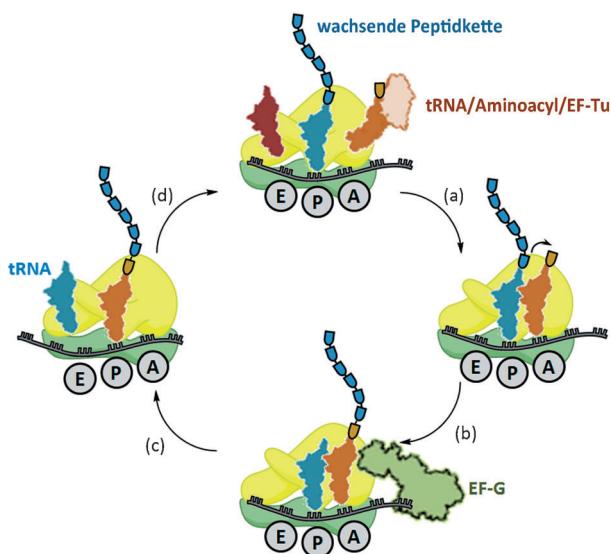


Abbildung 2. Bakterielle Proteinsynthese am Ribosom: (a) EF-Tu bringt den tRNA/Aminoacyl-Komplex zur Akzeptorstelle (A) des Ribosoms. (b) Die entstehende Polypeptidkette wird von der A-Bindungsstelle auf die Peptidylbindungsstelle (P) übertragen. Eine neue Peptidbindung wird gebildet. (c) EF-G bewirkt den Ortswechsel der Moleküle; die Peptidyl-tRNA wandert zur P-Bindungsstelle, die desacylierte tRNA wandert zur Austrittsstelle (E), von wo aus sie das Ribosom verlässt. (d) Das Ribosom ist bereit für einen neuen Reaktionszyklus.

gen Makrocyclus enthalten, binden den Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) und verhindern so, dass die Aminoacyl-tRNA (AA-tRNA) zum Ribosom gelangt. Der Wirkmechanismus von Thiopeptiden mit noch größeren, 35-gliedrigen Makrocyclen wie im Fall von TP-1161^[19] und Berninamycin A^[20] ist noch nicht aufgeklärt. Mit isolierten Zielmolekülen wurde in *In-vitro*-Experimenten auch für Gram-negative Bakterien eine Inhibition des Translationsapparates nachgewiesen. An Zellkulturen Gram-negativer Bakterien wurde jedoch keine Wachstumshemmung beobachtet, da Thiopeptide deren Zellwand anscheinend nicht zu durchdringen vermögen.^[21–24]

Ungeachtet ihrer beeindruckenden *In-vitro*-Profile schränken dürftige pharmakokinetische Eigenschaften – insbesondere die geringe Wasserlöslichkeit – ihre Verwendung in der Therapie ein, sodass sie bislang nur für die äußerliche, örtliche Anwendung und nur in der Veterinärmedizin für die Behandlung von Infektionen zum Einsatz kamen.



Xavier Just-Baringo hat einen B.Sc. im Fach Chemie von der Universität Barcelona (2008). Nach einem Jahr bei der Firma GlaxoSmithKline (Stevenage, Großbritannien) wurde er Mitglied der Gruppe um Fernando Albericio und Mercedes Álvarez am Institut für biomedizinische Forschung (Barcelona, Spanien), wo er seine Doktorarbeit über die Totalsynthese und die Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Thiopeptiden anfertigte.

2. Verschiedenartige Ansätze zur Erzeugung von Thiopeptidanalogika

Um die physikochemischen Nachteile der Thiopeptide zu überwinden, wurden diejenigen Strukturmerkmale der Verbindungen ermittelt, die ihre biologischen Wirkprofile bestimmen, und Analoga mit verbesserter Löslichkeit hergestellt, die sowohl die Wirksamkeit als auch die Wirkstärke der Ausgangsverbindung beibehalten. Zu diesem Ziel wurden drei Hauptwege beschritten: die chemische Synthese, die Abwandlung von Biosynthesewegen und die Semisynthese. Da sich diese Methoden sehr stark unterscheiden, sind die damit erreichten Modifikationen ebenfalls unterschiedlich, sodass verschiedene Bereiche des „chemischen Raum“ mit ihnen ausgeleuchtet werden konnten. Während bei Eingriffen in den Biosyntheseweg die enzymatische Maschinerie so abgeändert werden kann, dass man Zwischenstufen isolieren und Seitenreste am Molekül austauschen kann, ermöglicht der semisynthetische Ansatz die Einführung neuer Fragmente oder den Abbau an der reaktivsten Stelle des Naturstoffs. Durch chemische Synthese lassen sich überdies Modifikationen einführen, die nicht möglich sind, wenn man sich allein auf die Bildung *in vivo* stützt, wie es die beiden anderen Ansätze tun. Diese Strategie hat somit ein sehr großes Potenzial und wird vermutlich tiefere Einsichten in die Struktur-Wirkungs-Beziehung gestatten.

2.1. Chemische Synthesen

In den vergangenen zehn Jahren wurden Totalsynthesen zahlreicher Thiopeptid-Antibiotika durchgeführt. Diese Projekte gingen mit der Entwicklung leistungsstarker Synthesemethoden und Strategien einher, die auch für die Erzeugung von Analoga einsetzbar sind. Infolge dieser Fortschritte wurden Einsichten in die Wirkung von Analoga gewonnen, die durch alternative Methoden unmöglich erreichbar gewesen wären; die Aktivität von Fragmenten, die als Synthesebausteine angefallen sind, war hilfreich bei der Ermittlung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen („structure-activity relationships“, SAR). Angesichts ihres enormen Potenzials ist die chemische Synthese die Methode der Wahl für die Erzeugung neuer Verbindungen mit großen Abwandlungen.



Mercedes Álvarez ist gegenwärtig Professorin an der Universität von Barcelona und Forscherin im Institut für biomedizinische Forschung des Wissenschaftsparks von Barcelona. Sie wurde von der Universität Barcelona im Fach Chemie promoviert. Ihr Doktorvater war Prof. Ricardo Granados. Sie verbrachte ein „Freijahr“ an der Universität Manchester, wo sie mit Prof. John A. Joule arbeitete. 2002 verlegte sie ihre Forschungsgruppe in den Wissenschaftspark Barcelona. Ihre Forschungsinteressen umfassen Naturstoffsynthese, Heterocyclenchemie, kombinatorische Chemie und Methoden der Festphasensynthese.

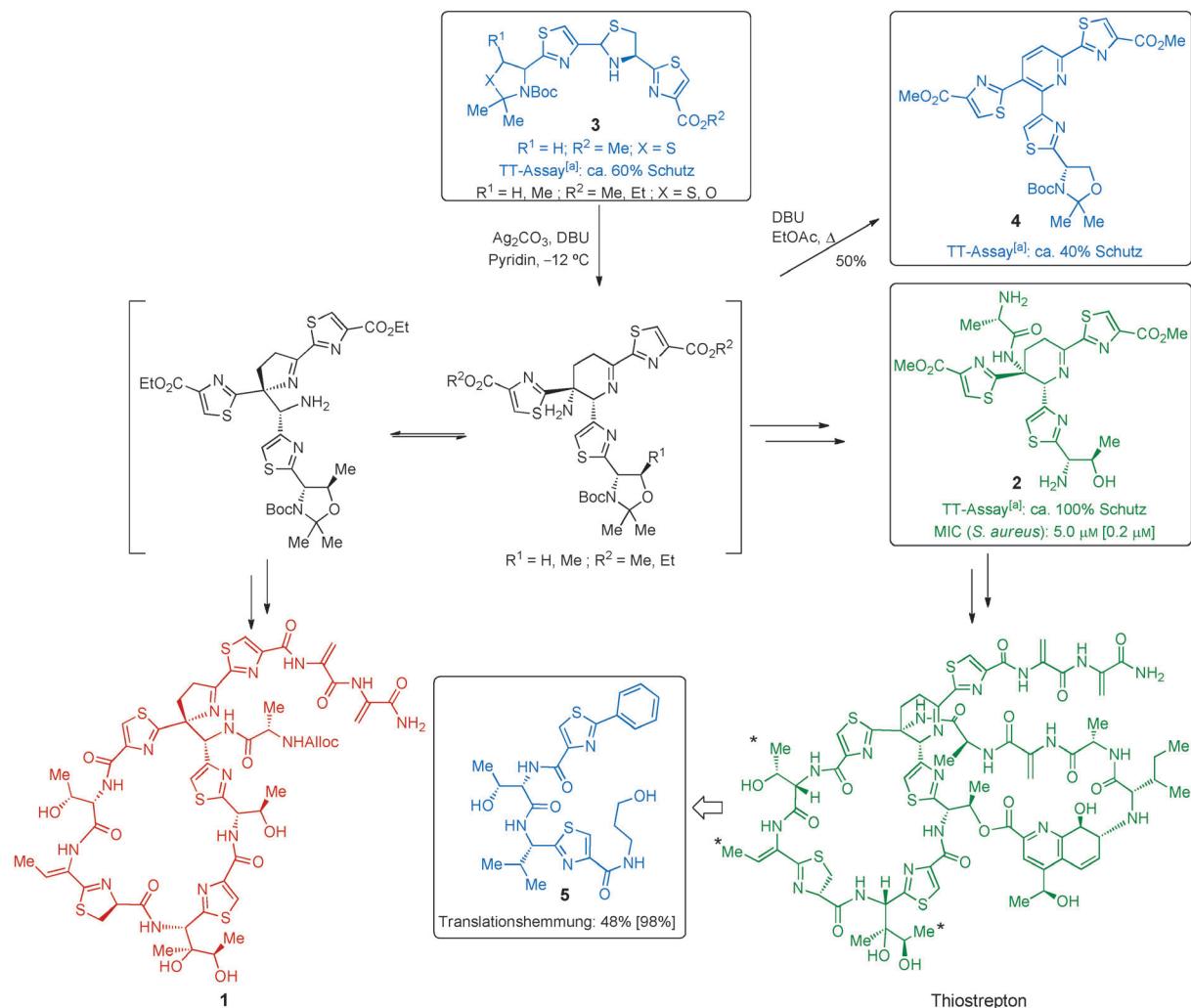


Abbildung 3. Die Beziehung verschiedener Thiopeptidintermediate und -anologa, die im Verlauf der Totalsynthese und der Fragment-Durchmusterung erzeugt werden. Verbindungen mit In-vivo- oder In-vitro-Aktivität sind grün unterlegt. Produkte, die nur in In-vitro-Assays mit Zielmolekülen wechselwirken, sind blau unterlegt. Moleküle ohne Aktivität sind rot unterlegt. Zahlenwerte für Aktivität und Löslichkeit sind in Klammern neben dem jeweiligen Analogon angegeben. [a] Inhibition der Synthese des Grün fluoreszierenden Proteins (GFP) durch Thiostrepton in einem Transkriptions-Translations-Mess-System (TT-Assay).

gen der natürlichen Molekülstruktur, insbesondere bei der Entwicklung antibakterieller Wirkstoffe.^[25]

Bahnbrechende Arbeiten der Gruppe um Nicolaou führten zur ersten Totalsynthese von Thiostrepton.^[4,5] Im Verlauf

dieser Studien wurde ein Analogon des Naturstoffs erzeugt, dem der zweite Makrocyclus fehlt, und der anstelle des natürlicherweise auftretenden Sechsringen einen zentralen Fünfring aufweist: das Analogon **1** (Abbildung 3).^[26] Dieses Produkt hatte keine merkliche antibakterielle Wirkung, belegte aber die Bedeutung des zentralen Sechsringes als Strukturmotiv. Weitere Untersuchungen am polyheterocyclischen Molekülkern ergaben, dass das Fragment **2**, das für die Totalsynthese des Thiostreptons herangezogen wurde, in vivo einige Restaktivität hatte und deshalb als Ausgangspunkt für die Entwicklung einer niedermolekularen antibakteriellen Leitsubstanz mit verbessertem pharmakologischem Profil dienen konnte.^[27] Die Fähigkeit, in vitro den Translationsapparat zu stören, wurde für **2** und Bausteine wie den Verbindungen **3** und **4** und zahlreichen Analoga und Stereoisomere ermittelt. Der zentrale Polyheterocyclus **4** ist eine vollständig ungesättigte Version des Kernfragmentes, wie sie in GE2270 A und T vorliegt.^[28] Die in vitro erhaltenen Resultate deuten auf eine alternative Wirkungsweise der Fragmente,



Fernando Albericio wurde 1981 an der Universität Barcelona in Chemie promoviert. Nach einer Postdoktorandenzzeit leitete er von 1992 bis 1994 die Peptidforschung bei Millipore Waters in Boston (USA). Danach wechselte er zurück an die Universität von Barcelona, die ihn 1995 zum Professor berief. Dort beteiligte er sich an der Gründung des Wissenschaftsparks Barcelona, dem er von 2005 bis 2012 als Generaldirektor vorstand. Seine Forschungen umfassen Peptidsynthese und kombinatorische Methoden der Chemie sowie die Synthese von Peptiden und niedermolekularen Verbindungen mit therapeutischen Wirkungen.

die wohl nicht in der Inhibition des Translationsapparates liegt.^[29] Einige der untersuchten Verbindungen waren in der Lage, in Anwesenheit von Thiomstrepton die Bildung des 70S-Initiationskomplexes (70SIC) wiederherzustellen, was darauf hindeutet, dass diese Fragmente mit dem Naturstoff konkurrieren, obwohl sie selbst nicht stark an das Ribosom binden.

Die in Abbildung 3 mit Sternchen markierten Hauptkontaktpunkte des Thiomstreptons mit der Bindungsdomäne der 23S-rRNA (rRNA; ribosomale RNA) für das Protein L11 gaben Anlass für den Entwurf und die Synthese einer Bibliothek von Analoga wie der Verbindung **5**, die Molekülteile tragen, die an derartigen Wechselwirkungen beteiligt sind.^[30] Obgleich einige der Verbindungen *in vitro* eine Restinhibitionsfähigkeit der Proteinbiosynthese zeigten, vermochte

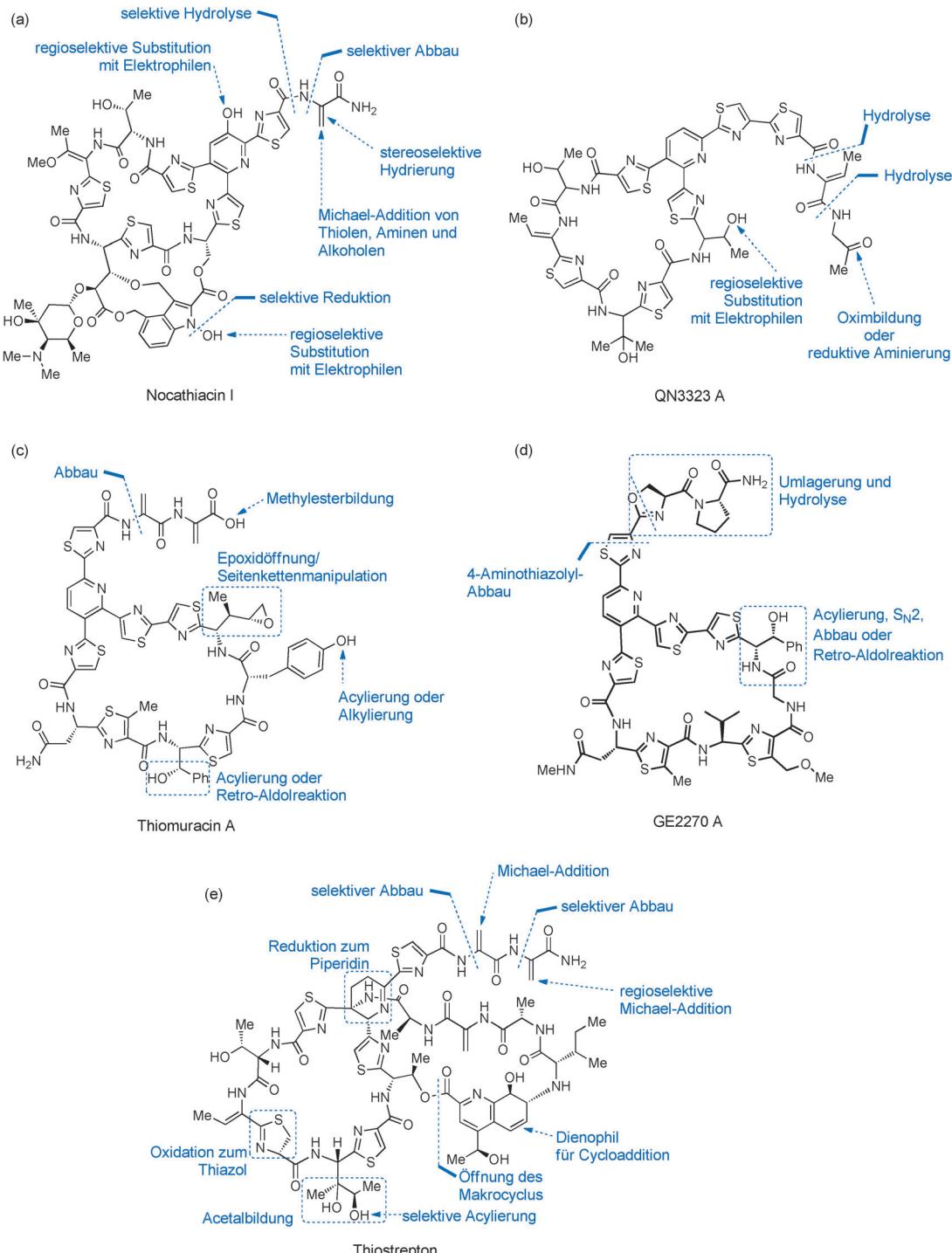


Abbildung 4. Graphische Darstellung der Reaktivität von Thiopeptiden im Verlauf semisynthetischer Modifikationen von Nocathiacin I, QN3323 A, Thiomuracin A, GE2270 A und Thiomstrepton.

keine das bakterielle Wachstum zu hemmen. Dies könnte eine Folge erhöhter Flexibilität des Fragments jenseits des ursprünglichen makrocyclischen Rahmens sein. Die synthetisierten Fragmente enthielten jedoch nur zwei der oben erwähnten drei wechselwirkenden Molekülteile, und der Thiazolinring war durch einen robusteren Thiazolrest ersetzt. Derartige Vereinfachungen könnten die Verminderung der Inhibition in vitro und die fehlende Aktivität in vivo bewirkt haben, was bedeuten könnte, dass kleinere Moleküle nicht alle wichtigen Kontakte bilden können, die ein Thiopeptid bildet.

2.2. Semisynthesen

Die am weitläufigsten eingesetzte Strategie für die Synthese von Thiopeptidanalog-Bibliotheken ist die chemische Modifikation von Naturstoffen oder Semisynthese. Die vergleichsweise großen Mengen an Naturstoffen, die sich in Fermentern gewinnen lassen, stellen genug Ausgangsmaterial für nachfolgende Derivatisierungen, die chemische Charakterisierung und Durchmusterungen zur Verfügung. Dieser Ansatz wird im Wesentlichen durch die inhärente Reaktivität des verwendeten Thiopeptids begrenzt. Obgleich sehr selektive Methoden entwickelt wurden, finden alle Modifikationen notwendigerweise an den reaktivsten Stellen des Substrats

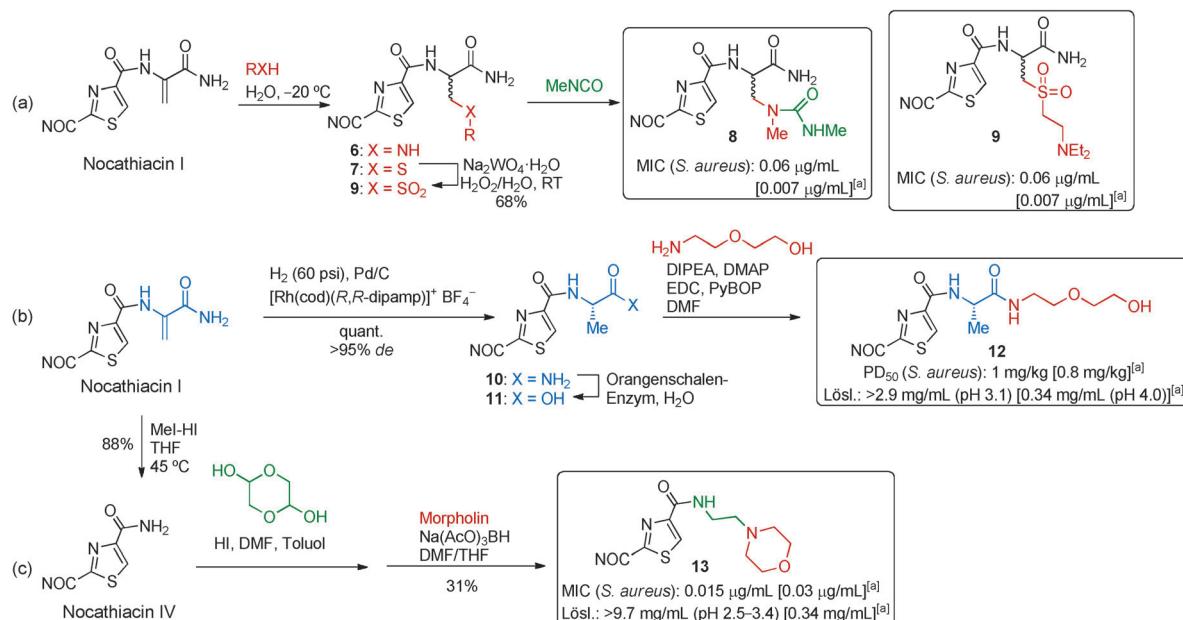


Abbildung 5. Beispiele semisynthetischer Modifikationen von Nocathiacin-Schwänzen. NOC = Nocathiacin-Makrocyclus; PD₅₀: notwendige Dosis, um 50% der infizierten Tiere zu heilen; MIC: minimale inhibierende Konzentration. [a] Aktivitäts- und Löslichkeitswerte des Naturstoffs in Klammern neben denen des Analogons.

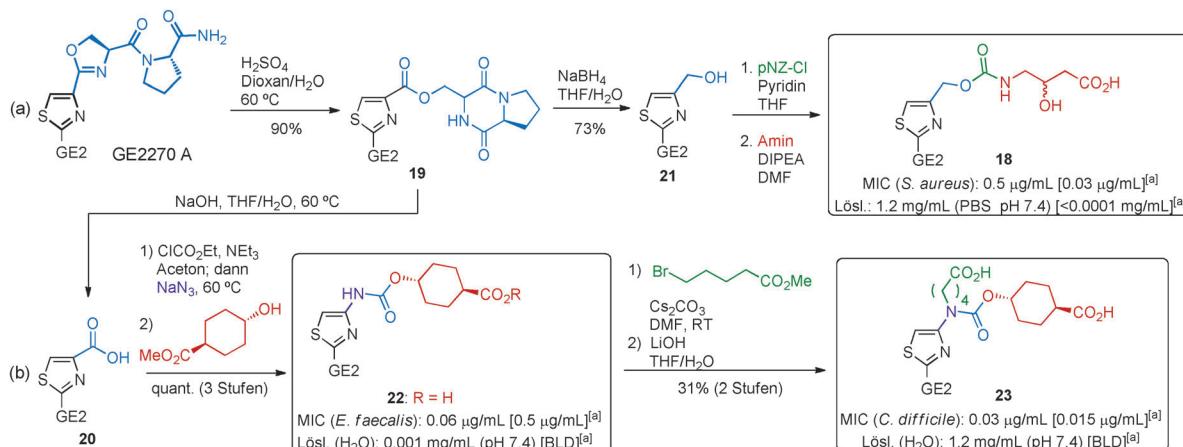


Abbildung 6. Beispiele semisynthetischer Modifikationen von GE2270 A-Molekülenschwänzen. GE2 = GE2270 A-Makrocyclus. [a] Aktivitäts- und Löslichkeitswerte des Naturstoffs in Klammern neben denen des Analogons. BLD: unterhalb der Nachweisgrenze („below limit of detection“). pNZ-Cl = (para-Nitrobenzyl)oxycarbonylchlorid.

statt und führen zu Produkten mit ähnlichen Molmassen wie der Naturstoff. Ungeachtet dessen haben die geringere Zahl chemischer Umwandlungen im Vergleich zur De-novo-Synthese und die große Anzahl Analoga, die sich leicht herstellen lassen, auf diesem Weg den Zugang zu den bislang vielversprechendsten Derivaten eröffnet.

Nocathiacin I (Abbildung 4a), eines der am ausgiebigsten modifizierten Thiopeptide, ist ein perfektes Beispiel für die verschiedenenartigen Transformationen, die sich an einer bestimmten Stelle des Thiopeptidgerüstes durchführen lassen. Die überwältigende Mehrheit der Derivate wurde durch Veränderungen am Peptidschwanzes erhaltenen (Abbildung 5–7). Wenn man die konfigurativen Einschränkungen des Makrocyclus einbezieht – ein Faktum, das die hohe Spezifität bezüglich seiner biologischen Zielstruktur untermauert – scheint der Dehydroalaninrest (Dha) im Schwanzteil des Moleküls eine weitaus flexiblere Stelle erhöhter Reaktivität zu sein. Eine der am häufigsten durchgeföhrten Modifikationen ist die Michael-Addition von Nucleophilen an Dha^[31] unter Bildung von Aminen (**6**)^[32] und Thioethern (**7**).^[33] Erstere lassen sich in Harnstoffderivate (**8**) und Amide^[34] überführen, letztere können unter milden Bedingungen in die entsprechenden Sulfone (**9**) umgewandelt werden. Dies sollte ihre Löslichkeitsprofil verbessern (Abbildung 5a).^[34] Alternativ dazu kann der Dha-Rest diastereoselektiv hydriert werden, um zu der Ala-Seitenkette (**10**) zu gelangen, die weiter modifiziert werden kann: Sie lässt sich enzymatisch in die Säure **11** umwandeln, um, wie in **12**, die Löslichkeit erhöhende Gruppen einzuführen, die ihre pharmazeutische Formulierung erleichtern sollten, ohne die Wirkung zu beeinträchtigen (Abbildung 5b).^[35] Der Abbau des Schwanzteils ist ebenfalls vielfach durchgeföhrten worden und gestattet je nach den gewählten Reaktionsbedingungen den Zugang zu zwei verschiedenen Produkten: dem Thiazol-4-carbonsäure-Derivat (Nocathiacinsäure) oder dem entsprechenden Amid

(Nocathiacin IV).^[36,37] Nocathiacinsäure muss nicht zur Steigerung der Löslichkeit modifiziert werden, oder sie kann nachfolgend mit Aminen kondensiert werden.^[38,39] Nocathiacin IV ist in einer Ein-Topf-Sequenz aus N-Alkylierung und reduktiver Aminierung umgesetzt worden, um lange Alkylschwänze in das Molekül einzuführen, ähnlich wie in **13** (Abbildung 5c).^[40] Derartige Modifikationen haben zu Nocathiacinanaloga mit verbesserter Löslichkeit und ähnlicher Wirkstärke wie Nocathiacin I geführt, die gegen verschiedene Pathogene, darunter Vancomycin-resistente Bakterienstämme, wirken.^[41]

Andere beschriebene Modifikationen von Nocathiacin I sind die selektive Substitution einer der beiden reaktiven Hydroxygruppen am Molekül, 2-Hydroxypyridyl- und N-Hydroxyindolyl-, was uns zu regioselektiven Alkylierungen und zur Bildung von Carbamaten und Phosphonaten führt.^[42,43] Einfach (**14**) oder doppelt O-substituierte (**15**) Verbindungen mit Phosphorsäuregruppen tragenden Alkylketten zeigten in vielen Fällen *in vitro* wie *in vivo* ausgezeichnete Wirksamkeit bei gleichzeitig verbesserter Wasserlöslichkeit (Abbildung 8a).^[42] Solche Derivate könnten geeignete Prowirkstoffe sein, da Phosphonooxymethylether bekannte Substrate für die Hydrolyse durch Phosphatasen sind, die in diesem Fall zur Freisetzung von Nocathiacin I führen würde.^[44] Selbst wenn man die Entwicklung des Thiopeptid-Prowirkstoffs als sehr konservative Strategie erachtet, ermöglicht sie die Beibehaltung der Wirksamkeit und umgeht die fehlende Löslichkeit des Naturstoffs. In ähnlicher Weise führte die regioselektive Substitution an einem der Threoninreste von QN3323 A (Abbildung 4b) mit entweder Oximbildung oder reduktiver Aminierung an der Methylketoneinheit zu Derivaten (**16**) mit verbessertem *In-vitro*-Profil (Abbildung 8b).^[45,46] Allgemein haben sich die Modifikationen an den Nocathiacinen und am QN3323 A, die beide am Ribosom-L11-Proteinkomplex angreifen, auf Modifikationen

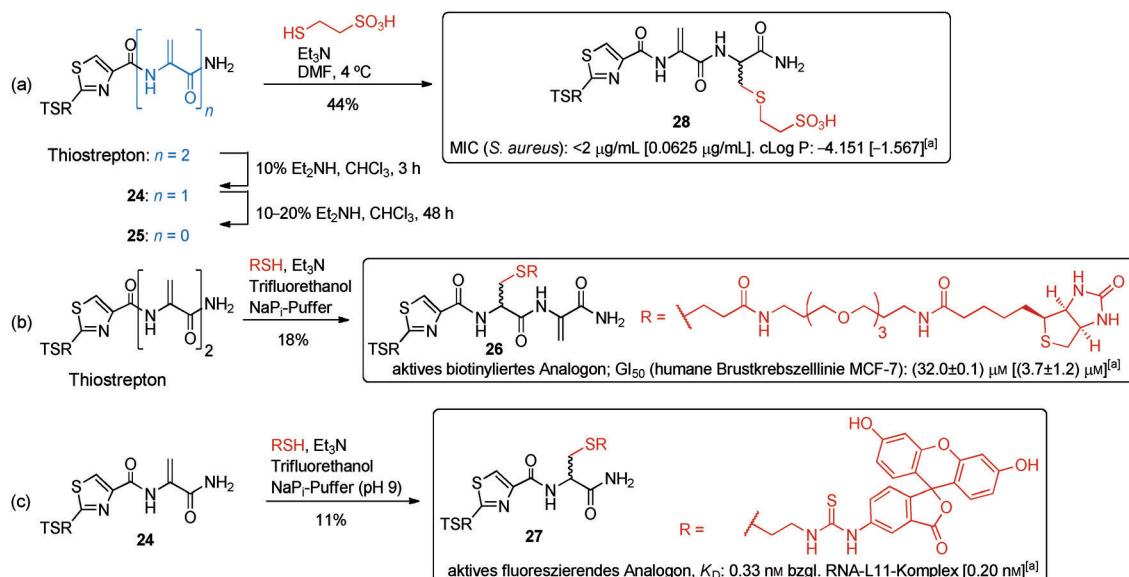


Abbildung 7. Beispiele semisynthetischer Modifikationen des Thiomakrocyclus. TSR = Thiomakrocyclus; cLogP: berechneter Verteilungskoeffizient für die Phasen Octanol und Wasser; GI₅₀: Wirkstoffkonzentration für 50% Wachstumshemmung; K_D: Dissoziationskonstante. [a] Aktivitäts- und Löslichkeitswerte des Naturstoffs in Klammern neben denen des Analogons.

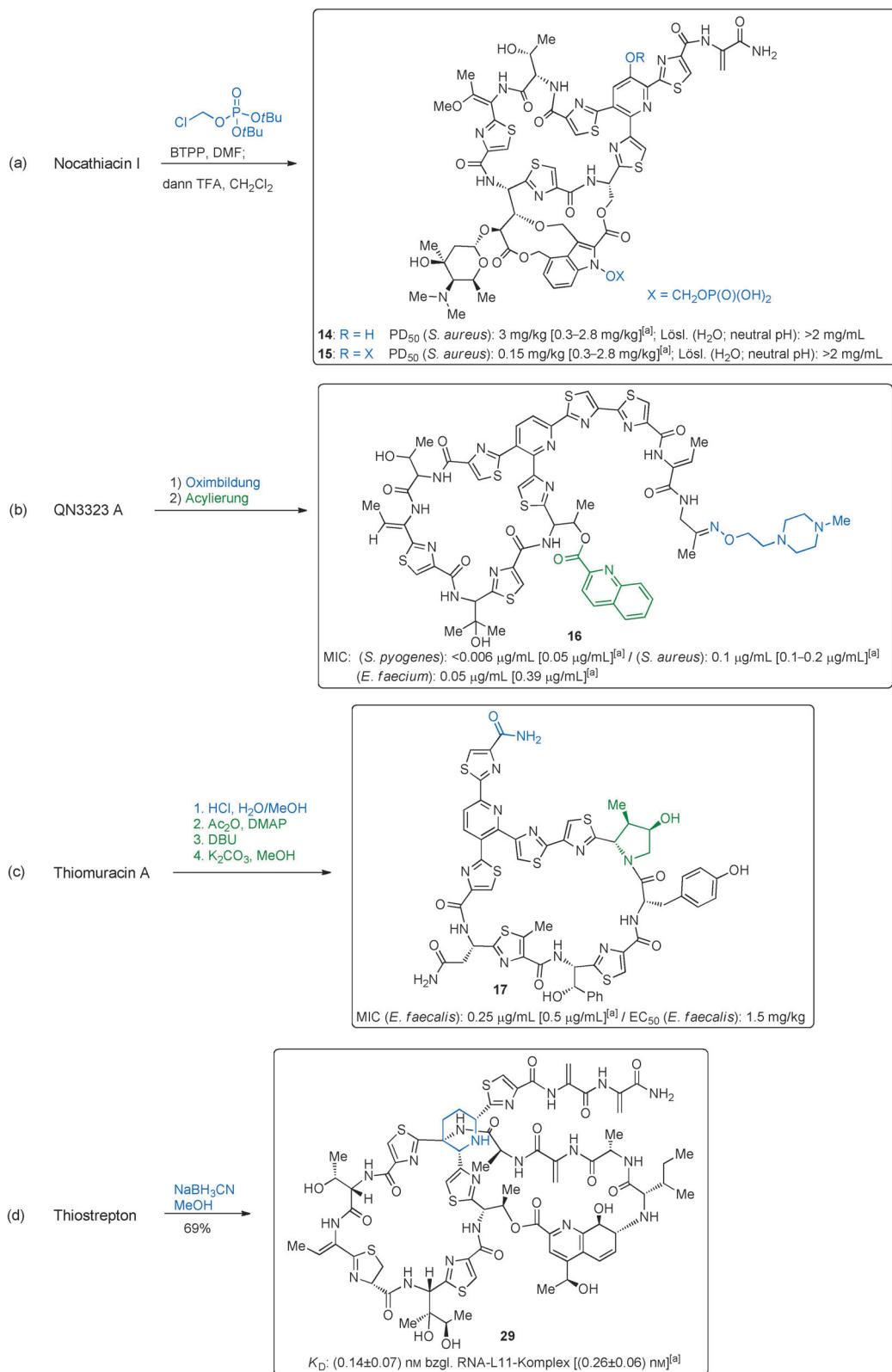


Abbildung 8. Beispiele für semisynthetische Modifikationen des Thiopeptidmakrocycles. PD_{50} : Dosis, die erforderlich ist, um 50% der infizierten Tiere zu heilen; K_D : Dissoziationskonstante. [a] Aktivitäts- und Löslichkeitswerte des Naturstoffs in Klammern neben denen des Analogons.

am Molekülschwanz und auf die Funktionalisierung an der „rechten“ Seite des Makrocycles konzentriert, die in weiten Grenzen toleriert wurden. Dieser Bereich ihrer Makrocycles ist sehr weit von der stark konservierten „linken“ Seite ent-

fernt, die sie mit dem Thiostrepton gemeinsam haben, und die als Teil des Pharmakophors identifiziert werden konnte (Abbildung 3).

Am Thiomuracin A wurden eine Reihe unterschiedlicher Transformationen vorgenommen (Abbildung 4c).^[47] Ein natürlicherweise vorhandenes Epoxid erwies sich als hervorragender Ansatzpunkt für umfängliche Derivatisierungen und ermöglichte die Bildung des substituierten Prolinrestes von **17** (Abbildung 8c). Dieser Pyrrolidinring trug jedoch Methyl- und Hydroxygruppen; seine Substitution unterschied sich von der der natürlicherweise auftretenden Reste von Thiomuracin I^[18] und GE37468.^[48] Die Entfernung dieses Molekülschwanzes führte zu noch robusteren und einfacheren Produkten. **17** behielt seine Wirksamkeit und zeigte in vitro eine allgemein erhöhte Wirkstärke; die In-vivo-Wirksamkeit war jedoch abhängig vom Bakterienstamm (Abbildung 8c). Derartige vereinfachte Analoga erleichterten außerdem die weitere Wirkstoffentwicklung.

Ebenso wie den Amythiamicinen fehlt auch GE2270 A (Abbildung 4d) jedwede Dehydroaminoäurefunktion. Trotzdem ist es eines der am besten untersuchten und am ausgiebigsten durch Semisynthese derivatisierten Thiopeptide.^[49] Obgleich das Molekül keine Michael-Akzeptoren für die Addition von Nucleophilen aufweist, existieren viele Berichte über Modifikationen und Abbau seines eigentümlichen Schwanzes, die zu einer großen Zahl von Analoga mit verbesserter Löslichkeit geführt haben, wie etwa **18** (Abbildung 6a). Eine weitere reaktive Stelle von GE2270 A ist die Seitenkette des Phenylserins,^[50,51] die modifiziert oder sogar entfernt werden kann. Wird sie entfernt, entsteht an ihrer Stelle in derselben Weise ein Glycinrest, wie dies am Thiomuracin A durch Transformation möglich ist (Abbildung 4c,d).^[47] Da Modifikationen des Makrocyclus zu keinen interessanten Verbindungen geführt hatten, konzentrierten sich die Anstrengungen auf den Austausch des Schwanzbereiches (Abbildung 6).^[52] Säurebehandlung von GE2270 A bewirkt eine Umlagerung des Schwanzes und liefert den Thiazol-4-carbonsäureester **19**, der unter basischen Bedingungen zu der entsprechenden Säure (**20**) hydrolysiert oder zum Alkohol **21** reduziert werden kann.^[51] Die Säure **20** kann dann mit Aminen oder Peptiden kondensiert werden, und der Alkohol **21** kann ebenfalls in vielen verschiedenen Reaktionen eingesetzt werden (Abbildung 6a).^[53] Von ungefähr 5000 Verbindungen, die auf diese Weise erhalten wurden, zeigten jedoch nur einige wenige Wirksamkeit bei gleichzeitig guter Löslichkeit. Interessanterweise war allen gut funktionierenden Substanzen ein Motiv gemeinsam, eine Carbonsäurefunktion, die wenigstens fünf Atome vom Thiazolring entfernt lag, was auf einen neuen wichtigen Kontakt dieser funktionellen Gruppe mit dem biologischen Ziel EF-Tu hinwies.

In jüngerer Zeit sind durch LaMarche et al. herausragende Ergebnisse erzielt worden. Die Forscher haben ihre Modifikationen auf die Substitution des 4-Aminothiazolyl-analogons gegründet, das aus der Curtius-Umlagerung der „schwanzlosen“ Verbindung GE2270 A resultiert (Abbildung 6b). Das Aminothiazolyl-Analogon kann noch weiter zum Picolinamid-Derivat abgebaut werden, doch auch dieses hatte keine Wirkung.^[54] Der 4-Aminothiazolylanteil ermöglichte die Bildung eines Imidazolrings, der eingesetzt wurde, um das ursprüngliche Oxazolin zu substituieren. Dieses und weitere imidazolhaltige Analoga zeigten jedoch in vitro ein

unbefriedigendes Verhalten.^[55] Zahlreiche weitere substituierte 4-Aminothiazolyl-Analoga wurden synthetisiert; dies führte zur Entdeckung der Cyclohexansäure-Serie (**22**) (Abbildung 6b),^[56,57] deren Mitglieder entweder durch eine Amid- oder eine Carbamatgruppe mit dem Thiazol verbunden sind. In beiden Fällen ist eine Carbonsäurefunktion vorhanden, die wiederum mindestens fünf Atome vom Thiazolrest entfernt liegt. Cokristallstrukturen von EF-Tu mit einem gebundenen Analogon mit Cyclohexansäurefragment enthielten, dass der vorhergesagte entscheidende Kontakt zwischen diesem Molekülteil und dem Elongationsfaktor tatsächlich existiert.^[56] Diese Verbindungen hatten in vitro Wirkstärken, die mit dem als Ausgangssubstanz verwendeten Naturstoff vergleichbar waren, ihre erhöhte Löslichkeit ließ aber die In-vivo-Prüfung zu, was zu ausgezeichneten Profilen dieser Stoffe führte.^[58] Die weitere Derivatisierung der Cyclohexansäure-Serie führte zur Entdeckung von LFF571 (**23**; Abbildung 6b), das am Carbamatteil eine zusätzliche Alkylkette mit Carboxylgruppe trägt, was die Löslichkeit noch weiter verbessert.^[59] Dieses neue Analogon ist das erste, das klinisch erprobt wird: es wird bei Menschen mit Darminfektionen mit *Clostridium difficile* eingesetzt. Trotz seiner verbesserten Löslichkeit findet sich **23** infolge seiner schlechten Membrangängigkeit nicht in hoher Konzentration im Blut. Wird es oral verabreicht, akkumuliert es im Stuhl. Dies macht die Substanz zu einem idealen Kandidaten für die Behandlung von Darminfektionen durch *C. difficile*. Bei der Prüfung in vivo zeigte es ein exzellentes Verhalten,^[60,61] und es konnte nachgewiesen werden, dass es noch immer den Elongationsfaktor Tu angreift.^[62]

Diese Ergebnisse zeigen auf, dass ein semisynthetischer Ansatz eine ausgezeichnete Strategie für die Ermittlung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen und die Hochdurchsatz-Durchmusterung derartig großer Moleküle ist. Der Umstand, dass nur einige wenige chemische Umwandlungen notwendig sind, belegt den Wert dieser Methode für die Herstellung hochkomplexer Moleküle in relativ großen Mengen.

Ungeachtet seiner komplexeren Architektur konnte Thiomstrepton an vielen verschiedenen Molekülteile selektiv modifiziert werden (Abbildung 4e). Abgesehen von den verbreiteten Dha-Resten liegen noch andere Fragmente vor, die für Modifikationen empfänglich sind. Im Verlauf ihrer Untersuchungen der Hemmung des Transkriptionsfaktors Forkhead Box M1 (FOXM1)^[63] mit Thiomstrepton, synthetisierten Balasubramanian et al. verschiedene überraschende Analoga.^[64] Als erstes gelang die Ketalbildung unter Heranziehung des dihydroxylierten Ile-Restes (Abbildung 4e). Die Autoren wiesen jedoch darauf hin, dass die Transformation schlecht reproduzierbar war. Eine der überraschendsten Umwandlungen, von denen berichtet wurde, ist jedoch die Cycloaddition von Danishefskys Dien an die Doppelbindung der Chinaldinsäureeinheit (Abbildung 4e). Unglücklicherweise ging die inhibitorische Wirkung von FOXM1 nach dieser Modifikation vollständig verloren. Eine weitere hervorstechende Modifikation war der selektive Abbau des Dha-Schwanzes, von dem die Gruppe um Arndt berichtet hat. Dabei ergaben sich je nach Reaktionsbedingungen Produkte mit einem einzelnen Dha (**24**) oder solche ohne jeden Schwanzbereich (**25**; Abbildung 7a)^[65] Thiomstrepton und

seine Mono-Dha-Analoga waren der selektiven Michael-Addition mit verschiedenen Thiolen zugänglich. Die daraus resultierenden Produkte wurden in einer Reihe von Untersuchungen eingesetzt. Dazu gehörten die Funktionalisierung durch Markierung mit Biotin (**26**), um die zuvor erwähnte Hemmung von FOXM1 (Abbildung 7b) weiter zu untersuchen, SAR-Studien von Thiotreponanaloga als Antimalariamittel,^[66] die Derivatisierung mit Fluoreszenzfarbstoffen (**27**) für die Untersuchung der Bindung an das Ribosom, (Abbildung 7c)^[65,67] sowie die Untersuchung, welchen Einfluss der Schwanzbereich des Thiotrepons auf die Hemmung der Translation (Proteinbiosynthese) hat. Dies schließt Untersuchungen am Translationsapparat Gram-negativer Bakterien ein.^[24]

Im Unterschied zu dem, was man im Allgemeinen in Experimenten zur Hemmung des bakteriellen Wachstums beobachtet, weist die FOXM1-Inhibition keine Toleranz gegenüber subtilen Modifikationen des Molekülschwanzes.^[64] Die Entfernung des Molekülschwanzes führte zu einem inaktiven Analogon, und obwohl das biotinierte Thiotrepon (**26**) weiterhin aktiv war (Abbildung 7b), war für die Aufrechterhaltung der biologischen Wirksamkeit der unveränderte Dha-Rest vonnöten. Diese Ergebnisse scheinen darauf hinzudeuten, dass der Molekülschwanz bei der Inhibition von FOXM1 eine bedeutendere Rolle spielt als bei der Störung der bakteriellen Proteinsynthese.

Unter den weiteren Modifikationen des Thiotrepons finden wir die selektive Oxidation des Thiazolinrings zum korrespondierenden Thiazol in hoher Ausbeute (Abbildung 4e). Dies eröffnete im Zusammenhang mit der selektiven Eliminierung eines einzelnen Dha-Restes den Zugang zu einer Reihe von Michael-Additionsprodukten mit verbesselter Antimalariawirksamkeit. Bei diesen waren verschiedene Alkyl- und Hydroxyalkylseitenketten in den Schwanzbereich der Moleküle eingeführt worden.^[66] In derselben Studie wird berichtet, dass die Solvolyse des chinaldinsäurehaltigen Rings zu einem einfach makrocyclischen Analogon ohne jede Aktivität führt, was abermals die Bedeutung der makrocyclischen Anordnung unterstreicht.^[68,69] Die Einführung eines Sulfonsäurerestes in die Schwanzregion des Thiotrepons ergab das Analogon **28**, das die Translationsapparate Gram-positiver wie Gram-negativer Bakterien hemmt (Abbildung 7a).^[24] Dieses Ergebnis stützt ein Modell, nach dem das Ausbleiben einer inhibitorischen Wirkung auf Gram-negative Bakterien auf Unterschiede im Aufbau der Zellwand zurückzuführen ist. Der Umstand, dass sowohl die Antimalariawirkung wie die antibakterielle Wirkung nach Modifikation des Schwanzbereichs des Thiotrepons erhalten bleiben, lässt sich durch die enge Verwandtschaft der Ribosomen von Bakterien und Apicoplasten erklären. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Thiotreponderivate auch das 20S-Proteasom angreifen. Die doppelte Wirkung könnte zu effektiveren Antimalariamitteln führen.^[66]

Um die Wechselwirkung des Thiotrepons mit dem Bakterienribosom zu untersuchen, wurde der Schwanz des Moleküls mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (**27**) (Abbildung 7c).^[65] Damit wurde der Frage nach den molekularen Determinanten von Resistzenzen nachgegangen. Gleichzeitig ergab sich ein vertieftes Verständnis für die Art

der Bindung an das Organell.^[67] Die Untersuchung ergab, dass Mutationen an Komponenten des Ribosoms die Affinität des Thiopeptids zum Ribosom-L11-Proteinkomplex herabsetzte, wohingegen Mutationen des L11-Gens dies nicht zur Folge hatten. Das deutet darauf hin, dass Thiotrepon einen engeren Kontakt zum Ribosom hat und nicht genau in der Mitte der Spalte des Komplexes sitzt. In einer separaten Untersuchung wurde bei der selektiven Reduktion des Dehydropiperidinrings im Zentralbereich des Thiotrepons zu dem vollständig gesättigten Analogon **29** ein guter Umsatz erzielt. Die Verbindung hat eine erhöhte Affinität zum Ribosom (Abbildung 8d). Demnach haben Thiopeptide keine perfekte Passung für ihre Zielstrukturen, welche eine große Substrattoleranz aufweisen.^[70]

Obwohl die Derivatisierung des Thiotrepons nicht so ausgedehnt war wie die anderer Thiopeptide, haben seine größere Vielfalt an reaktiven Stellen und seine verschiedenenartigen biologischen Wirkungen zu vielgestaltigeren Resultaten geführt. Der Einsatz unterschiedlicher Markierungen und der Einfallsreichtum von Forschern haben zahlreiche Felder durch Heranziehung nur weniger Thiotreponanaloga zusammengeführt. Somit sind Thiopeptide nicht nur gute Kandidaten für die Entwicklung neuer Wirkstoffe, sondern auch eine ausgezeichnete Plattform für Untersuchungen im Bereich der chemischen Biologie. Das Gesamtbild der semi-synthetischen Modifikation von Thiopeptiden zeigt die große Promiskuität der zugehörigen biologischen Zielmoleküle auf, die in der Hauptsache im Schwanzbereich der Moleküle zu suchen ist. Während die Entfernung des Schwanzbereichs oder die Anfügung einer großen Auswahl an funktionellen Gruppen im Allgemeinen unter Erhaltung der Aktivität erfolgen können, ergibt die Funktionalisierung oder die Entfernung verschiedener Teile des makrocyclischen Molekülerüstes für gewöhnlich inaktive Analoga. Dies führt uns zu der Schlussfolgerung, dass Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zielmoleküle und dem Makrocyclus spezifischer sind und erhalten bleiben müssen.

2.3. Analoga-Bildung *in vivo*

Die Strukturen der Thiopeptide ergeben sich im Gegensatz zu den häufigeren von Peptiden abgeleiteten Naturstoffen, die durch nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) gebildet werden, aus umfangreichen Modifikationen eines ribosomal synthetisierten Prä-Peptids.^[71] Ihre ribosomale Abkunft weist darauf hin, dass die Peptidsequenz genetisch codiert ist. Tatsächlich hat man die Strukturgene vieler Thiopeptide in demselben Gencluster gefunden, der auch die Enzyme für ihre posttranslationalen Modifikationen codiert (Abbildung 9a).^[12,13] Die Strukturgene der Thiopeptide codieren ein Präpeptid mit zwei Abschnitten: der C-terminalen Sequenz (Strukturpeptid), welche das reife Thiopeptid ergibt, und der N-terminalen Sequenz für das so genannte Führpeptid, das beim Durchlaufen des Biosyntheseweges verlorengeht (Abbildung 9b). Die wesentlichen posttranslationalen Modifikationen des Präpeptids sind bei allen Thiopeptiden gleich (Abbildung 9c). Als erstes entstehen durch Dehydratisierung von Ser und Thr im Zusammenspiel mit der

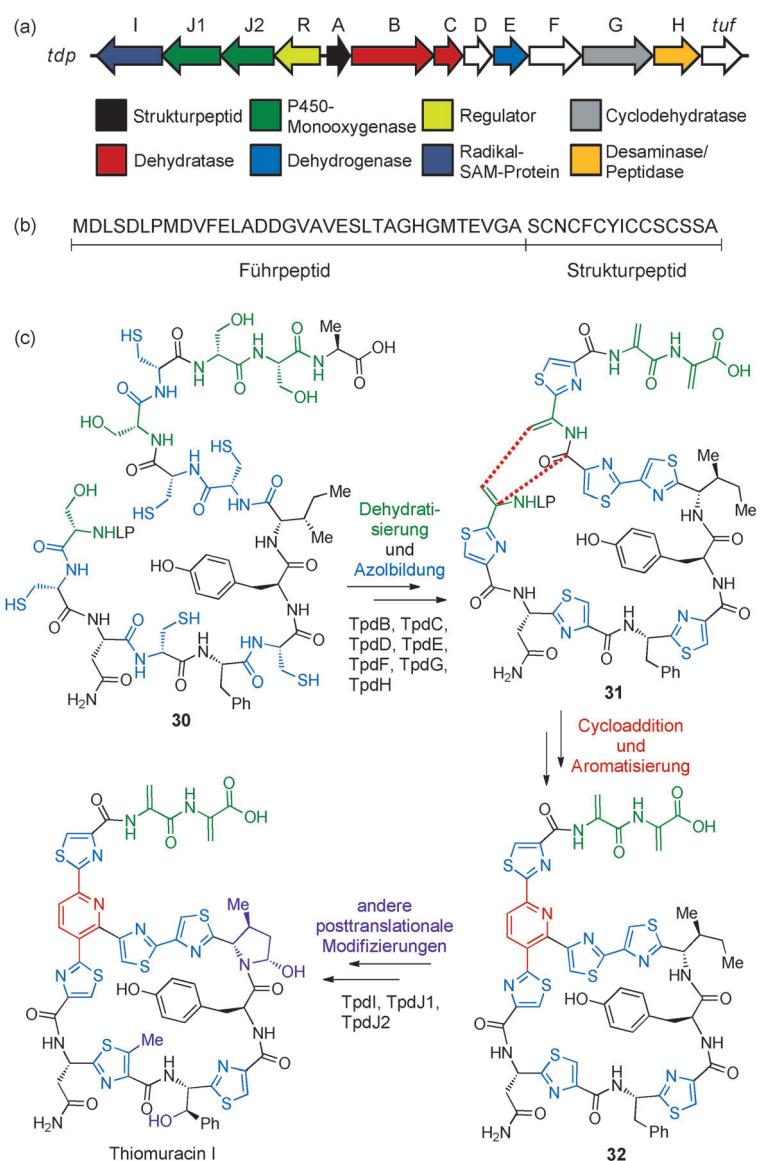


Abbildung 9. Thiopeptidbiosynthese. (a) Thiomuracin-Gengruppe; das Gen „*tdpX*“ codiert das zugehörige Protein/Enzym „TdpX“. (b) Thiomuracin-Präpeptid. (c) Vorschlag für den Thiomuracin-I-Biosyntheseweg. LP = Führpeptid.

Cyclodehydratisierung/Oxidation von Ser, Thr und Cys des Präpeptids **30** die charakteristischen Dehydroaminoäuren und -azole. Die Cycloaddition von zwei Dehydroalaninresten von **31** ergibt den Makrocyclus und den zentralen Sechsring von **32**. Zusätzliche Abänderungen können spezifischere Merkmale wie einem zweiten Makrocyclus, Methylierungen, Hydroxylierungen, Indol- und Chinaldinsäureresten usw. hervorbringen. Mutationsstudien am Gens des Präpeptids sowie an den es umgebenden enzymcodierenden Genen haben Einsichten in den Biosyntheseweg der Thiopeptide,^[3,72] Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und den Toleranzgrad des enzymatischen Apparates gegenüber Modifikationen geliefert.

Obgleich diesem Ansatz ein großes Potenzial hinsichtlich der Erzeugung von Analoga innewohnt, müssen einige Schwierigkeiten überwunden werden, um genügend wirksame

Derivate herzustellen. Erstens fallen die mit Zellkulturen erzielbaren Ausbeuten oftmals deutlich ab, wenn durch Mutagenese nur ein Rest konservativ ausgetauscht wurde, sodass umfangreiche Optimierungen notwendig werden, um eine effiziente Produktionsleistung zu erzielen.^[73] Darüber hinaus werden zahlreiche Mutationen des Präpeptids von den modifizierenden Enzymen nicht toleriert. Dies führt dazu, dass ein riesiges Gebiet des chemischen Raumes mit dieser Methode nicht ergründet werden kann. In gleicher Weise unterliegen nichtnatürliche Aminosäuren den Präferenzen dieses molekularen Apparates und müssen während der Translation mit den natürlichen Substraten konkurrieren, was zu Produktgemischen und noch niedrigeren Ausbeuten führt. Schließlich vermag der Einsatz von Knock-out-Mutanten (KO-Mutanten) höchst interessante nichtnatürliche Analoga liefern. Wegen der sequenziellen Natur des Biosyntheseweges ist es jedoch nicht möglich, die meisten Transformationen auszuführen, die nachfolgend ablaufen sollten, da die dazu notwendige Substraterkennung nicht gegeben ist. Daher wird nur ein „KO“ derjenigen Enzyme, welche die letzten Umwandlungen im Verlauf des Reifungsprozesses vermitteln, hinreichend reife Analoga liefern.

Die Gruppen um Walsh und Kelly haben Studien über Einzelrest-Austauschmutationen an Thiocillin,^[74,75] GE37468^[76] und Thiomureptone^[77,78] vorgelegt (Abbildung 10). Die Charakterisierung der auf diesem Wege erhaltenen Produkte lieferte sehr wertvolle Informationen, zum Beispiel darüber, ob der entsprechende Austausch von den modifizierenden Enzymen akzeptiert wird oder, falls dies nicht der Fall ist, auf welcher Stufe sich der für die Erkennung entscheidende Rest findet. Die Produktion derartiger Analoga macht die Fermentation hinreichend großvolumiger Flüssigkulturen notwendig, die eine für die Strukturbestimmung ausreichende Menge Produkt abwerfen. Ungeachtet der dadurch gewinnbaren Information, kann dieser Prozess aufwändig sein. Für die Produktion einer großen Zahl von Analoga ist er nicht geeignet. Walsh und Mitarbeiter berichteten kürzlich von einer Codon-Randomisierung im Rahmen der Untersuchung von Mutationenformen des Präpeptids von GE37468 (Abbildung 10a).^[79] Dadurch wurde der Austausch ausgewählter Reste gegen beliebige andere proteinogene Aminosäurereste möglich. Dies belegt, dass mit dieser Vorgehensweise eine sehr viel raschere Evaluierung von Analoga möglich ist als mit Kolonien auf festen Nährböden. Hochdurchsatz-MALDI-TOF-Analysen an Kolonieproben ergaben, dass 29 der Proben ausreichende Mengen des reifen Analogons bereitstellen können. Flüssigkulturen der entsprechenden Kolonien wurden weitergehend untersucht und sequenziert, um die vorliegende Mutation zu ermitteln. Diese Kolonien erzeugen Produktgemische, die aus dem erwarteten vollständig reifen Analogen sowie partiell oder alternativ prozessierten Pro-

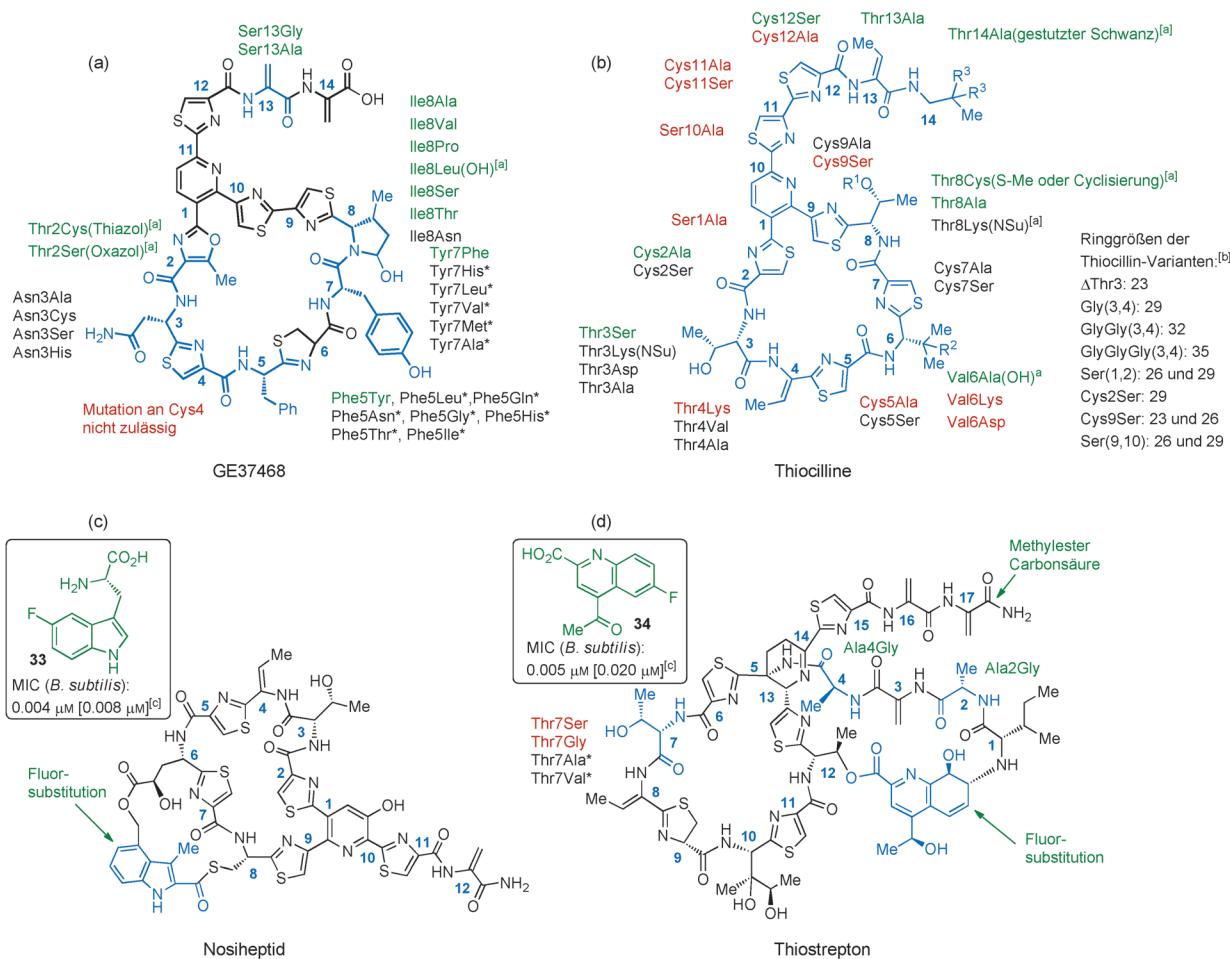


Abbildung 10. Erzeugung von Analoga durch Mutagenese des Gens für das Präpeptid, durch Zugabe modifizierter Bausteine oder durch Gendelenktion: (a) GE37469; (b) Thiocilline; (c) Nosiheptid; (d) Thiomstrepton. Modifikationen, die zu aktiven Analoga führen, sind grün unterlegt. Austausche von Resten, die zu inaktiven reifen Produkten führten, sind in schwarz angegeben, solche, die nicht zu reifen Produkten führten oder keine ausreichenden Ausbeuten für weitere Prüfungen ergaben, sind rot wiedergegeben. Ein Sternchen (*) zeigt solche Mutationen an, die zu einer Abänderung der weiteren Prozessierung des Produkts führten. [a] Posttranskriptionale Modifikationen mutativ veränderter Reste, zum Beispiel Hydroxylierung (OH), Azolbildung, N-Succinylierung (NSu) usw., sind in Klammern angegeben. [b] Die bezeichneten Mutationen führen zu Analoga mit abweichender Makrocyclusgröße, die neben der Mutation angegeben ist; Δ = Deletion; eingeklammerte Zahlen bezeichnen neue Reste, die zwischen den angegebenen Positionen in die Peptidsequenz eingeführt wurden. Die Verbindungen 33 und 34 wurden für Fütterungsexperimente verwendet; mit dieser Methode fluorinierte Positionen sind in der Struktur des Thiopeptids mit „F“ gekennzeichnet; die Aktivitätswerte gelten für die reifen Analoga, die Aktivitätswerte des Naturstoffs ist in Klammern angegeben.

dukten bestehen. Bemerkenswert ist, dass der Thr2Cys-Austausch (Austausch des Threonylrestes an der Position 2 gegen einen Cysteinylrest) die Wirkung *in vitro* verstärkte, während sie bei Thr2Ser gleichblieb. Obgleich diese Mutationen ziemlich konservativ sind, da sie zur Bildung anderer Azole führen (Abbildung 10a), weist die Möglichkeit der Erzeugung derartiger Analoga auf eine vielversprechende Substrattoleranz des Thiopeptid-Biosyntheseapparates hin, sodass neue Bereiche des chemischen Raums auf erhöhte Wirkstärke hin abgesucht werden könnten. Es soll auch erwähnt werden, dass Ile8 zahlreiche Substitutionen tolerierte. Im Fall von Ile8Leu fanden sich Produkte unterschiedlicher Oxidationsstufen, was bedeutet, dass das für die Oxidation von Ile8 verantwortliche Enzym einen Leu-Rest an dieser Stelle toleriert. Der Austausch von Ile8 gegen andere Aminosäuren, hauptsächlich Aminosäuren mit Alkylseitenketten, wurde toleriert und führte zu Analoga mit antibakterieller

Aktivität. Das deutet darauf hin, dass dieser Aminosäurerest keine entscheidenden Kontakte mit EF-Tu, dem Zielmolekül, bildet. Auch Asn3 konnte ausgetauscht werden (Abbildung 10a); keines der Produkte erwies sich jedoch als aktiv, was auf die bedeutsame Rolle dieses Restes für die Bindung des EF-Tu hindeutet. Ein Blick auf die Strukturen der anderen 29-gliedrigen Thiopeptide – der Amythiamicine, dem Baringolin, GE2270 A, GE37468 A und der Thiomuracine – zeigt, dass Asn3 in allen erhalten geblieben ist. Das bestätigt seine Wichtigkeit.

Modifikationen des Präpeptids, die darauf zielen, Thiocillinanaloga mit verschiedenen Makrocyclusgrößen zu generieren, wurden von der Walsh-Gruppe ebenfalls untersucht (Abbildung 10b).^[80] Zwei unterschiedliche Strategien kamen zum Einsatz, um solche Analoga zu erhalten. Auf der einen Seite führte die Deletion von Thr3 oder die Einführung von bis zu drei zusätzlichen Gly-Resten zwischen Thr3 und Thr4

zu Analoga mit Makrocyclen aus 23, 29, 32 und 35 Atomen. Obwohl es Thiopeptide mit unterschiedlich großen Makrocyclen gibt, kommen in der Natur bei dieser Familie von Verbindungen solche mit 23- oder 32-gliedrigen Ringen nicht vor. Um alternative Makrocyclen zu erzeugen, wurden neue Ser-Reste in das Präpeptid inkorporiert. Dabei wurden entweder bereits existierende Aminosäurereste ausgetauscht, oder sie wurden zwischen zwei in der natürlichen Sequenz aufeinanderfolgende inseriert. Auf diese Weise kam es, nachdem die Dehydratisierung des Ser stattgefunden hatte, zur Konkurrenz von Dha-Resten, und es entstanden neue Verbindungen mit unterschiedlichen Ringgrößen oder Gemische solche Verbindungen. All diesen Analoga-Serien fehlt die antibiotische Aktivität. Diese Befunde belegen jedoch, dass *TclM*, das Enzym, das die mutmaßliche Cycloaddition vermitteln soll, sehr promisk ist und daher für die Produktion zahlreicher Analoga, die sich gegen andere Ziele als das Ribosom oder Elongationsfaktoren richten könnte, einsetzbar wäre.

Inaktivierungsexperimente zur Aufklärung der Rolle der verschiedenen, von der Thiopeptid-Gengruppe codierten Enzyme haben Analoga geliefert. So lässt sich das bereits erwähnte *TclM* durch Deletion des Gens *tclM* „inaktivieren“, um zu linearen Thiocillin-Vorstufen zu gelangen.^[81] Obgleich diese linearen Analoga vollständig inaktiv sind, belegt dieser Befund, dass *TclM* dasjenige Enzym ist, das den Cycloadditionsschritt katalysiert. Die Inaktivierung von Enzymen, die an der Reifung des Molekülschwanzes beteiligt sind, ergibt aktive makrocyclische Analoga, was abermals auf das hohe Maß an Toleranz gegenüber Modifikationen in diesem Bereich verweist. Diese Enzyme wirken nach der Cycloaddition, was dazu führt, dass man sehr ausgereifte Produkte erhält, die die meisten für Thiopeptide kennzeichnenden Strukturmerkmale aufweisen. Das terminale Amid des Thiotreptons kann durch die Inaktivierung von *TsrS* oder *TsrT* gegen die entsprechenden Methylester oder die freie Carbonsäurefunktion ausgetauscht werden (Abbildung 10d).^[82,83] Thiotreptonmethylester erwies sich als zehnmal stärker wirksam als das natürlich vorkommende Amid; seine Löslichkeit war allerdings substanzell vermindert. Das Profil der Thiotreptonsäure war dem entgegengesetzt: Ungeachtet einer verbesserten Löslichkeit lag *in vitro* ihre Wirkstärke niedriger.

Die verschiedenen existenten Wege der Amidbildung bei Thiopeptidschwänzen bietet eine Gelegenheit für die Isolierung von Zwischenstufen, die sich von denen des Thiotreptons unterscheiden. Ein solcher Fall liegt beim Nosiheptid vor, dessen C-terminale Amidfunktion nach Abspaltung des letzten Dha-Restes des Strukturpeptids durch *NosA* entsteht. Eine Fermentation mit einer *nosA*-KO-Mutante liefert Nosiheptid mit einem zusätzlichen Dha-Aminosäurerest, der *in vitro* der Wirkstärke nicht abträglich ist.^[84] Die Inhibition of the Methyltransferase *NosN* resultiert in der Bildung eines Analogs, das den gleichen erweiterten Schwanzbereich aufweist; in diesem Fall wird jedoch der zweite Makrocyclus des Nosiheptids nicht gebildet. Dies belegt, dass *NosN* für die 4'-Methylierung des Indolsäureanteils des Moleküls verantwortlich zeichnet, der für die nachfolgende Cyclisierung unabdingbar ist.^[85] Darüber hinaus ergibt sich hieraus die Abfolge der Transformationen im Biosyntheseweg. Mit diesen

Experimenten lassen sich der Biosyntheseweg und die Produktion von Analoga *in vivo* synergistisch untersuchen.

Indol- und Chinaldinsäurefunktionen finden sich im zweiten Makrocyclus verschiedener Thiopeptide. Im Verlauf der Untersuchung der Biosynthese dieser Molekülteile konnten Liu und Mitarbeiter die Rolle verschiedener Enzyme offenlegen, die für die Konversion von Trp in diesen Fragmenten verantwortlich sind.^[86–88] Da der Ausgangs-Trp-Rest in der Sequenz des Präpeptids nicht zu finden ist und erst nach seiner eigenen Prozessierung in das Thiopeptid eingebaut wird, sind Fütterungsexperimente mit Trp-Derivaten möglich. Es konnten sowohl Indol- als auch Chinaldinsäure-haltige Thiopeptide gewonnen werden. Beide ergaben sich aus der Einschleusung fluorierter Vorstufen in den Biosyntheseweg. Zugabe von 5-Fluor-D,L-tryptophan (33) zu *S.-actuosus*-Kulturen führte zum Einbau der modifizierten L-Aminosäure-resten in das Nosiheptidgerüst; dabei entstand neben dem Naturstoff auch 5'-Fluornosiheptid (Abbildung 10c).^[86] Bemühungen, mit dem isolierten Enzym *NosL* andere vom Trp abgeleitete Indolsäurederivate als das fluorierte zu erzeugen, schlugen fehl. Dieses Enzym ist für die Transformation von Trp zu 3-Methylindolsäure verantwortlich,^[87] aber diese Resultate gehen auf seine hohe Substratspezifität zurück, die die Zahl der mit dieser Strategie darstellbaren Analoga stark begrenzt. Um ein 6'-fluoriertes Thiotretonanalogon darzustellen, wurde einer Kultur mutierter *S.-laurentii*-Zellen, denen das Gen *tsrT* fehlt, das Chinaldinsäurederivat 34 zugesetzt. *TsrT* ist eine Methyltransferase, die für die ersten Schritte der Umwandlung von Trp in Chinaldinsäure notwendig ist. Mit dieser Strategie wurde die Konkurrenz durch nichtmodifiziertes Trp vollständig umgangen, und man erhielt nur das gewünschte 6'-Fluorthiotreton (Abbildung 10d).^[88] In beiden Fällen führte die Fluorierung zu einer Steigerung der Wirkstärke *in vitro* (Abbildung 10c,d), was das große Potenzial der Mutasynthese unterstreicht.

Alternativ lassen sich modifizierte Thiopeptide auch aus Kulturen des Wildtyps des Produzentenstamms gewinnen, falls die Aktivität der Enzyme durch Modifikation verschiedener Faktoren wie dem pH-Wert, anwesenden Metallionen und anderen Additiven einer Feinabstimmung unterzogen wurde. Die *In-situ*-Umwandlung von Nocathiacin I in Nocathiacinsäure lässt sich so ohne Rückgriff auf Semisynthesen erreichen.^[89]

Allgemein lässt sich sagen, dass die meisten Punktmutationen nicht toleriert werden und nicht die erwarteten reifen Analoga hervorbringen. Das lässt sich besonders an den Codon-Randomisierungsexperimenten mit GE37468 A aufzeigen, bei denen man nur zu 29 von 133 möglichen Analoga gelangte.^[79] Ein kurzer Blick auf Abbildung 10 enthüllt, dass die aktivsten Analoga durch Modifikationen des Schwanzbereichs und der „rechten“ Hälfte des Thiopeptids gewonnen wurden. Hieraus ergibt sich eine ähnliche Schlussfolgerung wie bei der Bewertung der semisynthetischen Analoga: Die „linken“ Seiten der Moleküle, die die am höchsten konservierten Reste enthalten, stellen offenkundig die entscheidenden Kontakte zum biologischen Zielmolekül her.

Ungeachtet der Tatsache, dass durch *In-vivo*-Methoden einige stark modifizierte Produkte hergestellt wurden, haben Thiopeptide mit sehr konservativen Abwandlungen, die

noch immer ihre charakteristischen Makrocyclus aufwiesen, interessante Profile gezeigt. Tatsächlich vermag der enzymatische Apparat der Thiopeptid-Biosynthese keine Produkte hervorzubringen, die sehr verschieden von denen sind, für deren Herstellung sie entwickelt wurden. Obwohl dank des ribosomalen Ursprungs des Präpeptids ein Austausch von Resten möglich ist, sind solche Austausche bislang auf solche mit den 20 natürlichen proteinogenen Aminosäuren beschränkt geblieben. Ungeachtet dieser Limitierungen hat der Einsatz nichtnatürlicher Tryptophanderivate oder seiner prozessierten Metaboliten die Einführung von ihm abgeleiteter abgewandelter Molekülteile ermöglicht und den erforschbaren chemischen Raum erweitert.

3. Zusammenfassung und Ausblick

Die meiste Literatur zur Modifikation von Thiopeptiden ist sehr jungen Datums, und für die kommenden Jahre lassen sich weitere Fortschritte erwarten. Zusammen mit Informationen, die auf anderen Wegen gewonnen wurden, könnten weitere Modifikationen der Naturstoffe die Merkmale offenlegen, die den Thiopeptiden ihre riesige Wirkstärken verleihen, und sie könnten dazu dienen, sie und ihre Löslichkeit zu verbessern. Die verschiedenen Disziplinen, denen dieser Aufsatz gewidmet ist, sind aber möglicherweise nicht in der Lage, die erforderliche Diversität im Alleingang zu erzeugen. Wie bereits erwähnt, sehen sie sich alle irgendwelchen Limitierungen gegenüber, die auch die Formen der möglichen Modifikationen einschließen. Obgleich die chemische Synthese im Prinzip jedes denkbaren Analogon bereitzustellen in der Lage sein sollte, sind die oft langen und kostspieligen Synthesewege vielfach unrentabel, wenn es um die Herstellung von „Bibliotheken“ oder die Produktion im großen Maßstab geht. Eine Kombination aller genannten Strategien sollte daher ausgefeilte Analoga hervorbringen, die an den verschiedenen Stellen diejenigen Modifikationen aufweisen, die die einzelnen Ansätze jeweils beizusteuern vermögen (Abbildung 11).^[90] Zuerst könnte auf chemischem Wege ein Präpeptid hergestellt werden, das sowohl das Strukturpeptid wie das Präpeptid umfasst (Abbildung 11b), zum Beispiel durch Festphasen-Peptidsynthese. Auf dieser Stufe lassen sich zahlreiche Modifikationen einführen, zum Beispiel der Austausch von Aminosäureresten oder der Einbau nichtproteinogener Aminosäurereste, die sonst aufgrund des ribosomalen Ursprungs der Thiopeptide „verboten“ sind. Als nächstes kann die Reifung des Peptids mithilfe der enzymatischen Maschinerie eines geeigneten Stammes erfolgen, der sich gentechnisch anpassen lässt, und dessen Aufgabe darin besteht, das Thiopeptid gründlich maßzuschneidern. Die Zugabe modifizierter Indole würde dabei die Diversität erhöhen (Abbildung 11c). Nach der Isolierung der Substanz könnten semisynthetische Modifikationen vorgenommen werden, um die weitere Verbesserungen zu erreichen, so zum Beispiel das Anbringen von Molekülteilen, die die Löslichkeit erhöhen (Abbildung 11d).

In den kommenden Jahren werden wir wahrscheinlich neue Berichte über Thiopeptidanaloge lesen, die auf allen in diesem Aufsatz beschriebenen Wegen gewonnen wurden. Die

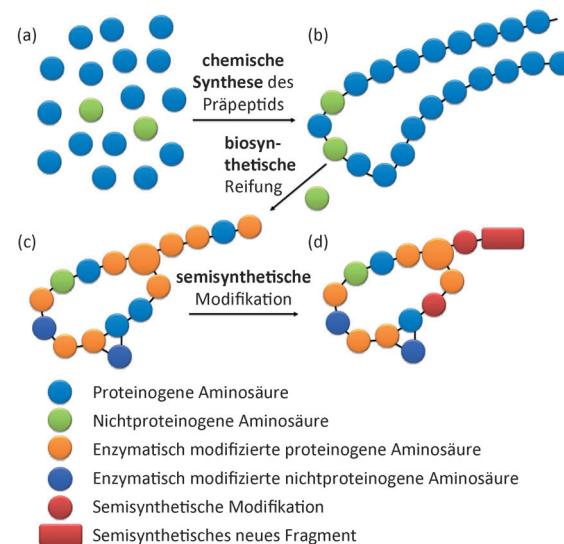


Abbildung 11. Vorgeschlagene Abfolge für die zukünftige Produktion hochgradig modifizierter Thiopeptidanaloge: Unter Verwendung proteinogener wie modifizierter Aminosäuren (a) könnten abgewandelte synthetische Präpeptide erzeugt werden (b). Eine Reifung *in vivo* sollte Thiopeptide mit den charakteristischen Strukturmerkmalen ergeben. Weitere, modifizierte Bausteine ließen sich einführen (c). Durch semisynthetische Modifikationen des isolierten Produktes ließen sich weitere Abwandlungen der Moleküle erreichen (d).

zu erwartenden Fortschritte werden uns ganz sicher ein tieferes Verständnis der Chemie und der Biologie dieser faszinierenden Naturstoffe vermitteln und die Vielseitigkeit der Synthesestrategien und -methoden, die Selektivität der semisynthetischen Ansätze und die Toleranzen der Biosyntheseapparate auf die Probe stellen.^[91]

Für Unterstützung bedanken wir uns beim Spanischen Ministerium für Wissenschaft und Innovation, bei CICYT (CTQ2012-30930) und bei der Generalitat de Catalunya (2009SGR 1024). X.J. dankt der ISCIII für ein PFIS-Stipendium.

Eingegangen am 19. August 2013
Online veröffentlicht am 23. Mai 2014

Übersetzt von Dr. Thomas Lazar, Paderborn

- [1] M. C. Bagley, J. W. Dale, E. A. Merritt, X. Xiong, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 685–714.
- [2] R. A. Hughes, C. J. Moody, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8076–8101; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7930–7954.
- [3] H. A. Kirst, *Expert Opin. Drug Discovery* **2013**, *8*, 479–493.
- [4] K. C. Nicolaou, B. S. Safina, M. Zak, A. A. Estrada, S. H. Lee, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5197–5202; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5087–5092.
- [5] K. C. Nicolaou, M. Zak, B. S. Safina, S. H. Lee, A. A. Estrada, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5202–5207; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5092–5097.
- [6] H. M. Müller, O. Delgado, T. Bach, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4855–4858; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4771–4774.
- [7] D. Lefranc, M. A. Ciufolini, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4262–4265; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4198–4201.

- [8] R. A. Hughes, S. P. Thompson, L. Alcaraz, C. J. Moody, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15644–15651.
- [9] V. S. Aulakh, M. A. Ciufolini, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5900–5904.
- [10] X. Just-Baringo, P. Bruno, L. K. Ottesen, L. M. Cañedo, F. Albericio, M. Alvarez, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 7972–7975; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7818–7821.
- [11] J.-Y. Lu, M. Riedrich, K. P. Wojtas, H.-D. Arndt, *Synthesis* **2013**, *45*, 1300–1311.
- [12] H.-D. Arndt, S. Schoof, J.-Y. Lu, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6900–6904; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6770–6773.
- [13] C. Li, W. L. Kelly, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 153–164.
- [14] J. Vandeputte, J. D. Dutcher, *Antibiot. Ann.* **1955**, *3*, 560–561.
- [15] J. E. Leet, H. A. Ax, D. R. Gustavson, D. M. Brown, L. Turner, K. Brown, W. Li, K. S. Lam, *Nocathiacin Antibiotics*, U.S. Patent US 6218398 B1, **2001**.
- [16] J. Shoji, H. Hinoo, Y. Wakisaka, K. Koizumi, M. Mayama, S. Matsuura, K. Matsumoto, *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 366–374.
- [17] E. Selva, G. Beretta, N. Montanini, G. S. Saddler, L. Gastaldo, P. Ferrari, R. Lorenzetti, P. Landini, F. Ripamonti, B. P. Goldstein, M. Berti, L. Montanaro, M. Denaro, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 693–701.
- [18] R. P. Morris, J. A. Leeds, H. U. Naegeli, L. Oberer, K. Memmert, E. Weber, M. J. LaMarche, C. N. Parker, N. Burrer, S. Esterow, A. E. Hein, E. K. Schmitt, P. Krastel, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5946–5955.
- [19] K. Engelhardt, K. F. Degnes, M. Kemmler, H. Bredholt, E. Fjaervik, G. Klinkenberg, H. Sletta, T. E. Ellingsen, S. B. Zotchev, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 4969–4976.
- [20] H. Abe, K. Katsuhiko, S. Yoshinori, K. Mitsuaki, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 1401–1404.
- [21] J. Thompson, E. Cundliffe, M. Stark, *Eur. J. Biochem.* **1979**, *98*, 261–265.
- [22] J. Thompson, E. Cundliffe, *Biochimie* **1991**, *73*, 1131–1135.
- [23] B. T. Porse, I. Leviev, A. S. Mankin, R. A. Garrett, *J. Mol. Biol.* **1998**, *276*, 391–404.
- [24] C. L. Myers, P. C. Hang, G. Ng, J. Yuen, J. F. Honek, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *18*, 4231–4237.
- [25] F. von Nussbaum, M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand, D. Häbich, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5194–5254; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5072–5129.
- [26] K. C. Nicolaou, M. Nevalainen, M. Zak, S. Bulat, M. Bella, B. S. Safina, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3540–3546; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3418–3424.
- [27] K. C. Nicolaou, M. Zak, S. Rahimipour, A. A. Estrada, S. H. Lee, A. O’Brate, P. Giannakakou, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15042–15044.
- [28] K. C. Nicolaou, B. Zou, D. H. Dethé, D. B. Li, D. Y.-K. Chen, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7950–7956; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7786–7792.
- [29] A. L. Starosta, H. Qin, A. Mikolajka, G. Y. C. Leung, K. Schwinghammer, K. C. Nicolaou, D. Y.-K. Chen, B. S. Cooperman, D. N. Wilson, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 1087–1096.
- [30] J. Bower, M. Drysdale, R. Hebdon, A. Jordan, G. Lentzen, N. Matassova, A. Murchie, J. Powles, S. Roughley, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2455–2458.
- [31] B. N. Naidu, W. Li, M. E. Sorenson, T. P. Connolly, J. A. Wichtowski, Y. Zhang, O. K. Kim, J. D. Matiskella, K. S. Lam, J. J. Bronson, Y. Ueda, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 1059–1063.
- [32] B. N. Naidu, M. E. Sorenson, Y. Zhang, O. K. Kim, J. D. Matiskella, J. A. Wichtowski, T. P. Connolly, W. Li, K. S. Lam, J. J. Bronson, M. J. Pucci, J. M. Clark, Y. Ueda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5573–5577.
- [33] B. N. Naidu, M. E. Sorenson, J. J. Bronson, M. J. Pucci, J. M. Clark, Y. Ueda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2069–2072.
- [34] B. N. Naidu, W. Li, K. S. Lam, M. E. Sorenson, J. A. Wichtowski, T. P. Connolly, Y. Ueda, J. J. Bronson, Y. Zhang, O. K. Kim, *Water Soluble Thiazolyl Peptide Derivatives*, U.S. Patent US2002065219A1, **2002**.
- [35] B. N. Naidu, M. E. Sorenson, J. D. Matiskella, W. Li, J. B. Sausker, Y. Zhang, T. P. Connolly, K. S. Lam, J. J. Bronson, M. J. Pucci, H. Yang, Y. Ueda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3545–3549.
- [36] A. Regueiro-Ren, Y. Ueda, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 8699–8702.
- [37] T. P. Connolly, A. Regueiro-Ren, J. E. Leet, D. M. Springer, J. Goodrich, X. S. Huang, M. J. Pucci, J. M. Clark, J. J. Bronson, Y. Ueda, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 550–553.
- [38] L. Xu, A. K. Farthing, Y.-J. Shi, P. T. Meinke, K. Liu, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 7447–7450.
- [39] L. Xu, A. K. Farthing, J. F. Dropinski, P. T. Meinke, C. McCallum, P. S. Leavitt, E. J. Hickey, L. Colwell, J. Barrett, K. Liu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3531–3535.
- [40] P. Hrnčiar, Y. Ueda, S. Huang, J. E. Leet, J. J. Bronson, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 8789–8793.
- [41] M. J. Pucci, J. J. Bronson, J. F. Barrett, K. L. Denbleyker, L. F. Discotto, C. Joan, J. C. Fung-Tomc, Y. Ueda, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 3697–3701.
- [42] A. Regueiro-Ren, B. N. Naidu, X. Zheng, T. W. Hudyma, T. P. Connolly, J. D. Matiskella, Y. Zhang, O. K. Kim, M. E. Sorenson, M. Pucci, J. Clark, J. J. Bronson, Y. Ueda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 171–175.
- [43] B. N. Naidu, M. E. Sorenson, T. Hudyma, X. Zheng, Y. Zhang, J. J. Bronson, M. J. Pucci, J. M. Clark, Y. Ueda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3743–3746.
- [44] J. Golik, H. S. L. Wong, S. H. Chen, T. W. Doyle, J. J. K. Wright, J. Knipe, W. C. Rose, A. M. Casazza, D. M. Vyas, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1837–1842.
- [45] T. Tojo, T. Hanadate, A. Okada, J. Kazami, S. Takeda, M. Shiba, *Preparation of Cyclic Thiopeptides (QN3323-A Derivatives) and Their Pharmaceutical Compositions for Multidrug-Resistant Bacteria*, U.S. Patent J2008115165A, **2008**.
- [46] K. Junichi, O. Takashi, W. Masato, K. Kazuma, Y. Takashi, T. Kaniaki, *Preparation of O-Acyl-QN3323-A Oxime Thiopeptide Compounds as Antibacterial Agents*, U.S. Patent JP2009018991A, **2009**.
- [47] M. J. LaMarche, J. A. Leeds, J. Dzink-Fox, E. Gangl, P. Krastel, G. Neckermann, D. Palestrant, M. A. Patane, E. M. Rann, S. Tiamfook, D. H. Yu, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6934–6941.
- [48] P. Ferrari, L. Colombo, S. Stella, E. Selva, L. F. Zerilli, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 1304–1311.
- [49] P. Tavecchia, P. Gentili, M. Kurz, C. Sottani, R. Bonfichi, E. Selva, S. Lociuro, E. Restelli, R. Ciabatti, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 4867–4890.
- [50] P. Tavecchia, M. Kurz, L. Colombo, R. Bonfichi, E. Selva, S. Lociuro, E. Marzorati, R. Ciabatti, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 8763–8774.
- [51] S. Lociuro, P. Tavecchia, E. Marzorati, P. Landini, B. P. Goldstein, M. Denarod, R. Ciabatti, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 344–349.
- [52] A. Malabarba, M. Cavaleri, G. Mosconi, D. Jubes, G. Romano, *Use of Amide Derivative of GE 2270 Factor a3 for the Treatment of Acne*, U.S. Patent WO 03105881, **2007**.
- [53] J. Clough, S. Chen, E. M. Gordon, C. Hackbarth, S. Lam, J. Trias, R. J. White, G. Candiani, S. Donadio, G. Romanò, R. Ciabatti, J. W. Jacobs, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3409–3414.
- [54] M. J. LaMarche, J. A. Leeds, J. Dzink-Fox, K. Gunderson, P. Krastel, K. Memmert, M. A. Patane, E. M. Rann, E. Schmitt, S. Tiamfook, B. Wang, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2517–2521.
- [55] M. J. LaMarche, J. A. Leeds, J. Dzink-Fox, S. Mullin, M. A. Patane, E. M. Rann, S. Tiamfook, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3210–3215.
- [56] M. J. LaMarche, J. Leeds, K. Amaral, J. Brewer, S. Bushell, J. Dewhurst, J. Dzink-Fox, E. Gangl, J. Goldovitz, A. Jain, S. Mullin, G. Neckermann, C. Osborne, D. Palestrant, M. A.

- Patane, E. M. Rann, M. Sachdeva, J. Shao, S. Tiamfbok, L. Whitehead, D. H. Yu, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 8099–8109.
- [57] M. J. LaMarche, S. Bushell, M. A. Patane, L. Whitehead, *Ami-nothiazoles and Their Uses*, U.S. Patent WO2007142986, **2010**.
- [58] J. A. Leeds, M. J. LaMarche, J. T. Brewer, S. M. Bushell, G. Deng, J. M. Dewhurst, J. Dzink-Fox, E. Gangl, A. Jain, L. Lee, M. Lilly, K. Manni, S. Mullin, G. Neckermann, C. Osborne, D. Palestrant, M. A. Patane, A. Raimondi, S. Ranjitkar, E. M. Rann, M. Sachdeva, J. Shao, S. Tiamfook, L. Whitehead, D. Yu, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 5277–5283.
- [59] M. J. LaMarche, J. A. Leeds, A. Amaral, J. T. Brewer, S. M. Bushell, G. Deng, J. M. Dewhurst, J. Ding, J. Dzink-fox, G. Gamber, A. Jain, K. Lee, L. Lee, T. Lister, D. McKenney, S. Mullin, C. Osborne, D. Palestrant, M. A. Patane, E. M. Rann, M. Sachdeva, J. Shao, S. Tiamfook, A. Trzasko, L. Whitehead, A. Yifru, D. H. Yu, W. L. Yan, Q. M. Zhu, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2376–2387.
- [60] A. Trzasko, J. A. Leeds, J. Praestgaard, M. J. LaMarche, D. McKenney, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 4459–4462.
- [61] L. S. L. Ting, J. Praestgaard, N. Grunenberg, J. C. Yang, J. A. Leeds, P. Pertel, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 5946–5951.
- [62] J. A. Leeds, M. Sachdeva, S. Mullin, J. Dzink-Fox, M. J. LaMarche, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 4463–4465.
- [63] S. S. Myatt, E. W.-F. Lam, *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 847–859.
- [64] N. S. Hegde, D. A. Sanders, R. Rodriguez, S. Balasubramanian, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 725–731.
- [65] S. Schoof, S. Baumann, B. Ellinger, H.-D. Arndt, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 242–245.
- [66] S. Schoof, G. Pradel, M. N. Aminake, B. Ellinger, S. Baumann, M. Potowski, Y. Najajreh, M. Kirschner, H.-D. Arndt, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3389–3393; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3317–3321.
- [67] S. Baumann, S. Schoof, M. Bolten, C. Haering, M. Takagi, K. Shin-ya, H.-D. Arndt, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6973–6981.
- [68] S. Schoof, H.-D. Arndt, *Chem. Commun.* **2009**, 7113–7115.
- [69] B. Pandit, U. Bhat, A. L. Gartel, *Cancer Biol. Ther.* **2011**, *11*, 43–47.
- [70] H. R. A. Jonker, S. Baumann, A. Wolf, S. Schoof, F. Hiller, K. W. Schulte, K. N. Kirschner, H. Schwalbe, H.-D. Arndt, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 3366–3370; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3308–3312.
- [71] C. J. Schofield, J. E. Baldwin, M. F. Byford, I. Clifton, J. Hajdu, C. Hensgens, P. Roach, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 857–864.
- [72] Q. Zhang, W. Liu, *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 218–226.
- [73] F. Zhang, W. L. Kelly, *In Vivo Production of Thiopeptide Variants*, Elsevier, San Diego, **2012**.
- [74] M. G. Acker, A. A. Bowers, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17563–17565.
- [75] A. A. Bowers, M. G. Acker, A. Koglin, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7519–7527.
- [76] T. S. Young, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 13053–13058.
- [77] C. Li, F. Zhang, W. L. Kelly, *Mol. BioSyst.* **2011**, *7*, 82–90.
- [78] C. Li, F. Zhang, W. L. Kelly, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 558–560.
- [79] T. S. Young, P. C. Dorrestein, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 1600–1610.
- [80] A. A. Bowers, M. G. Acker, T. S. Young, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10313–10316.
- [81] A. A. Bowers, C. T. Walsh, M. G. Acker, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12182–12184.
- [82] W. L. Kelly, L. Pan, C. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4327–4334.
- [83] R. Liao, W. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2852–2855.
- [84] Y. Yu, H. Guo, Q. Zhang, L. Duan, Y. Ding, R. Liao, C. Lei, B. Shen, W. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16324–16326.
- [85] Y. Yu, L. Duan, Q. Zhang, R. Liao, Y. Ding, H. Pan, E. Wendt, G. Tang, B. Shen, W. Liu, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 855–864.
- [86] Q. Zhang, Y. Li, D. Chen, Y. Yu, L. Duan, B. Shen, W. Liu, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 154–160.
- [87] Q. Zhang, D. Chen, J. Lin, R. Liao, W. Tong, Z. Xu, W. Liu, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 21287–21294.
- [88] L. Duan, S. Wang, R. Liao, W. Liu, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 443–448.
- [89] M. Wei, S. Wang, Y. Fang, Y. Chen, *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 3617–3622.
- [90] A. Kirschning, F. Hahn, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4086–4096; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4012–4022.
- [91] Nach der Einreichung dieses Aufsatzes wurde die erste Bibliothek vollsynthetischer Thiopeptidanaloge beschrieben: X. Just-Baringo, P. Bruno, C. Pitart, J. Vila, F. Albericio, M. Álvarez, *J. Med. Chem.* **2014**, DOI: 10.1021/jm500062g.