

# Stephacidin B: eine neue Komplexitätsstufe prenylierter Indol-Alkaloide aus Pilzen\*\*

Franz von Nussbaum\*

## Stichwörter:

Alkaloide · Aminosäuren · Biosynthese · Naturstoffe · Strukturaufklärung

Professor Samuel J. Danishefsky gewidmet

## Einleitung

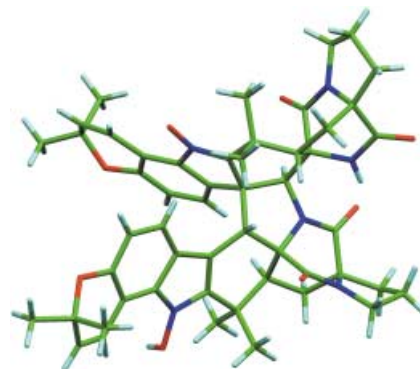
Auch wenn das Zählen weniger einfach ist, als man im Zeitalter von internationalen Datenbanken erwarten sollte, lässt sich die Zahl bekannter Alkaloide auf ca. 20000 schätzen.<sup>[1,2]</sup> Bisher hat der uneinheitliche Gebrauch des Begriffs „Alkaloid“ eine konsistente und einheitliche Klassifizierung erschwert. Stattdessen hat sich eine gedanklich „orthogonale“ (und somit leider überlappende) Einteilung nach der Struktur (z.B.  $\beta$ -Carbolin-Alkaloide) oder nach der Herkunft (z.B. Strychnon-Alkaloide) durchgesetzt.

Traditionell wurden Alkaloide aus Pflanzen und in einem geringeren Maß aus Tieren gewonnen. Hierbei entwickelten sich die Isochinolin- und die Indol-Alkaloide zu den herausragenden Strukturklassen. Erst das Screening von Mikroorganismen nach neuen Antibiotika und die Untersuchung von Pilzen zum Verständnis ihrer toxischen Prinzipien<sup>[3]</sup> oder ihrer auffälligen Pigmentierung<sup>[4]</sup> zeigte, dass die natürliche Alkaloid-Chemie nicht allein auf Pflanzen und Tiere beschränkt ist. Eine Vielzahl von Alkaloiden, insbesondere solchen, die sich biosynthetisch von Tryptophan ableiten, wurde aus Pilzen isoliert.

## Stephacidin B: eine aufregende Struktur mit vielversprechender biologischer Wirkung

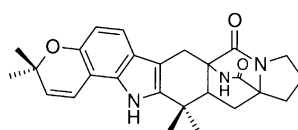
Eine Forschergruppe des Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute<sup>[5]</sup> beschrieb Stephacidin B (**2**) kürzlich als ein neues Antibiotikum mit Antitumor-Aktivität im Zelltest (Schema 1). Die herausragende strukturelle Architektur des Stephacidin B zeigt einen neuen Grad an Komplexität innerhalb der prenylierten Indol-Alkaloide aus Pilzen (Abbildung 1). Beide Indol-Einheiten des Stephacidin B werden in seltenen Oxidationszuständen präsentiert. Zwar wurden schon einige *N*-Methoxyindol-Alkaloide isoliert, hingegen sind bisher nur sehr wenige Beispiele für natürliche *N*-Hydroxyindole<sup>[6]</sup> und indolische Nitrone bekannt.

Stephacidin A (**1**) und Stephacidin B (**2**) wurden durch Fermentation

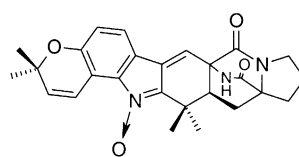


**Abbildung 1.** Struktur<sup>[5]</sup> von Stephacidin B (**2**) im Kristall (Stabdarstellung,<sup>[16]</sup> relative Stereochemie).

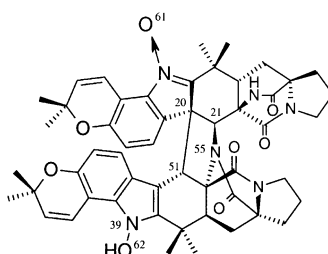
von *Aspergillus ochraceus* WC76466 gewonnen. Leider konnte die vollständige relative Stereochemie des Stephacidin A trotz umfangreicher NMR-Experimente nicht bestimmt werden. Stephacidin A und B zeigten In-vitro-Cytotoxizität ge-



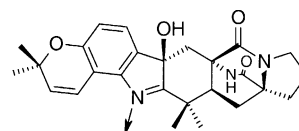
Stephacidin A (**1**)



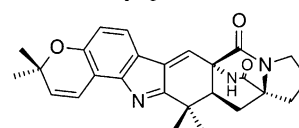
Avrainvillamid (CJ-17665, **3**)



Stephacidin B (**2**)



Aspergamid A (**4**)



Aspergamid B (**5**)

**Schema 1.** Stephacidin B (**2**)<sup>[5]</sup> und verwandte Alkaloide<sup>[14,15]</sup> aus *Aspergillus ochraceus* (relative Stereochemie).

[\*] Dr. F. von Nussbaum  
Medicinal Chemistry  
Pharma Research, Bayer AG  
42096 Wuppertal (Deutschland)  
Fax: (+49) 202-36-969-479  
E-mail:  
franz.vonnussbaum.fv@bayer-ag.de

[\*\*] Meinen Kollegen Dr. Nils Griebenow und Dr. Robert Velten bin ich für ihre Diskussionsbeiträge zu Dank verpflichtet.

gen ein Panel von humanen Tumor-Zelllinien. Während sich beim Stephacidin A die beobachteten  $IC_{50}$ -Werte für Eierstock-, Dickdarm-, Brust- und Lungenkrebs-Zelllinien vorwiegend im einstelligen mikromolaren Bereich bewegten, wurden für das komplizierter gebaute Stephacidin B fünf- bis dreißigfach höhere Aktivitäten beobachtet. Auffällig war die vergleichsweise stärkste Wirkung von **1** und **2** auf Testosteron-abhängige LNCaP-Prostata-Krebszellen. Die Bristol-Myers-Squibb-Arbeitsgruppe weist hierbei auf einen möglichen neuen Wirkmechanismus hin. Leider werden keine detaillierten experimentellen Daten präsentiert, die diese vielversprechende Einschätzung belegen. Mit den Methoden der funktionalen Genomik (functional genomics) könnten sich die Stephacidine zu einem weiteren Beispiel dafür entwickeln, dass bioaktive Naturstoffe nicht nur nützliche Leitstrukturen für neue Pharmakophore oder Toxophore sind, sondern auch Wegweiser zu neuen biologischen Targets und/oder Wirkmechanismen, die zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt durch Wirkstoffe von vollkommen andersartiger Struktur adressierbar sind (vgl. chemical genomics).

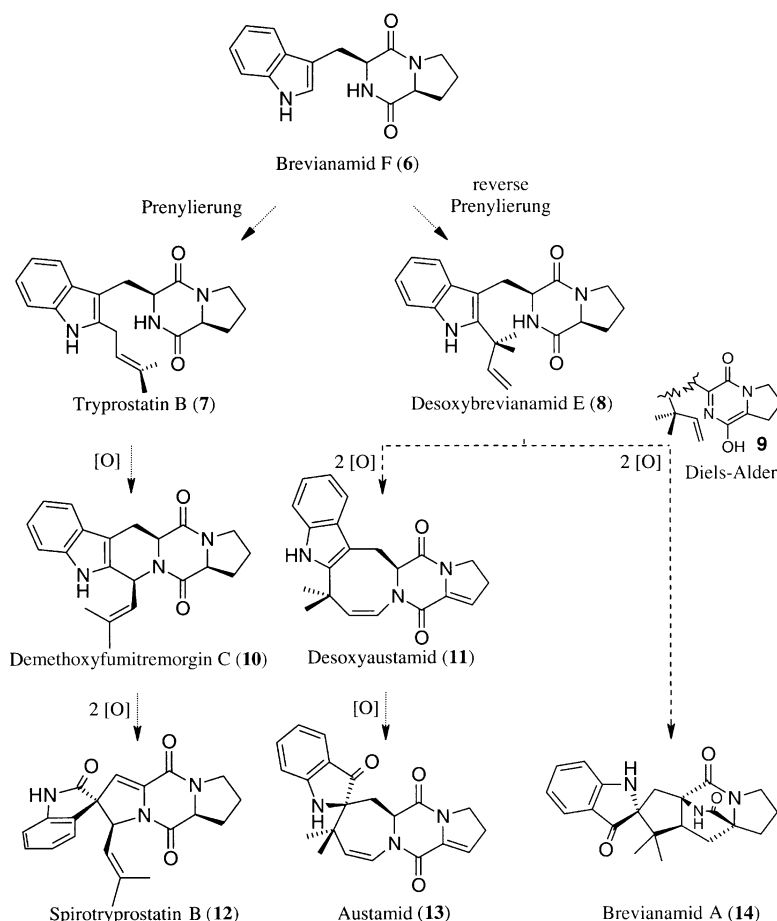
### Biosynthese von Stephacidin B: ein Lehrbeispiel für die Kombinatorische Chemie

In Pilzen wurden unterschiedliche prenylierte, vom Tryptophan abgeleitete Alkaloide identifiziert. Diese Indol-Alkaloide illustrieren eindrucksvoll den natürlichen Prozess, demnach aus einem kleinen Set von – strukturell wenig diversen – „Ausgangsmaterialien“ umfangreiche „Verbindungsbibliotheken“ von hoher struktureller Diversität aufgebaut werden. Beim Aufbau komplexer Kohlenstoff-Gerüste sind Enzymkatalysierte selektive C-H-Oxidationen wichtige Reaktionen. Insbesondere in der Biogenese von Alkaloiden wird diese kombinatorische Redoxchemie durch eine abwechslungsreiche Kondensationschemie ergänzt. Hierbei wird die ambivalente Reaktivität Heteroatom-reicher Biosynthesebausteine wie Tryptophan, Tyrosin oder Dopa (3,4-Dihydroxyphenylalanin) nahezu spielerisch genutzt. Die Zahl „möglicher“

Kondensationsmodi wird oft erhöht durch eine elektronische Modulation der polaren chemischen Funktionalitäten in Form von Redoxprozessen (z. B. Phenole  $\rightleftharpoons$  Chinone) oder aber durch die intermediäre Koordination von Lewis-Säuren (z. B. Protonen, Methylierung  $\rightleftharpoons$  Demethylierung).

Diese Trends der Alkaloid-Biogenese lassen sich gut mit einer abwechslungsreichen Gruppe pilzlicher Naturstoffe veranschaulichen, die biosynthetisch aus nur je einer Einheit Tryptophan, Prolin und Isopren aufgebaut werden (Schema 2).<sup>[7,8]</sup> Die Stephacidine sind strukturell eng verwandt mit diesen Alkaloiden und sollten somit in einer analogen Biosynthese gebildet werden, wenngleich sie eine zusätzliche Isopren-Gruppe an jedem ihrer Indol-Ringe aufweisen, wie man es auch von den Paraherquamiden und den Marcfortinen kennt. Ausgehend von *cyclo*-Trp-Pro (**6**), einem reinen Kondensati-

onsprodukt, findet ein Prenylierungs- oder ein reverser Prenylierungsschritt statt, der zu Tryprostatin B (**7**)<sup>[9]</sup> bzw. zu Desoxybrevianamid E (**8**) führt. Von nun an wird die strukturelle Komplexität in den fortschreitenden Biosynthesekaskaden mit jedem Oxidationsschritt erhöht. Als letzter oxidativer „Freiheitsgrad“ erweist sich oft die Transformation von Indolen in die entsprechenden Spirooxindole oder aber Spiro- $\psi$ -indoxyle (z. B. Demethoxyfomitremorgin C (**10**) zu Spirotryprostatin B (**12**)<sup>[10]</sup> oder Desoxyaustamid (**11**) zu Austamid (**13**)). Das charakteristische Diazabicyclo[2.2.2]-Ringsystem der Stephacidine ist wohl bekannt von verschiedenen Brevianamiden, Paraherquamiden und Marcfortinen.<sup>[8]</sup> Eine intramolekulare Diels-Alder-Reaktion wurde von Birch<sup>[11]</sup> sowie Porter und Sammes<sup>[12]</sup> als Schlüsselschritt der Biosynthese dieser Naturstoffe vorgeschlagen (Schema 2). Auch wenn mechanistische De-



**Schema 2.** Repräsentative monoprenylierte Alkaloide aus Pilzen, die sich von Tryptophan und Prolin ableiten. Anordnung nach Prozessierungsgrad innerhalb der (z. T. hypothetischen) Biosynthese.

tails nach wie vor Gegenstand laufender Untersuchungen sind.<sup>[8]</sup> kann diese Transformation (**8**→**14**) formal als eine – durch die Oxidation (**8**→**9**) des inneren Diketopiperazin-Rings ausgelöste – Diels-Alder-Reaktion (**9**→**14**) aufgefasst werden. Aktuelle Arbeiten zur Biosynthese und zur Synthese der Alkaloide vom Brevianamid- und vom Paraherquamid-Typ stammen vor allem aus der Arbeitsgruppe um Williams.<sup>[8]</sup>

## Ist Stephacidin B das Produkt einer Michael-Michael-Dimerisierung?

Strukturell eng verwandt mit Stephacidin A (**1**) ist Avrainvillamid<sup>[13]</sup> (CJ-17665,<sup>[14]</sup> **3**), das aus der Fermentationsbrühe von zwei *Aspergillus*-Stämmen gewonnen wurde. Die Produzenten wurden unabhängig voneinander aus einer vor den Bahamas gesammelten Probe von Grünalgen (*Avrainvillae* sp., marines Habitat) und aus einer venezolanischen Bodenprobe (terrestrisches Habitat) gewonnen. Analog zu den Stephacidinen (**1** und **2**) zeigte auch Avrainvillamid (**3**) im Zelltest Antitumor-Aktivität. Zusätzlich wurde für **3** eine antibakterielle Aktivität gegen einige Antibiotika-resistente Gram-positive Kokken beobachtet. Die ungewöhnliche – in den Strukturen **2** und **3** herausragende – Nitron-Funktionalität wurde auch in Aspergamid A (**4**)<sup>[15]</sup> gefunden, einem weiteren Fermentationsprodukt des gleichen Produzenten *Aspergillus ochraceus*. Neben dem Nitron **4** konnten Zeeck et al. das Anhydrodesoxy-Derivat Aspergamid B (**5**) nachweisen.

Die Bristol-Myers-Squibb-Arbeitsgruppe wies bereits darauf hin, dass Stephacidin B (**2**) ein Dimer von Avrainvillamid (**3**) sein könnte, das wiederum nach einem Oxidationsprodukt von Stephacidin A (**1**) aussieht. Die Art, in der die beiden Avrainvillamid-Einheiten miteinander verknüpft sind (C20–C51, C21–N55), deutet auf einen bisher bei Indol-Alkaloiden nicht beschriebenen Dimerisierungsmodus hin. Qian-Cutrone et al.<sup>[5]</sup> schlugen eine initiale Protonierung der „unteren“ monomeren Einheit an O62 vor, die einen elektrophilen Angriff von C51 an der C20–C21-Doppelbindung der „oberen“ Einheit auslösen würde und somit die

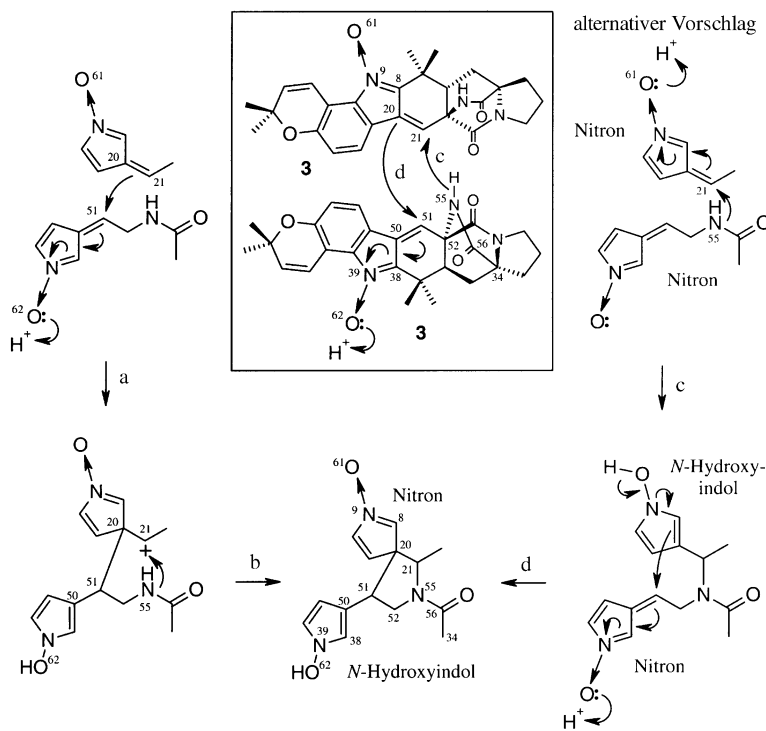
Bildung eines sekundären Carbokations an C21 zur Folge hätte (Stephacidin-B-Nummerierung, Schema 3, Schritt a). Ein abschließender Angriff des „unteren“ amidischen N55 an C21 würde dann den zentralen Fünfring schließen (Schritt b).

Berücksichtigt man, dass alle fünf Metabolite **1–5** aus dem gleichen Pilz *A. ochraceus* isoliert wurden, so erscheint es sehr wahrscheinlich, dass „monomere“ Zwischenstufen vom Typ **3** in einer späten Phase der Biosynthese eine Rolle spielen. Dennoch soll hier ein anderer Reaktionsweg für die Bildung von **2** vorgeschlagen werden (Schema 3), der das sekundäre Carbokation vermeidet: Ein nucleophiler Angriff des „unteren“ amidischen N55 auf den „oberen“ Nitron-Michael-Acceptor würde die Dimerisierung von Avrainvillamid (**3**) auslösen (Schritt c). Ein Umschalten des ursprünglich elektrophilen „oberen“ Nitron-Systems zu einem nucleophilen *N*-Hydroxyindol-System wäre die Folge der C21–N55-Kupplung (Schritt c). Ein Angriff des „oberen“ Donors auf den „unteren“ Nitron-Michael-Acceptor hätte nun die Bildung des Spirozentrums an C20 zur Folge und würde so den mehrstufigen Dimerisie-

rungsprozess abschließen (Schritt d). Überraschenderweise deutet dieser Biosynthesevorschlag auf einen bisher nicht beschriebenen Typ der Michael-Addition hin. Während 1,4-Additionen von amidischen Stickstoffatomen an Carbonyl-Michael-Systeme bekannt sind, wurden keine entsprechenden Umsetzungen vom Michael-Typ mit 2-Vinylnitronen (Nitron-Michael-Acceptoren) in der Literatur gefunden.

## Fazit

Aus Naturstoffen mit neuartigen Strukturelementen ergeben sich oft überraschende Fragen zu ihrer Biosynthese und zu einer möglichen Totalsynthese. Mit 15 Ringen ist Stephacidin B (**2**) eines der kompliziertesten Indol-Alkaloide aus Pilzen. Der Verknüpfungsmodus beider Tryptophan-Untereinheiten impliziert eine ungewöhnliche Dimerisierung innerhalb der Biosynthese und hat somit Modellcharakter für eine denkbare (biomimetische) Partialsynthese von Stephacidin B (**2**) aus Avrainvillamid (**3**). Die Biosynthese von Stephacidin B könnte auch für die methodisch orientierte Organische Syn-



**Schema 3.** Alternativer Vorschlag für die Spätphase der Biosynthese von Stephacidin B (**2**) durch Michael-Michael-Dimerisierung.

these von Interesse sein, da sie auf die potenzielle Michael-Reaktivität von 2-Vinylnitronen hinweist. Künftige Untersuchungen sollten klären, ob diese abschließende Dimerisierung (oder Pseudodimerisierung) Enzym-katalysiert ist.

Die vielversprechende und mechanistisch unverstandene In-vitro-Cytotoxizität von Stephacidin B (**2**) gegen Testosteron-abhängige LNCaP-Prostata-Krebszellen macht dieses Alkaloid nicht nur zu einer potenziellen Leitstruktur, sondern hebt erneut die Bedeutung ungewöhnlicher Naturstoffe als wertvolle Schlüssel zu neuen biologischen Targets und/oder Wirkmechanismen hervor.

- 
- [1] *Dictionary of Natural Products* (CD-ROM), Chapman & Hall/CRC, **1982–2003**.
- [2] *Römpp Encyclopedia. Natural Products* (Hrsg.: W. Steglich, B. Fugmann, S. Lang-Fugmann), Thieme, Stuttgart, **2000**.
- [3] „Alkaloids from Mushrooms“: R. Antikowiak, W. Z. Antikowiak, *Alkaloids* **1991**, *40*, 189–340.
- [4] „Pigments of Fungi (Macromycetes)“: a) M. Gill, W. Steglich, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **1987**, *51*, 1–317; b) M. Gill, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 301–317.
- [5] a) J. Qian-Cutrone, S. Huang, Y.-Z. Shu, D. Vyas, C. Fairchild, A. Menendez, K. Krampitz, R. Dalterio, S. E. Kloor, Q. Gao, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14556–14557; b) J. Qian-Cutrone, K. D. Krampitz, Y.-Z. Shu, L.-P. Chang, S. E. Lowe, US Patent 6,291,461, **2001** [*Chem. Abstr.* **2001**, *135*, 236411].
- [6] M. Somei, *Adv. Heterocycl. Chem.* **2002**, *82*, 101–155.
- [7] A. J. Birch, J. J. Wright, *Tetrahedron* **1970**, *26*, 2329–2344.
- [8] a) R. M. Williams, E. M. Stocking, J. F. Sanz-Cervera, *Top. Curr. Chem.* **2000**, *209*, 97–173; b) R. M. Williams, *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 711–740; c) R. M. Williams, R. J. Cox, *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 127–139.
- [9] Isolierung: a) C.-B. Cui, H. Kakeya, G. Okada, R. Onose, M. Ubukata, I. Takahashi, K. Isono, H. Osada, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 1382–1384; Synthese: b) K. M. Depew, S. J. Danishefsky, N. Rosen, L. Sepp-Lorenzino, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12463–12464.
- [10] Isolierung: a) C.-B. Cui, H. Kakeya, H. Osada, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 12651–12666; Stereochemie: b) F. von Nussbaum, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2175–2178.
- [11] A. J. Birch, *J. Agric. Food Chem.* **1971**, *19*, 1088–1092.
- [12] A. E. A. Porter, P. G. Sammes, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1970**, 1103.
- [13] W. Fenical, P. R. Jensen, X. C. Cheng, US Patent 6,066,635, **2000** [*Chem. Abstr.* **2000**, *132*, 346709].
- [14] Y. Sugie, H. Hirai, T. Inagaki, M. Ishiguro, Y.-J. Kim, Y. Kojima, T. Sakakibara, S. Sakemi, A. Sugiura, Y. Suzuki, L. Brennan, J. Duignan, L. H. Huang, J. Sutcliffe, N. Kojima, *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 911–916.
- [15] a) J. Fuchser, Dissertation, Universität Göttingen, **1995**; Stereochemie: b) A. Zeeck, persönliche Mitteilung, **2003**.
- [16] Cambridge Crystallographic Data Centre, Mercury 1.1.2.
-