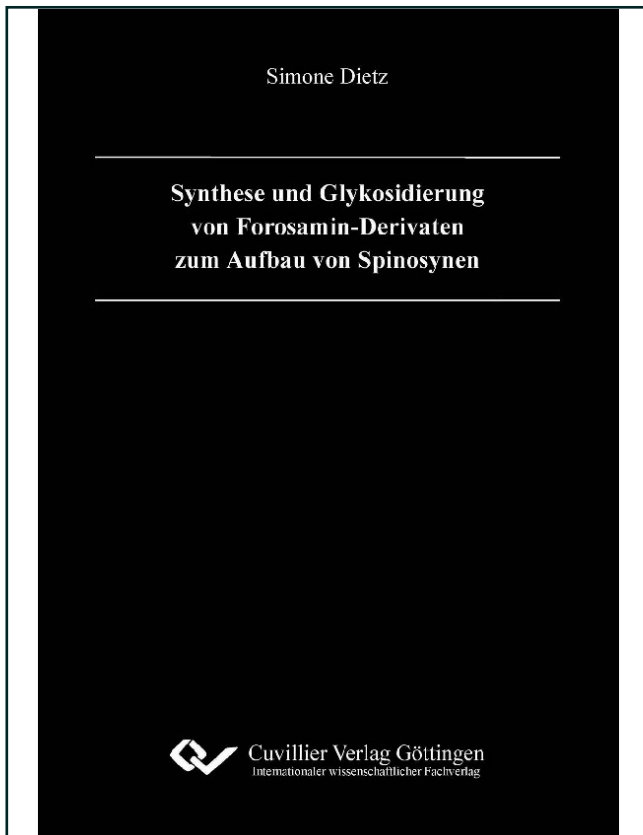




Simone Dietz (Autor)  
**Synthese und Glykosidierung von Forosamin-  
Derivaten zum Aufbau von Spinosynen**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/148>

Copyright:  
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,  
Germany  
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

# A ALLGEMEINER TEIL

## 1 Einleitung

Innerhalb der letzten zehn Jahre sind die Preise für Nahrungsmittel kontinuierlich gestiegen. Witterungsbedingte Ertragsausfälle, sowie ein hohes Bevölkerungswachstum in vielen Entwicklungsländern und die damit verbundene erhöhte Nachfrage sind Anlass hierfür. Ferner ist der Handel mit Agrarrohstoffen zur Bioenergieerzeugung ein durchaus rentables Geschäft was in einer weiteren Minimierung der Nutzungsflächen für die Nahrungsmittelproduktion resultiert.<sup>[1]</sup>

Innovative Pflanzenschutzmittel zeichnen sich durch eine gezielte Wirkung auf den Schädling und eine gute Umweltverträglichkeit aus. Darüber hinaus dürfen wirtschaftliche Faktoren wie z. B. ein relativ geringer Produktionsaufwand und der damit verbundene geringe Kostenaufwand nicht unberücksichtigt bleiben. Ein innovatives Pflanzenschutzmittel ermöglicht somit die Versorgung mit hochwertigen Nahrungsmitteln zu angemessenen Preisen. Leitstrukturen die oftmals für die Synthese von biologisch aktiven Substanzen wie Pharmazeutika oder Pflanzenschutzmitteln dienen, sind häufig Naturstoffe die aus verschiedenen Ressourcen, z. B. Mikroorganismen, zugänglich sind.

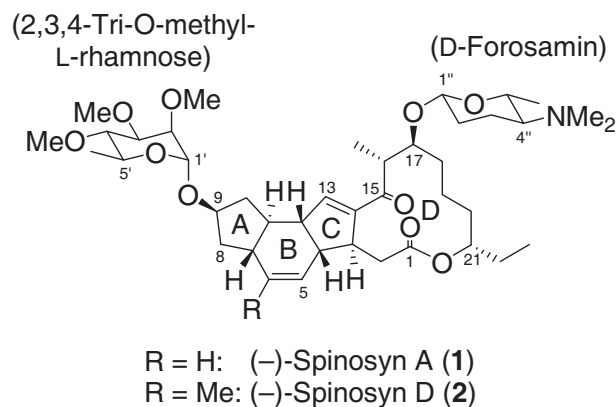
Die Spinosyne A und D sind natürlich vorkommende Insektizide die sich durch eine gute Umweltverträglichkeit und eine hohe Selektivität gegenüber Schädlingen auszeichnen. Infolge auftretender Resistenzen gegenüber dem Naturstoff werden im Arbeitskreis um *L. F. Tietze* Spinosynanaloge entwickelt um diesen Trend entgegenzutreten zu können.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Synthese von D-Forosamin, einem integralen Bestandteil der Spinosyne sowie weiteren Naturstoffen, und dessen Analoga. Grundlegendes Element der Synthesen war die von *L. F. Tietze* entwickelte *Domino-Knoevenagel-hetero-Diels-Alder*-Reaktion zur Synthese von sechsgliedrigen Heterocyclen. Mit dieser Methodik konnte die effiziente Synthese von komplexen Systemen ausgehend von einfachen Substraten realisiert werden. Darüber hinaus sind intensive Untersuchungen zur selektiven Verknüpfung von D-Forosamin und dessen Analoga erfolgt die im Anschluss auf die bereitgestellten Spinosynvorstufen angewendet wurden.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Die Naturstoffklasse der Spinosyne<sup>[2]</sup>

Der Bodenorganismus *Saccharopolyspora spinosa* wurde 1982 im Rahmen von Screening-Programmen einer Erdprobe einer stillgelegten Rumdestillerie in der Karibik entdeckt. Einigen seiner Fermentationsprodukte (Sekundärmetabolite) konnte später eine insektizide Wirkung zugeordnet werden. Bei diesem Bakterium handelt es sich um einen aeroben, grampositiven und Mycel bildenden Actinomyceten, der im Wesentlichen die aktiven Sekundärmetabolite (-)-Spinosyn A (**1**) (Hauptkomponente) und (-)-Spinosyn D (**2**) (Minderkomponente) produziert.



**Abbildung 1:** Spinosyn A (**1**) und Spinosyn D (**2**).

Den Grundkörper der Spinosyne bildet ein tetracyclisches Ringsystem bestehend aus einem 12-gliedrigen Makrolacton welches an eine *cis-anti-trans*-verknüpfte Octahydro-*as*-indaceneinheit anneliert ist, das insgesamt neun stereogene Zentren aufweist. Die zwei Hydroxyfunktionen (C-9, C-17) dienen als Bindungsstellen für 2,3,4-Tri-*O*-methyl-L-rhamnose und D-Forosamin.

#### 2.1.1 Eigenschaften und Wirkungsweise<sup>[3]</sup>

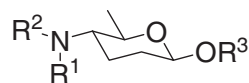
Spinosad (generische Bezeichnung) wird durch Fermentation von *Saccharopolyspora spinosa* Kulturbrühen gewonnen. Kommerzielle Produkte enthalten die Spinosyne A (**1**) und D (**2**) in dem vom Organismus gebildetem Verhältnis von ca. 85:15. Die Spinosyne zeichnen sich durch eine hervorragende insektizide Wirkung gegenüber vielen Schädlingen wie z.B. *Dipteren* (Zweiflügler, z.B. Fliegen), *Hymenopteren* (Hautflügler, z.B. Wespen), *Lepidopteren* (Schmetterlinge), *Thysanopteren* (Fransenflügler), *Homopteren* (Gleichflügler, z.B. Zikaden), *Isopteren* (Termiten), *Orthopteren* (Springschrecken) und *Siphonapteren* (Flöhe)

aus.<sup>[4]</sup> Aufgrund seiner insektiziden Wirkung wird Spinosad nicht nur im modernen Pflanzenschutz sondern auch im veterinärmedizinischen Bereich eingesetzt. In der kommerziellen Tierzucht wird Spinosad zum Schutz des Tierbestands gegenüber blutsaugenden Insekten angewendet, die für die Übertragung von Krankheitserregern verantwortlich sind. Spinosad wird z.B. in der Schaf- und Rinderzucht zum Schutz der Tiere vor Fliegen, Maden, Läusen, Zecken als auch vor diversen Käfern verwendet.<sup>[5]</sup> Zusätzlich wurde durch Studien bestätigt, dass Spinosad wirksam gegenüber weiteren gefährlichen Parasiten, wie z.B. der Tsetsefliege und auch der Neuwelt-Schraubenwurmflye, ist.<sup>[6]</sup> Der immense Vorteil dieser Verbindungsklasse liegt nicht nur in seiner Wirkung gegenüber den Schadorganismen sondern auch in der nicht oder nur geringfügig vorhandenen Toxizität gegenüber Säugetieren, Vögeln und Wasserlebewesen.<sup>[2a,3c]</sup> Spinosad unterliegt einem schnellen Degradierungsprozess (Photolyse, mikrobieller Degradierungsprozess). Unter direkter Sonneneinstrahlung beträgt die Halbwertszeit etwa einen Tag. Aufgrund des geringen Verlagerungspotentials und der mäßigen Wasserlöslichkeit weist der Wirkstoff eine relativ geringe Grundwassergefährdung auf.<sup>[2a,3c,d]</sup> Eine weitere Besonderheit liegt in dem Wirkmechanismus dieser Verbindungsklasse der sich von anderen kommerziell erhältlichen Insektiziden unterscheidet.<sup>[2a,]</sup> Spinosad greift in das Nervensystem des Insekts ein was eine Hyperaktivität zur Folge hat, die zu einer gesteigerten Muskelaktivität und letztendlich zu vollständiger Lähmung sowie Tod des Insekts führt.<sup>[7]</sup> Diese Wirkung wird nach einigen Minuten bis hin zu einigen Stunden nach Aufnahme des Wirkstoffes beobachtet. Der genaue Mechanismus ist bis dato unbekannt, es wird jedoch angenommen, dass ein Angriff an einem Subtyp des nicotinergen Acetylcholinrezeptors (n-AChR) als auch eine antagonistische Wirkung am  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)-Rezeptor erfolgt.<sup>[7,8]</sup>

Untersuchungen zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen haben ergeben, dass die 2,3,4-Tri-O-methyl-L-rhamnose als auch D-Forosamin eine zentrale Rolle bezüglich der insektiziden Wirkung spielen.<sup>[9]</sup> Es wurden bereits unterschiedliche, zum Teil chemisch als auch biosynthetisch veränderte, Spinosynanaloge untersucht. Im Nachfolgenden soll jedoch nur auf die Derivatisierung bezüglich des Forosamins eingegangen werden.<sup>[2b]</sup>

Der jeweilige Verlust eines als auch beider Saccharide führt zu einer drastischen Verringerung der Aktivität (Spinosyn A:  $LC_{50} = 0.3$  ppm, 17-Pseudoaglykon, 9-Pseudoaglykon, Aglykon: jeweils  $LC_{50} > 64$  ppm, *Heliothis virescens*). Bezüglich des Forosaminstickstoffs hat sich ergeben, dass ein Fehlen der Alkylsubstituenten in einer leichten Abschwächung der Aktivität resultiert. Die Länge der Alkylsubstituenten scheint hier eine untergeordnete Rolle

zu spielen. Ein hoher Aktivitätsverlust lässt sich bei der Einbringung von elektronenziehenden Substituenten wie Carbonyl-, Carboxyl- oder Amidsubstituenten beobachten (Tabelle 1).



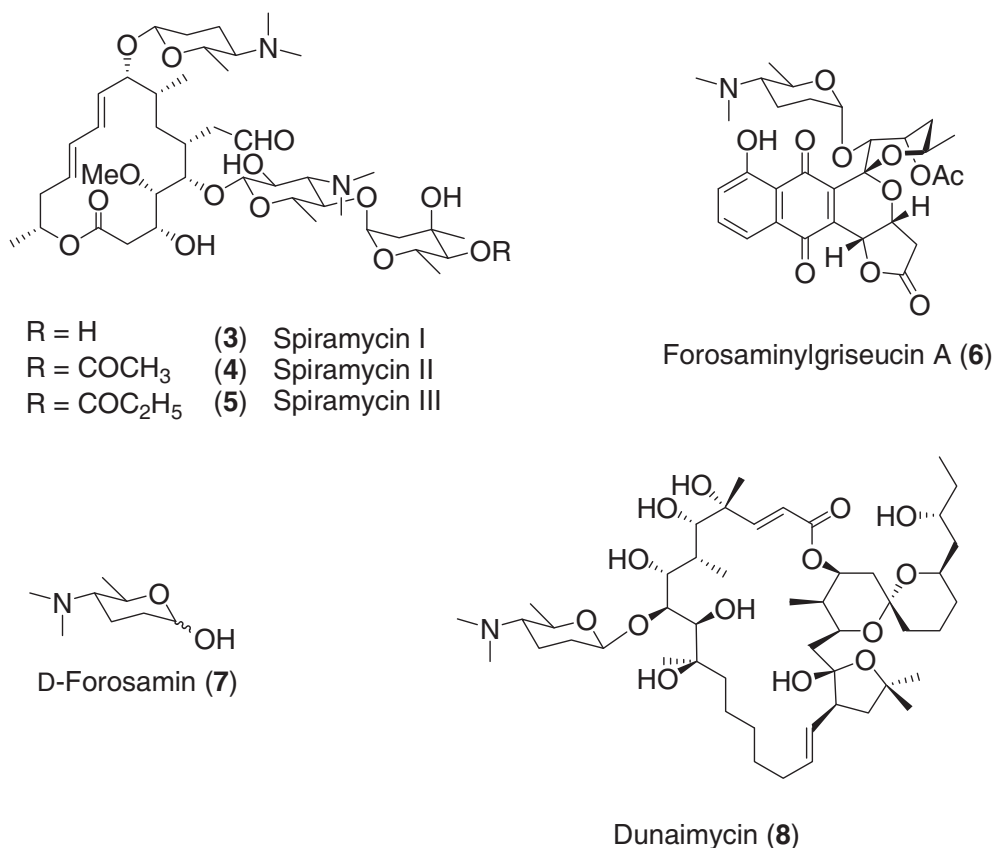
R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Spinosynkörper R <sup>3</sup>	LC <sub>50</sub> [ppm]
CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	A	0.3
CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	D	0.5
CH <sub>3</sub>	H	B	0.4
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	H	B	0.4
H	H	C	0.8
C(O)CH <sub>3</sub>	H	B	5.7
C(O)NHCH <sub>3</sub>	H	B	46

**Tabelle 1:** Einfluss des Substitutionsmusters am Forosaminstickstoff auf die Aktivität gegenüber *Heliothis virescens*.<sup>[2b]</sup>

Inwiefern die  $\beta$ -glykosidische Bindung des Forosamins für die Wirksamkeit der Spinosyne erforderlich ist, ist nicht bekannt. Darüber hinaus wurde von einem Derivat berichtet, dass durch Manipulation des Glykosyltransferasegens statt der Forosamin- eine Mycaroseeinheit an C-17 trägt. Über dessen Aktivität wurde jedoch nichts berichtet.<sup>[10]</sup>

## 2.2 Synthese von Forosamin und Analoga

D-Forosamin (**7**) wurde bereits 1957, lange vor der Entdeckung der Spinosyne, durch Abbau der Makrolid-Antibiotika Spiramycin I (**3**), II (**4**) und III (**5**)<sup>[11]</sup> entdeckt. Hierbei konnte auch die Konstitution von D-Forosamin (**7**) bestimmt werden.<sup>[12]</sup> Weitere relevante Naturstoffe in denen die Forosaminyleinheit eine Zentrale Rolle spielt sind das Chinon-Antibiotika Forosaminylgriseucin A (**6**)<sup>[13]</sup> und das Immunsuppressivum Dunaimycin (**8**)<sup>[14]</sup> (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Spiramycin I (**3**), II (**4**), III (**5**), Forosaminylgriseucin A (**6**), Dunaimycin (**8**) und D-Forosamin (**7**).

Die absolute Konfiguration von D-Forosamin (**7**) konnte erst 1966 von *Stevens et al.* durch Transformation von Penta-*O*-acetyl-D-glucose in den 2,3,4,6-Tetradesoxydimethylaminosaccharid (**7**) über dreizehn Stufen in einer Gesamtausbeute von 0.1%, bestimmt werden.<sup>[15]</sup> *Horton et al.* konnten 3 Jahre später, ebenfalls ausgehend von D-Glucose, das Aminosaccharid **7** in 1% Ausbeute über dreizehn Stufen erhalten.<sup>[16]</sup> 1976 entwickelten *Dyong et al.* eine Synthesesequenz, ausgehend von Sorbinsäure, in der die Synthese des D-Forosamins (**7**) in 7 Stufen in einer Gesamtausbeute von 12% realisiert wurde.<sup>[17]</sup>

Eine weitaus effizientere Methode wurde 1981 von *Baer et al.* publiziert.<sup>[18]</sup> Hier konnte Methyl- $\alpha$ -D-Forosamin (**17**) in 24% Gesamtausbeute ausgehend von Methyl-4-*O*-benzyliden- $\alpha$ -D-glucopyranosid **9** über sieben Stufen erhalten werden.

Durch *Hanesian-Hullar* Transformation von **9** erfolgte die Öffnung der Benzyliden-Schutzgruppe und lieferte das Bromid **10**. Die Hydroxylgruppen an C-2 und C-3 konnten im Anschluss durch Desoxygenierung mit Triphenylphosphin und Triiodimidazol entfernt werden. Umschätzung an C-4 lieferte das Acetat **12**, das durch Reduktion mit Lithiumtriethoxyborhydrid in den Alkohol **13** überführt werden konnte. Die darauf folgende Acetylierung und palladiumkatalysierte Aminierung lieferte das benzylgeschützte Amin **15**. Reduktion der Doppelbindung und simultane Entschützung unter Verwendung von Palladium auf Aktivkohle ergab Methyl-*N*-demethyl- $\alpha$ -D-forosamin (**16**). Als letzter Schritt der Synthese erfolgte die reduktive Aminierung durch Umsetzung mit Formaldehyd und Natriumborhydrid zu Methyl- $\alpha$ -D-forosamin (**17**) (Abbildung 3).

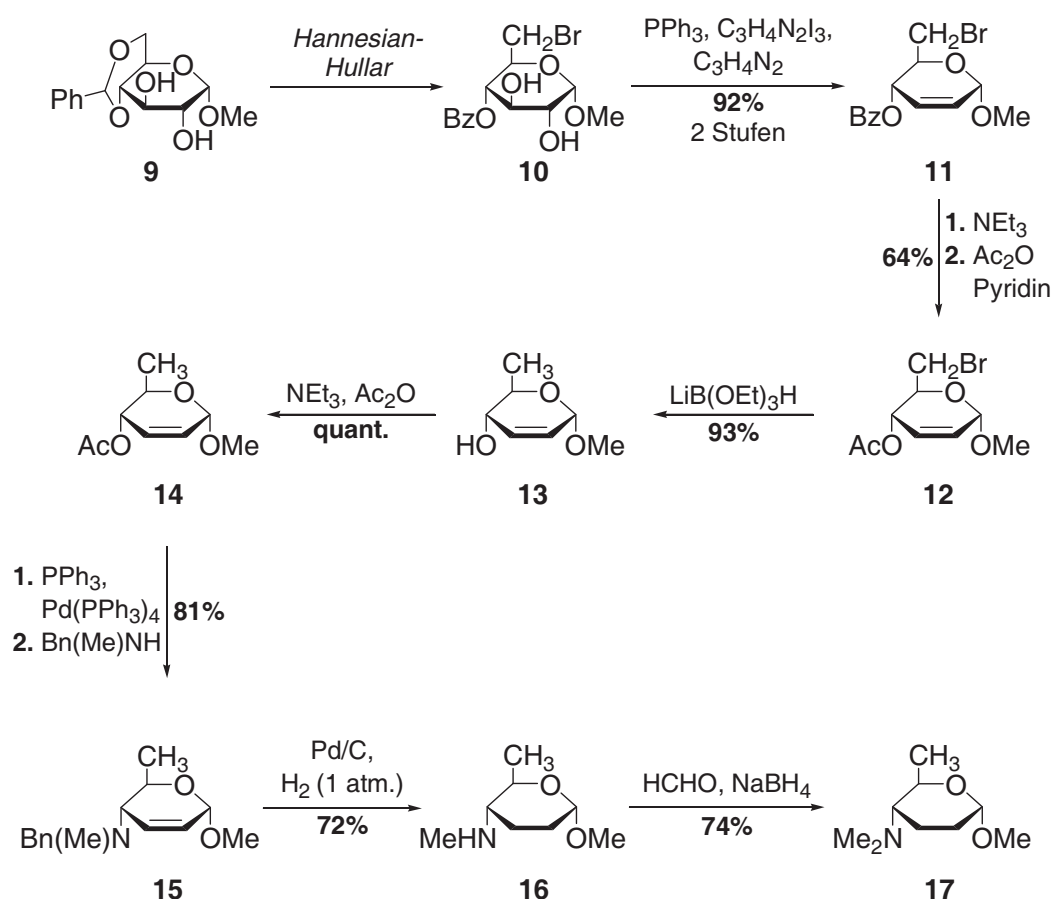
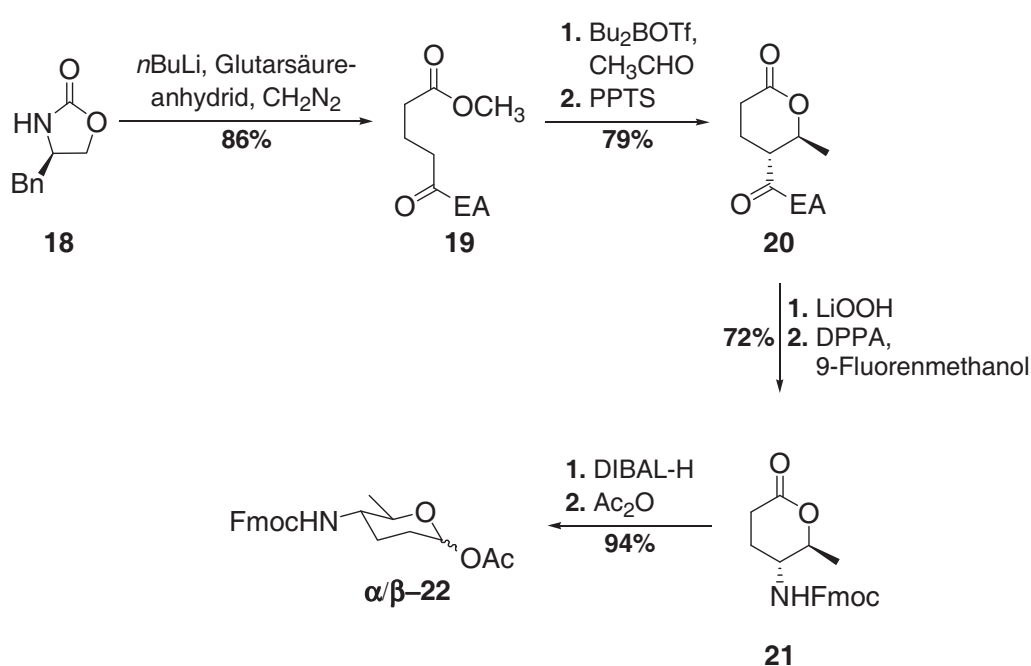


Abbildung 3: Synthese von Methyl- $\alpha$ -D-forosamin (**17**) nach *Baer et al.*.

1984 wurde, ebenfalls ausgehend von D-Glucose, eine weitere Synthese von *Voelter et al.* vorgestellt, in der D-Forosamin (**7**) in einer siebenstufigen Sequenz erhalten wurde.<sup>[19]</sup>

*Evans et al.* veröffentlichten im Zuge der Totalsynthese von (-)-Spinosyn A auch die Synthese des L-Forosamins (*ent*-7).<sup>[20]</sup> Das von (*R*)-Phenylalanin abgeleitete Oxazolidinon **18** wurde im ersten Schritt der Synthese mit Glutarsäureanhydrid acyliert das nach anschließender Methylierung der entstandenen Säurefunktion das Imid **19** lieferte. In der darauf folgenden *Evans-Aldol*-Reaktion des Borenolats mit Acetaldehyd konnte der entsprechende Alkohol erhalten werden, der nach Entschützung des Methylrestes unter saurer Katalyse in das Lacton **20** überführt wurde. Abspaltung des Auxiliars sowie *Curtius*-Umlagerung lieferte das Fmoc-geschützte-Amin **21**, das nach Reduktion in die Acetylglykoside  $\alpha/\beta$ -**22** überführt wurde (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Synthese des geschützten L-Forosaminylacetats (**22**) nach *Evans et al.*.

Eine weitere Synthese des L-Forosamins (*ent*-7) wurde von *Zacuto et al.* 2010 veröffentlicht.<sup>[21]</sup> Das enantiomerenreine kommerziell erhältliche (*S*)-*N*-Boc-propagylglycin (**23**) wurde in das Weinreb-Amid **24** überführt, das nach *Meerwein-Ponndorf-Verley* Reduktion den geschützten Aminoalkohol **25** lieferte. Den entscheidenden Schritt in dieser Synthese stellt die Cycloisomerisierung unter Rutheniumkatalyse dar, die dem Aufbau des Dihydropyrans **26** dient. Das Dimethylaminintermediat **27** konnte nach Methylierung des Amids sowie Reduktion der Boc-Schutzgruppe erhalten und auch *via*  $^1\text{H-NMR}$  charakterisiert werden, wurde aber aufgrund seiner Flüchtigkeit nicht isoliert. L-Forosamin (*ent*-7) wurde nach saurer Aufarbeitung ausgehend von **26** über 2 Stufen erhalten (Abbildung 5).



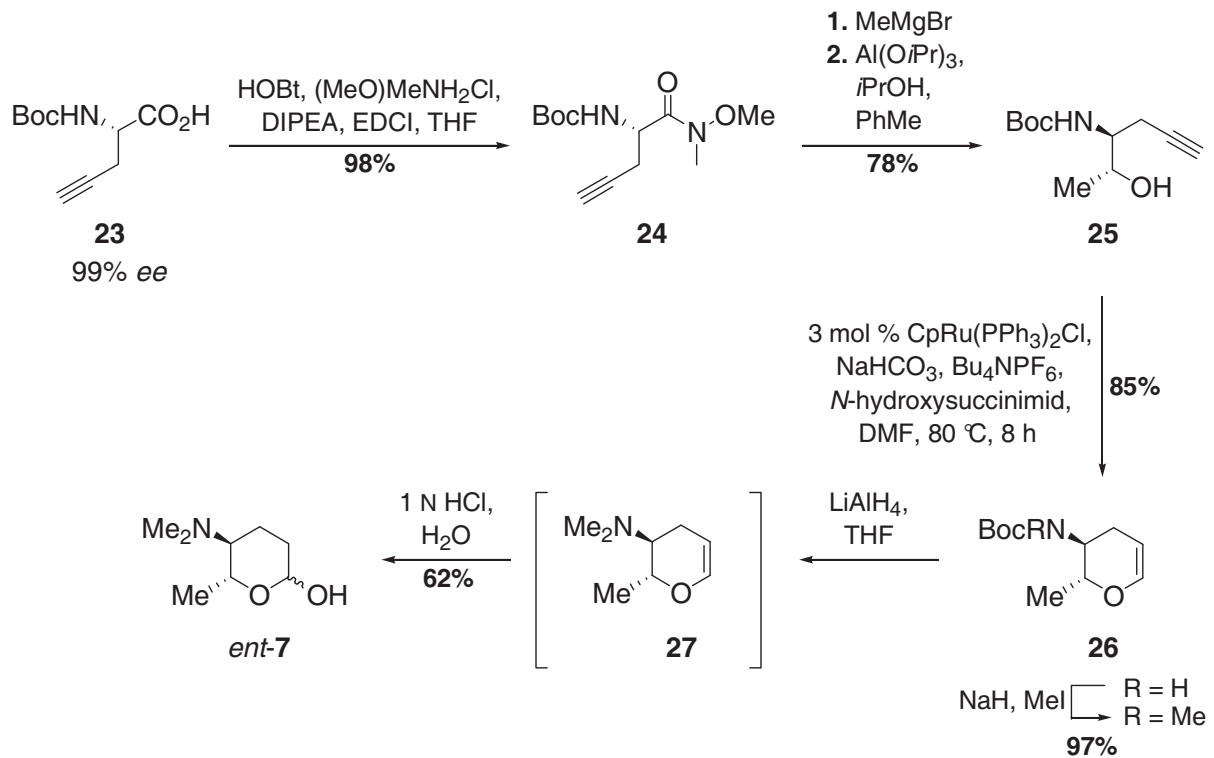


Abbildung 5: Synthese des L-Forosamins (*ent*-7) nach Zacuto *et al.*.

### 2.2.1 Biosynthese von D-Forosamin<sup>[22]</sup>

Biosynthetische Untersuchungen von *Saccharopolyspora spinosa* haben zum dem Ergebnis geführt, dass wahrscheinlich fünf Gene (*spnO*, *spnN*, *spnQ*, *spnR*, *spnS*) für die Biosynthese von D-Forosamin (**7**) ausgehend von TDP-4-keto-6-desoxy-D-glucose (**31**) verantwortlich sind. **31** wird ausgehend von Glucose-1-phosphat (**29**), durch enzymatische Katalyse in TDP-Glucose **30** gefolgt von 4,6-Dehydratisierung zu **31**, synthetisiert. *SpnQ* kodiert eine 2,3-Dehydratase und *spnN* eine 3-Ketoreduktase die die Bildung von **31** zu **32** bzw. **32** zu **33** zur Folge haben. Die Bildung von **34** erfolgt durch eine 3-Dehydrase codiert durch *spnQ*, während *spnR* und *spnS* eine Aminotransferase sowie Methyltransferase codieren die **34** zu **35** und **35** zu **36** umwandeln (Abbildung 6).

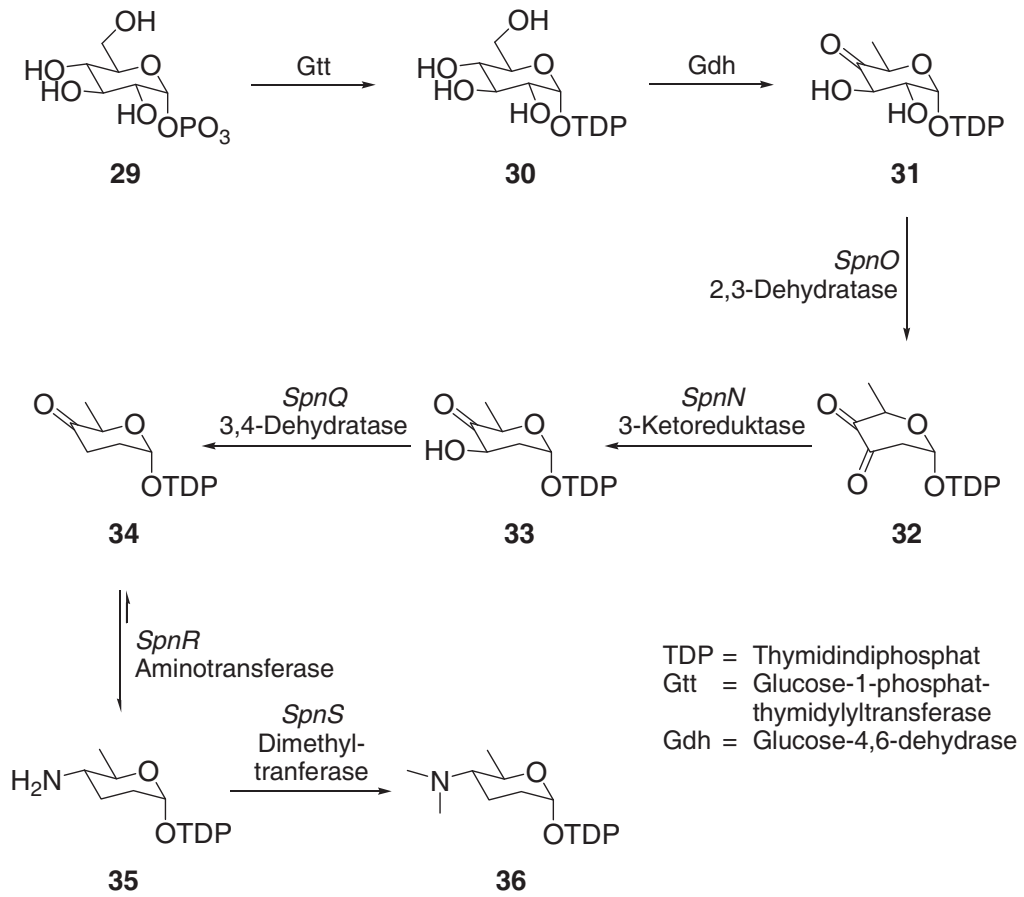


Abbildung 6: Biosynthese von TDP-Forsamin (36).