

Unikke naturstoffer dræber resistente cancerceller

I samarbejde med et bredt sammensat hold af forskere fra Aarhus Universitet har vi gennem en kombination af organisk syntese, mikrobiologi, genomics, computermodellering og cellebiologi studeret naturstoffet BE-43547A₁ (**1**). Naturstoffet viste sig at være særligt giftigt over for hypoxiske cancerceller, som ellers er notorisk svære at komme til livs. Studierne er udgivet i *Nature Chemistry* [1].

Af Nikolaj L. Villadsen^a, Kristian M. Jacobsen^a, Thomas Tørring^{a,b} og Thomas B. Poulsen^a

a) Institut for Kemi, Aarhus Universitet, b) Interdisciplinary Nanoscience Center (iNANO), Aarhus Universitet

Udvikling af nye kræftbehandlinger har siden 1990'erne taget flere tigerspring fremad og ændret kræftdiagnosen fra en sikker dødsdom til en alvorlig, men stadig oftere overkommelig sygdom.

Men visse underklasser af cancerceller volder lægerne store problemer i behandlingen af sygdommen. Heriblandt findes de hypoxiske cancerceller – altså cancerceller, der lever under ekstremt lave iltkoncentrationer, figur 1.

Disse cancerceller er både resistente overfor kemo- og stråleterapi. Derudover resulterer de i øget risiko for spredning af kræftsygdommen til andre steder i kroppen; metastase [2,3]. Det efterlader et betydeligt behov for en bedre forståelse af hy-

poxiske cancerceller og hvad der adskiller dem fra cancerceller med normal iltforsyning (normoxiske cancerceller).

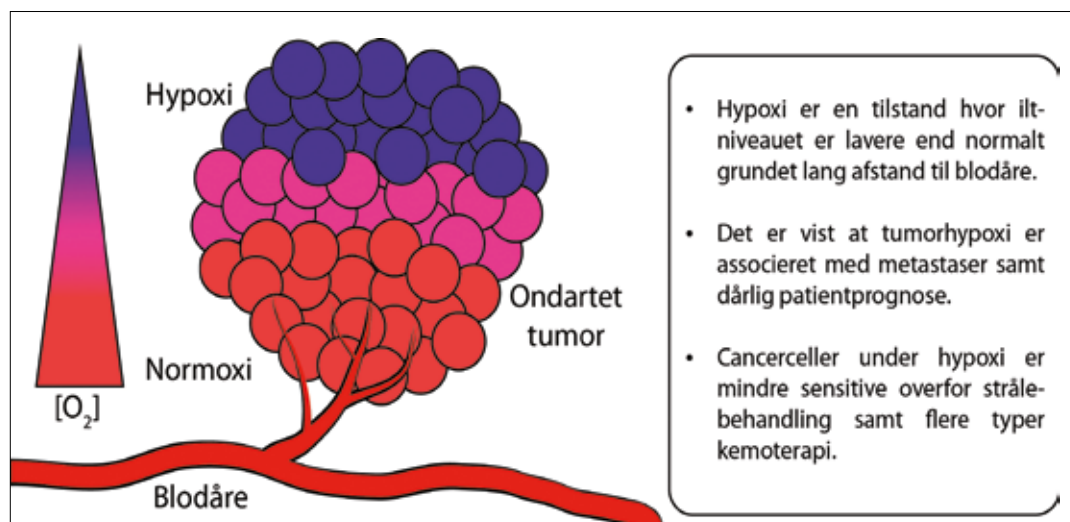
Unik gruppe af naturstoffer som redskab

Dette bringer en lille gruppe af makrocycliske naturstoffer, som indeholder den særlige 4-amido-2,4-pentadienoat-funktionalitet (APD-funktionalitet, figur 2, blå) i fokus. Det særlige ved disse APD-bærende cykliske lipodepsipeptider (APD-CLD) er, at de er selektive – altså mere toksiske overfor hypoxiske end normoxiske cancerceller. De to mest potente APD-CLD-medlemmer er BE-43547A₁ (**1**) og rakicidin A (**2**), der udviser henholdsvis 55 og 10 fold højere toksicitet overfor cancerceller under hypoxi, figur 2.

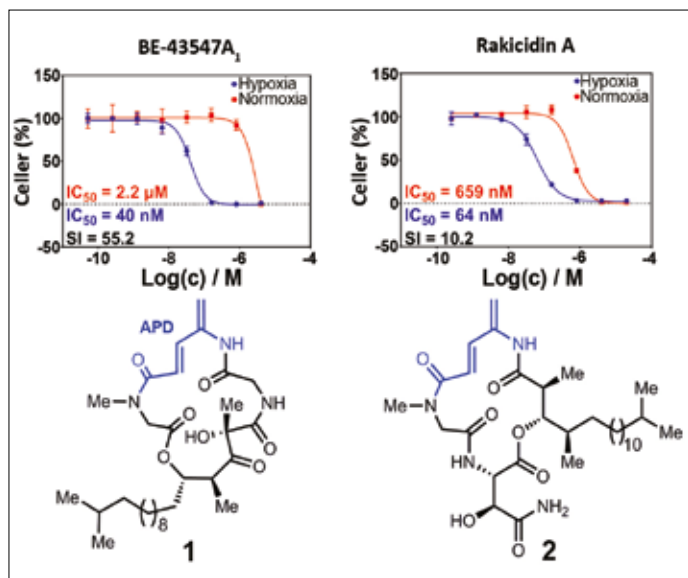
Denne unikke fænotype er interessant at studere, da ingen kender de cellebiologiske mekanismer, der ligger til grund for toksiciteten, dvs. stoffernes såkaldte virkningsmekanisme. På sigt er målet med projektet at finde nye proteiner eller andre

biomolekyler, der er essentielle for hypoxiske cancerceller, som kan agere "targets" i kræftbehandling. En forsimplet udgave af et APD-CLD-naturstof vil potentielt kunne bruges til kemoterapi.

Rakicidin A har tiltrukket sig opmærksomhed fra flere forskningsgrupper rundt omkring i verden. Det blev syntetiseret første gang i 2014 af Yue Chen fra Nankai Universitet, Kina og hans laboratorium [4]. Vi har efterfølgende også syntetiseret rakicidin A samt en simplificeret analog (WY-1, ikke vist), som bevarer hypoxiselektiviteten [5,6].



Figur 1. En forsimplet fremstilling af tumorhypoxi. Koncentrationen af O₂ falder i takt med, at afstanden til blodåren stiger.



Figur 2. Naturstofferne BE-43547A₁ (**1**) og rakicidin A (**2**) tilhører begge APD-CLD-klassen af naturstoffer. Begge stoffer udviser forøget toksicitet overfor cancerceller under hypoxi relativt til under normoxi.

BE-43547A₁ (**1**) er det mest potente medlem af BE-43547-familien, der indeholder syv forskellige naturstoffer A_{1,2}, B_{1,3} og C_{1,2}, med forskellig længde og forgrening af den alifatiske sidekæde. BE-43547-molekylerne blev isoleret fra en *Streptomyces* bakterie (stamme: A43547) og beskrevet i et japansk patent fra 1998 [7].

Dette var det eneste offentliggjorte studie af BE-43547-molekylerne, og det beskrev ikke molekylerne stereokemi eller den hypoxi-selektive fænotype.

Vi påbegyndte syntesen af BE-43547A₁ for at udlede stereokemien. Vi havde desuden en hypotese om, at stoffet ville udvise samme hypoxi-selektivitet som rakicidin A.

Totalsyntesen

Grundet den ukendte stereokemi var det essentielt at udvikle en syntesevej, som ville give adgang til alle stereoisomerer af BE-43547A₁. I syntesen startede vi med at syntetisere aldehydet **3** samt TBS-enolatet **4**. Vi kunne herefter udnytte en kendt Kobayashi aldol-reaktion til at koble de to molekyler og opnå alkoholen **5-anti**, figur 3. Ved at ændre mængden af TiCl₄ fra 1 til 4 ækvivalenter kunne vi konstruere molekylet **5-syn** (ikke vist). Derved havde vi fuld kontrol over de to nye stereocentre. I en sekvens på syv reaktioner kunne vi omdanne alkoholen **5-anti** til produktet **9-anti** i en 1,4:1 blanding af diastereomerer, figur 3. Oxidation af alkoholen i **9-anti** til aldehydet og efterfølgende cyklisering via en Horner-Wadsworth-Emmons-type reaktion gav de makrocycliske stoffer **10-anti P1/P2**. Her kunne vi let separere de to isomerer kaldet henholdsvis **P1** og **P2**. Disse blev omdannet til BE-43547A₁-isomererne **1-A₁-anti P1** og **1-A₁-anti P2** via tre syntesetrin. Gennem en lignende reaktionssekvens blev **5-syn** omdannet til **1-A₁-syn P1/P2**.

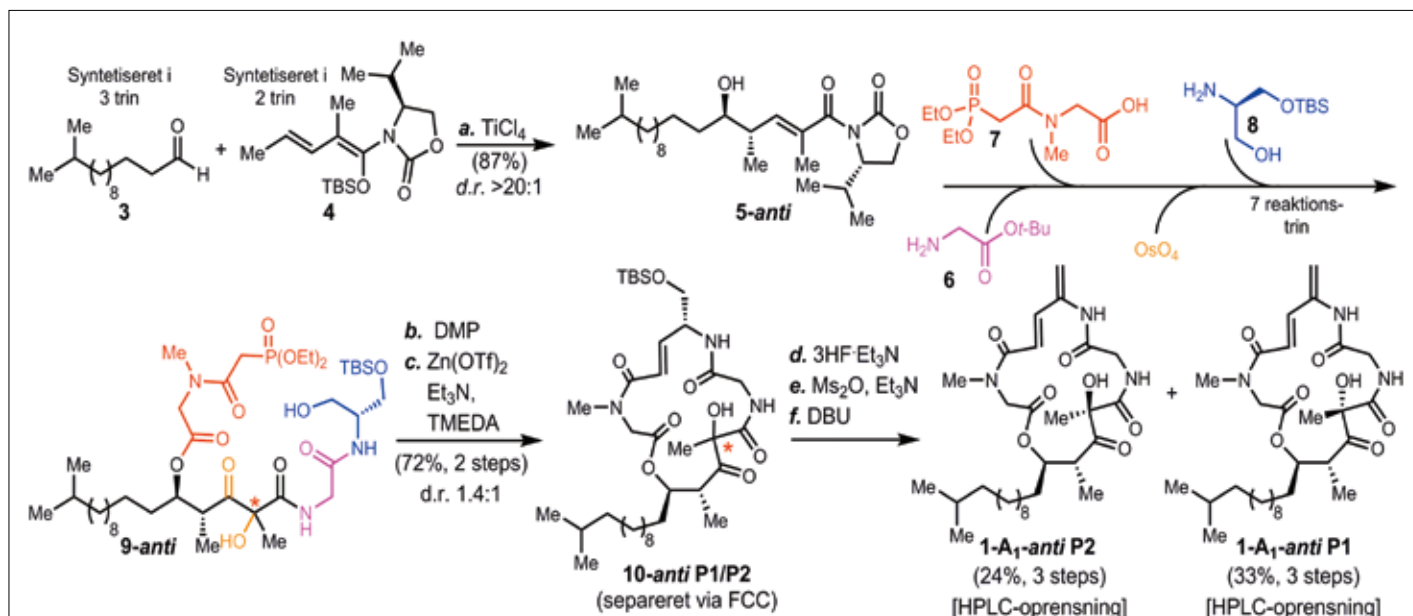
De fire mulige diastereomere burde muliggøre en sammenligning af NMR-data med naturstoffet og derved entydigt afsløre, hvilken isomer, der var den naturlige. Det viste sig dog – temmelig overraskende – at alle de syntetiserede stoffer havde markante afvigelser fra naturstoffet, hvilket kun kunne betyde, at den rapporterede kemiske struktur eller det rapporterede data måtte være forkert.

For endeligt at kunne fastslå, hvilken isomer der var den naturlige variant, var vi derfor nødt til at isolere BE-43547A₁ fra en mikroorganisme, der kan producere stoffet. Ved analyse af disse bakteriers DNA ville vi kunne opnå indsigt i stoffets biosyntese, da dette ligeledes ville kunne afsløre stoffets kemiske struktur.

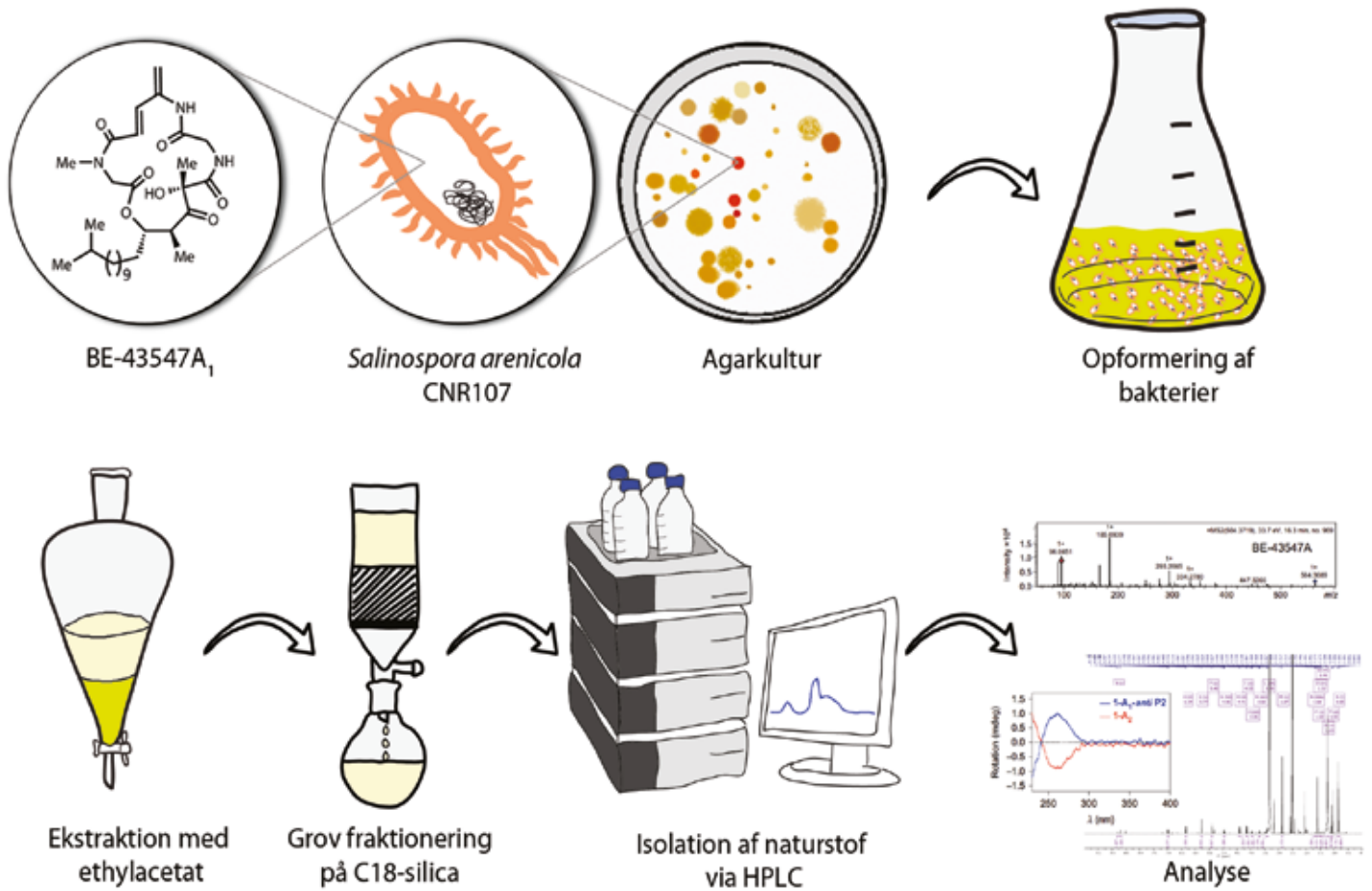
Genom-analyse og isolation fra bakterier

Desværre var det hverken muligt at få fat i den originale bakteriestamme eller at komme i kontakt med forfatterne fra det japanske patent.

Vores eneste ledetråd var derfor en artikel, der analyserer samlingen af gener (kaldet et gencluster), der er ansvarlig for



Figur 3. En komprimeret udgave af totalsyntesen af enantiomeren af **1 (1-A₁-anti P2)** samt en diastereomer af **1-A₁ (anti P1)**. En lignende syntesevej resulterede i de to syn-isomerer af **1-A₁** (ikke vist). * indikerer blanding af R og S på det pågældende stereocenter. Forkortelser: Me; methyl, d.r.; diastereomerisk ratio, TBS; *tert*-butyldimetylsilyl, DMP; Dess-Martin periodinan, Tf; triflat, Et₃N, trimethylamin, TMEDA; tetramethylethylendiamin, FCC; flash column chromatography, Ms; mesyl, DBU; 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en.

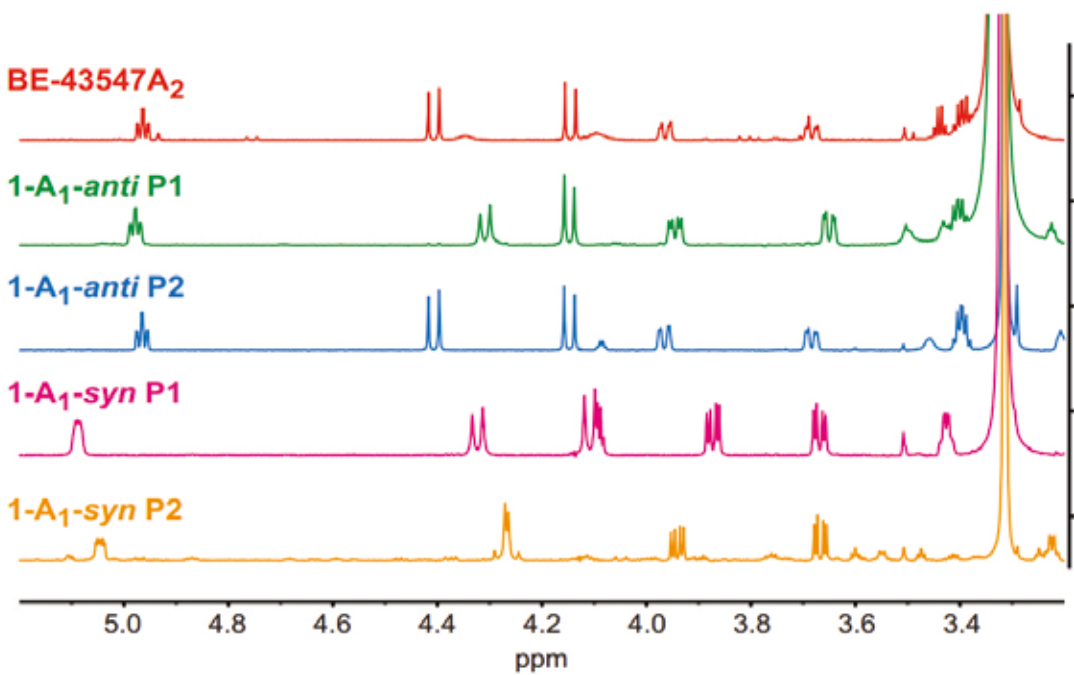


Figur 4. Bakterien CNR107 af stammen *Salinispora arenicola*, der producerer BE-43547A₁, blev dyrket på en agarplade. En enkelt koloni blev opformeret i flydende medie. Efter ekstraktion, fraktionering og HPLC-oprensning blev det rene naturlstoff isoleret og analyseret.

biosyntesen af et medlem fra rakacidin-familien, rakacidin D (ikke vist) [8]. Her opdagede vi, at to protein-domæner i den del af det biosyntetiske samlebånd, som er ansvarligt for dan-

nelsen af APD-enheden, var arrangeret i en ukonventionel rækkefølge. Vi kunne bruge dette som et DNA-fingeraftryk, og ved hjælp af BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) var vi i stand til at finde bakterier med samme maskineri til at producere stoffer med en APD-enhed. Videre analyse af de fundne match viste, at to kendte bakteriestammer burde være i stand til at producere BE-43547A₁.

Opdyrkning af bakterierne på lille skala og analyse via HPLC-MS (High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry) og sammenligning med de syntetiske isomerer viste, at bakterierne producerede BE-43547A-, B- og C-molekylerne. Bakterien *Salinispora arenicola* CNR107 blev derefter opdyrket på stor skala (14 L), hvorefter de blev ekstraheret med ethylacetat, og BE-43547-molekylerne



Figur 5. Sammenligning af H-NMR spektrum for det isolerede naturlstoff (rød) med de fire syntetiserede isomerer viser, at **1-A₁-anti P2** (blå) matcher.

blev oprenset via en grov fraktionering på revers-fase silica og efterfølgende HPLC, figur 4. Det viste sig, at CNR107 producerede markant mere BE-43547A₂ end BE-43547A₁.

Sammenligning af NMR-data fra BE-43547A₂ med de fire syntetiserede **1-A₁**-isomerer viste tydeligt, at isomeren **1-A₁-anti P2** matchede, figur 5. Med naturstoffet i hånden kunne vi udføre biologiske eksperimenter, og her påviste vi, at BE-43547A₁ var toksisk samt hypoxi-selektivt.

Konklusion og perspektiver

Den sidste brik i puslespillet var at finde stereokemien af BE-43547A₁. Cirkulær dikroisme spektroskopi viste, at den syntetiserede isomer var enantiomeren af naturstoffet. Den rumlige konfiguration ved det kvaternære stereocenter blev tilordnet via en blanding af 2D-NMR og computermodellering. Resultatet (S-konfiguration) stemte overens med den stereokemi, som vores analyse af biosyntesen ligeledes indikerede.

Vi har dermed fundet stereokemien af naturstoffet og fuldført den første totalsyntese af enantiomeren af BE-43547A₁. Vi har fundet et DNA-fingeraftryk for APD-producerende bakterier, og vi har vist, at BE-43547-familien er den hidtil mest hypoxi-selektive toksiske naturstoffer.

I igangværende cellebiologiske studier undersøger vi, hvordan BE-43547A₁ opnår sin selektivitet mod hypoxiske celler.

Vi vil også prøve at fremstille simplificerede BE-43547A₁-analoger, som vi kan bruge til præ-kliniske studier i mus.

I sidste ende kan vores studier forhåbentlig resultere i en øget overlevelse af kræftpatienter.

E-mail:

Thomas B. Poulsen: thpou@chem.au.dk

Thomas Tørring: thomast@chem.au.dk

Referencer

1. Villadsen, N. L.; Jacobsen, K. M.; Keiding, U. B.; Weibel, E. T.; Christiansen, B.; Vosegaard, T.; Bjerring, M.; Jensen, F.; Johannsen, M.; Tørring, T.; Poulsen, T. B. (2016): Synthesis of ent-BE-43547A₁ reveals a potent hypoxia-selective anticancer agent and uncovers the biosynthetic origin of the APD-CLD natural products *Nat. Chem.*, doi:10.1038/nchem.2657.
2. Brown, J. M.; Wilson, W. R. (2004) Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, s. 437-447.
3. Rankin, E. B.; Giaccia, A. J. (2016) Hypoxic control of metastasis. *Science*, vol. 352, s. 175-180.
4. Sang, F.; Li, D.; Sun, X.; Cao, X.; Wang, L.; Sun, J.; Sun, B.; Wu, L.; Yang, G.; Chu, X.; Wang, J.; Dong, C.; Geng, Y.; Jiang, H.; Long, H.; Chen, S.; Wang, G.; Zhang, S.; Zhang, Q.; Chen, Y. (2014): Total synthesis and determination of the absolute configuration of rakicidin A. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, s. 15787-15791.
5. Tsakos, M.; Clement, L. L.; Schaffert, E. S.; Olsen, F. N.; Rupiani, S.; Djurhuus, R.; Yu, W.; Jacobsen, K. M.; Villadsen, N. L.; Poulsen, T. B. (2016): Total synthesis and biological evaluation of rakicidin A and discovery of a simplified bioactive analogue. *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 55, s. 1030-1035.
6. Tsakos, M.; Jacobsen, K. M.; Yu, W.; Villadsen, N. L.; Poulsen, T. B. (2016) The rakicidin family of anticancer natural products - synthetic strategies towards a new class of hypoxia-selective cytotoxins. *Synlett.*, vol. 27, s. 1898-1906.
7. Nishioka, H.; Nakajima, S.; Nagashima, M.; Kojiri, K.; Suda, H. (1998) BE-43547 series substances, their manufacture with *Streptomyces* species, and their use as antitumor agent. Japanese patent 10147594 A 19980602.
8. Albright, J. C.; Goering, A. W.; Doroghazi, J. R.; Metcalf, W. W.; Kelleher, N. L. (2014) Strain-specific proteogenomics accelerates the discovery of natural products via their biosynthetic pathways. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 41, s. 451-459.

NEED A CREATIVE ADVISOR?

Between you and your ideas, we'll find the spark for brilliant business opportunities. From IP strategy, legal services and analysis to patents, trademarks, design and copyright, we help illuminate the vast potential in your creation. www.awapatent.com

 **AWAPATENT**