

Die Totalsynthese von (+)-Ratjadon

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Chemiker Mathias Christmann

geboren am 17. Oktober 1972

in Peine

2001

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbständig durchgeführt und keine unerlaubte Hilfe in Anspruch genommen zu haben. Die aus fremden Quellen übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Hannover, im Januar 2001

Referent: PD Dr. Markus Kalesse
Koreferent: Prof. Dr. Hartmut H. Meyer
Tag der Prüfung: 09.02.2001

Kurzfassung

Christmann, Mathias

Die Totalsynthese von (+)-Ratjadon

Schlagnworte: Totalsynthesen, Naturstoffe, Ratjadon

Im Rahmen dieser Dissertation konnte die erste Totalsynthese von (+)-Ratjadon erfolgreich abgeschlossen und die bislang unbekannte Konfiguration mit Hilfe von NMR-Methoden, CD-Spektroskopie und biologischen Tests zweifelsfrei ermittelt werden. Die hier beschriebene Ratjadon-Synthese umfaßt 17 lineare Stufen bei 7.5% Gesamtausbeute. Unsere Strategie erlaubt es, Ratjadon ausgehend von den Fragmenten **A**, **B** und **C** in nur 5 Stufen zu synthetisieren, was im Hinblick auf Struktur-Aktivitätsuntersuchungen einen flexiblen Zugang zu Analoga eröffnet. Für die Synthese des **A**-Fragments wurde eine hochdiastereoselektive Variante der vinylogenen Mukaiyama-Aldolreaktion mit Triarylboranen als Lewis-Säuren entwickelt. Das **C**-Fragment wurde durch eine optimierte asymmetrische Hetero-Diels-Alder-Reaktion in insgesamt 4 Stufen aufgebaut. Diese Route stellt den bislang kürzesten publizierten Zugang zu diesem wichtigen Polyketidbaustein dar. Weiterhin konnte für die Anknüpfung des **A**- an das **BC**-Fragment gezeigt werden, daß die intermolekulare Heck-Reaktion eine interessante Alternative zu Stille- oder Suzuki-Kupplungen in der Synthese komplexer Naturstoffe ist. Um einen ersten Überblick über die Struktur-Aktivitätsbeziehungen von Ratjadon zu erhalten, wurden einige Ratjadon-Derivate synthetisiert und getestet. Das Derivat **R1** bewirkt bei geringerer Cytotoxizität die gleiche Wachstumsinhibierung wie der Naturstoff. Im Hinblick auf eine pharmazeutische Anwendung ist das ein sehr wichtiges Ergebnis, da der erwünschte biologische Effekt die Inhibierung von unkontrolliertem Zellwachstum ist. Durch eine Zellzyklusanalyse konnte festgestellt werden, daß Ratjadon die Zellen in der G1-Phase arretiert.

Abstract

Christmann, Mathias

The Total Synthesis of (+)-Ratjadone

Keywords: Total syntheses, natural products, ratjadone

The first total synthesis of (+)-ratjadone is described. With this work its previously unknown configuration was determined unambiguously by NMR-studies, CD-spectroscopy and biological testings. This highly convergent synthesis has 17 linear steps and 7.5% overall yield. Our approach allows the synthesis of ratjadone from 3 fragments **A**, **B** and **C** within 5 steps, which opens the door for a rapid assembly of various ratjadone derivatives for the identification of biologically active substructures. For the synthesis of the **A**-fragment a highly diastereoselective version of the vinylogous Mukaiyama aldol reaction using triarylboranes as the Lewis acids was developed. The **C**-fragment was synthesized using an optimized hetero Diels-Alder approach. This route allows fast access to this important polyketide building block. In addition, the Heck reaction has been demonstrated to be an interesting alternative to Stille and Suzuki couplings in the total synthesis of natural products. To gain insight into the structure-activity-relationship of ratjadone we synthesized analogs. The derivative **R1** was found to have the same growth inhibiting properties as ratjadone but with a lower cytotoxicity. This is an important finding since growth inhibition accompanied with low cytotoxicity is highly desirable for pharmaceutical application. In mode of action studies ratjadone was shown to cause cell cycle arrest in the G1-phase.

Für Christina

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom Juli 1998 bis zum Januar 2001 unter der Leitung von PD Dr. Markus Kalesse am Institut für Organische Chemie der Universität Hannover angefertigt.

Für die Überlassung des Themas, die intensive Betreuung während der Doktorarbeit und die ständig vorhanden Diskussionsbereitschaft möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. Markus Kalesse herzlich bedanken.

Prof. Dr. H. H. Meyer danke ich für die Übernahme des Koreferats sowie die zahlreichen Anregungen und sein Interesse während dieser Doktorarbeit.

Meinen Laborkollegen Ulhas Bhatt, Eckhard Claus, Sven Lange, Katrin Michelis, Monika Quitschalle, Olaf Schrake und Timo Stellfeld danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit inner- und außerhalb des Labors.

Den Mitarbeitern der Spektroskopie, Dr. Edgar Hofer, Monika Rettstadt und Dagmar Körtje danke ich für ihre Hilfsbereitschaft.

Lars Ole Haustedt und Rüdiger Wittenberg danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meinen Eltern, Manfred und Edeltraud Christmann und meinen Schwestern, Sonja und Ute, danke ich für das Vertrauen und die Unterstützung, ohne die diese Arbeit nie entstanden wäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt Christina Lorenz für ihre Unterstützung und ihr Verständnis für die Nachtschichten und Wochenenden im Labor während der letzten Jahre.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Myxobakterien als Produzenten biologisch aktiver Sekundärmetaboliten | 2 |
| 1.2 Ratjadon – ein cytotoxisches Antibiotikum aus <i>Sorangium Cellulosum</i> | 3 |
| 2. Aufgabenstellung | 5 |
| 3. Synthetischer Teil | 7 |
| 3.1 Retrosynthese | 7 |
| 3.2 Synthese eines Modellsystems für das A -Fragment | 9 |
| 3.3 Synthese des A -Fragments | 11 |
| 3.4 Synthese des B -Fragments | 24 |
| 3.5 Synthese des C -Fragments | 26 |
| 3.6 Abschließende Stufen zur Totalsynthese von (+)-Ratjadon | 30 |
| 4. Diskussion der Ergebnisse und Ausblick | 39 |
| 5. Experimenteller Teil | 46 |
| 5.1 Allgemeine Bemerkungen | 46 |
| 5.2 Beschreibung der Versuche | 48 |
| 6. Literaturverzeichnis | 84 |

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| Ac | Acetyl |
| BINAP | 2,2'-Bis-(diphenylphosphino)-1,1'-binaphtyl |
| BINOL | 2,2'-Dihydroxy-1,1'-binaphthyl |
| Bn | Benzyl |
| Bu | Butyl |
| CD | Circulardichroismus |
| CoA | Coenzym A |
| COSY | correlated spectroscopy |
| dba | Dibenzylidenaceton |
| DET | Diethyltartrat |
| Dibal-H | Diisobutylaluminiumhydrid |
| DMAP | <i>N,N</i> -4-Dimethylaminopyridin |
| DMF | <i>N,N</i> -Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNPH | Dinitrophenylhydrazon |
| ee | Enantiomerenüberschuß |
| eq | Equivalent |
| Et | Ethyl |
| GBF | Gesellschaft für Biotechnologische Forschung |
| GI | Growth inhibition |
| HMG | Hydroxymethylglutarsäure |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| HRMS | High resolution mass spectroscopy |
| <i>i</i> Pr | Isopropyl |
| IR | Infrarotspektrum |
| KHMDS | Kaliumhexamethyldisilazid |
| LAH | Lithiumaluminiumhydrid |
| LC | Lethal concentration |
| LS | Lewis-Säure |
| <i>m</i> -CPBA | <i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure |

| | |
|--------|---|
| Me | Methyl |
| MIC | minimale inhibierende Konzentration |
| MS | Massenspektrum |
| MTPA | Methoxy-(trifluormethyl)-phenyllessigsäure |
| NaHMDS | Natriumhexamethyldisilazid |
| NCI | National cancer institute (USA) |
| NMO | <i>N</i> -Methylmorpholin- <i>N</i> -oxid |
| NMR | Nuclear magnetic resonance, Kernresonanz |
| Nu | Nucleophil |
| PCC | Pyridiniumchlorochromat |
| Ph | Phenyl |
| PMB | <i>para</i> -Methoxybenzyl |
| PPTS | Pyridinium- <i>para</i> -toluolsulfonat |
| Pr | Propyl |
| TASF | Tris(dimethylamino)-schwefel-trimethylsilyltrifluorid |
| TBAF | Tetrabutylammoniumfluorid |
| TBDPS | <i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl |
| TBHP | <i>tert</i> -Butylhydroperoxid |
| TBS | <i>tert</i> -Butyldimethylsilyl |
| Tf | Trifluormethansulfonyl |
| TGI | Total growth inhibition |
| THF | Tetrahydrofuran |
| TMS | Trimethylsilyl |
| TPAP | Tetra- <i>n</i> -propyl-ammoniumperruthenat |
| UV | ultraviolett |

1. Einleitung

Für die Behandlung von Krankheiten stehen der Medizin heute eine große Anzahl an Wirkstoffen zur Verfügung. Dennoch gibt es zahlreiche Krankheitsbilder, wie zum Beispiel Krebs, die nicht oder nur unzureichend behandelt werden können. Viele der eingesetzten Wirkstoffe sind Naturstoffe oder von Naturstoffen abgeleitete Verbindungen.

Neben Pflanzen sind oft Mikroorganismen, wie Pilze und Bakterien die Quelle neuer biologisch aktiver Verbindungen. Wird in den Bakterien eine interessante biologische Aktivität festgestellt, wird der betreffende Stamm in größerem Maßstab kultiviert. Die aktiven Verbindungen werden isoliert und auf ihre genaue Wirkung und Spezifität untersucht. Besteht die Vermutung, daß es sich um einen bisher unbekanntem Verbindungstyp handelt, wird dessen chemische Struktur aufgeklärt. Besonders interessant ist es, wenn ein Naturstoff eine hohe biologische Aktivität aufweist, die auf einen neuartigen Wirkmechanismus hindeutet. Um einen Zusammenhang zwischen der chemischen *Struktur* und der biologischen *Wirkung* zu finden, wird die Struktur des Naturstoffs modifiziert. Die Veränderungen in der biologischen Aktivität können so mit den strukturellen Veränderungen korreliert werden. Da man bei der Derivatisierung eines Naturstoffs auf wenige funktionelle Gruppen beschränkt ist, besteht oft ein starkes Interesse an einem flexiblen synthetischen Zugang. Die Totalsynthese erlaubt es, durch die gezielte Synthese von Analoga die biologische Wirkung zu untersuchen. Desweiteren leistet die Totalsynthese oft einen entscheidenden Beitrag zur Strukturaufklärung.

Naturstoffe selbst sind wegen ihrer Nebenwirkungen und ihres oft ungeklärten Wirkmechanismus meist nicht für den Einsatz als Wirkstoff geeignet. Der wirkliche Nutzen von Naturstoffen liegt darin, daß sie oft eine hohe Affinität zu einem bestimmten Target, z. B. einem Protein haben und durch die Interaktion mit diesem einen biologischen Effekt auslösen.^[1] Die Identifikation eines Targets ist der Schlüssel für die Untersuchung der Prozesse, die für das Funktionieren oder die Fehlfunktion eines biologischen Systems verantwortlich sind. Mit Hilfe der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung kann dann zum Beispiel die Rolle eines bestimmten Proteins in einen zellulären Prozeß auf molekularer Ebene untersucht werden (FK506: FK506 bindendes Protein; Paclitaxel: Tubulin; Mevinolin: HMG CoA Reduktase).

Das wichtigste zelluläre Ereignis ist das Zellwachstum, das durch eine Vielzahl von Proteinen reguliert wird. Gerät dieses komplizierte Regelwerk außer Kontrolle, kann das ein ungebremstes Zellwachstum und somit eine Krebserkrankung zur Folge haben. In unserer Arbeitsgruppe beschäftigen wir uns mit der Synthese kleiner zellpermeabler Moleküle wie Epothilon^[2] und Ratjadon, die den Zellzyklus beeinflussen. Mit Hilfe dieser Naturstoffe und deren Analoga sind wir in der Lage, die Funktion zellulärer Proteine zu untersuchen.

1.1 Myxobakterien als Produzenten biologisch aktiver Sekundärmetaboliten

Myxobakterien gehören zu den komplexesten prokaryontischen Organismen.^[3] Sie wachsen und teilen sich als einzelne Zellen, ernähren sich jedoch in dichten Schwärmen und sind unter Mangelbedingungen zur Bildung vielzelliger Aggregate, der sogenannten Fruchtkörper befähigt. Die Zellen im Inneren der Fruchtkörper besitzen eine höhere Resistenz gegen Trockenheit, Hitze und UV-Strahlung und erhöhen so die Überlebensfähigkeit des Gesamtorganismus. Myxobakterien besitzen die Fähigkeit, sich auf Oberflächen durch Gleiten in Schwärmen fortzubewegen (gliding bacteria), so daß man auf festen Medien eine rasche Ausbreitung der Kolonien beobachten kann. Hinsichtlich ihrer Ernährung lassen sich zwei Gruppen unterscheiden. Während die meisten Arten einen bakteriolytischen Stoffwechsel aufweisen haben sich die Vertreter der Gattung *Sorangium* auf den Abbau von Cellulose spezialisiert (cellulolytischer Stoffwechsel).

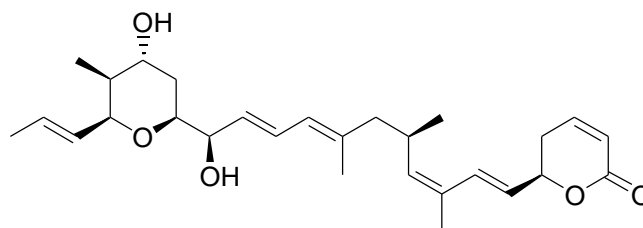
Myxobakterien produzieren eine große Anzahl von Sekundärmetaboliten, deren strukturelle Diversität mit der von Streptomycceten vergleichbar ist. Im Gegensatz zu den primären haben die sekundären Metaboliten keine unmittelbare Bedeutung für die Lebenserhaltung und den Stoffwechsel von Mikroorganismen. Sie dienen vielmehr der interzellulären Kommunikation und der Abwehr von Freßfeinden und Konkurrenten um einen bestimmten Lebensraum. Daher wirken viele dieser Substanzen antibiotisch oder cytotoxisch.

Seit 1975 werden an der GBF in Braunschweig in den Arbeitsgruppen von Reichenbach und Höfle Myxobakterienstämme kultiviert und auf die Produktion biologisch aktiver Sekundärmetaboliten untersucht.^[4] Im Rahmen dieses Screening-Programms wurden bisher 80 neue Grundstrukturen mit über 350 Strukturvarianten isoliert. Zu den größten Erfolgen zählt die Isolierung des neuartigen Antitumor-Wirkstoffs Epothilon aus dem Myxobakterienstamm *Sorangium cellulosum* (So ce90). Die isolierten Verbindungen umfassen ein breites Spektrum an unterschiedlichen Verbindungsklassen wie Makrolactamen

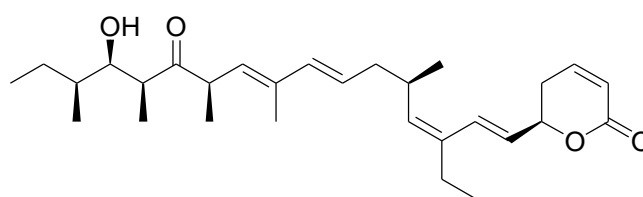
und -lactonen, Polyenen, Heterocyclen, Aromaten, Alkaloiden und Peptiden. Interessanterweise ist die Fähigkeit, einen bestimmten Strukturtyp zu produzieren stammspezifisch und nicht auf eine bestimmte Art beschränkt. Da es nur ca. 40 Arten von Myxobakterien gibt, hingegen aber eine praktisch unbegrenzte Zahl von Stämmen, bietet die Forschung an Myxobakterien auch in der Zukunft ein vielversprechendes Betätigungsfeld für die Entdeckung neuer biologisch aktiver Naturstoffe.

1.2 Ratjadon – ein cytotoxisches Antibiotikum aus *Sorangium Cellulosum*

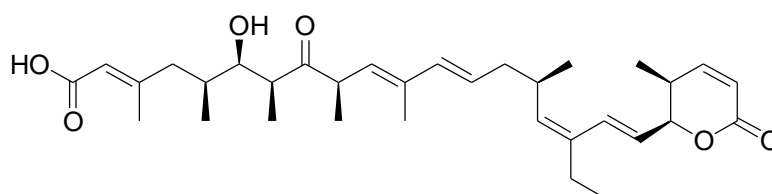
Das Polyketid Ratjadon wurde 1994 von Höfle et al. aus dem Myxobakterienstamm *Sorangium Cellulosum* (So ce360) isoliert.^[5] Seine Konstitution und die relative Konfiguration der Substituenten am Tetrahydropyran-Ring (C17-C21) wurde mit Hilfe von zweidimensionalen NMR-Methoden (H,H-COSY, H,C-COSY, HMQC, HMBC) bestimmt. Strukturell wie auch in seinem biologischen Profil ähnelt Ratjadon den Leptomycinen,^[6] Callystatin A^[7] und anderen strukturell verwandten Verbindungen.^[8]



Ratjadon (isoliert aus *Sorangium cellulosum*)



Callystatin A (isoliert aus *Callyspongia truncata*)



Leptomycin B (isoliert aus *Streptomyces sp.*)

Abbildung 1. Ratjadon, Callystatin A und Leptomycin.

Ratjadon ist ein typisches Polyketid, das aus 8 Acetat- und 4 Propionat-Einheiten aufgebaut ist. Dieses konnte durch Fütterungsexperimente mit ^{13}C -Acetat und ^{13}C -Propionat bestätigt werden. Die ungewöhnliche Position der C16-Hydroxygruppe wurde einem intramolekularen Angriff des C21-Sauerstoffs auf ein C16-C17-Epoxid zugeschrieben (Abbildung 2).

Ratjadon weist eine hohe Cytotoxizität gegenüber der Mauszelllinie L929 auf ($\text{IC}_{50} = 50 \text{ pg mL}^{-1}$) und inhibiert das Wachstum der HeLa-Zelllinie bei bemerkenswert niedriger Konzentration (40 pg mL^{-1}).^[9] Neben anderen interessanten biologischen Effekten, wie z. B. der Änderung der Zellmorphologie von Hefe, zeigt Ratjadon ein enges antibiotisches Spektrum gegen *Mucor hiemalis*, *Phytophthora drechsleri*, *Ceratocystis ulmi* und *Monila brunnea* mit MIC-Werten von 0.04 bis $0.6 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Trotz dieser vielversprechenden biologischen Eigenschaften sind weder der genaue Mechanismus noch die molekularen Targets bekannt.

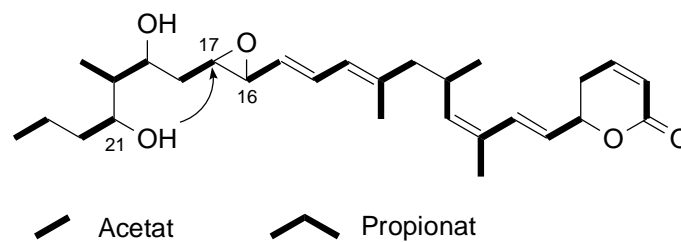


Abbildung 2. Biogenese-Schema von Ratjadon.