

der Sauerstoffaktivierung hat allerdings ein generelles Hindernis, die leichte Bildung von μ -Peroxo-Dimeren^[15].

Berücksichtigt man die vielfältigen und komplexen Wechselwirkungen zwischen aktivem Zentrum und Substrat, die oft durch die Mitwirkung von Cofaktoren weiter moduliert wird, so kann man kaum ein einheitliches Bild des Reaktionsmechanismus und der aktiven oxygenierenden Spezies der einkernigen Häm-freien Eisenproteine erwarten. Allerdings ergaben die intensiven Forschungen der letzten Jahre, daß die Häm-freien Eisenenzyme wahrscheinlich über eine Peroxo-Zwischenstufe reagieren, also anders als Eisenporphyrine, bei denen hochkoordinierte Oxoeisen-Spezies die zentralen Intermediate sind.

Stichworte: Bioanorganische Chemie · Bleomycin · Eisenverbindungen · Nicht-Häm-Eisenproteine · Sauerstoffaktivierung

- [1] A. L. Feig, S. Lippard, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 759.
- [2] „Iron Proteins with Mononuclear Active Site“: L. Que in *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, Vol. 4 (Hrsg.: R. B. King), Wiley, Chichester, **1994**, S. 1859.
- [3] J. Stubbe, J. W. Kozarich, *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 1107.
- [4] a) R. J. Guajardo, S. E. Hudson, S. J. Brown, P. Mascharak, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7971; b) J. W. Sam, X.-J. Tang, J. Peisach, *ibid.* **1994**, *116*, 5250; c) T. E. Westre, K. E. Loeb, J. M. Zaleski, B. Hedman, K. O. Hogson, E. I. Solomon, *ibid.* **1995**, *117*, 1309.
- [5] a) G. C. Silver, W. C. Trogler, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3983; b) A. L. Nivorozhkin, P. Mialane, J.-J. Girerd, G. Blondin, A. Rabion, G. Pratiel, M. Slany, F. Godde, B. Meunier, T. A. Mattioli, P. Soubayrol, *Inorg. Chem.* **1995**, eingereicht; c) I. Bernal, I. M. Jensen, K. B. Jensen, C. J. McKenzie, H. Toftlund, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1995**, 3667; d) Y. Zang, T. E. Elgren, Y. Dong,
- [6] a) J. C. Boyington, B. J. Gaffney, L. M. Amzel, *Science* **1993**, *260*, 1483; b) W. Minor, J. Steczko, J. T. Bolin, Z. Otwowski, B. Axelrod, *Biochemistry* **1993**, *32*, 6320.
- [7] a) M. J. Nelson, R. A. Cowling, S. P. Seitz, *Biochemistry* **1994**, *33*, 4966; b) R. J. Guajardo, P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 802.
- [8] P. L. Roach, I. J. Clifton, V. Füllöp, K. Harlos, G. J. Barton, J. Hajdu, I. Andersson, C. J. Schofield, J. E. Baldwin, *Nature* **1995**, *375*, 700.
- [9] a) S. Han, L. D. Eltis, K. N. Timmis, S. W. Muchmore, J. T. Bolin, *Science* **1995**, *270*, 976; b) P. A. Mabrouk, A. M. Orville, J. D. Lipscomb, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4053; c) L. Shu, Y.-M. Chiou, A. M. Orville, M. A. Miller, J. D. Lipscomb, L. Que, *Biochemistry* **1995**, *34*, 6649; d) J. Sanvoisin, G. J. Langley, T. D. H. Bugg, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7836.
- [10] a) A. M. Orville, J. D. Lipscomb, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 8596; b) D. H. Orlendorf, J. D. Lipscomb, P. C. Weber, *Nature* **1988**, *336*, 403; c) D. H. Orlendorf, A. W. Orville, J. D. Lipscomb, *J. Mol. Biol.* **1994**, *244*, 586.
- [11] a) H. G. Jang, D. D. Cox, L. Que, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9200; b) Y.-M. Chiou, L. Que, *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 3577; c) W. O. Koch, H.-J. Krüger, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2928; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *107*, 2671.
- [12] a) G. T. Gassner, D. P. Ballou, G. A. Landrum, J. W. Whittaker, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4820; b) E. G. Pavel, L. J. Martins, W. R. Ellis, E. E. Solomon, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 173; c) P. Wende, I.-H. Bernhardt, K. Pfleger, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *181*, 189.
- [13] a) T. Dix, S. J. Benkovic, *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 101; b) N. Kitajima, M. Ito, H. Fukui, Y. Moro-oka, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9335.
- [14] a) Y.-M. Chiou, L. Que, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7567; b) Y.-M. Chiou, L. Que, *ibid.* **1995**, *117*, 3999; c) E. H. Ha, R. Y. N. Ho, J. F. Kisiel, J. S. Valentine, *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 2265.
- [15] N. Kitajima, N. Tamura, H. Amagai, H. Fukui, Y. Moro-oka, Y. Mizutani, T. Kitagawa, R. Mathur, K. Heerwegh, C. A. Reed, C. R. Randall, L. Que, K. Tatsumi, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9071.

Dimere Pyrazinsteroid-Alkaloide aus marinen Organismen: eine Herausforderung bei der Isolierung, der Synthese und der Erforschung ihrer biologischen Wirkung**

Arasu Ganesan*

Professor Clayton Heathcock zum 60. Geburtstag gewidmet.

Die Isolierung der Cephalostatine und Ritterazine

Seit 1955 sucht man am American National Cancer Institute (NCI) mit großem Einsatz nach antitumorwirksamen Verbindungen. Allein zwischen 1955 und 1980 wurden etwa 130 000 Pflanzen- und Tierextrakte untersucht, wobei der größte Erfolg sicherlich die Isolierung von Taxol aus der Pazifischen Eibe war. Hier wird eine Gruppe von Steroiden vorgestellt, die ihre Entdeckung ebenfalls den Anstrengungen des NCI verdanken.

Im Jahre 1974 erwiesen sich Extrakte aus dem winzigen (ca. 5 mm großen) marinen Röhrenwurm *Cephalodiscus gilchristi*,

der vor der südafrikanischen Küste gefunden wurde, bei der vom NCI als Primärassay verwendeten murinen lymphozytischen Leukämie P388 als wirksam. Fünfzehn Jahre rastloser Forschung durch die Arbeitsgruppe von Pettit gipfelten in der Isolierung von 139 mg der bioaktiven Hauptkomponente, des Cephalostatins 1, aus 166 kg (Naßgewicht) Röhrenwürmern und schließlich in der strukturellen Charakterisierung dieser Verbindung^[1]. Was daraufhin geschah, wurde so beschrieben^[2]: „Interest in such a powerfully antileukemic agent as cephalostatin 1 . . . has prompted Americans to dive extensively at a depth of 20 meters to collect *C. gilchristi* in open seawaters controlled by the white shark.“

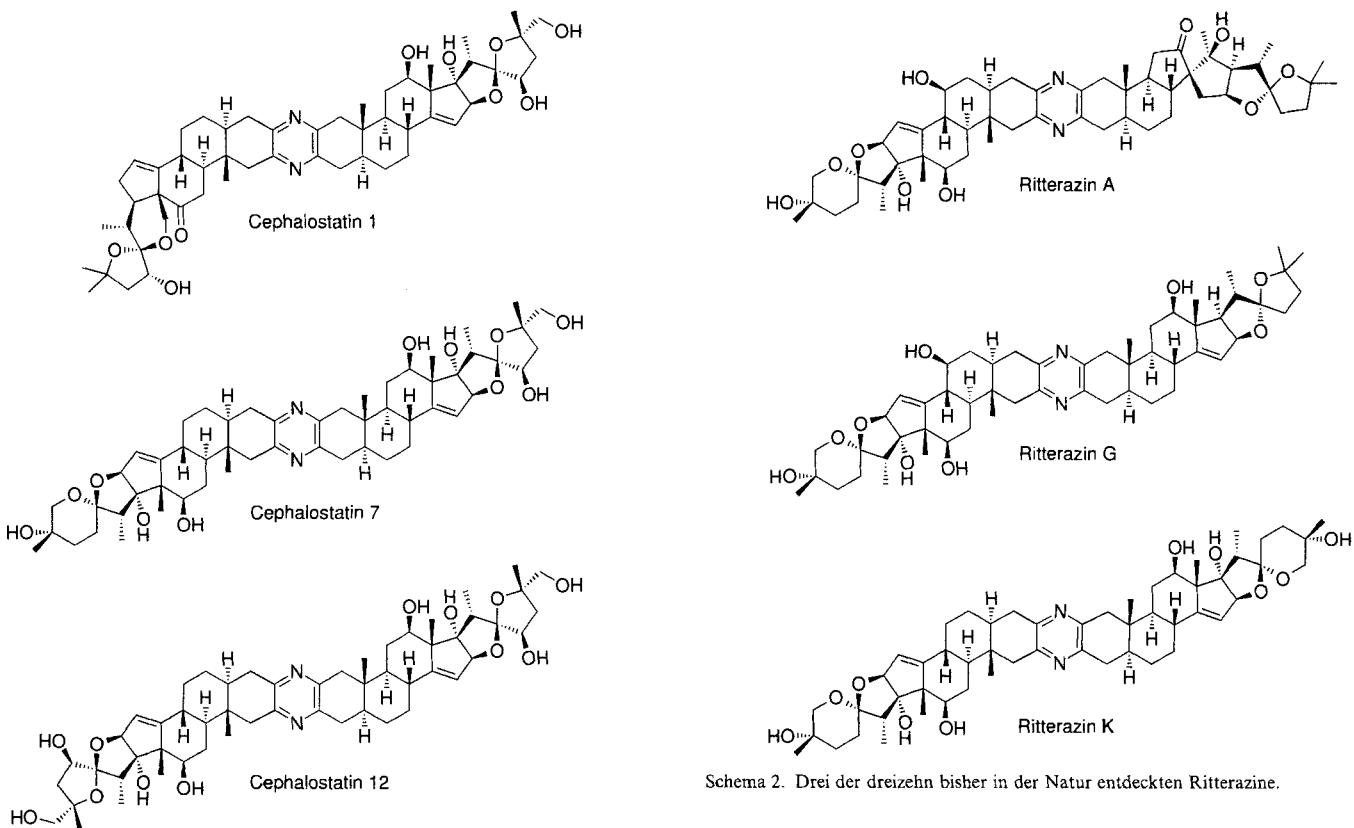
Cephalostatin 1 ist mit einem ED₅₀-Wert von 10^{-7} – $10^{-9} \mu\text{g mL}^{-1}$ äußerst wirksam gegen P388. In den Folgejahren wurden in der Arbeitsgruppe von Pettit sechzehn weitere Cephalostatine charakterisiert^[3], alle mit dem gleichen neuartigen Grundgerüst (Schema 1): Die A-Ringe zweier Steroidmoleküle sind durch einen ankondensierten Pyrazinring miteinander ver-

[*] Dr. A. Ganesan

Centre for Natural Product Research, Institute of Molecular and Cell Biology
National University of Singapore
10 Kent Ridge Crescent, Singapore 119260 (Singapur)

Telefax: Int. +779/1117
E-mail: mcgbane@nus.sg

[**] Der Autor dankt Dr. Christopher Larson vom Salk Institute, San Diego, USA,
für hilfreiche Diskussionen.



Schema 1. Drei der siebzehn bisher in der Natur entdeckten Cephalostatine.

knüpft. Bei fünfzehn dieser Alkaloide ist die „rechte Hälfte“ identisch, und Cephalostatin 12 ist sogar ein C_2 -symmetrisches Homodimer.

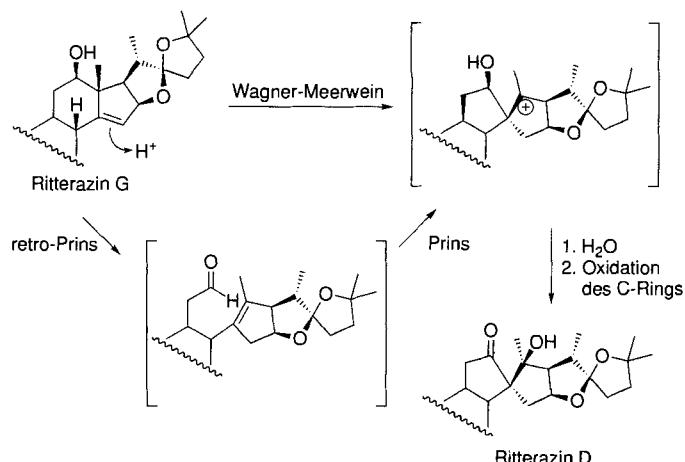
Im Jahre 1994 wurde ein dimeres Pyrazinsteroid in einer ungewöhnlichen Quelle gefunden^[4]: Fusetani und seine Gruppe isolierten Ritterazin A aus dem vor Japans Küsten lebenden Manteltierchen *Ritterella tokioka*; diese Verbindung hat einen ED_{50} -Wert von $10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$ bei der Behandlung von P 388. Seitdem wurden zwölf weitere Ritterazine beschrieben^[5] (Schema 2), darunter ein Homodimer, Ritterazin K. Die umgelagerten „rechten Hälften“ einiger Ritterazine könnten folgendermaßen entstanden sein (Schema 3): Nach der Protonierung der Doppelbindung im D-Ring erfolgt entweder eine 1,2-Wagner-Meerwein-Umlagerung oder eine Retro-Prins-Ringöffnung mit anschließendem Prins-Ringschluß.

Die Verbindungen aus *C. gilchristi* und *R. tokioka* sind eindeutig miteinander verwandt (Ritterazin K enthält z. B. die „linke Hälfte“ von Cephalostatin 7); ein in beiden Spezies vorkommendes Alkaloid wurde aber bisher noch nicht gefunden. Das Vorkommen dieser Substanzen in zwei unterschiedlichen Tierstämmen deutet darauf hin, daß sie möglicherweise von symbiotischen Mikroorganismen gebildet werden.

Untersuchungen zur Synthese

Am Anfang konzentrierten sich die präparativen Arbeiten^[6] auf die Synthese von symmetrischen dimeren Pyrazinsteroiden über die klassische Kondensation von α -Aminoketonen (Schema 4). Interessanterweise ist schon das Dimer **1** – mit einem

Schema 2. Drei der dreizehn bisher in der Natur entdeckten Ritterazine.

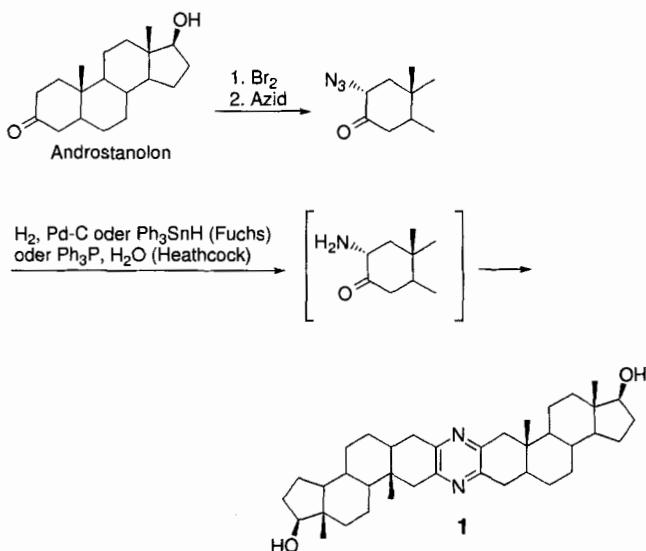


Schema 3. Möglicher Mechanismus der Umlagerung von Ritterazin G in Ritterazin D.

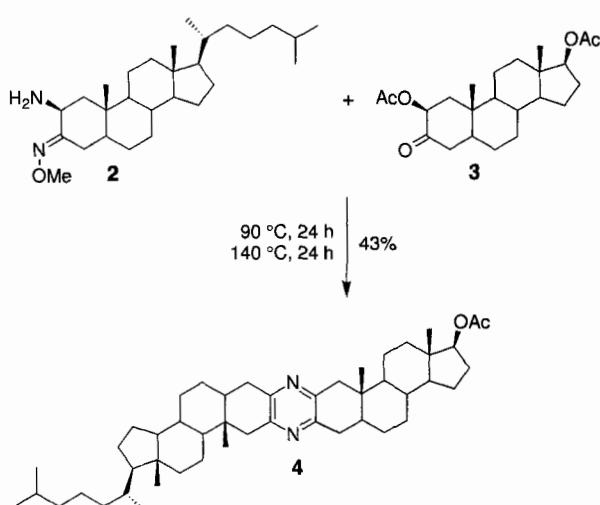
ED_{50} -Wert von etwa $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ für Tumorzelllinien – schwach cytotoxisch.

Smith und Heathcock^[6b] gelang die Synthese unsymmetrischer Dimere (Schema 5) – die meisten der natürlich vorkommenden Verbindungen gehören ja zu diesem Typ: Bei 90°C reagieren der α -Aminooximether **2** und das α -Oxoacetat **3** bevorzugt zu Intermediaten, die bei höherer Temperatur zum Pyrazin **4** aromatisieren. Die Umsetzung muß in zwei Stufen erfolgen, da der α -Aminooximether bei 140°C mit sich selbst kondensiert.

Winterfeldt et al.^[7] gelang es, aus einem Homodimer eine unsymmetrische Verbindung herzustellen (Schema 6): Kommerziell erhältliches Hecogeninacetat wurde nach Literaturvorschriften in das Keton **5** überführt und dieses zu **6** dimerisiert. Enolisierung und Abfangen des Produkts lieferten ein statisti-



Schema 4. Synthese symmetrischer dimerer Pyrazinsteroide.

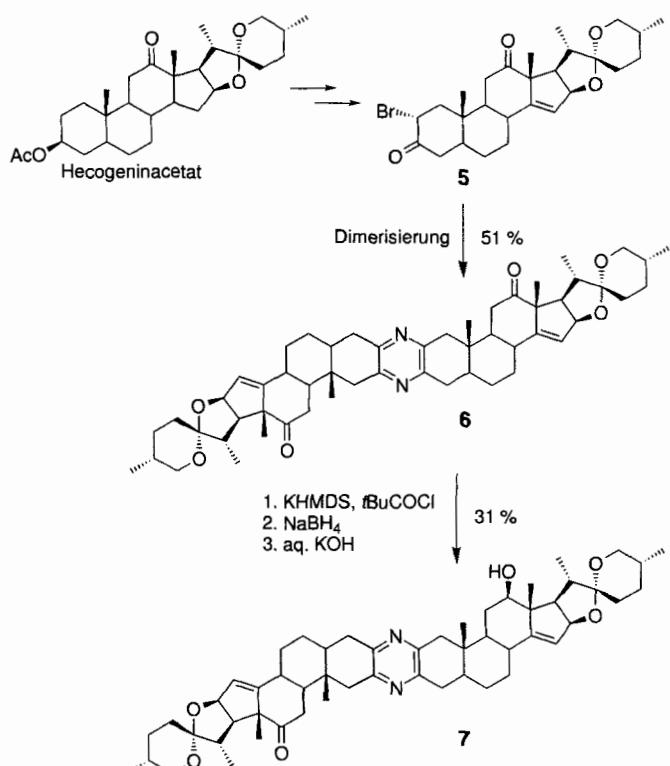


Schema 5. Synthese eines unsymmetrischen dimeren Pyrazinsteroids durch Smith und Heathcock.

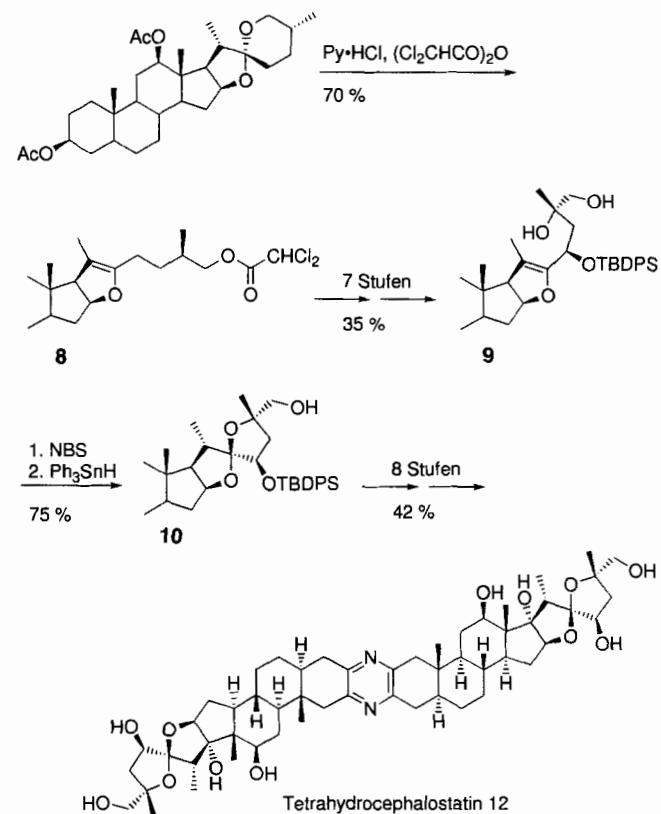
sches Gemisch aus unsymmetrischem Mono- und symmetrischem Bis-Ester, das getrennt werden konnte. Der unsymmetrische Ester wurde reduziert und zum Dimer 7 hydrolysiert, das das gleiche Oxygenierungsmuster am C-Ring und die Doppelbindung im D-Ring aufweist wie Cephalostatin 1.

Bisher stammen alle Veröffentlichungen zur Totalsynthese von Cephalostatinen aus der Arbeitsgruppe von Fuchs, dem als erstem die Synthese eines symmetrischen Dimers, dessen Teile der „rechten Hälfte“ von Cephalostatin 1 entsprechen, gelungen war^[8], allerdings ohne die Doppelbindung im D-Ring. Bei diesem Dimer handelt es sich also eigentlich um das Tetrahydro-derivat von Cephalostatin 12, dessen Existenz damals erst noch bewiesen werden mußte.

Ausgangspunkt der Synthese war ein Derivat von Hecogenin-acetat, in dem bereits das vollständige Kohlenstoffgerüst vorliegt. Eine klassische Marker-Ringöffnung des Sapogeninspiroketal-systems liefert 8 (Schema 7), das weiter zu 9 umgesetzt wurde. Die säurekatalysierte Cyclisierung von 9 lieferte eine Mischung aus den 5/5- und 6/5-Spiroketal-epimeren des Natur-



Schema 6. Selektive Umwandlung eines symmetrischen Dimers in ein unsymmetrisches durch Winterfeldt et al.

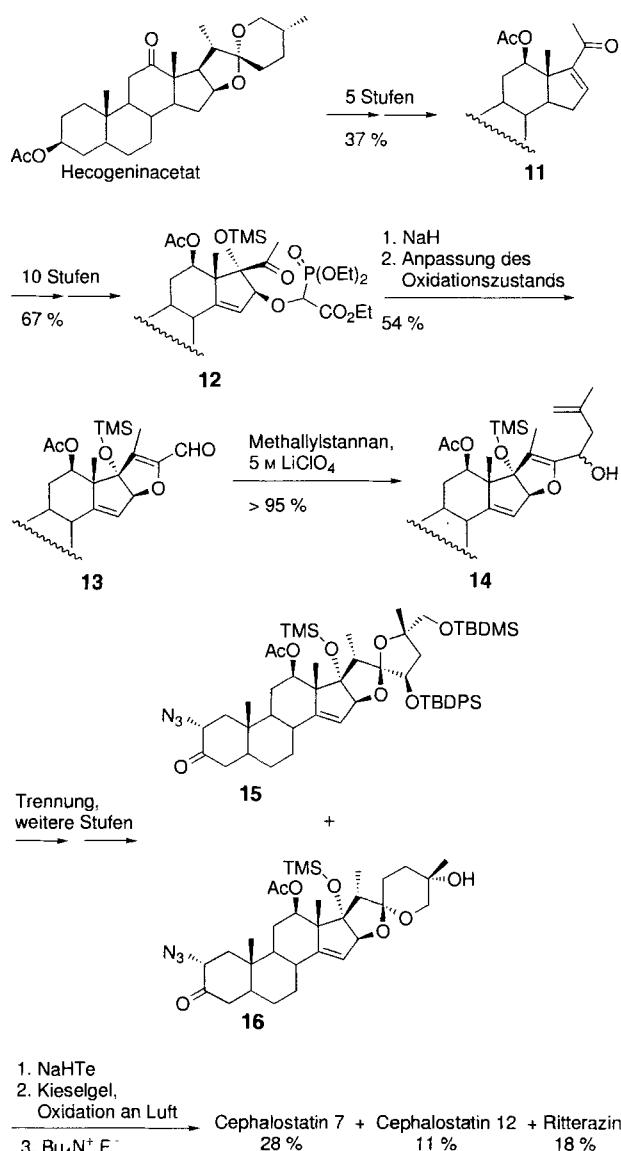


Schema 7. Synthese von Tetrahydrocephalostatin 12 durch Fuchs et al.

stoffen. In der Regel hängt das Verhältnis der Spiroketalverbindungen bei Cephalostatin-Vorstufen stark vom jeweiligen Substitutionsmuster ab. Dies kann man auch bei den natürlich vorkommenden Cephalostatinen beobachten; so gibt es drei

Paare von Ritterazinen, die sich nur in der Konfiguration der Spiroketalgruppe unterscheiden. In dem hier diskutierten Fall wurde das gewünschte Produkt **10** aus **9** durch elektrophile Bromierung und anschließende Entfernung des Broms erhalten. Dimerisierung lieferte dann das Tetrahydrocephalostatin **12**. Die biologische Aktivität dieser Verbindung wurde nicht beschrieben.

Inzwischen haben die Bemühungen der Arbeitsgruppe von Fuchs in der Totalsynthese von drei Alkaloiden dieses Typs kulminiert^[9]. Wegen der Doppelbindung im D-Ring und der Alkoholfunktion an C-17 mußte ein anderer Syntheseweg als beim Tetrahydrocephalostatin **12** gewählt werden. Im ersten Schritt wurde Hecogeninacetat durch einen Marker-Seitenkettenabbau in das Enon **11** überführt (Schema 8). Danach wurden die D-Ring-Substituenten eingeführt und der E-Ring durch eine intramolekulare Wadsworth-Emmons-Reaktion von **12** aufgebaut. Durch eine Methallylstannan-Addition an **13** wurde die restliche Seitenkette wieder eingeführt, und man erhielt schließlich **14**.

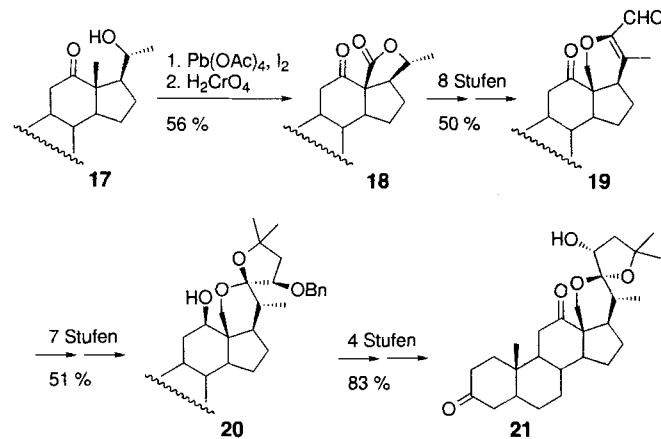


Schema 8. Synthese von Cephalostatin 7, Cephalostatin 12 und Ritterazin K durch Fuchs et al.

Die beiden Diastereomere von **14** wurden getrennt und einzeln zu den Monomeren **15** bzw. **16** weiter umgesetzt. Im großen Finale wurde eine 1:1-Mischung der α -Azidoketone reduziert, was die drei Dimere etwa im erwarteten Verhältnis von 1:2:1 lieferte; das Heterodimer war dabei das Hauptprodukt. Trennung und Abspaltung der Schutzgruppen lieferte die Naturstoffe. Fuchs et al. sind der Ansicht, daß eine ähnliche statistisch gesteuerte Dimerisierung auch in der Natur abläuft. Dies impliziert, daß Ritterazin K auch von *C. gilchristi* produziert wird. Und tatsächlich fand man in der Arbeitsgruppe von Pettit bei der Untersuchung von Rückständen Mikrogramm-Mengen einer Verbindung mit dem gleichen Chromatographieverhalten wie Ritterazin K.

Diese Arbeit ist ein Meilenstein in der Synthese komplexer mariner Naturstoffe und zeigt zugleich den Stand der präparativen Organischen Chemie, die manche für eine schon vollständig ausgereifte Wissenschaft halten. Sicherlich *effektiv* ist die präparative Organische Chemie in dem Sinne, daß wahrscheinlich jede stabile Verbindung herstellbar ist, doch *effizient* ist sie selten. Dies gilt besonders für Zielverbindungen mit vielen sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen. Um von Hecogeninacetat zu den beiden Naturstoff-Molekühlhälfte zu gelangen, waren mehr als zwanzig Stufen notwendig; die meisten betrafen den Austausch von funktionellen Gruppen oder das Einführen und Entfernen von Schutzgruppen. Es gibt also auch im nächsten Jahrhundert für Organiker noch viel zu tun, das ist sicher!

Die Arbeitsgruppe von Fuchs hat auch die „linke Hälfte“ von Cephalostatin 1 ohne die Doppelbindung im D-Ring synthetisiert^[10], um herauszufinden, welche Bedeutung diese Doppelbindung hat. Bei dieser Synthese (Schema 9) wurde die angulare Methylgruppe des Oxoalkohols **17** (der aus Hecogeninacetat erhalten wurde) mit der Hypoiodit-Methode von Meystre functionalisiert und oxidiert, was **18** ergab. Weitere Umsetzungen lieferten über die Intermediates **19** und **20** die Verbindung **21**, die wahrscheinlich zu einem α -Azidoketon, das sich für eine Kupplung mit **15** eignet, weiter umgesetzt wird.



Schema 9. Synthese der „linken Hälfte“ von Dihydrocephalostatin 1 durch Fuchs et al.

Biologische Aspekte

Die hier vorgestellten Alkaloide enthalten keine funktionellen Gruppen, die man normalerweise mit Cytotoxizität in Verbindung bringt – wie alkylierende Gruppen, Michael-Acceptoren,

intercalierende Gruppen oder redoxaktive Chinoneinheiten. Eine Untersuchung des Wirkungsmechanismus wird dadurch erschwert, daß diese Alkaloide nur in sehr kleinen Mengen verfügbar sind. Bei einer der ersten Hypothesen^[11] ging man vom steroidalen und dimeren Charakter dieser Verbindungen aus und nahm an, daß sie sich in die Lipiddoppelschicht einlagern (Cephalostatin 1 ist 30 Å lang) und so die Zellmembran von Eukaryonten durchdringen. Dann erwogen Fuchs et al.^[6a], daß es sich um Enzymhibitoren handelt, die mit einem bestimmten Zielmolekül Wasserstoffbrücken bilden. Später äußerten sie die Vermutung^[10a], daß ein Vorgang ähnlich dem in Schema 3 auch in vivo abläuft, d. h. daß durch Protonierung oder Epoxidierung der Doppelbindung im D-Ring reaktive elektrophile Intermediate entstehen. Es ist auch noch nicht klar, welchen Vorteil es bringt, daß es sich bei diesen Verbindungen um dimere Alkaloide handelt. Vielleicht gibt es eine Analogie zu dem hochwirksamen Immunsuppressivum FK 506; hier hat ein synthetisches Dimer einzigartige Eigenschaften^[12].

Steroide sind wichtig für die Stabilität von Membranen, als Bestandteile von Lipoproteinen und als Liganden, die die Großfamilie der Zellkernhormone dimerisieren und so zu Gentranskription oder -repression führen. Steroide können auch indirekte Wirkungen haben, z. B. indem sie eine Apoptose (den programmierten Zelltod) auslösen. Kürzlich wurde auch gezeigt^[13], daß entzündungshemmende Glucocorticoide zusätzlich zu ihrer Eigenschaft, an ihr entsprechendes Antwortelement (Response Element, RE) zu binden, auch mit der NF-κB-Signalweg in Wechselwirkung treten. Um herauszufinden, an welchen Zielstrukturen Cephalostatine und Ritterazine genau angreifen, wird man wohl größere Mengen einfacherer Analoga der Naturstoffe synthetisieren müssen.

Das Testen von vielen Verbindungen ist auch weiterhin ein wichtiger Weg, um Leitstrukturen für Pharmawirkstoffe zu finden. Die Cephalostatine und Ritterazine sind ein Beleg dafür, wie man durch Screening von Naturstoffextrakten zu komplexeren und neuartigeren Strukturen kommen kann als mit der kombinatorischen Chemie. Mit dieser werden viele Verbindungen durch kurze Reaktionssequenzen erzeugt, während Naturstoffe das Ergebnis viel längerer und kreativerer Synthesewege sind.

Stichworte: Alkaloide · Cephalostatine · Ritterazine · Totalsynthesen

- [1] G. R. Pettit, M. Inoue, Y. Kamano, D. L. Herald, C. Arm, C. Dufresne, N. D. Christie, J. M. Schmidt, D. L. Doubek, T. S. Krupa, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2006–2007.
- [2] F. Pietra, *A Secret World: Natural Products of Marine Life*, Birkhäuser, Basel, **1990**, S. 149.
- [3] Neueste Veröffentlichung: G. R. Pettit, J.-P. Xu, J. M. Schmidt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2027–2032.
- [4] S. Fukuzawa, S. Matsunaga, N. Fusetani, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6164–6166.
- [5] Neueste Veröffentlichung: S. Fukuzawa, S. Matsunaga, N. Fusetani, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 6707–6716.
- [6] a) Y. Pan, R. L. Merriman, L. R. Tanzer, P. L. Fuchs, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 967–972; b) C. H. Heathcock, S. C. Smith, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6828–6839.
- [7] A. Kramer, U. Uilmann, E. Winterfeldt, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 2865–2867.
- [8] J. U. Jeong, P. L. Fuchs, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 773–774.
- [9] J. U. Jeong, S. C. Sutton, S. Kim, P. L. Fuchs, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10157–10158.
- [10] a) S. Bhandaru, P. L. Fuchs, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8347–8350; b) *ibid.* **1995**, *36*, 8351–8354.
- [11] A. Ganeshan, C. H. Heathcock, *Chemtracts Org. Chem.* **1988**, *1*, 311–312.
- [12] D. J. Austin, G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 131–136.
- [13] J. Marx, *Science* **1995**, *270*, 232–233.