

Gelenkte Synthese unsymmetrischer bis-steroidaler Pyrazine und die ersten biologisch aktiven Cephalostatin-Analoga**

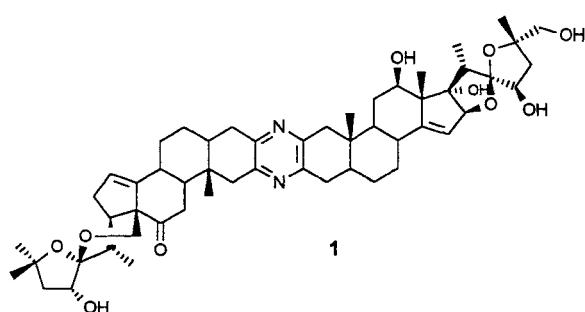
Michael Drögemüller, Rolf Jautelat und Ekkehard Winterfeldt*

Professor Ernst Mutschler zum 65. Geburtstag gewidmet

Cephalostatin 1 (1) ist der Prototyp der Cephalostatine und Ritterazine, einer Familie von 30 trisdecacyclischen Pyrazinen, die von Pettit und Mitarbeitern seit 1988 aus dem im Indischen Ozean heimischen Meereswurm *Cephalodiscus gilchristi*^[11] und von der Gruppe um Fusetani aus Tuniken der Art *Ritterella tokioka*^[12] isoliert wurden. Die ungewöhnlich hohe cytostatische Aktivität^[1b, 31], die neuartige und interessante Struktur sowie die schlechte Zugänglichkeit^[1a] führten in mehreren Syntheselabouratorien sofort zu Aktivitäten^[14–6]. Obwohl Fuchs et al. kürz-

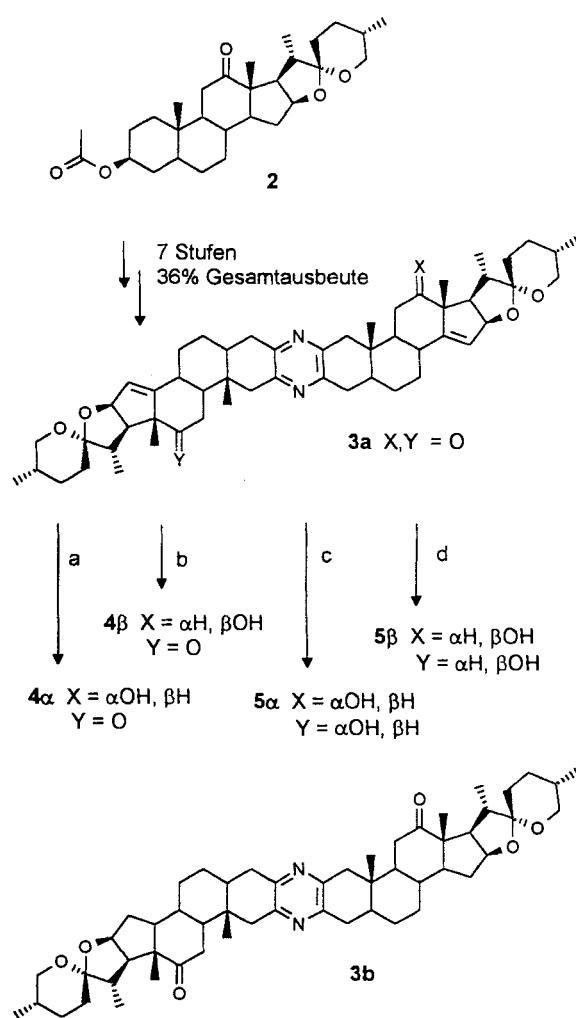
steroidal Pyrazine über die Vereinigung zweier Steroid-derivate.

In der Startphase entwickelten wir zunächst die *symmetrische Route*, die uns über eine kurze und effiziente siebenstufige Synthese aus dem gut zugänglichen Hecogeninacetat 2 das symmetrische Diketon 3a lieferte^[6]. Die Desymmetrisierung dieses Diketons über eine diastereoselektive Reduktion ergab mit L-Selektrid das α -Hydroxyketon 4 α , während mit Borhydrid das β -Hydroxyketon 4 β gewonnen werden konnte. Unter geeigneten Bedingungen ließen sich beide Prozesse natürlich auch zum α -Diol 5 α und zum β -Diol 5 β durchführen (Schema 1).



lich über höchst eindrucksvolle Erfolge bei der Totalsynthese von Cephalostatinen und Ritterazinen berichteten, wurde das Kernproblem der gelenkten Synthese unsymmetrischer bis-steroidaler Pyrazine nicht befriedigend gelöst. Fuchs und Mitarbeiter gewannen die Cephalostatine 7 und 12 zusammen mit dem Ritterzin K aus zwei unterschiedlichen Vorstufen in statistischer Manier und mußten die drei Produkte trennen^[5b]. Die erste gezielte Synthese von unsymmetrischen Pyrazinen aus α -Acetoxyketonen und α -Aminooximethern, die bisher allerdings bei $\Delta^{14, 15}$ -Steroiden noch keine Anwendung fand, beschrieben Heathcock et al.^[4], die jedoch über die Notwendigkeit hoher Reaktionstemperaturen (145 °C) und daraus resultierende niedrige Ausbeuten sowie Regioselektivitätsprobleme klagten.

Systematische Studien in unserem Laboratorium legten zwei unabhängige Wege zu unsymmetrischen Cephalostatin-Analoga nahe, mit denen Informationen über die für die biologische Aktivität unerlässlichen Strukturelemente gewonnen werden sollten. Auf dem ersten Weg, den wir die *symmetrische Route* nennen, strebten wir die Standardsynthese symmetrischer bis-steroidaler Pyrazine über Dimerisierung von α -Aminoketonen an^[7]. Diese Pyrazine müssen dann allerdings in einer späteren Phase desymmetrisiert und weiteren Funktionalisierungen unterworfen werden. Der andere Zugang, die *unsymmetrische Route*, verlangt die gelenkte Synthese unsymmetrischer bis-



Schema 1. Synthese der Verbindungen 4 α , 4 β , 5 α und 5 β . a) 0.7 Äquiv. L-Selektrid, wasserfreies Toluol, –78 °C (49% in einer Stufe, 82% umsatzbereinigt); b) 0.7 Äquiv. NaBH₄, CH₂Cl₂/MeOH, –78 °C (47% in einer Stufe, 81% umsatzbereinigt); c) L-Selektrid, wasserfreies Toluol, –78 °C (96%); d) NaBH₄, CH₂Cl₂/MeOH, –78 °C (98%).

Beim Testen der Verbindungen 3a, 3b, 4 β und 5 β in dem auf humane Krebszelllinien orientierten In-vitro-Evaluationssystem des National Cancer Institutes (NCI) der USA^[8] zeigte das symmetrische, gesättigte Diketon 3b^[9] nur sehr schwache Aktivität [Wirkung nur bei 4 von 58 Zelllinien; GI₅₀: gemittelte Aktivität über alle Zelllinien (MG_MID) > – 4.0]. Im Gegensatz dazu zeigten die symmetrischen, ungesättigten Substanzen, das Diketon 3a (Wirkung bei 32 von 58 Zelllinien; GI₅₀: MG_MID > – 4.3) und das β -Diol 5 β (Wirkung bei 21 von 58 Zelllinien; GI₅₀: MG_MID > – 4.2), bereits mäßige

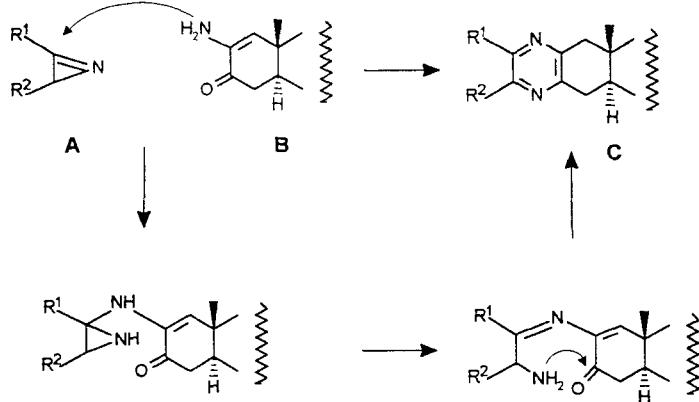
* Prof. Dr. E. Winterfeldt, Dipl.-Chem. M. Drögemüller, Dipl.-Chem. R. Jautelat
Institut für Organische Chemie der Universität
Schneiderberg 1b, D-30167 Hannover
Telefax: Int. + 511/762 3011

** Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie, von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und von der Schering AG, Berlin, gefördert. R. J. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Stipendium.

tumorinhibierende Wirkung. Eine signifikante cytostatische Aktivität registrierte man schließlich beim unsymmetrischen, ungesättigten β -Hydroxyketon **4 β** (Wirkung bei 58 von 58 Zelllinien; GI₅₀: MG_MID = -5.3), das bei allen Zelllinien Wirkung zeigte^[10]. Diese Verbindung reiht sich somit bereits in die Riege einiger Standard-Chemotherapeutika ein (z.B. Cyclophosphamid GI₅₀: MG_MID = -3.7; 5-Fluoruracil GI₅₀: MG_MID = -4.7; Cisplatin GI₅₀: MG_MID = -5.7; Adriamycin GI₅₀: MG_MID = -6.9)^[11]. Sie ähnelt in der Wirksamkeit Tamoxifen (GI₅₀: MG_MID = -5.3)^[11] und ist etwa 4000fach schwächer wirksam als das hochaktive Cephalostatin 1 (GI₅₀: MG_MID = -8.9)^[11] und nur 400fach schwächer als Taxol (GI₅₀: MG_MID = -7.9)^[11].

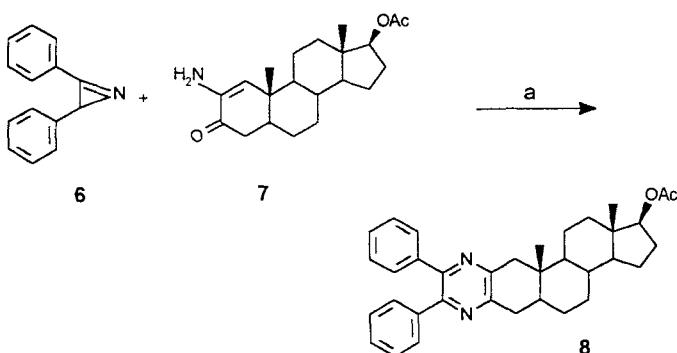
Man erkennt nun beim Vergleich mit den nichtcytostatischen, gesättigten Cephalostatin-Analoga^[4, 5a], daß die $\Delta^{14,15}$ -Doppelbindung für die biologische Aktivität unverzichtbar und eine unsymmetrische Gesamtstruktur von besonderer Bedeutung für die Wirkungsbreite ist. Dieses war Grund genug, unsere Bemühungen, unsymmetrische Verbindungen durch die bereits erwähnte *unsymmetrische Route* zu synthetisieren, zu verstärken.

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß Enaminoketone vom Typ **B** thermisch stabil sind und nicht zur Dimerisierung neigen, hegten wir die Erwartung, daß deren Reaktion mit Azirinen vom Typ **A** als ebenfalls nicht dimerisierende Synthese-Äquivalente von α -Aminoketonen einen guten Zugang zu unsymmetrischen Pyrazinen vom Typ **C** gestatten würde (Schema 2).

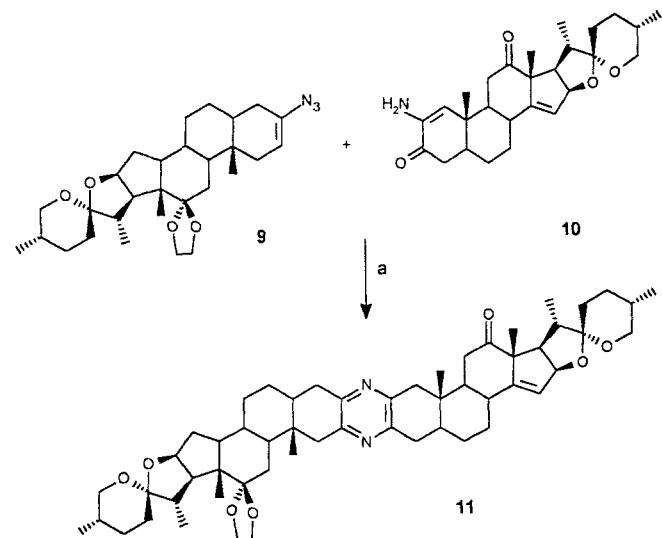


Schema 2.

Wie erwartet lieferte das Azirin **6**, das leicht aus *trans*-Stilben^[12] präpariert werden kann, mit dem Enaminoketon **7** und Trifluoressigsäure (TFA) bei 0 °C in THF auf Anhieb das Pyrazin **8** in 63% Ausbeute (Schema 3).

Schema 3. Synthese des Pyrazins **8**. a) THF, TFA, 0 °C, 3 h (63%).

In der Absicht, zwei Steroide zu kombinieren, nutzten wir – nach deutlicher Verbesserung^[13] – Zbirals^[14] Methode zur Herstellung steroidaler Vinylazide, um diese als Vorläufer für Azirine^[15] zu gebrauchen. Alle Bemühungen jedoch, diese Verbindungen zu generieren und in Substanz zu isolieren, scheiterten. Angesichts der bekannten Instabilität hochgespannter, polycyclischer Azirine^[16], die offenbar viel reaktiver als monocyclische Azirine wie **6** sind, erzeugten wir das Azirin in Gegenwart des Enaminoketons **10**, um es *in situ* abzufangen. Erhitzte man das Vinylazid **9** in siedendem Dioxan in Gegenwart von **10** und Pyridinium-*para*-toluolsulfonat (PPTS), so wurde in der Tat das unsymmetrische Pyrazin **11** in 67% Ausbeute gewonnen (Schema 4).

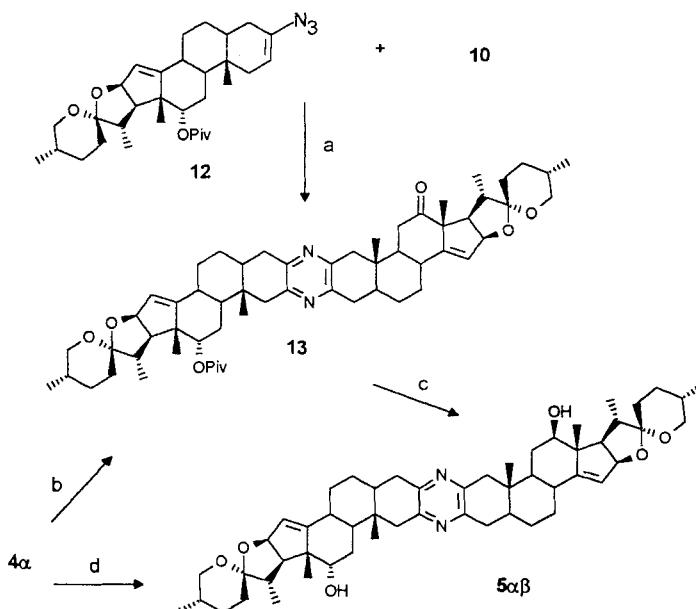
Schema 4. Synthese des Pyrazins **11**. a) Dioxan, PPTS, 90 min Rückfluß (67%).

Wir nutzten diese Methode auch zur Herstellung des Pyrazins **13** aus dem Vinylazid **12** und dem Enaminoketon **10** (51% Ausbeute) und erhielten so ein weiteres Cephalostatin-Analogon, das biologische Aktivität versprach^[17]. Dieses Pyrazin **13** gewannen wir unabhängig auch über die *symmetrische Route* durch Veresterung der OH-Gruppe des α -Hydroxyketons **4 α** in 96% Ausbeute. Beide Substanzen waren dünnenschichtchromatographisch sowie IR-, ¹H- und ¹³C-NMR-spektroskopisch identisch und belegten somit die Regioselektivität der neuen Pyrazinsynthese. Reduktion dieses Pyrazins **13** mit Natriumboranat und Diisobutylaluminiumhydrid (DIBAH) ergab das α, β -Diol **5 $\alpha\beta$** , das man auch aus dem α -Hydroxyketon **4 α** durch Reduktion mit Natriumboranat bereiten konnte (Schema 5)^[18].

Wir konnten also biologisch aktive Cephalostatin-Analoga auf einfache Weise präparieren und eine neue, flexible Methode entwickeln, um gezielt unsymmetrische bis-steroidale Pyrazine darzustellen.

Experimentelles

13: Eine entgaste Lösung von 51 mg (0.11 mmol) Enaminoketon **10**, 64 mg (0.12 mmol) Vinylazid **12**, 5 mg PPTS und 23 mg gekörntem 3 Å-Molekularsieb in 2 mL wasserfreiem Dioxan wurde unter Argon 2 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Filtration über Kieselgel wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand durch Flash-Chromatographie (Kieselgel, Petrolether/Ethylacetat = 2/1) gereinigt. Man erhielt 55 mg (51% Ausbeute) Pyrazin **13**: weiße Kristalle, Schmp. 269 °C; UV/Vis (CH₃OH): λ_{max} = 305 (sh), 288, 210 nm; IR (KBr): ν = 2956, 2932, 2872, 1716 (br), 1400, 1376, 1192, 1156, 980, 908 cm⁻¹; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 0.77–1.03 (m, 24 H), 1.18 (s, 9 H), 1.20–2.43 (m, 32 H), 2.47–2.92 (m, 8 H), 3.31–3.53 (m, 4 H), 4.78 (dd, J = 8.1, 2.0 Hz, 1 H), 4.90 (dd, J = 7.9, 2.0 Hz, 1 H),



Schema 5. Synthese der Verbindungen 13 und 5αβ. a) PPTS, Dioxan, gekörntes 3 Å-Molekularsieb, Rückfluß (51%); b) Pivaloylchlorid, Dimethylaminopyridin, Pyridin, 100 °C (96%); c) 1. NaBH₄, CH₂Cl₂/MeOH, -78 °C; 2. DIBAH, Toluol (68%); d) NaBH₄, CH₂Cl₂/MeOH, -78 °C (96%).

4.93 (s, 1 H), 5.49 (s, 1 H), 5.52 (s, 1 H); ¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 11.52, 11.75, 13.76, 14.10, 17.14, 18.79, 20.75, 26.08, 27.14, 27.85, 27.95, 28.74, 28.77, 30.31, 30.39, 31.09, 31.26, 33.95, 34.20, 35.15, 35.21, 35.68, 36.36, 37.20, 38.91, 41.24, 41.65, 44.21, 44.52, 45.17, 45.75, 49.75, 49.89, 49.92, 53.14, 53.60, 62.29, 67.09, 67.12, 77.71, 83.93, 85.00, 106.64, 107.05, 120.67, 121.56, 148.09, 148.10, 148.58, 148.64, 153.85, 154.28, 177.60, 210.73; FAB-MS (Nitrobenzylalkohol-Matrix): m/z (%): 932 (100) [M⁺], 818 (27); C₅₉H₈₂O₇N₂ (931.31): gef. C 76.09, H 8.60, N 3.16; ber. C 76.09, H 8.87, N 3.01.

Eingegangen am 13. Februar 1996 [Z 8818]

Stichworte: Azirine · Cephalostatine · Enaminoketone · Pyrazine · Synthesemethoden

- [1] a) G. R. Pettit, M. Inoue, Y. Kamano, D. L. Herald, C. Arn, C. Dufresne, N. D. Christie, J. M. Schmidt, D. L. Doubek, T. S. Krupa, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2006; b) G. R. Pettit, J. Xu, Y. Ichihara, M. D. Williams, M. R. Boyd, *Can. J. Chem.* **1994**, *72*, 2260; c) G. R. Pettit, J. Xu, M. D. Williams, N. D. Christie, D. L. Doubek, J. M. Schmidt, *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 52.
- [2] S. Fukuzawa, S. Matsunaga, N. Fusetani, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 6707.
- [3] Diese Verbindungsklasse gehört zu den potentesten Cytostatica, die jemals am National Cancer Institute (NCI) der USA getestet wurden. – Kurze Übersicht: A. Ganesan, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 667; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 611.
- [4] a) S. C. Smith, C. H. Heathcock, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6379; b) C. H. Heathcock, S. C. Smith, *ibid.* **1994**, *59*, 6828.
- [5] a) Y. Pan, R. L. Merriman, L. R. Tanzer, P. L. Fuchs, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *9*, 967; b) J. U. Jeong, S. C. Sutton, S. Kim, P. L. Fuchs, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10157.
- [6] A. Kramer, U. Uilmann, E. Winterfeldt, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 2865. Die Ausbeute der Synthese des Diketons 3a wurde mittlerweile deutlich verbessert.
- [7] Übersicht zur Darstellung und Chemie von Pyrazinen: *Comprehensive Heterocyclic Chemistry* (Hrsg.: A. R. Katritzky, C. W. Rees), Pergamon Press, Oxford **1984**, S. 157–197.
- [8] a) M. R. Boyd, K. D. Paull, L. R. Rubinstein in *Antitumor Drug Discovery and Development* (Hrsg.: F. A. Valeriote, T. Corbett, L. Baker), Kluwer Academic Press, Amsterdam **1992**, S. 11–34; b) K. D. Paull, R. H. Shoemaker, L. Hodes, A. Monks, D. A. Scudiero, L. R. Rubinstein, J. Plowman, M. R. Boyd, *J. Natl. Cancer Inst.* **1989**, *81*, 1088; c) A. Monks, D. A. Scudiero, P. Skehan, R. H. Shoemaker, K. D. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigro-Wolff, M. Gray-Goodrich, H. Campbell, M. R. Boyd, *ibid.* **1991**, *83*, 757.
- [9] S. Flemming, Dissertation, Universität Hannover, **1991**.
- [10] Die Substanzen 3a (NSC D-674135-O/0-1/55), 3b (NSC D-674136-P/0-1/56), 5β (NSC D-674133-M/0-1/53) und 4β (NSC D-674134-N/0-1/54) wurden vom NCI (Experiment ID 9411MD95) getestet. Detaillierte Resultate werden ge-

sondert veröffentlicht. Wir danken dem Team des Development Therapeutics Program des NCI für die Tests.

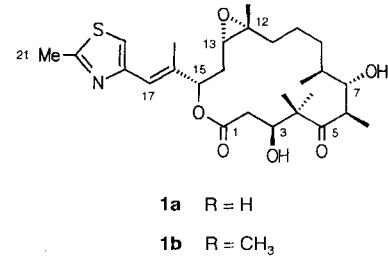
- [11] Genauere Informationen über Cyclophosphamid (NSC 26271), 5-Fluoruracil (NSC 19893), Cisplatin (NSC 119875), Adriamycin (NSC 123127), Tamoxifen (NSC 180973) und Taxol (NSC 125 973) sind über das World Wide Web erhältlich: <http://epnws1.ncicrf.gov:2345/dis3d/itb/stdagnt@tab.html>.
- [12] F. W. Fowler, A. Hassner, L. A. Levy, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 2077.
- [13] Die Vinylazide wurden über die Sequenz modifizierter Mitsunobu-Reaktion/ Eliminierung aus den entsprechenden 2β-Chlor-3β-hydroxy-Derivaten in etwa 50% Ausbeute gewonnen. Detaillierte Ergebnisse dazu werden wir in einer demnächst erscheinenden vollständigen Arbeit mitteilen.
- [14] J. Schweng, E. Zbiral, *Liebigs Ann. Chem.* **1978**, 1089.
- [15] V. Nair, K. H. Kim, *Heterocycles* **1977**, *7*, 353.
- [16] A. Hassner, F. W. Fowler, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 2869.
- [17] In diesem Fall ist das 3 Å-Molekularsieb von entscheidender Bedeutung, da es die Hydrolyse des Enaminoketons 10 zum entsprechenden α-Diketon verhindert. Dieses ist offensichtlich die einzige ärgerliche Nebenreaktion, und ihre vollständige Unterdrückung führt zu noch besseren Ausbeuten an unsymmetrischen Pyrazinen.
- [18] Die Prüfung der neu gewonnenen Cephalostatin-Analoga findet an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) statt. Wir danken Herrn Prof. Dr. med. W. Beil (MHH) für die Kooperation.

Epothilon A und B – neuartige, 16gliedrige Makrolide mit cytotoxischer Wirkung: Isolierung, Struktur im Kristall und Konformation in Lösung**

Gerhard Höfle*, Norbert Bedorf, Heinrich Steinmetz, Dietmar Schomburg, Klaus Gerth und Hans Reichenbach

Myxobakterien der Gattung *Sorangium* haben sich in den vergangenen Jahren als außerordentlich vielseitige Produzenten biologisch aktiver Sekundärmetabolite erwiesen^[1]. Dies gilt sowohl für die in der Regel neuen Grundstrukturen als auch für die biologischen Effekte und die ihnen zugrundeliegenden Wirkmechanismen. Besonders häufig produzieren *Sorangium* antifungische Verbindungen, was möglicherweise damit zu erklären ist, daß diese Cellulose abbauenden Organismen mit Pilzen um dieselbe ökologische Nische konkurrieren müssen.

Auch der *Sorangium-cellulosum*-Stamm Soce90 fiel im Screening durch seine antifungische Aktivität auf, die den Weg zur Isolierung von zwei neuen, strukturell nicht verwandten Substanzklassen, den Epothilonen **1**^[2, 3] und den



[*] Prof. Dr. G. Höfle, Dr. N. Bedorf, Ing. H. Steinmetz
Abteilung Naturstoffchemie

Prof. Dr. D. Schomburg
ZWE Molekulare Strukturforschung

Dr. K. Gerth, Prof. Dr. H. Reichenbach
Abteilung Naturstoffbiologie
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung
Mascheroder Weg 1, D-38124 Braunschweig
Telefax: Int. + 531/6181-461

[**] Antibiotika aus Gleitenden Bakterien. – 77. Mitteilung. – 76. Mitteilung: D. Schummer, E. Forche, V. Wray, T. Domke, H. Reichenbach, G. Höfle, *Liebigs Ann.* **1996**, 971–978. Wir danken Herrn Dr. A. Roß und den Mitarbeitern des Biotechnikums für Fermentationen, Herrn Dr. V. Wray und den Mitarbeitern der Instrumentellen Analytik für die Aufnahme von NMR- und Massenspektren sowie Frau B. Pluta, Frau A. Ritter und Frau K. Schicht für technische Mitarbeit. Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert.