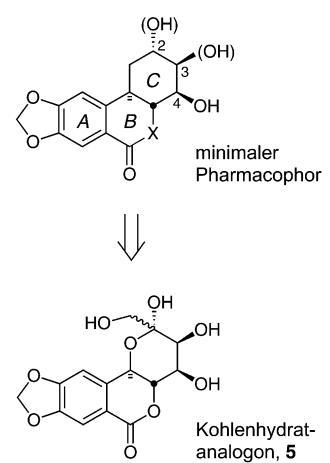
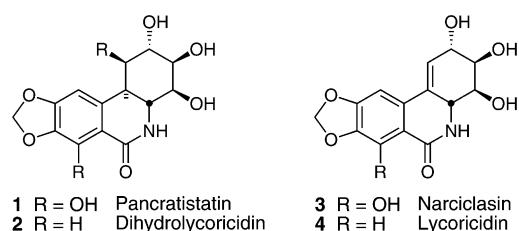


## Pancratistatin-Analoga

### Stereospezifische biokatalytische Synthese von Pancratistatin-Analoga\*\*

Anh Nga Phung, Maria Teresa Zannetti, Gregg Whited und Wolf-Dieter Fessner\*

Die *Amaryllidaceae*-Alkaloide bilden eine wichtige Klasse von Naturstoffen,<sup>[1]</sup> von denen speziell das Pancratistatin (**1**) und seine engen Anhydro- und Desoxy-Verwandten Narciclasin (**3**), Lycoricidin (**4**) und *trans*-Dihydrolycoricidin (**2**) aus den Wurzelknollen der Hawaiianischen *Hymenocallis littoralis* isoliert wurden.<sup>[2]</sup> Diese Verbindungen haben erhebliches Aufsehen erregt wegen ihres interessanten biologischen Wirkspktrums, das potente cytotoxische, antivirale und



[\*] Prof. Dr. W.-D. Fessner, A. N. Phung, Dr. M. T. Zannetti  
Institut für Organische Chemie und Biochemie  
Technische Universität Darmstadt  
Petersenstraße 22, 64287 Darmstadt (Deutschland)  
Fax: (+49) 6151-16-6636  
E-mail: fessner@tu-darmstadt.de

Dr. G. Whited  
Genencor International  
925 Page Mill Road, Palo Alto, CA 94304 (USA)

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 380/B25) und den Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. M.T.Z. dankt der Alexander-von-Humboldt-Stiftung für ein Postdoc-Stipendium.

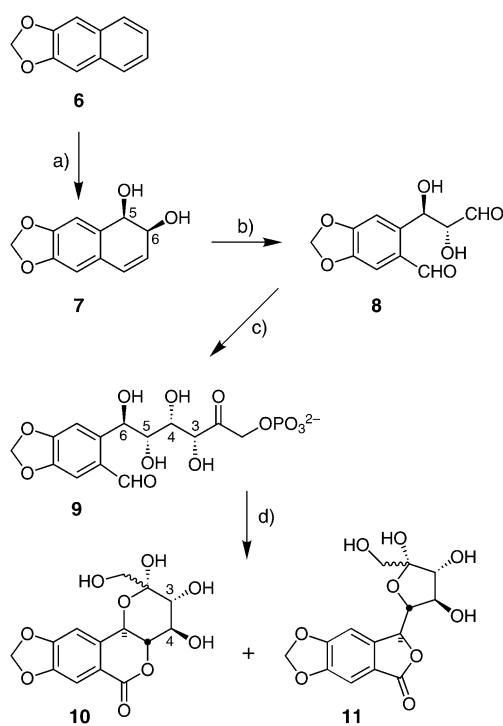
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Insektenfraß hemmende Eigenschaften umfasst.<sup>[1-3]</sup> Gegenwärtig wird ein Wirkmechanismus favorisiert, nach dem die Proteinbiosynthese durch eine Inhibition der ribosomalen tRNA-Bindung unterbrochen wird.<sup>[4]</sup> Somit bildet das einzigartige, hoch oxygenierte Phenanthridongerüst eine vielversprechende Leitstruktur auf der Suche nach neuen Tumortheraeutika.

Die Strukturen **1-4** waren Ziel von Totalsynthesen,<sup>[5,6]</sup> deren Hauptproblem in der gezielten Installation der fünf bis sechs benachbarten stereogenen Zentren lag, einschließlich der Verknüpfungsstellen der B- und C-Ringe. Systematische Untersuchungen zur minimalen Pharmacophor-Struktur wurden erst in jüngster Zeit angegangen,<sup>[6-9]</sup> was in der begrenzten Verfügbarkeit des Naturstoffs und der Komplexität der Kernstruktur begründet ist. Aus diesen Studien kann geschlossen werden, dass die biologische Aktivität auf folgenden Kernelementen beruht: 1) dem Piperonylring A sowie 2) der *trans*-Konfiguration der B-C-Ringverknüpfung, die 3) die korrekte räumliche Ausrichtung der peripheren Hydroxyfunktionen im Aminocyclitolring C sichert. Zumindest die korrekt positionierte 4- sowie eine oder beide der 2- und 3-Hydroxygruppen scheint für den minimalen Pharmacophor obligatorisch zu sein.<sup>[9]</sup> Während gezeigt werden konnte, dass oxygenierte Seco-Derivate inaktiv sind,<sup>[6,8]</sup> ist die Notwendigkeit einer Lactameinheit in Ring B bisher unbewiesen.

Unter der Annahme einer solchen hypothetischen Minimalstruktur schien uns der Ersatz der Cyclitoleinheit durch einen Kohlenhydratbaustein eine zulässige Strukturvariation zu sein, weil die meisten Hexoaldosen und -ketosen in wässriger Lösung eine cyclische Pyranosestruktur bevorzugen. Zusätzlich zur anomeren Hydroxygruppe, die dann die 2-OH-Gruppe im Pancratistatin ersetzt, könnte eine Ketoseeinheit wie in **5** möglicherweise eine primäre CH<sub>2</sub>OH-Gruppe so positionieren, dass sie die zusätzlichen hydrophilen Kontakte von 1-OH in **1** bei der Effektorbindung ersetzen könnte. Das B-Lactonanalogon **5** erschien daher ein interessantes Syntheseziel (ebenso wie damit verwandte Stereoisomere). Der Hauptvorteil einer solchen Synthesestrategie liegt in der relativ einfachen Aufgabe, an einen Aromaten eine lineare Kohlenhydratkette zu knüpfen. Das Kohlenhydratfragment selbst ließe sich enzymatisch mit einer Aldolasereaktion erzeugen, die eine Kettenverlängerung durch ein Dihydroxyacetonfragment bewirkt unter gleichzeitig kontrollierter Installation der nötigen Absolutkonfiguration.<sup>[10]</sup> Vorteilhaft ist dabei, dass die bekannten Dihydroxyaceton-abhängigen Aldolasen eine ungewöhnliche Vielfalt an Aldehyden anstelle ihres natürlichen Substrats akzeptieren, unter volliger Erhaltung der Stereokontrolle bei der Bildung neuer Asymmetriezentren.<sup>[11]</sup>

Die Retrosynthese dieser Strategie erforderte eine aldehydische Acceptorkomponente vom Typ **8**, die wiederum durch ozonolytische Ringspaltung eines ungesättigten *cis*-Diols **7** als Vorstufe erzeugt würde (Schema 1). Solche Dihydroaren-*cis*-diole aus dem oxidativen mikrobiellen Arenabbau wurden in jüngerer Zeit zu wertvollen Synthesebausteinen entwickelt.<sup>[12]</sup> Insbesondere die Naphthalindioxigenasen<sup>[13]</sup> aus *Pseudomonas*-Stämmen erwiesen sich als hoch effektiv in der Dihydroxylierung polycyclischer Arene und

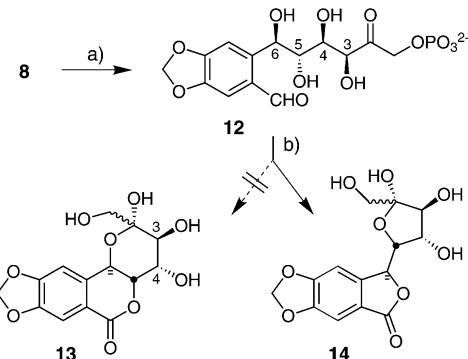


**Schema 1.** Sequenz enzymatischer Dihydroxylierung und Aldolisierung zur Erzeugung von vier benachbarten Stereozentren. a) Naphthalindioxygenase (*E. coli*), Luft, 24 h bei 37 °C, 64 % Ausbeute (85 % bezogen auf Umsatz); b) O<sub>3</sub>, -78 °C, MeOH, dann Me<sub>2</sub>S, RT; c) Rhamnulose-1-phosphataldolase, Dihydroxyacetophosphat, pH 7.0, RT, 2 d; d) saure Phosphatase, pH 5.9, 3 d, dann Br<sub>2</sub>/BaCO<sub>3</sub>, Produktverhältnis 1:1; Blitz-Chromatographie, 10 % Gesamtausbeute (vier Schritte ausgehend von 7).

ihrer Derivate. Das für die geplante Studie benötigte Dioxol **6** bildete wegen seiner linear gestreckten Substratstruktur eine Herausforderung, weil derartige Biokatalysatoren bekanntermaßen angulare Substrate bevorzugen.<sup>[12,14]</sup> Screeningexperimente zeigten, dass Toluoldioxygenasen zwar ineffektiv waren, dass aber eine Naphthalindioxygenase aus *Pseudomonas putida* G7 in der Lage war, **6** zu oxidieren. Präparative Biooxidation im Multigramm-Maßstab mit rekombinanten *Escherichia coli*-Zellen, die das Gen zur Überproduktion der Dioxygenase enthielten,<sup>[15]</sup> lieferten nach Extraktion und Flash-Chromatographie das gesuchte Diol **7** in enantiomerenreiner Form (> 98 % ee).<sup>[16]</sup> Die Verbindung erwies sich als empfindlich gegen Säurespuren, was Zersetzung zum entsprechenden Naphthol verursacht und die Gesamtausbeute schmälern kann (85 % bezogen auf den Umsatz). Die 5*R*,6*S*-Absolutkonfiguration von **7** folgt aus dem für alle verwandten *cis*-Dihydrodiolmetaboliten aus polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen typischen positiven Drehwert sowie aus dem Nachweis, dass solche Metabolite unabhängig von Typ und Quelle der verwendeten Enzyme eine identische Konfiguration haben.<sup>[12]</sup>

Wegen seiner Tendenz zur Naphtholbildung und der leichten Überoxidierbarkeit des elektronenreichen Aromaten durch überschüssiges Ozon musste das Endiol **7** unter sorgfältig kontrollierten Bedingungen ozonisiert werden. Die wässrige Lösung des resultierenden Dialdehyds **8** (Gemisch

konstitutionsisomerer Hydrate laut <sup>1</sup>H-NMR-Analyse) wurde ohne weitere Reinigung direkt zur Aldoladdition mit Dihydroxyacetophosphat<sup>[17]</sup> in Gegenwart einer Aldolase eingesetzt. Sowohl die Fructose-1,6-bisphosphataldolase (FruA)<sup>[11b]</sup> als auch die stereokomplementäre Rhamnulose-1-phosphataldolase (RhuA)<sup>[11a]</sup> akzeptierten **8** als Substrat unter Bildung monophosphorylierter Produkte (DC-Analyse). Die Umsetzung verlief allerdings nur schleppend und blieb unvollständig, was vermutlich auf die begrenzte Wasserlöslichkeit von **8** zurückgeht, die die effektive Substratkonzentration begrenzt. Es wurde erwartet, dass die Aldolase-katalysierte Addition wegen der allgemein ausgezeichneten Substratqualität von Hydroxyaldehyden und der bekannten Unreaktivität aromatischer Carbaldehyde regiospezifisch an der aliphatischen Aldehydeinheit erfolgt.<sup>[10]</sup> Die spektroskopische Analyse der Aldoladdukte **9** und **12** lieferte komplexe, zur Produktidentifizierung ungeeignete Spektren. Grund sind vermutlich intramolekulare Fünf- und Sechsring-Cyclisierungen zu äquilibrierenden Halbacetalen mit unterschiedlicher Diastereomerenzusammensetzung. Daher musste die Analyse zunächst durch Bildung stabiler Lactone vereinfacht werden, was nach vorheriger enzymatischer Dephosphorylierung durch milde Oxidation erreicht wurde. Interessanterweise bildete sich aus der RhuA-katalysierten Reaktion sowohl das gesuchte pyranoiden Isomer **10** als auch in gleichen Anteilen das furanoide Isomer **11** (10 % Gesamtausbeute aus **7**),<sup>[16]</sup> während aus der FruA-Reaktion nur das unerwünschte furanoide Produkt **14** (10 % Gesamtausbeute) und nicht das  $\delta$ -Lacton **13** resultierte (Schema 2). Ein Erklärungsversuch



**Schema 2.**  $\gamma$ -Lacton-Bildung nach FruA-katalysierter Aldolisierung. a) FruA, Dihydroxyacetophosphat, pH 7.0, RT, 2 d; b) saure Phosphatase, pH 5.9, 3 d, dann Br<sub>2</sub>/BaCO<sub>3</sub>; 10 % Ausbeute (vier Schritte ausgehend von 7).

basiert auf der in der FruA-Reaktion induzierten Konfiguration der 3- und 4-Hydroxygruppen, die in **13** in eine diaxiale Orientierung gezwungen würden, was die Pyranosebildung zugunsten furanoider Strukturen benachteiligt. Weiterhin könnte die Oxidation furanoider Halbacetale kinetisch bevorzugt sein, was die Bildung von  $\gamma$ -Lactonen begünstigt.

Das  $\delta$ -Lacton **10** ähnelt (+)-Pancreatistatin in seiner Absolutkonfiguration bis auf die invertierte Lage von 3-OH. Die korrekte Gesamtkonfiguration wie in **5** (3,4-OH *cis*-vicinal) würde die Katalyse einer Tagatose-1,6-bisphosphataldolase (TagA) erfordern. Bisher bekannte TagA-Enzyme

weisen jedoch nur eine geringe Stereoselektivität mit nicht-natürlichen Substratanaloga auf,<sup>[10,18]</sup> weshalb eine solche Option zurzeit nicht umsetzbar ist und ein Screening nach neuen stereoselektiven Aldolasen erforderlich.<sup>[19]</sup> Eine chemische Inversion an dieser Position dürfte wegen der sterisch eingeschränkten Zugänglichkeit schwierig sein. Daher scheint Verbindung **10** die nach diesem Verfahren bislang optimale Approximation zu sein.

Zusammenfassend haben wir eine neue Strategie zur stereospezifischen Synthese neuartiger Pancratistatin-Analoga entwickelt. Unsere Studie belegt, dass durch eine Kombination von enzymatischer Dihydroxylierung und Aldolisierung Strukturen von hoher molekularer Komplexität und mit mehreren benachbarten Chiralitätszentren in wenigen Syntheseschritten einfach und ohne Bedarf an Schutzgruppenmanipulationen aufgebaut werden können. Über ein zurzeit laufendes Screening der neuen Verbindungen auf biologische Aktivität, insbesondere im Hinblick auf anti-neoplastische Effektivität, werden wir in Kürze berichten.

Ein eingegangen am 2. Juni 2003 [Z52023]

**Stichwörter:** Aldolreaktionen · Asymmetrische Synthesen · Enzymkatalyse · Kohlenhydrate · Tumortherapeutika

- [1] a) S. F. Martin in *The Alkaloids*, Vol. 40 (Hrsg.: A. R. Brossi), Academic Press, New York, **1987**, S. 251–376; b) O. Hoshino in *The Alkaloids*, Vol. 51 (Hrsg.: G. A. Cordell), Academic Press, New York, **1998**, S. 324–424.
- [2] a) G. R. Pettit, V. Gaddamidi, D. L. Herald, S. B. Singh, G. M. Cragg, J. M. Schmidt, F. E. Boettner, M. Williams, Y. Sagawa, *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 995–1002; b) G. R. Pettit, G. R. Pettit III, R. A. Backhaus, M. R. Boyd, A. W. Meerow, *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 1682–1687.
- [3] a) B. Gabrielsen, T. P. Monath, J. W. Huggins, D. F. Kefauver, G. R. Pettit, G. Groszek, M. Hollingshead, J. J. Kirsi, W. M. Shannon, E. M. Schubert, *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1569–1581; b) M. Ouarzane-Amara, J.-F. Franetich, D. Mazier, G. R. Pettit, L. Meijer, C. Doerig, I. Desportes-Livage, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 3409–3415.
- [4] a) L. Carrasco, M. Fresno, D. Vazquez, *FEBS Lett.* **1975**, *52*, 236–239; b) A. Mondon, K. Krohn, *Chem. Ber.* **1975**, *108*, 445–463; c) A. Jimenez, L. Sanchez, D. Vazquez, *FEBS Lett.* **1975**, *60*, 66–70; d) A. Baez, D. Vazquez, *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *518*, 95–103.
- [5] R. Polt in *Organic Synthesis: Theory and Applications*, Vol. 3 (Hrsg.: T. Hudlicky), JAI, Greenwich, **1997**, S. 109–148.
- [6] T. Hudlicky, U. Rinner, D. Gonzalez, H. Akgun, S. Schilling, P. Siengalewicz, T. A. Martinot, G. R. Pettit, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 8726–8743, zit. Lit.
- [7] a) A. Evidente, O. Arrigoni, R. Liso, G. Calabrese, G. Randazzo, *Phytochemistry* **1986**, *25*, 2739–2743; b) G. R. Pettit, N. Melody, D. L. Herald, J. M. Schmidt, R. K. Pettit, J.-C. Chapuis, *Heterocycles* **2002**, *56*, 139–155.
- [8] F. Chretien, S. I. Ahmed, A. Masion, Y. Chapleur, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 7463–7478.
- [9] J. McNulty, J. Mao, R. Gibe, R. Mo, S. Wolf, G. R. Pettit, D. L. Herald, M. R. Boyd, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 169–172.
- [10] a) W.-D. Fessner, C. Walter, *Top. Curr. Chem.* **1996**, *184*, 97–194; b) W.-D. Fessner in *Stereoselective Biocatalysis* (Hrsg.: R. N. Patel), Marcel Dekker, New York, **2000**, S. 239–265.

- [11] a) W.-D. Fessner, G. Sinerius, A. Schneider, M. Dreyer, G. E. Schulz, J. Badía, J. Aguilar, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 596–599; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 555–558; b) M. T. Zannetti, C. Walter, M. Knorst, W. D. Fessner, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1882–1890; c) A. C. Joerger, C. Gosse, W.-D. Fessner, G. E. Schulz, *Biochemistry* **2000**, *39*, 6033–6041; d) M. Kroemer, G. E. Schulz, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2002**, *58*, 824–832.
- [12] a) H. A. J. Carless, *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 795–826; b) S. M. Brown, T. Hudlicky in *Organic Synthesis: Theory and Applications*, Vol. 2 (Hrsg.: T. Hudlicky), JAI, Greenwich, **1993**, S. 113–176; c) D. R. Boyd, G. N. Sheldrake, *Nat. Prod. Rep.* **1998**, *15*, 309–324; d) T. Hudlicky, D. Gonzalez, D. T. Gibson, *Aldrichimica Acta* **1999**, *32*, 35–62.
- [13] A. Karlsson, J. V. Parales, R. E. Parales, D. T. Gibson, H. Eklund, S. Ramaswamy, *Science* **2003**, *299*, 1039–1042.
- [14] D. R. Boyd, N. D. Sharma, J. S. Harrison, M. A. Kennedy, C. C. R. Allen, D. T. Gibson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2001**, *1264*–1269.
- [15] a) W.-C. Suen, D. T. Gibson, *Gene* **1994**, *143*, 67–71; b) C. M. Serdar, D. C. Murdock, B. D. Ensley, U.S. Patent 5173425, **1992** [*Chem. Abstr.* **1993**, *118*, 100551].
- [16] Ausgewählte Daten neuer Verbindungen: **7**, Schmp.: 132–133 °C;  $[\alpha]_D^{20} = +180.6^\circ$  ( $c = 1$ ,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS):  $\delta = 5.66$ , 5.31 (2s, 1-H, 4-H), 5.08 (dd, 7-H), 4.66 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.59 (dd, 8-H), 3.19 (d, 5-H), 2.97 ppm (dt, 6-H),  $J_{5,6} = 4.9$ ,  $J_{6,7} = 0.8$ ,  $J_{6,8} = 4.0$ ,  $J_{7,8} = 9.7$  Hz;  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , TMS):  $\delta = 147.2$ , 147.1 (C-2, C-3), 130.4 (C-4a), 128.1, 126.9 (C-1, C-4), 126.5 (C-1a), 108.0, 107.0 (C-7, C-8), 101.0 ( $\text{CH}_2$ ), 70.6, 67.8 ppm (C-5, C-6); ESI-MS:  $m/z$  (%): 206 (17)  $[\text{M}]^+$ , 188 (100)  $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$ . **10**,  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , TSP):  $\delta = 7.18$ , 7.13 (2s,  $2\text{H}_{\text{ar}}$ ), 6.05 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 5.24 (d, 6-H), 3.89 (t, 4-H), 3.74 (d, 1-H<sub>a</sub>), 3.71 (d, 3-H), 3.68 (t, 5-H), 3.54 ppm (d, 1-H<sub>b</sub>),  $J_{1a,1b} = 11.8$ ,  $J_{3,4} = 9.6$ ,  $J_{4,5} = 9.4$ ,  $J_{5,6} = 10.0$  Hz;  $^{13}\text{C-NMR}$  (125.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , TSP):  $\delta = 188.4$  (C=O), 151.2, 150.5 (2OC<sub>ar</sub>), 132.4, 118.6 (2C<sub>ar</sub>), 115, 5, 111.4 (2HC<sub>ar</sub>), 105.1 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 101.0 (C-2), 76.9 (C-5), 76.5 (C-4), 75.6 (C-6), 73.4 (C-3), 66.5 ppm (C-1); ESI-MS:  $m/z$  (%): 349 (100)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . **11**,  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , TSP):  $\delta = 7.16$ , 7.12 (2s,  $2\text{H}_{\text{ar}}$ ), 6.17 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 5.60 (d, 6-H), 4.25 (t, 4-H), 4.13 (d, 3-H), 4.00 (dd, 5-H), 3.65 (d, 1-H<sub>a</sub>), 3.60 (d, 1-H<sub>b</sub>),  $J_{1a,1b} = 12.1$ ,  $J_{3,4} = 7.9$ ,  $J_{4,5} = 6.8$ ,  $J_{5,6} = 5.8$  Hz;  $^{13}\text{C-NMR}$  (125.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , TSP):  $\delta = 175.6$  (C=O), 157.0, 152.4 (2OC<sub>ar</sub>), 147.1, 121.2 (2C<sub>ar</sub>), 106.5, 106.2 (2HC<sub>ar</sub>), 106.1 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 104.9 (C-2), 83, 7 (C-6), 83.4 (C-5), 78.3 (C-3), 77.7 (C-4), 65.5 ppm (C-1); ESI-MS:  $m/z$  (%): 349 (100)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .
- [17] W.-D. Fessner, G. Sinerius, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 217–220; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 209–212.
- [18] W.-D. Fessner, O. Eyrisch, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 76–78; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 56–58.
- [19] E. Gonzalez-Garcia, V. Helaine, G. Klein, M. Schuermann, G. A. Sprenger, W.-D. Fessner, J.-L. Reymond, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 893–899.