

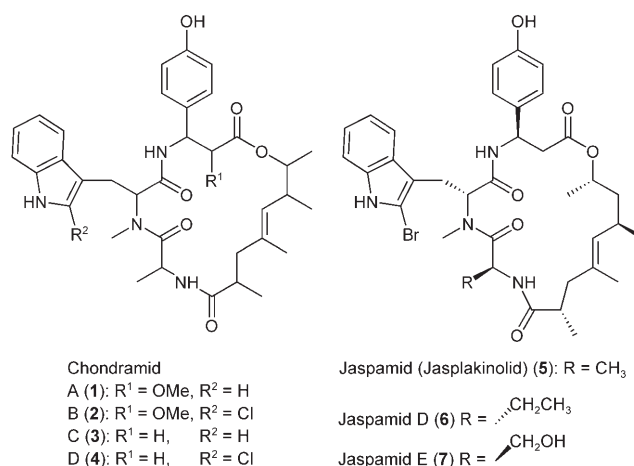
Chondramid C: Synthese, Strukturaufklärung und Struktur-Aktivitäts-Beziehungen**

Ulrike Eggert, Randi Diestel, Florenz Sasse, Rolf Jansen, Brigitte Kunze und Markus Kalesse*

Die Arbeitsgruppen von Reichenbach und Höfle berichteten 1995 von der Isolierung einer Gruppe von Sekundärmetaboliten, die sie Chondramide nannten.^[1] Drei Jahre später wurde berichtet, dass die Chondramide die Polymerisation von G-Actin induzieren;^[2] dagegen bewirken andere Naturstoffe aus Myxobakterien wie Rhizopodin^[3] oder Chivosazol^[4] eine Destabilisierung und Reorganisation der Actin-Filamente. In beiden Fällen führt die Wechselwirkung zum Zusammenbrechen Actin-abhängiger zellulärer Vorgänge. Auch die Cytokinese am Ende der Zellteilung kann nicht abgeschlossen werden, und als Folge entstehen vergrößerte, mehrkernige Zellen.

Die Aufklärung der Konstitution offenbarte das Vorliegen eines 18-gliedrigen Makrocyclus, dessen sechs Stereozentren jedoch nicht bestimmt wurden. Die Mitglieder der Familie der Chondramide unterscheiden sich durch unterschiedliche Substituenten an R¹ und R² (Schema 1). Beim Vergleich der Chondramide mit den strukturell verwandten Jaspamiden (Jasplakinoliden) zeigt sich eine sehr ähnliche Struktur der Tripeptide; zudem haben die β -Tyrosin-Einheiten die gleiche Konfiguration.^[5] Signifikante Unterschiede bestehen hingegen in der unterschiedlichen Ringgröße beider Naturstoffe (18- gegenüber 19-gliedrig) und einer veränderten sekundären Hydroxygruppe im Polyketid-Segment der Chondramide. Zeitgleich zu unseren Arbeiten berichteten die Gruppen von Waldmann und Arndt vom Abschluss der Totalsynthese von Chondramid C.^[6]

Die ersten Vertreter der Jaspamide wurden von Zabriske,^[7] Crews,^[8] Braekman et al.^[9] isoliert und erlangten große Beachtung, weil sie die Polymerisation des Actin-Cytoskeletts beeinflussen konnten.^[10] Die eingehende Untersuchung ihrer biologischen Eigenschaften zeigte antiproliferative Ei-

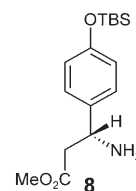


Schema 1. Mitglieder der Chondramid-Jaspamid-Familie.

genschaften gegen 36 solide Tumore^[11] und gab daher Anlass für eine Reihe präparativer Untersuchungen.^[12] Mehrere Gruppen beschäftigten sich mit der Totalsynthese, aber auch mit der Synthese vereinfachter Jaspamid-Analoga. Riccio et al.^[13] ersetzten den Polyketid-Teil durch einfache Aminosäure-Brücken. In einem anderen Ansatz untersuchten Maier et al.^[14] den Einfluss der Allylspannung auf die Konformation und ersetzten dabei Teile des Polyketids durch Arene. Alle so hergestellten Analoga zeigten allerdings eine verringerte biologische Aktivität. Kürzlich konnten Zampella et al.^[15] dank der Isolierung weiterer natürlicher Jaspamide aus *Jaspis splendans* zusätzliche Daten zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) präsentieren. Trotz all dieser Arbeiten steht immer noch eine detaillierte Untersuchung der strukturellen Bedeutung des Polyketid-Segmentes der Jaspamid-Chondramid-Familie aus.

Aufbauend auf der Strukturähnlichkeit beider Substanzklassen begannen wir die Synthese mit dem Ziel, Derivate von Chondramid C zu erhalten. Diese sollten uns helfen, sowohl die absolute Konfiguration zu bestimmen als auch erste SAR-Daten von Chondramid C zu erhalten. Weiterhin nahmen wir an, dass das Polyketid-Segment die Konformation des Tripeptids bestimmt und somit ein zentrales Element für die biologische Aktivität ist.

Unsere Synthese des Tripeptids beruht auf Literaturvorschriften im Zusammenhang mit der Synthese von Jaspamid^[7,16,17] und beginnt mit Verbindung **8** (Schema 2).^[16] Die



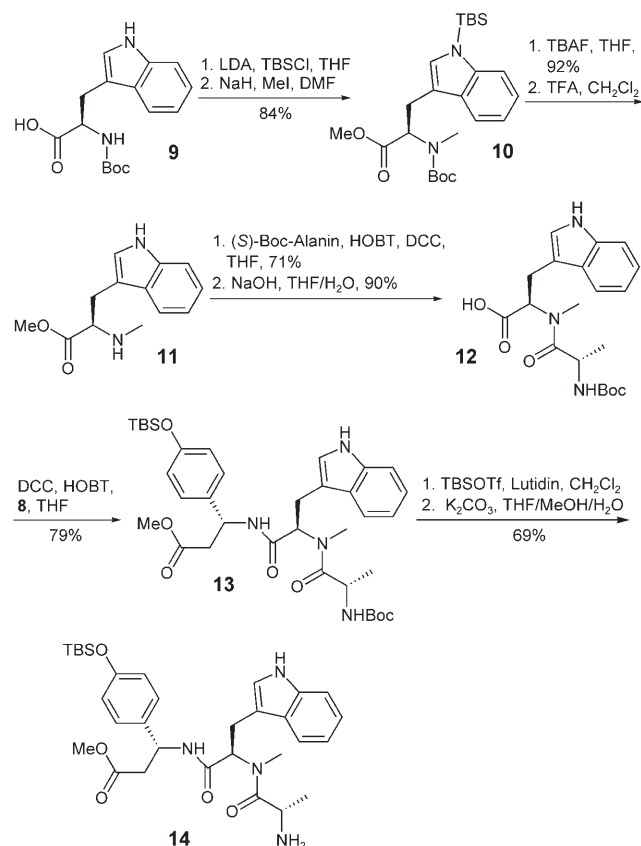
Schema 2. Der β -Tyrosin-Baustein **8**. TBS = *tert*-Butyldimethylsilyl.

[*] U. Eggert, R. Diestel, Prof. Dr. M. Kalesse
 Zentrum für Biomolekulare Wirkstoffe (BMWZ)
 Leibniz Universität Hannover
 Schneiderberg 1B, 30167 Hannover (Deutschland)
 Fax: (+49) 511-7623011
 E-Mail: Markus.Kalesse@oci.uni-hannover.de
 und
 Medizinische Chemie
 Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
 Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig (Deutschland)
 Dr. F. Sasse, Dr. R. Jansen, Dr. B. Kunze
 Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
 Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der DFG (Ka 913/11-1) unterstützt. Wir danken Bettina Hinkelmann und Birte Engelhardt für technische Unterstützung bei den Zelltests.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200801156> zu finden.

Synthese des Tripeptids **14** wurde für Jaspamid von Kocienski et al. beschrieben und bildet mit Ausnahme der Bromierung die Basis für unsere Synthese von Chondramid C (Schema 3).



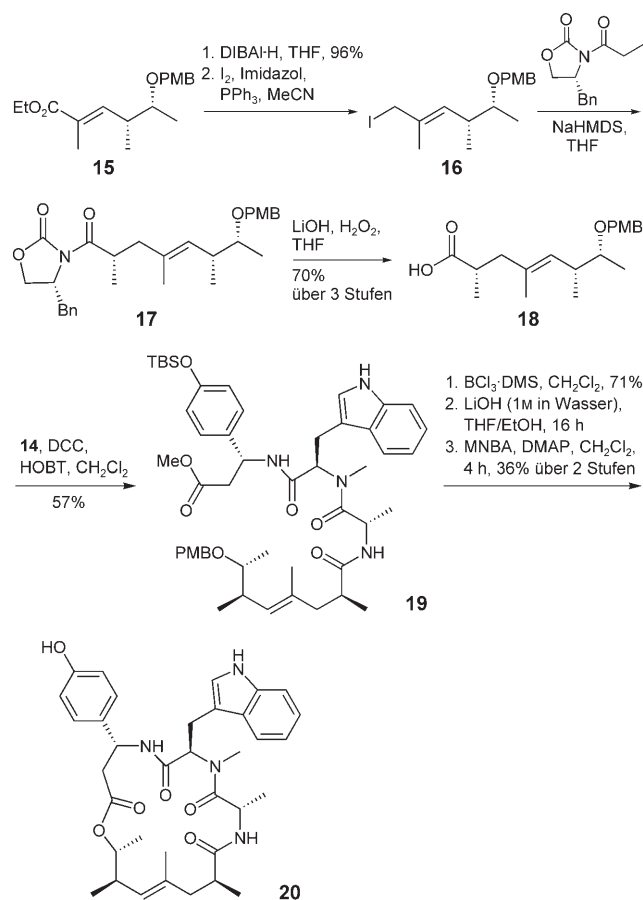
Schema 3. Synthese des Tripeptids von Chondramid C basierend auf der Route von Kocienski et al.^[16] Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, DCC = *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid, HOBT = 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol, LDA = Lithiumdiisopropylamid, OTf = Trifluormethansulfonat, TBAF = Tetrabutylammoniumfluorid, TFA = Trifluoressigsäure.

Zu den notwendigen Anpassungen an die hier vorgestellte Route zählt die Synthese von **10** nach Hirai et al.^[18] Hier verbessert besonders die Verwendung von DMF als Lösungsmittel im Methylierungsschritt die Ausbeute auf 84% über zwei Stufen. Zur Erhöhung der Ausbeuten im schlecht reproduzierbaren Entschützungsschritt (**13**→**14**) wurde eine Synthesesequenz von Grieco et al. eingesetzt.^[12c] In dieser zweistufigen Sequenz wurde Intermediat **13** zunächst mit der TBS-Gruppe geschützt und anschließend bei Raumtemperatur mit zwei Äquivalenten K₂CO₃ in THF/MeOH/H₂O (2:1:1) umgesetzt. Diese Variation lieferte Amin **14** in guten Ausbeuten.

Die Synthese des Polyketid-Segments begann mit einer *syn*-selektiven Crotyl-Borierung nach Brown et al.,^[19,20] gefolgt von PMB-Schützung und Ozonolyse. Der so erhaltene Aldehyd wurde einer Wittig-Olefinierung unterzogen und lieferte den ungesättigten Ester **15**. Reduktion mit DIBAL-H und eine anschließende Umsetzung mit Iod, Imidazol und PPh₃ lieferten das Iodid **16**, das in einer Evans-Alkylierung **17**

ergab. Die sich anschließende Verseifung zur Säure gelang unter Standardbedingungen mit LiOH und H₂O₂ (Schema 4).

Das Tripeptid **14** wurde im Anschluss mit der Säure **18** unter Verwendung von DCC und HOBT zum Amid verknüpft. Die Entfernung der PMB-Gruppe gelang mit BCl₃.



Schema 4. Synthese des Polyketid-Segments **18** und Kupplung mit dem Tripeptid. Bn = Benzyl, DIBAL-H = Diisobutylaluminiumhydrid, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, DMS = Dimethylsulfid, MNBA = 2-Methyl-6-nitrobenzoesäureanhydrid, NaHMDS = Natriumhexamethyldisilazanid, PMB = *para*-Methoxybenzyl.

Bemerkenswerterweise scheiterten alle Versuche, die PMB-Gruppe mit 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-1,4-benzochinon (DDQ) zu entfernen, und es konnte lediglich das oxidierte Tryptophan-Derivat isoliert werden. Die Freisetzung der entsprechenden seco-Säure wurde schließlich mit LiOH in EtOH/THF/H₂O erreicht. Keiner der ersten Versuche zur Makrocyclisierung lieferte das gewünschte Ergebnis. Um auszuschließen, dass diese Fehlschläge an der Verwendung des unnatürlichen Stereoisomers lagen, verwendeten wir in der Folge für die Optimierung die seco-Säure, die durch Verseifung aus dem natürlichen Chondramid C erhalten wurde.

Die Makrocyclisierung bereitete auch in Folgeversuchen unerwartete Schwierigkeiten. So konnte mit etablierten Methoden wie der Veresterung nach der Keck-Boden-Methode,^[21] der Yamaguchi-Lactonisierung^[22] sowie der Mukaiyama- oder Mitsunobu-Reaktion^[23] kein Cyclisierungspro-

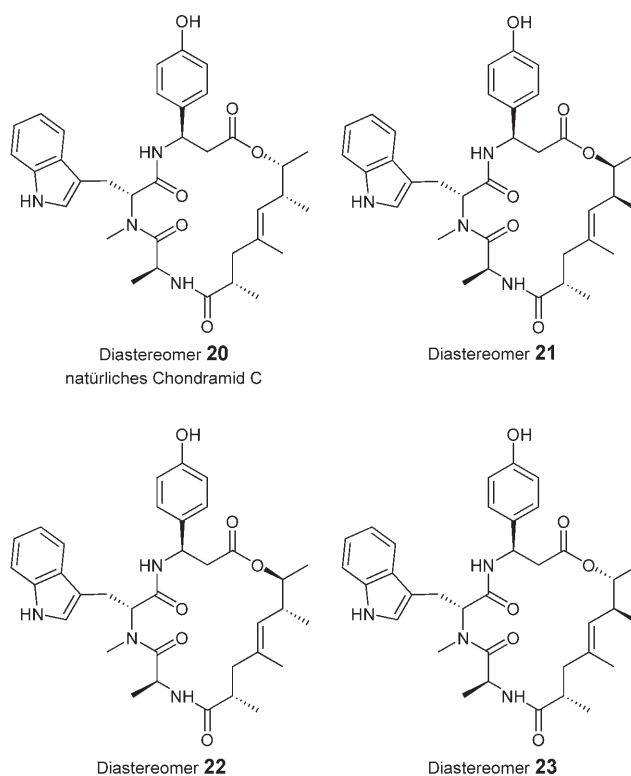
dukt erhalten werden. Auch andere Strategien wie die Umesterung mit $[(n\text{Bu}_2\text{ClSn})\text{O}]$ nach Giannis, Otera et al.^[24] waren erfolglos. Schließlich lieferte die Abwandlung der Yamaguchi-Lactonisierung nach Shiina et al.^[25] mit 2-Methyl-6-nitrobenzoesäureanhydrid für die Aktivierung der Carbonsäure akzeptable Ausbeuten (Schema 4). Anschließend wurden nach dem oben skizzierten Syntheseweg die übrigen drei Diastereomere synthetisiert, und durch den Vergleich der NMR-Spektren konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass Isomer **20** identisch mit natürlichem Chondramid C ist.

Mit den vier Diastereomeren in Händen konnten wir nun beginnen, die unterschiedliche biologische Aktivität zu untersuchen. Der Vergleich der antiproliferativen Eigenschaft mit der Fähigkeit, die Actin-Polymerisation zu induzieren, kann wertvolle Informationen liefern – nicht nur für SAR-Studien, sondern auch im Hinblick auf das Vorhandensein eines weiteren möglichen zellulären Targets, das zumindest zum Teil zur beobachteten biologischen Aktivität beiträgt.

Zur Beurteilung der antiproliferativen Eigenschaften von Chondramid C wurden fünf unterschiedliche Zelllinien untersucht. Wie in Tabelle 1 gezeigt, hat das natürliche Chondramid C, Isomer **20** (Schema 5), den stärksten hemmenden Effekt auf das Wachstum kultivierter Säugerzellen; im selben Konzentrationsbereich liegt jedoch auch die Inhibitoraktivität von **21**. Die Diastereomere **22** und **23** fallen in ihrer Wirkung hingegen deutlich zurück; im Durchschnitt liegt ihr IC_{50} -Wert bei einer 20- bzw. 36fach höheren Konzentration.

In weiteren Experimenten wurde die Fähigkeit der Chondramide zur Induktion einer Actin-Polymerisation untersucht. Abbildung 1 zeigt, dass das natürliche Chondramid (**20**) die Polymerisation deutlich stärker induziert, als dies die übrigen Diastereomere tun. Allerdings war auch in diesen zellfreien Experimenten Diastereomer **21** deutlich effektiver als **22** und **23**. Die Polymerisationskurven der unterschiedlichen Diastereomere (siehe Hintergrundinformationen) ergaben EC_{50} -Werte von: 2 (**20**), 3 (**21**), 5 (**22**) und 6 μM (**23**). Die EC_{50} -Werte beziehen sich auf den maximal erreichbaren Wert, der durch eine sigmoidale Kurvenanpassung des Polymerisationsverlaufs mit **20** (40 μM) bestimmt wurde. Abbildung 1 zeigt zusätzlich die Induktion der Polymerisation in Abhängigkeit unterschiedlicher Konzentrationen von **20**. Man sieht, dass die Beziehung zwischen der Konzentration und dem Polymerisationsgrad exponentiell ist. Diese Abhängigkeit muss bei der Beurteilung der EC_{50} -Werte berücksichtigt werden.

Bei einer Konzentration von 160 nM von **21** beobachteten wir deutliche Auswirkungen auf das Actin-Cytoskelett von Nierenkrebszellen (Abbildung 2). Die Reorganisation der



Schema 5. Diastereomere von Chondramid C.

Actin-Strukturen während der Mitose war beeinträchtigt, und in der Interphase wurden stärkere Stressfasern und Flocken von F-Actin gebildet. Nach 18 Stunden wurden die ersten Zellen mit zwei Zellkernen beobachtet. Dieser Phänotyp wurde auch mit Diastereomer **22** gefunden, jedoch bei deutlich höheren Konzentrationen (8 μM).

Aus der Überlagerung der vier Diastereomere ist ersichtlich, dass **20** und **21** eine ähnliche Konformation im Peptidteil einnehmen – das ist bemerkenswert, weil zwei der drei Konfigurationszentren im Polyketidteil die entgegengesetzte Konfiguration aufweisen. Die Konformationen von **22** und **23** weichen hingegen deutlich von jenen der beiden erstgenannten Strukturen ab (Abbildung 3).

Die vergleichbare biologische Aktivität von **20** und **21** kann mit einer ähnlichen räumlichen Anordnung erklärt werden, die durch die Polyketid-Segmente eingestellt wird. In Schema 6 wird die Konformation wiedergegeben, die durch das Polyketid-Segment eingestellt wird. Man sieht, dass in **20** und **21** ähnliche Torsionswinkel und Abstände eingenommen werden. Diese Werte sind in **23** hingegen deutlich verschieden.

Wir haben hier über die Total-synthese von Chondramid C und die darauf beruhende Aufklärung seiner absoluten Konfiguration berichtet. Die Synthese von drei zusätzlichen Diastereomeren ermöglichte erste SAR-Studien, in denen die Fähigkeit zur Induktion der Actin-Polymerisation mit den anti-

Tabelle 1: Antiproliferative Wirkung von **20–23** auf unterschiedliche Säugerzellen; angegeben ist der IC_{50} -Wert in nM.^[a]

Zelllinie	Zelltyp	20	21	22	23
L-929	murine Fibroblasten aus Bindegewebe	55 ± 24	81 ± 6	1670 ± 390	2400 ± 115
A-431	humanes epidermoides Karzinom	55 ± 5	49 ± 3	620 ± 280	1200 ± 45
A-498	humanes Nieren-Karzinom	24 ± 3	32 ± 2	500 ± 130	920 ± 270
A-549	humanes Lungen-Karzinom	26 ± 5	23 ± 2	510 ± 195	930 ± 60
SK-OV-3	humanes Ovarialkarzinom	16 ± 5	19 ± 2	320 ± 60	1040 ± 160

[a] Die Zahlen sind Mittelwerte ± Standardabweichungen zweier unabhängiger IC_{50} -Bestimmungen.

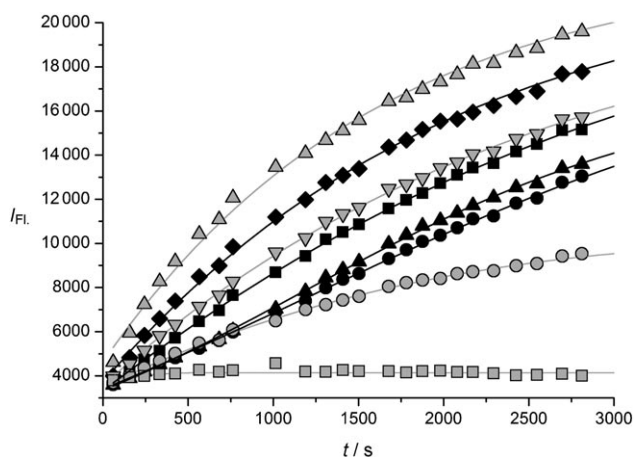


Abbildung 1. Induktion der G-Actin-Polymerisation durch Chondramid. Pyren-Actin wurde in einem nichtpolymerisierenden Puffer mit Chondramid-Diastereomeren inkubiert, und die Actin-Polymerisation wurde über die ansteigende Fluoreszenz verfolgt. Jedes Diastereomer wurde in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt (wiedergegeben durch schwarze Symbole: \blacklozenge 20, \blacksquare 21, \blacktriangle 22 und \bullet 23). Für Chondramid C wurde die Fähigkeit zur Induktion bei zusätzlichen Konzentrationen gezeigt (graue Symbole: \blacktriangle 40 μM , \blacktriangledown 5 μM und \bullet 1 μM ; \blacksquare Methanol).

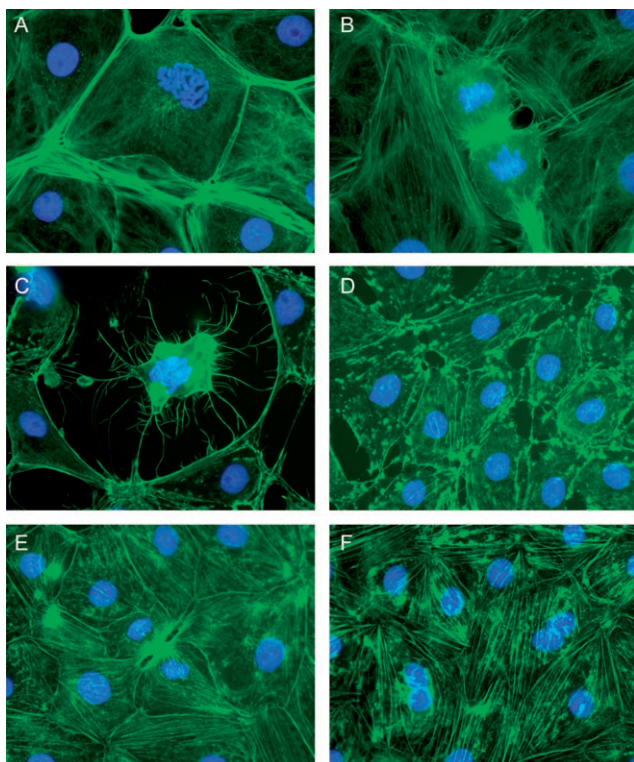


Abbildung 2. Einfluss von 21 auf das Actin-Cytoskelett von A-498-Nierenkrebs-Zellen nach unterschiedlicher Inkubationszeit. F-Actin ist grün, Zellkerne und Chromosomen sind blau markiert. A, B: Kontrollzellen mit jeweils einer mitotischen Zelle in der Bildmitte; Metaphase (A) und Telophase (B). Zellen, die mit 21 (160 nM) inkubiert wurden, zeigen anomale Metaphasen (C, nach 2 h) und einen verstärkten kontraktilen Ring in der späten Telophase (E, nach 18 h). Punktförmige Flecken aus F-Actin wurden besonders an den fokalen Adhäsionspunkten sichtbar (D, nach 4 h), Stressfasern verstärken sich und Actin-Flocculationen entstehen (E und F, nach 18 h).

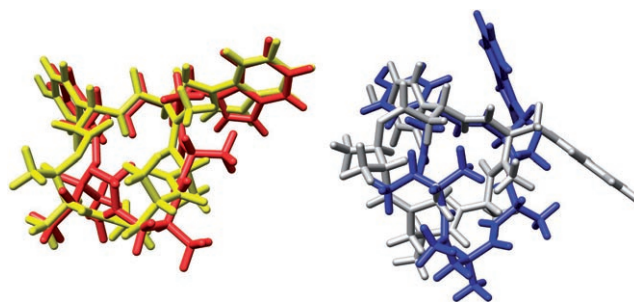
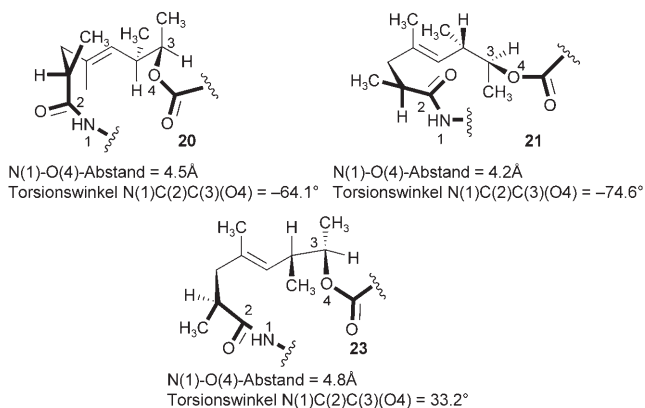


Abbildung 3. Überlagerung verschiedener Chondramid C Isomere. 20 rot, 21 gelb, 22 grau, 23 blau. 20 und 21 haben die gleiche Konformation im Tripeptid-Segment.



Schema 6. Polyketid-Segmente von 20, 21 und 23.

proliferativen Effekten verglichen wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass die Antitumorwirkung durch die Induktion der Actin-Polymerisation ausgelöst wird. Überraschend war der Befund, dass der Naturstoff 20 und das Isomer 21 nahezu die gleiche biologische Aktivität aufweisen. Dies kann mithilfe einer Konformationsanalyse erklärt werden, die zeigt, dass die durch das Polyketidsegment aufgebauten Winkel und Abstände einander sehr ähnlich sind; daraus ergibt sich eine nahezu identische Konformation des Peptidteils. Damit konnte bestätigt werden, dass der Polyketidteil als Strukturelement fungiert, das eine Feinjustierung der Aminosäuren im Molekül vornimmt.

Eingegangen am 10. März 2008,
veränderte Fassung am 28. April 2008
Online veröffentlicht am 15. Juli 2008

Stichwörter: Chondramid · Naturstoffe · Struktur-Aktivitäts-Beziehungen · Strukturaufklärung · Totalsynthesen

- [1] a) B. Kunze, R. Jansen, F. Sasse, G. Höfle, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1995**, 48, 1262; b) R. Jansen, B. Kunze, H. Reichenbach, G. Höfle, *Liebigs Ann.* **1996**, 285.
[2] F. Sasse, B. Kunze, T. M. A. Gronewold, H. Reichenbach, *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, 90, 1559.

- [3] a) F. Sasse, H. Steinmetz, G. Höfle, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 741; b) T. M. A. Gronewold, F. Sasse, H. Lünsdorf, H. Reichenbach, *Cell Tissue Res.* **1999**, *295*, 121.
- [4] a) R. Jansen, H. Irschik, H. Reichenbach, G. Höfle, *Liebigs Ann.* **1997**, 1725; b) D. Janssen, D. Albert, R. Jansen, R. Müller, M. Kalesse, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4985; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4898; c) D. Janssen, M. Kalesse, *Synlett* **2007**, 2667.
- [5] a) S. Rachid, D. Krug, K. Weissman, R. Müller, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 21810; b) S. Rachid, D. Krug, I. Kochems, B. Kunze, M. Scharfe, H. Blöcker, M. Zabriski, R. Müller, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 667.
- [6] H. Waldmann, T.-S. Hu, S. Renner, S. Menninger, R. Tannert, T. Oda, H.-D. Arndt, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6573; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6473.
- [7] T. M. Zabriskie, J. A. Klocke, C. M. Ireland, A. H. Marcus, T. F. Molinski, D. J. Faulkner, C. Xu, J. C. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3123.
- [8] P. Crews, L. V. Manes, M. Boehler, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 2797.
- [9] J. C. Braekman, D. Daloze, B. Moussiaux, R. Riccio, *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 994.
- [10] a) M. R. Bubb, A. M. J. Senderowicz, E. A. Sausville, K. L. K. Duncan, E. D. Korn, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 14869; b) M. R. Bubb, I. Spector, B. B. Beyer, M. K. Fosen, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 5163.
- [11] W. Inman, P. Crews, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2822.
- [12] a) A. K. Ghosh, D. K. Moon, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2425, zit. Lit.; b) Y. Hirai, K. Yokota, T. Momose, *Heterocycles* **1994**, *39*, 603; c) T. Imaeda, Y. Hamada, T. Shioiri, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 591; d) K. S. Chu, G. R. Negrete, J. P. Konopelski, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5196; e) P. A. Grieco, Y. S. Hon, A. Perez-Medrano, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1630; f) U. Schmidt, W. Siegel, K. Mundinger, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 1269.
- [13] a) S. Terracciano, I. Bruno, G. Bifulco, J. E. Copper, C. D. Smith, L. Gomez-Paloma, R. Riccio, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1325; b) S. Terracciano, I. Bruno, G. Bifulco, E. Avallone, C. D. Smith, L. Gomez-Paloma, R. Riccio, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5225.
- [14] S. Maringanti, S. Yasmeen, D. Fischer, M. E. Maier, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 6687.
- [15] a) A. Zampella, C. Giannini, C. Debitus, C. Roussakis, M. V. D'Auria, *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 332; b) F. Gala, M. V. D'Auria, S. De Marino, F. Zollo, C. D. Smith, J. E. Copper, A. Zampella, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5212.
- [16] P. Ashworth, B. Broadbelt, P. Jankowski, P. Kocienski, *Synthesis* **1995**, 199.
- [17] S. G. Davies, O. Ichihara, *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, *2*, 183.
- [18] Y. Hirai, K. Yokota, T. Momose, *Heterocycles* **1994**, *39*, 603.
- [19] a) U. S. Racherla, H. C. Brown, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 401; b) H. C. Brown, K. S. Bhat, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5919.
- [20] a) G. Ehrlich, J. Hassfeld, U. Eggert, M. Kalesse, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2232; b) G. Ehrlich, J. Hassfeld, U. Eggert, M. Kalesse, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14038; c) J. Hassfeld, U. Eggert, M. Kalesse, *Synthesis* **2005**, 1183; d) J. Hassfeld, M. Kalesse, *Synlett* **2002**, 2007.
- [21] E. P. Boden, G. E. Keck, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2394.
- [22] J. Inanaga, K. Hirata, H. Saeki, T. Katsuki, M. Yamaguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, *52*, 1989.
- [23] O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981**, 1.
- [24] a) P. Baumhof, R. Mazitschek, A. Giannis, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3784; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3672; b) J. Otera, N. Dan-oh, H. Nozaki, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5307.
- [25] I. Shiina, M. Kubota, R. Ibuka, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7535.