

# Synthese und biologische Aktivität von Largazol und Derivaten\*\*

Tobias Seiser, Faustin Kamena und Nicolai Cramer\*

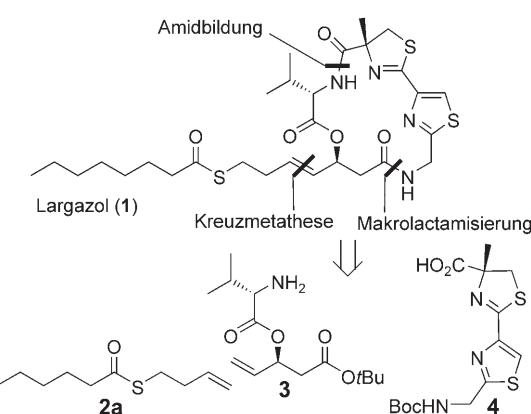
Auf der Suche nach neuen Leitstrukturen für die Wirkstoff-Forschung richtet sich nach wie vor ein Hauptaugenmerk auf Naturstoffe.<sup>[1]</sup> Hierbei zeigen insbesondere zytotoxische Verbindungen, die aus marinen Quellen isoliert wurden, eine reichhaltige Strukturvielfalt.<sup>[2]</sup> Allerdings mangelt es diesen oft hoch potenzen Verbindungen häufig an Selektivität für Krebszellen gegenüber den nichttransformierten Wildtypzellen. Eine Ausnahme von diesem Muster scheint Largazol (**1**) zu sein, das kürzlich von Luesch et al. aus einem Cyanobakterium des Genus *Symploca* in geringen Mengen isoliert werden konnte.<sup>[3]</sup> Die proliferationshemmende Aktivität von **1** ist bei Krebszelllinien bemerkenswert höher als bei entsprechenden nichttransformierten Zellen (7.7 nm bzw. 122 nm).<sup>[3]</sup> Diese hervorragende Eigenschaft macht **1** zu einem wichtigen Syntheseziel, wobei die Synthese eine ausreichende Substanzmenge für weiter reichende biologische Untersuchungen liefern sollte, um den Wirkungsmechanismus und die beobachtete selektive Inhibition aufzuklären.

Die Struktur von Largazol (**1**) enthält mehrere ungewöhnliche Untereinheiten, beispielsweise ein 4-Methylthiazolin, das analog zu Didehydromirabazol<sup>[4]</sup> linear an einen Thiazolring geknüpft ist, sowie einen empfindlichen Thioester. Unsere Strategie sollte den Aufbau verschiedener Derivate ausgehend von einer gemeinsamen Vorstufe in einem fortgeschrittenen Synthesestadium ermöglichen. Diese Zielsetzung spiegelt sich in unserer Retrosynthese wider: Verknüpfung der Fragmente **3** und **4** über zwei Amidbindungen zum cyclischen terminalen Olefin **13** mit anschließender Einführung der Seitenkette durch Kreuzmetathese der beiden terminalen Olefinbausteine **2a**<sup>[5]</sup> und **13** (Schema 1).

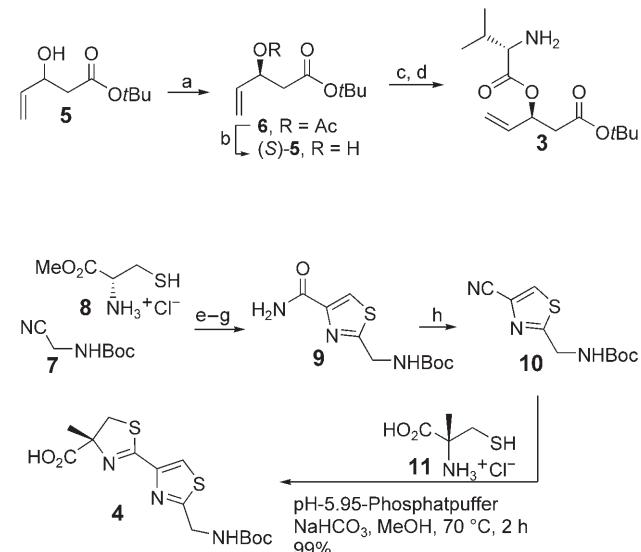
Die Synthese von Fragment **3** beginnt mit einer enzymatischen Racematspaltung des Alkohols **5** unter Verwendung von Amano-Lipase PS, die das Acetat **6** mit ausgezeichneter Enantioselektivität ergab (Schema 2).<sup>[6]</sup> Die anschließende Hydrolyse des Acetats **6** erfordert ausgesprochen milde Bedingungen, da eine Eliminierung zum konjugierten Dien als Konkurrenzreaktion auftritt. Durch Verwendung von Kaliumcarbonat in Methanol ließ sich diese Nebenreaktion weitestgehend zurückdrängen. Der so in 82 % erhaltene optisch reine Allylalkohol (*S*)-**5** wurde mit Fmoc-L-Valin verestert,

und die Abspaltung der Fmoc-Gruppe mit Piperidin ergab danach das Amin **3**.

Das cyansubstituierte Thiazol **10**<sup>[7]</sup> wurde ausgehend von N-Boc-Aminoacetonitril (**7**) und dem Hydrochlorid von Cysteinmethylester (**8**) in 4 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 39 % hergestellt: Eine basenkatalysierte Kondensation ergab das Thiazolin, das direkt mit Bromtrichlormethan zum Thia-



**Schema 1.** Retrosynthese von Largazol (1).



**Schema 2.** Reagenzien und Bedingungen: a) Amano-Lipase PS, Vinylacetat, 30 °C, 16 h, 45 %, > 95 % ee; b) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, 10 °C, 15 min, 82%; c) Fmoc-L-Valin, Diisopropylcarbodiimid, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 97%; d) Piperidin, DMF, 20 min, RT, 96%; e) NEt<sub>3</sub>, MeOH, 60 °C, 3 h; f) CBrCl<sub>3</sub>, DBU, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 10 h; g) NH<sub>3</sub>, MeOH, 2 d, RT, 44 % über 3 Stufen; h) Trifluoressigsäureanhydrid, NEt<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C, 1 h, 89 %. Boc = *tert*-Butyloxycarbonyl, DMAP = 4-(*N,N*-Dimethylamino)pyridin, DBU = 1,5-Diazabicyclo[5.4.0]undec-5-en, Fmoc = 9-Fluorenylmethoxy-carbonyl.

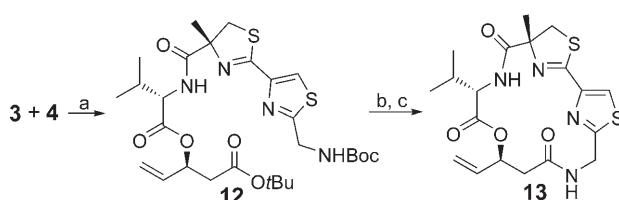
[\*] T. Seiser, Dr. F. Kamena, Dr. N. Cramer  
Laboratorium für Organische Chemie, ETH Zürich  
Wolfgang-Pauli-Strasse 10, HCI H 304  
8093 Zürich (Schweiz)  
Fax: (+41) 446-331-235  
E-Mail: Nicolai.cramer@org.chem.ethz.ch

[\*\*] N.C. wird vom Fonds der Chemischen Industrie durch ein Liebig-Stipendium gefördert. Wir danken Prof. Dr. Peter H. Seeberger für die großzügige finanzielle Unterstützung und Prof. Dr. Dieter Seebach für hilfreiche Diskussionen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200802043> zu finden.

zol oxidiert wurde. Ammonolyse führte zum Amid **9**, das in einem weiteren Schritt mit Trifluoressigsäureanhydrid und Triethylamin zum Nitril **10** dehydratisiert wurde. Die anschließende Umsetzung von **10** mit  $\alpha$ -Methylcystein erforderte einige Optimierungsarbeit, da die von Pattenden et al. beschriebenen Methoden<sup>[8]</sup> das gewünschte Kondensationsprodukt nur in geringen Ausbeuten und Reinheiten ergaben. Unter unerwartet milden Bedingungen (pH-5.95-Phosphatpuffer/Methanol, 70 °C, 2 h)<sup>[9]</sup> konnte jedoch **10** mit (*R*)- $\alpha$ -Methylcystein-Hydrochlorid<sup>[10]</sup> umgesetzt werden, und eine einfache Säure-Base-Extraktion lieferte das Thiazolin-Thiazol **4** in nahezu quantitativer Ausbeute und hoher Reinheit.

Die Carbonsäure **4** wurde anschließend unter Standardbedingungen mit dem Amin **3** und HATU zum Amid **12** umgesetzt (Schema 3). Im nächsten Syntheseschritt wurden



**Schema 3.** Reagentien und Bedingungen: a) HATU, Diisopropylethylamin, DMF, RT, 20 min, 96%; b) TFA, Et<sub>3</sub>SiH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C → RT, 1.5 h, 88%; c) HATU, Diisopropylethylamin, THF, 4 mm, 0 °C, 16 h, 77–89%. HATU = O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)tetramethyluronium-hexafluorophosphat, TFA = Trifluoressigsäure.

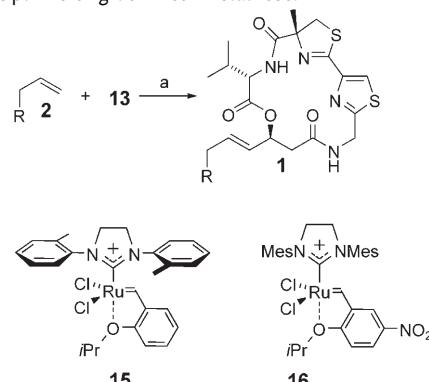
mit einem Gemisch aus Trifluoressigsäure und Triethylsilan sowohl der *tert*-Butylester gespalten als auch die Boc-Schutzgruppe entfernt. Die langsame Zugabe des dabei entstandenen Ammoniumsalzes zu einer auf 0 °C gekühlten, verdünnten Lösung von HATU und Hünig-Base in THF führte zum gewünschten Ringschluss. Bei einer Ansatzgröße von 40 µmol wurde das Lactam **13** in einer bemerkenswert hohen Ausbeute von 89 % isoliert. Wurde die Ansatzgröße um das 25-Fache vergrößert, so sank die Ausbeute auf 77 %.

Aus einer Röntgenkristallstrukturanalyse<sup>[11]</sup> lassen sich einige interessante Eigenschaften des Lactams **13** ableiten (Abbildung 1). Wegen der planaren Anordnung der Thiazol-

lin-Thiazol-Einheit zeigen beide Stickstoffatome (N25 und N26) ins Ringinnere. Zusammen mit dem Amid-Stickstoffatom (N24) und Ester-Sauerstoffatom (O20) ergibt sich eine potenzielle chelatisierende Umgebung für Metallionen.<sup>[12]</sup> Ein weiteres bemerkenswertes Detail ist die nahezu perfekte orthogonale Ausrichtung der Estergruppe mit O20 zur Carbonylgruppe von C15 und zur Doppelbindung C18-C19. Somit ist die Estergruppe für eine *anti*-Eliminierung ausgerichtet, was die Basenempfindlichkeit von **13** erklärt.

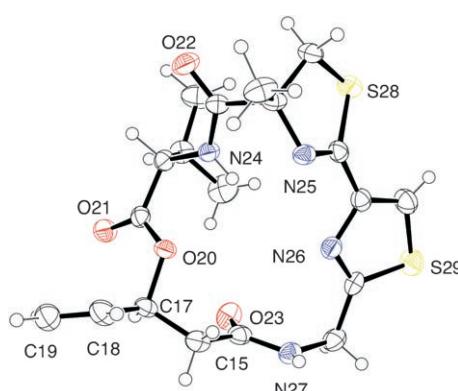
Als nächstes wurde die entscheidende Kreuzmetathese optimiert. Der Schwefelsubstituent in  $\delta$ -Stellung an Verbindung **2a** erwies sich erwartungsgemäß als problematisch. Ein Screening von Ruthenium-Metathesekatalysatoren ergab, dass ausschließlich in 1,2-Dichlorehthan bei 80–100 °C in Gegenwart von 10–15 % Katalysator signifikante Umsätze erhalten werden (Tabelle 1). Der Hoveyda-Grubbs-II-Kataly-

**Tabelle 1:** Optimierung der Kreuzmetathese.<sup>[a]</sup>



Nr.	Katalysator	2	R	Produkt	Ausb. [%] <sup>[b]</sup>
1	Grubbs-I	<b>2a</b>	CH <sub>2</sub> SC(O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	<b>1</b>	5 <sup>[c]</sup>
2	Grubbs-II	<b>2a</b>	CH <sub>2</sub> SC(O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	<b>1</b>	11 <sup>[c]</sup>
3	Hoveyda-Grubbs-II	<b>2a</b>	CH <sub>2</sub> SC(O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	<b>1</b>	44 <sup>[d]</sup>
4	<b>15</b>	<b>2a</b>	CH <sub>2</sub> SC(O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	<b>1</b>	13 <sup>[e]</sup>
5	<b>16</b>	<b>2a</b>	CH <sub>2</sub> SC(O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	<b>1</b>	75
6	Hoveyda-Grubbs-II	<b>2b</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> CH <sub>3</sub>	<b>1b</b>	73
7	<b>16</b>	<b>2c</b>	CH <sub>2</sub> Br	<b>1c</b>	92
8	<b>16</b>	<b>2d</b>	CH <sub>2</sub> OC(O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	<b>1d</b>	37
9	<b>16</b>	<b>2e</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SC(O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	<b>1e</b>	69
10	<b>16</b>	<b>2f</b>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SC(O)(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> CH <sub>3</sub>	<b>1f</b>	58

[a] 4 Äquiv. Olefin **2**, 10 % Katalysator (+ 5 % nach 2 h), 0.1 M in 1,2-Dichlorehthan, 90 °C, 3–12 h. Mes = 2,4,6-Trimethylphenyl. [b] Kombinierte Ausbeute an isoliertem Produkt (*cis* und *trans*). [c] 68 % **13** wurden zurückgewonnen. [d] 44 % **13** wurden zurückgewonnen. [e] 77 % **13** wurden zurückgewonnen.



**Abbildung 1.** ORTEP-Darstellung von **13** (Ellipsoide bei 50 % Aufenthaltswahrscheinlichkeit).

sator erzeugte deutlich weniger Zersetzungsprodukte als die Grubbs-I- und Grubbs-II-Katalysatoren und ergab eine Ausbeute von 44 % (Nr. 1–3). Die sterisch weniger anspruchsvolle Variante **15**<sup>[13]</sup> (Nr. 4) lieferte eine wesentlich geringere Ausbeute als der Standard-Hoveyda-Grubbs-II-Katalysator. Der *p*-Nitro-substituierte Katalysator **16** von Grela<sup>[14]</sup> war deutlich aktiver und ergab Largazol<sup>[15]</sup> in 75 % Ausbeute mit einem *trans/cis*-Verhältnis von 6:1 (Nr. 5). Unter den optimierten Bedingungen konnten anschließend

auch die Derivate **1b–f** in vergleichbaren Ausbeuten (37–92 %) und *trans/cis*-Selektivitäten (4:1–10:1) erhalten werden (Nr. 6–10).

Synthetisches Largazol (**1**) und die Derivate **1b–f** wurden in MTT-Testreihen auf ihre antiproliferative Wirkung gegen die humane Epithelkarzinom-Zelllinie A431 und die Präadipozyten-Zelllinie 3T3L1 untersucht (Tabelle 2). Synthetisches **1** wies nur eine relativ geringe Selektivität für die

**Tabelle 2:** Antiproliferative Aktivität von **1** und den Analoga **1b–g** im MTT-Assay.<sup>[a]</sup>

Zelllinie	<b>1</b>	<b>1b</b>	<b>1d</b>	<b>1e</b>	<b>1f</b>	<b>1g</b> <sup>[15]</sup>
A431	49	n.b. <sup>[b]</sup>	n.b. <sup>[b]</sup>	n.b. <sup>[b]</sup>	n.b. <sup>[b]</sup>	126
3T3L1	127	n.b. <sup>[b]</sup>	n.b. <sup>[b]</sup>	n.b. <sup>[b]</sup>	n.b. <sup>[b]</sup>	1200
SI	2.6	–	–	–	–	9.5

[a] GI<sub>50</sub> in nM. [b] n.b. = nicht bestimmt; bis zu einer Konzentration von 5 μM wurde keine Aktivität festgestellt.

Krebszelllinie (GI<sub>50</sub> = 49 nM) gegenüber den 3T3-Zellen (GI<sub>50</sub> = 127 nM) auf. Das Intermediat **13** mit einer endständigen Doppelbindung und das Derivat **1b**, bei dem die Seitenkette durch eine C<sub>13</sub>-Alkylkette ersetzt wurde, wirkten selbst bei einer Konzentration von 5 μM nicht wachstums-hemmend. Eine allein auf dem cyclischen Grundgerüst be-ruhende Bioaktivität kann somit ausgeschlossen werden. Der Austausch der Thioestergruppe gegen einen Ester (in **1d**) führte ebenfalls zum vollständigen Verlust der Aktivität. Somit lag die Schlussfolgerung nahe, dass der Octansäure-Thioester in **1** eine Schutzgruppe für das freie Thiol darstellt, die unter physiologischen Bedingungen schnell hydrolysiert wird, und tatsächlich zeigte das freie Thiol **1g**<sup>[16]</sup> eine stark antiproliferative Wirkung. Bemerkenswerterweise ist das Aktivitätsprofil von **1g** nicht mit demjenigen von **1** identisch. Das freie Thiol **1g** zeigt eine etwas geringere Potenz (GI<sub>50</sub> = 126 nM; GI<sub>50</sub>(**1**) = 49 nM), aber eine deutlich stärkere Spezi-tät (SI = 9.5; SI(**1**) = 2.6) gegenüber den Wildtypzellen als der Thioester **1**. Dies lässt sich möglicherweise durch eine verminderte Aufnahme des freien Thiols durch die Wildtyp-zellen erklären. Die um ein bzw. zwei Kohlenstoffatome verlängerten Thioesterderivate **1e** und **1f** wirkten überraschenderweise nicht wachstumshemmend. Dieses Ergebnis unterstreicht, wie wichtig der richtige Abstand der Thio-funktion vom cyclischen Grundgerüst ist.

Zusammenfassend haben wir eine kurze und modulare Synthese (19 % Gesamtausbeute, neun Stufen in der längsten linearen Sequenz) von Largazol beschrieben, die es uns auch ermöglichte, eine Reihe von Derivaten herzustellen.<sup>[17]</sup> Die Bioaktivitäten der synthetisierten Verbindungen wurde in MTT-Testreihen bestimmt, wobei sich die Thiobutetylgruppe als unabdingbar für eine antiproliferative Wirkung zeigte. Das entsprechende freie Thiol weist eine bessere Selektivität auf als **1**. Weiterführende Studien zur Modifizierung der Aktivität und zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus auf molekularer Ebene sind im Gange.

Eingegangen am 30. April 2008  
Online veröffentlicht am 16. Juli 2008

**Stichwörter:** Biologische Aktivität · Metathesen · Naturstoffe · Struktur-Aktivitäts-Beziehungen · Totalsynthesen

- [1] a) I. Paterson, E. A. Anderson, *Science* **2005**, *310*, 451–453; b) F. E. Koehn, G. T. Carter, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 206–220.
- [2] a) J. W. Blunt, B. R. Copp, W.-P. Hu, M. H. G. Munro, P. T. Northcote, M. R. Prinsep, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 35–94; b) J. W. Blunt, B. R. Copp, W.-P. Hu, M. H. G. Munro, P. T. Northcote, M. R. Prinsep, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 31–86; c) D. J. Faulkner, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 1–48.
- [3] K. Taori, V. J. Paul, H. Luesch, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1806–1807.
- [4] a) S. Carmeli, R. E. Moore, G. M. L. Patterson, T. H. Corbett, F. A. Valeriote, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8195–8197; b) S. Carmeli, R. E. Moore, G. M. L. Patterson, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2593–2596.
- [5] Hergestellt durch Alkylierung von Octanthio-S-säure (M. Toriyama, H. Kamijo, S. Motohashi, T. Takido, K. Itabashi, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2003**, *178*, 1661–1665) mit 1-Brom-3-butene (siehe die Hintergrundinformationen).
- [6] a) S. Vrielynck, M. Vandewalle, A. M. Garcia, J. L. Mascarenas, A. Mourino, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 9023–9026; b) C.-H. Tan, T. Stork, N. Feeder, A. B. Holmes, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 1397–1400.
- [7] M. Knopp, S. Koser, B. Schäfer (BASF AG), DE-19934066A1, **2001**.
- [8] a) M. North, G. Pattenden, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 8267–8290; b) G. Pattenden, S. M. Thom, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1993**, 1629–1636.
- [9] R. J. Bergeron, J. Wiegand, J. S. McManis, B. H. McCosar, W. R. Weimar, G. M. Brittenham, R. E. Smith, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2432–2440.
- [10] G. Pattenden, S. M. Thorn, M. F. Jones, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 2131–2138.
- [11] Kristallographische Daten für **13**: C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>, *M* = 436.55, orthorhombisch, Raumgruppe P<sub>2</sub>12<sub>1</sub>2<sub>1</sub>, *a* = 9.6075(2), *b* = 10.9467(2), *c* = 20.3175(3) Å, *V* = 2136.80(7) Å<sup>3</sup>, *Z* = 4, ρ<sub>ber.</sub> = 1.357 Mg m<sup>-3</sup>, *T* = 223 K, gesammelte Reflexe: 3647, unabhängige Reflexe: 3628 (*R*<sub>int</sub> = 0.023), *R*(alle) = 0.0394. *wR(gt)* = 0.0997, Flack-Parameter -0.06 (7). CCDC-686672 enthält die ausführlichen kristallographischen Daten zu dieser Veröffentlichung. Die Daten sind kostenlos beim Cambridge Crystallographic Data Centre über www.ccdc.cam.ac.uk/data\_request/cif erhältlich.
- [12] a) D. J. Freeman, G. Pattenden, A. F. Drake, G. Siligardi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, 129–136; b) L. A. Morris, M. Jaspars, J. J. K. van den Bosch, K. Versluis, A. J. R. Heck, S. M. Kelly, N. C. Price, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 3185–3197.
- [13] I. C. Stewart, C. J. Douglas, R. H. Grubbs, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 441–444.
- [14] A. Michrowska, R. Bujok, S. Harutyunyan, V. Sashuk, G. Dolgonos, K. Grela, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9318–9325.
- [15] Synthetisches Largazol (**1**) stimmt in allen spektroskopischen Daten mit natürlichem Largazol überein; siehe auch die Hintergrundinformationen.
- [16] **1g** wurde durch Monoalkylierung von Bis(trimethylsilyl)thiol mit dem Bromid **1c** synthetisiert.
- [17] Anmerkung bei der Korrektur (4. Juli 2008): Eine weitere Synthese von Largazol wurde kürzlich beschrieben: Y. Ying, K. Taori, H. Kim, J. Hong, H. Luesch, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8455–8459.