

Synthese von Cyclopamin unter Verwendung biomimetischer und diastereoselektiver Transformationen**

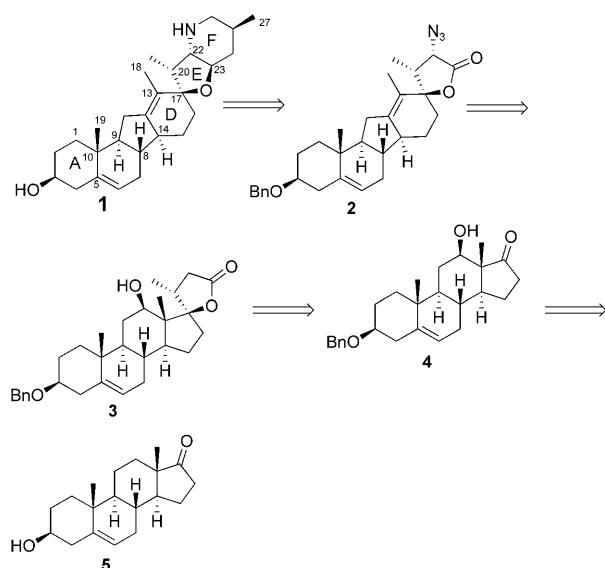
Athanassios Giannis,* Philipp Heretsch, Vasiliki Sarli und Anne Stößel

Philip A. Beachy, Lynn F. James und Richard F. Keeler gewidmet

Der Hedgehog(Hh)-Signaltransduktionsweg ist an einer Vielzahl von Prozessen der Embryonalentwicklung sowie der Homöostase von adultem Gewebe beteiligt.^[1] Da die fehlerhafte Aktivierung des Hh-Weges zu malignen Veränderungen wie Basalzell-Karzinomen, Medulloblastomen, Rhabdomyosarkomen, Prostata-, Pankreas- und Brustkrebs führt, bietet die Inhibition des Hh-Weges eine neue Möglichkeit zur Therapie dieser Krankheiten.^[2,3] Das *Veratrum*-Alkaloid Cyclopamin ist der erste bekannte Inhibitor des Hh-Signaltransduktionsweges und beeinflusst die Balance zwischen der aktiven und inaktiven Form des Proteins Smoothened. Obwohl hoher Bedarf sowohl an Cyclopamin als auch an metabolisch stabileren und potenteren Analoga besteht, war bisher noch keine kurze chemische Synthese dieses Steroidalkaloids verfügbar.

Wir berichten hier über eine effiziente Synthese von Cyclopamin ausgehend von kommerziell erhältlichem Dehydroepiandrosteron unter Verwendung biomimetischer und diastereoselektiver Transformationen. Ein totalsynthetischer Zugang ist zwar aus früheren Publikationen^[4–6] ableitbar, erweist sich aber als mühsam und nicht stereoselektiv und ergibt nur eine äußerst geringe Ausbeute. Unsere Synthese enthält eine Kupfer-vermittelte C-H-Aktivierung/Hydroxylierung, eine kationische Ringkontraktion/-expansion und schließlich eine Alder-En-Reaktion und ermöglicht den zügigen Aufbau dieses ungewöhnlichen Moleküls. Die hier beschriebene Strategie eröffnet darüber hinaus den Zugang zu Cyclopamin-Analoga, die nicht in der Natur vorkommen. Diese Analoga werden es möglich machen, die biologische Aktivität des Naturstoffs weiter zu untersuchen und anzupassen.

Die Entdeckung von Cyclopamin (**1**; Schema 1) datiert auf das Jahr 1957, als Schafhirten in Idaho (USA) durch das Auftreten von neugeborenen Lämmern alarmiert wurden, die



Schema 1. Struktur (mit Steroidnummerierung) und Retrosynthese von Cyclopamin. Bn: Benzyl.

nur ein Auge mitten auf der Stirn trugen, das dem eines Zyklopen glich.^[7] Eine gründliche Untersuchung brachte den Zusammenhang zwischen der Aufnahme der Lilienart *Veratrum californicum* (Kalifornischer Germer) durch trächtige Schafe beim Weiden und der Geburt von Lämmern mit Zyklopie ans Licht. Als auslösendes Agens konnte Cyclopamin identifiziert werden.

Zyklopie ist auch beim Menschen seit dem Altertum bekannt und tritt in schweren Fällen der Holoprosencephalie (HPE) auf. Bei dieser Fehlbildung des Gehirns teilt sich das Prosencephalon nicht, was in ungeteilten oder unvollständig geteilten Hemisphären, Telencephalon, Diencephalon sowie olfaktorischen und optischen Nerven resultiert.^[8] Assoziiert mit dieser Entwicklungsstörung ist ein Spektrum craniofacialer Mittellinienanomalien, darunter okularer Hypotelorismus und interorbitale Proboscis (Ethmocephalie).^[9] Die Ätiologie der HPE ist heterogen und kann sowohl genetische als auch teratogene Faktoren einschließen.

Erst kürzlich wurde das zelluläre Zielmolekül von Cyclopamin aufgeklärt: Cyclopamin bindet an das Plasma-

[*] Prof. Dr. A. Giannis, Dipl.-Chem. P. Heretsch, Dipl.-Chem. A. Stößel
Institut für Organische Chemie
Fakultät für Chemie und Mineralogie
Universität Leipzig
Johannisallee 29, 04103 Leipzig (Deutschland)
Fax: (+49) 341-9736599
E-Mail: giannis@uni-leipzig.de

Dr. V. Sarli
Laboratory of Organic Chemistry, Department of Chemistry
University of Thessaloniki
54124 Thessaloniki (Griechenland)

[**] Wir danken Dr. Lothar Hennig für die Aufnahme der NMR-Spektren und seine Hilfe bei der Interpretation der 2D-NMR-Spektren. Der DFG wird für anteilige finanzielle Unterstützung gedankt. P.H. dankt dem FCI für ein Stipendium.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Synthesen und spektroskopische Daten der gezeigten Verbindungen) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200902520> zu finden.

membranprotein Smoothened, induziert eine Konformationsänderung und inhibiert so den Hedgehog-Signaltransduktionsweg.^[3]

Die Struktur von Cyclopamin birgt eine Vielzahl von Besonderheiten, die die Synthese deutlich erschweren. Darunter fällt die C-nor-D-homo-Steroid-Substruktur, ein hoch substituiertes Furan, das über eine Spiroverknüpfung mit dem D-Ring verbunden ist und außerdem mit dem Piperidinring F anelliert ist, der ein basisches sekundäres Stickstoffatom enthält. Zusätzlich ist Cyclopamin stark säureempfindlich: Bereits bei pH < 3 oder einer Umsetzung mit Lewis-Säuren wird unter Spaltung des Furancarbons und Aromatisierung des D-Rings das toxische Veratramin gebildet.

Auf Grundlage der Retrosynthese in Schema 1 definieren wir drei Ziele von übergeordneter Bedeutung: 1) die Erzeugung des ABCD-Ringsystems, 2) die Installation des Furans (Ring E) und 3) die Synthese des Piperidinrings (Ring F).

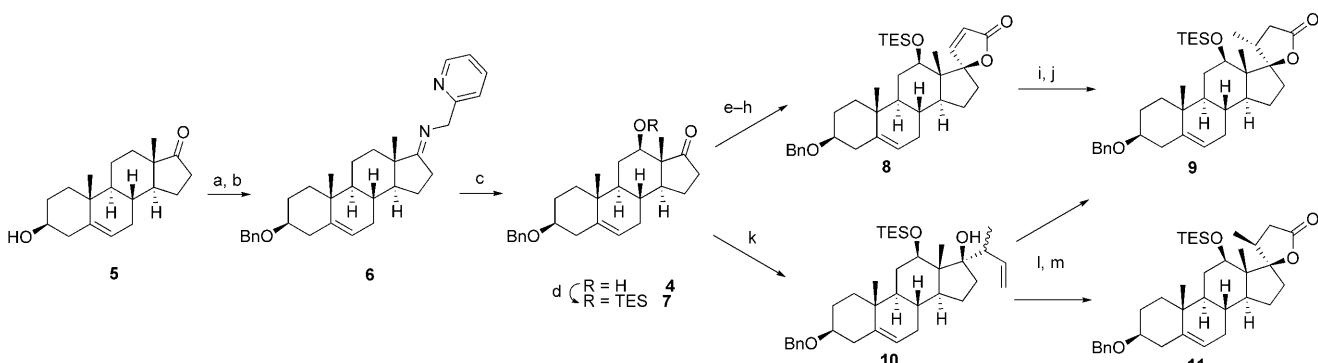
Obwohl das C-nor-D-homo-Steroid in einem totalsynthetischen Ansatz z.B. aus dem (+)-Wieland-Miescher-Keton erzeugt werden könnte, wählten wir einen semisynthetischen Zugang zu dieser Substruktur, um eine kurze und effiziente Gesamtsynthese zu erzielen. Wir vermuteten, dass die kationische Umlagerung von 12 β -Hydroxysteroiden in ihre C-nor-D-homo-Gegenstücke^[10] einen deutlich einfacheren Zugang böte. Da aber 12 β -Hydroxysteroide äußerst selten sind und kein korrekt funktionalisierter Vertreter (wie **4**), der dem Cyclopamin-ABCD-Gerüst gleicht, verfügbar war, zogen wir eine Hydroxylierung in 12-Position durch C-H-Aktivierung von käuflichen Steroiden (z.B. Dehydroepiandrosteron, **5**) in Betracht. Kürzlich publizierten Schönecker et al. eine Methode zu diesem Zweck, bei der Kupfersalze zum Einsatz kommen.^[11] Weiterhin wurde geplant, das Furan mit seiner Spiroverknüpfung zum D-Ring durch die Addition eines funktionalisierten C-Nucleophils an die 17-Keto-Gruppe von **4** zu erzeugen und so direkt an C17 das korrekt substituierte quartäre Zentrum in Form eines tertiären Alkohols zu generieren. Eine oxidative Cyclisierung könnte dann ein Lacton (wie in **3**) als Vorstufe des Furans bilden. Diese Funktionalität

wurde als am besten geeignet für die weitere Umwandlung in das Piperidin (Ring F) erachtet, bei der C-N- und C-C-binndungsbildende Reaktionen sowie ein finaler Ringschluss zum Piperidinring durch eine nucleophile Substitution zum Einsatz kommen sollten.

Ausgehend von kommerziell verfügbarem **5** wurde zunächst die 3 β -Hydroxygruppe mit dem Pyridiniumtriflat von Dudley und Poon^[12] als Benzylether geschützt; anschließend wurde in 17-Position ein 2-Picolylimin generiert, indem das Keton mit 2-Picolylamin unter azeotroper Entfernung des freiwerdenden Wassers umgesetzt wurde (Schema 2). Das erhaltene Imin **6** war nun vorbereitet für die Hydroxylierung in 12-Position. Es gelang uns, durch Umsetzen mit Tetrakis-(acetonitril)kupfer(I)-phosphorhexafluorid und molekularem Sauerstoff die gewünschte 12 β -Hydroxygruppe mit kompletter Regio- und Stereoselektivität in einer guten Ausbeute einzuführen. Nachdem die 12 β -Hydroxygruppe ihrerseits als Triethylsilylether **7** geschützt worden war, wandten wir uns dem Aufbau des Lactons zu.

Die diastereoselektive Addition von Lithiumtriethylsilylpropargylat an **7** ergab den tertiären Alkohol, der durch Umsetzen mit Essigsäure monodesilyliert, nachfolgend mit dem Lindlar-Katalysator diastereoselektiv ausschließlich zum cis-Isomer hydriert und danach mit katalytischen Mengen 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinoxyl-Radikal (TEMPO) und stöchiometrischen Mengen Iodbenzoldiacetat (BAIB) oxidativ zum Butenolid **8** cyclisiert wurde. Umsetzung von **8** mit dem Anion von Trimethylorthothioformiat^[13] und nachfolgende vorsichtige Reduktion mit Raney-Nickel ergaben das korrekt funktionalisierte Lacton **9** als einziges Diastereomer (54% über sechs Stufen).

Das Lacton **9** ist jedoch in ähnlich guter Ausbeute schon in einer dreistufigen Sequenz zugänglich. Dazu wurde das Keton mit 2-Methyl-1-propenylcerchlorid^[14] umgesetzt, anschließend wurden die resultierenden Alkene durch 9-Borabicyclo[3.3.1]nonan (9-BBN) und Natriumperborat hydroboriert/oxidiert und schließlich die Diole erneut mit der Reagentienkombination TEMPO/BAIB oxidativ cyclisiert. Die so direkt erhaltenen Lactone fielen als Epimerengemisch



Schema 2. Synthese der 12 β -Hydroxylactone **9** und **11**: Reaktionsbedingungen: a) 2-Benzylloxymethylpyridiniumtriflat, MgO, PhCF₃, 85 °C; b) 2-Picolylamin, pTsOH (2.5 Mol-%), Toluol, Rückfluss, 90% (95% b.r.s.m.) über zwei Stufen; c) [Cu(MeCN)₄]PF₆, Aceton, dann O₂ (1 atm), dann NH₄OH, dann HOAc, MeOH, 48% (57% b.r.s.m.); d) TESOTf, 2,6-Lutidin, CH₂Cl₂, 0 °C, 93%; e) Triethylsilylpropargyllithium, THF, -15 °C; f) HOAc, THF, H₂O; g) Lindlar-Katalysator (3 Mol-%), Pyridin, THF; h) BAIB, TEMPO (20 Mol-%), 64% (77% b.r.s.m.) über vier Stufen; i) Tris(methylthio)methylolithium, THF, -78 °C; j) Raney-Nickel (W2), THF, H₂O, 69% über zwei Stufen; k) 1-Methyl-2-propenylcerchlorid, THF, 0 °C, 95%; l) 9-BBN, THF, 64 °C; m) BAIB, TEMPO (20 Mol-%), 77% über zwei Stufen, d.r.: 6:4. b.r.s.m.: basierend auf zurückgewonnener Ausgangsverbindung, OTf: Triflat, pTsOH: p-Toluolsulfonsäure, TES: Triethylsilyl.

an C20 an (**9** und **11**), das chromatographisch leicht zu trennen war. Das benötigte 20*R*-Lacton **9** wurde so über drei Stufen in 42% Ausbeute erhalten, des Weiteren fiel das 20*S*-konfigurierte Lacton **11** in 30% Ausbeute an. Diese deutlich kürzere Sequenz verwendeten wir, um das Lacton in Mengen bis zu 10 g pro Ansatz zu erzeugen.

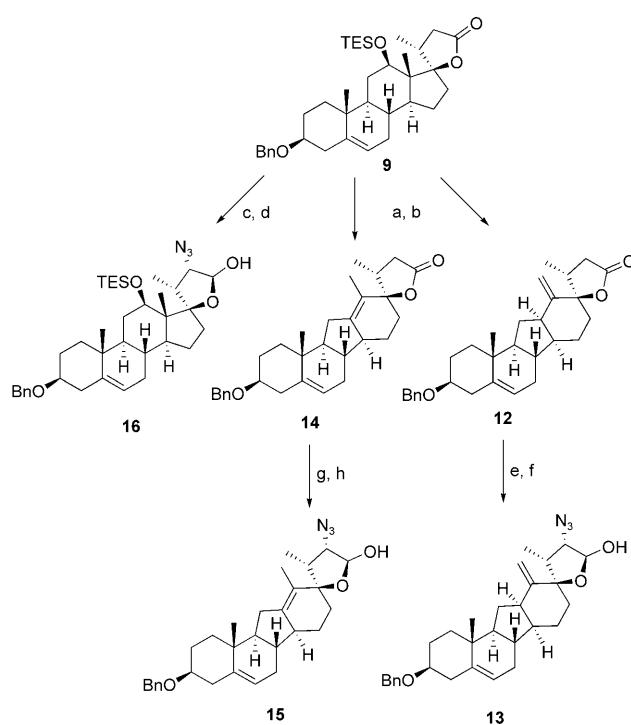
Es erschien uns nun sinnvoll, zunächst das Steroidgerüst umzulagern, ehe wir mit dem Aufbau des Piperidinrings fortfuhren. Dazu wurde der Triethylsilylether mit Flusssäure gespalten und der entstandene Alkohol mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid (Tf_2O) in Pyridin umgesetzt. Bei erhöhter Temperatur lieferte diese Umlagerung vom Wagner-Meerwein-Typ das gewünschte *C-nor-D-homo*-Gerüst in nahezu quantitativer Ausbeute als chromatographisch leicht trennbares 7:3-Gemisch der Regioisomere **12** und **14** (Schema 3). Obwohl das Isomer **12** mit exocyclischer Doppelbindung dominierte, schritten wir in der Reaktionssequenz fort, bevor wir nach einer Möglichkeit zur gezielten Herstellung des endocyclischen Isomers suchten.

Zur Einführung des Stickstoffs wurde durch Umsetzen mit einem Überschuss an Lithiumdiisopropylamid (LDA) bei -30°C das Lactonenolat gebildet und mit Trisyazid^[15] zur Reaktion gebracht. Die so erhaltenen epimeren Azidolactone fielen als chromatographisch trennbares 3:1-Gemisch in 75% Ausbeute an. Da sich das unerwünschte Epimer leicht durch

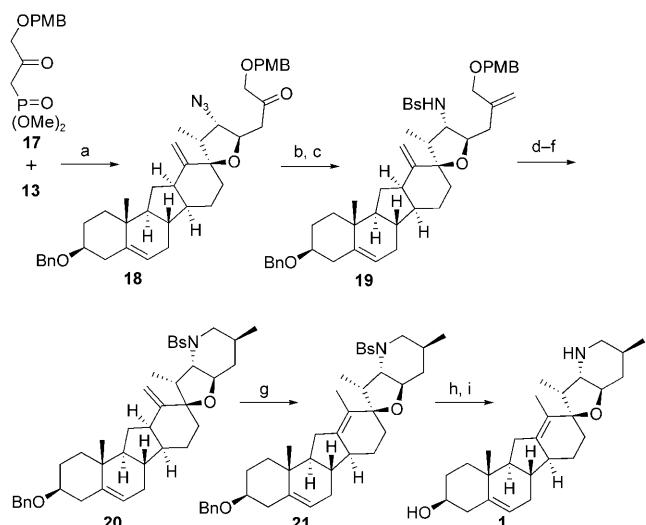
das Einwirken von 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) in CH_2Cl_2 zum gewünschten Epimer isomerisieren ließ, wurde auf dieser Stufe kein Material eingebüßt.

Zum Aufbau der Furanstruktur zogen wir eine Tandemsequenz aus Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion und intramolekularer Michael-Addition zwischen dem β -Ketophophonat **17** (Synthese siehe Hintergrundinformationen) und Azidolactol **15** (zugänglich aus dem Azidolacton durch Umsetzen mit Diisobutylaluminumhydrid (DIBAH) bei -65°C) in Betracht. Im Rahmen eingehender Studien stellten wir allerdings fest, dass selbst bei erhöhten Temperaturen und ausgedehnten Reaktionszeiten weder das Azidolactol **15** (mit einer C12-C13-Doppelbindung) noch das Azidolactol **16**, das direkt aus dem nicht umgelagerten Lacton **9** zugänglich ist, das gewünschte Produkt ergeben. Das Regioisomer **12** mit exocyclischer Doppelbindung reagierte jedoch nach Konversion in das Azidolactol **13** zum gewünschten Furan **18** als einzigem Produkt (Schema 4). Unter milden Reaktionsbedingungen (Base: Bariumhydroxid, Lösungsmittelsystem: THF/Wasser^[16]) erfolgte diese Reaktion in guter Ausbeute.

Nun widmeten wir uns dem Aufbau des Piperidinrings. Hierzu wurde das 25-Keton **18** mithilfe der zweistufigen Peterson-Olefinition [Reaktion mit (Trimethylsilyl)methylcerchlorid^[17] und nachfolgende Eliminierung durch kurze Umsetzung mit Flusssäure] in das Alken transformiert. Die anschließende Staudinger-Reduktion^[18] des Azids und das Schützen des so erzeugten Amins mit Benzolsulfonylchlorid lieferten das Sulfonamid **19**, das durch Umsetzen mit 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-1,4-benzochinon (DDQ) in den entsprechenden Allylalkohol überging (Schema 4). Der Ringschluss



Schema 3. Synthese der Azidolactole **13**, **15** und **16**. Reaktionsbedingungen: a) HF, MeCN, H_2O , 85%; b) Tf_2O , Pyridin, $0 \rightarrow 50^\circ\text{C}$, 94% (7:3-Verhältnis von **12** und **14**); c) LDA, THF, -78°C , dann Trisyazid, -78°C , dann HOAc, KOAc, $-78 \rightarrow 22^\circ\text{C}$, 78% (d.r. 8:1); d) DIBAH, THF, $-78 \rightarrow -65^\circ\text{C}$, 82%; e) LDA, THF, -78°C , dann Trisyazid, -78°C , dann HOAc, $-78 \rightarrow 22^\circ\text{C}$, 93% (d.r. 5:4); f) DIBAH, THF, $-78 \rightarrow -65^\circ\text{C}$, 95%; g) LDA, THF, -78°C , dann Trisyazid, -78°C , dann HOAc, $-78 \rightarrow 22^\circ\text{C}$, 75% (d.r. 3:1); h) DIBAH, THF, $-78 \rightarrow -65^\circ\text{C}$, 90%.



Schema 4. Synthese von Cycloparmin. Reaktionsbedingungen: a) **17**, $\text{Ba}(\text{OH})_2$, THF, H_2O , dann **13**, 48% (59% b.r.s.m.); b) (Trimethylsilyl)methylcerchlorid, THF, -78°C , dann HF, MeCN, H_2O ; c) PPh_3 , THF, H_2O , 50°C , dann BsCl , Et_3N , CH_2Cl_2 , 40°C , 80% über zwei Stufen; d) DDQ, pH-7.0-Puffer, CH_2Cl_2 ; e) Bu_3P , ADDP, Toluol; f) $[\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3]$, H_2 (1 atm), Benzol, 71% (d.r. 3:1) über drei Stufen; g) *N*-Sulfinylbenzolsulfonamid, Benzol, 60°C , dann Raney-Nickel (W2), H_2 (5 atm), Benzol, 57%; h) Raney-Nickel (W2), EtOH, 78°C ; i) Natrium-naphthalid, DME, -78°C , 79% über zwei Stufen. ADDP: Azo-dicarboxylatdipiperid, Bs: Benzolsulfonyl, DME: 1,2-Dimethoxyethan, PMB: para-Methoxybenzyl.

zum Piperidin gelang effizient mit einem modifizierten Mitsunobu-Verfahren^[19] in einer Ausbeute von 57% über sechs Stufen.

Die vollständig regioselektiv verlaufende Hydrierung der C25-C27-Doppelbindung in Gegenwart des Wilkinson-Katalysators ergab das geschützte Cyclopaminderivat **20** mit einer exocyclischen Doppelbindung zwischen C13 und C18. Die Isomerisierung dieser Doppelbindung erwies sich als äußerst schwierig. Schließlich konnte dieses Isomer in das geschützte Cyclopamin **21** umgewandelt werden, indem zunächst eine Alder-En-Reaktion mit dem selten verwendeten *N*-Sulfinylbenzolsulfonamid^[20] durchgeführt und direkt im Anschluss mit einem Überschuss an Raney-Nickel entschwefelt wurde.^[21] Unter den angewandten Reaktionsbedingungen reagierte weder die C5-C6-Doppelbindung noch wurde der Benzylether angegriffen. Diese zweistufige Sequenz verlief mit einer guten Ausbeute von 57%. Abschließendes Spalten des Benzylethers (Raney-Nickel in siedendem Ethanol) und danach des Benzolsulfonamids mit einem Überschuss an Natriumnaphthalid bei -78°C^[22] lieferten den Naturstoff, dessen spektroskopische und physikalische Eigenschaften allesamt identisch zu publizierten Daten^[23] waren.

Wir haben eine effiziente Strategie (20 Stufen, 1% Gesamtausbeute) für die Synthese von Cyclopamin entwickelt. Die Besonderheiten der Syntheseroute sind die regio- und stereoselektive Hydroxylierung durch C-H-Aktivierung, eine biomimetische Ringkontraktion/-expansion, eine Tandemsequenz aus Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion und intramolekularer Michael-Addition sowie eine Alder-En-Reaktion. Darüber hinaus haben wir Methoden aufgezeigt, um Diastereomere und Regiosomere mit exocyclischer Doppelbindung zu erhalten. Dies stimmt uns zuversichtlich, dass unsere Strategie das Wissen um die Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Cyclopamin erweitern und Analoga mit einer abgestimmten Bioaktivität verfügbar machen wird. Über diesbezügliche Untersuchungen und biologische Studien soll in Kürze berichtet werden.

Eingegangen am 12. Mai 2009

Online veröffentlicht am 9. Juli 2009

Stichwörter: Alkaloide · Biomimetische Synthesen · Cyclopamin · Tumortherapeutika · Naturstoffe

- [1] L. Lum, P. A. Beachy, *Science* **2004**, *304*, 1755–1759.
- [2] J. Taipale, P. A. Beachy, *Nature* **2001**, *411*, 349–354.
- [3] J. Taipale, K. C. Chen, M. K. Cooper, B. Wang, R. K. Mann, L. Milenkovic, M. P. Scott, P. A. Beachy, *Nature* **2000**, *406*, 1005–1009.
- [4] W. S. Johnsons, J. M. Cox, D. W. Graham, H. W. Whitlock, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 4524–4526.
- [5] T. Masamune, M. Takasugi, A. Murai, K. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 4521–4523.
- [6] T. Masamune, Y. Mori, M. Takasugi, A. Murai, S. Ohuchi, N. Sato, N. Katsui, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1965**, *38*, 1374–1378.
- [7] L. F. James, K. E. Panter, W. Gaffield, R. J. Molyneux, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3211–3230.
- [8] J. E. Ming, M. Muenke, *Clin. Invest.* **1998**, *53*, 155–163.
- [9] R. Edison, M. Muenke, *Congenital Anomalies* **2003**, *43*, 1–21.
- [10] R. Hirschmann, C. S. Snoddy, Jr., N. L. Wendler, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 2693–2694.
- [11] B. Schönecker, T. Zheldakova, Y. Liu, M. Kötteritzsch, W. Günther, H. Görts, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3361–3365; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3240–3244.
- [12] K. W. C. Poon, G. B. Dudley, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3923–3927.
- [13] D. Seebach, K.-H. Geiß, A. K. Beck, B. Graf, H. Daum, *Chem. Ber.* **1972**, *105*, 3280–3300.
- [14] T. Imamoto, T. Kusumoto, Y. Tawarayama, Y. Sugiura, M. Takeishi, Y. Hatanaka, M. Yokoyama, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 3904–3912.
- [15] D. A. Evans, T. C. Britton, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6881–6883.
- [16] I. Paterson, K.-S. Yeung, J. B. Smaill, *Synlett* **1993**, 774–776.
- [17] C. R. Johnson, B. D. Tait, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 281–283.
- [18] N. Knouzi, M. Vaultier, M. R. Carrié, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1985**, *26*, 815–819.
- [19] W. J. Moran, K. M. Goodenough, P. Raubo, J. P. A. Harrity, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3427–3429.
- [20] G. Deleris, J. Kowalski, J. Dunogues, R. Calas, *Tetrahedron Lett.* **1977**, *18*, 4211–4214.
- [21] L. A. Paquette, H.-S. Lin, B. P. Gunn, M. J. Coghlan, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5818–5826.
- [22] H. Uchida, A. Nishida, M. Nakagawa, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 113–116.
- [23] J. E. Oatis, Jr., P. Brunsfeld, J. W. Rushing, P. D. Moeller, D. W. Bearden, T. M. Gallien, G. Cooper IV, *Chem. Cent. J.* **2008**, *2*, 12.