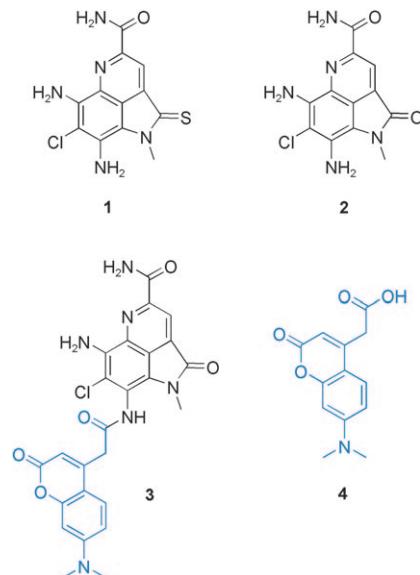


Wertvolles aus der Tiefe des Meeres: die Entdeckung und Totalsynthese der Ammosamide

Didier Zurwerra, Christoph W. Wullschleger und Karl-Heinz Altmann*

Antiproliferation · Fluoreszenzsonden · Myosin · Naturstoffe · Totalsynthesen

Meeresorganismen sind eine reichhaltige Quelle für biologisch aktive Sekundärmetaboliten, von denen viele eine wichtige Rolle bei der Aufklärung von Zellprozessen wie auch als Leitstrukturen zur Identifizierung neuer Wirkstoffe gespielt haben und auch in Zukunft spielen werden.^[1,2] Solche marinen Naturstoffe haben oftmals sehr komplexe, einzellige Strukturen, jedoch können auch weniger komplexe (manchmal sogar achirale) Strukturen hohe biologische Aktivitäten aufweisen. Ein charakteristisches Beispiel dieser zweiten Klasse von marinen Naturstoffen sind die Ammosamide A (**1**) und B (**2**), deren Totalsynthese kürzlich von Hughes und Fenical beschrieben wurde und die Gegenstand dieses Highlights sind.^[3] Der Arbeitsgruppe von Fenical gebührt auch das Verdienst der Entdeckung dieser Verbindungen im marinen Streptomyces-Stamm CNR-698, der aus 1600 m unter der Meeresoberfläche gelegenen Tiefseesedimenten isoliert wurde.^[4] Ammosamide gehören zur Naturstoffklasse der Pyrroloiminochinone;^[5] besonders hervorzuheben ist dabei die Tatsache, dass Ammosamid A (**1**) der einzige bekannte Naturstoff ist, der einen Thio- γ -lactam-Ring aufweist.^[4,6] Obwohl die Strukturen von **1** und **2** weit weniger komplex sind, als man dies von marinen Naturstoffen erwarten könnte, ist ihre Totalsynthese doch äußerst anspruchsvoll, zum einen wegen der dichten Funktionalisierung des aromatischen Grundkörpers, zum anderen wegen der geringen Löslichkeit dieser Verbindungen in organischen Lösungsmitteln.^[3] Hughes und Fenical haben sich dieser Herausforderung gestellt, und die Schlüsselschritte ihrer Synthesestrategie werden weiter unten aufgezeigt. Vorher soll jedoch kurz auf die biologische Wirkung von **1** und **2** eingegangen werden, die einen wesentlichen Anreiz für die Entwicklung einer Totalsynthese lieferte. Diese wiederum bildet die grundlegende Voraussetzung für die Untersuchung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) und das Design von verbesserten Analoga.



1 und **2** wurden als wirksame Inhibitoren des Wachstums menschlicher Krebszelllinien mit In-vitro-IC₅₀-Werten zwischen 20 nM und 1 μM beschrieben, wobei konkrete Daten allerdings nur für die Darmkrebszelllinie HCT-116 (IC₅₀ = 320 nM für **1** und **2**) verfügbar sind.^[7] Um das Zielprotein (oder die Zielproteine) zu identifizieren, die der antiproliferativen Wirkung der Ammosamide zugrunde liegen, wurde von La Clair, Fenical und Mitarbeitern das fluoreszierende Ammosamid-B-Derivat **3** hergestellt.^[7] Dessen Dimethylaminocumarin-Fluorophor (blau in der gezeigten Struktur) fungiert zum einen als spektroskopischer Marker und zum anderen als Epitop für die Bindung eines monoklonalen Antikörpers (mAb). Als Ausdruck dieser Dualität werden **3** und ähnliche Konjugate als Immunaffinitätsfluoreszenz-(IAF)-Sonden bezeichnet.^[8] La Clair und Mitarbeiter hatten bereits früher gezeigt, dass solche IAF-Sonden zur Isolierung von biologisch aktiven Naturstoffen aus komplexen Extrakten verwendet werden können und darüber hinaus die Möglichkeit bieten, das (oder die) molekulare(n) Zielprotein(e) dieser Naturstoffe durch Coimmunpräzipitation (co-IP) zu identifizieren.^[8] Obwohl die IAF-Sonde **3** eine 50-mal kleinere antiproliferative Aktivität als **2** aufweist (**3**: IC₅₀ (HCT-116) = 17 μM), erachteten die Autoren dieses Konjugat als einen relevanten „Köder“ zum „Heraufischen“ des Zielproteins (oder der Zielproteine) der Ammosamide, beson-

[*] Dipl.-Chem. D. Zurwerra,^[+] MSc Chem. C. W. Wullschleger,^[+] Prof. Dr. K.-H. Altmann
ETH Zürich, Departement Chemie und Angewandte Biowissenschaften, Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, HCI H405
Wolfgang-Pauli-Strasse 10, 8093 Zürich (Schweiz)
Fax: (+ 41) 44-633-1369
E-Mail: karl-heinz.altmann@pharma.ethz.ch
Homepage: http://www.pharma.ethz.ch/institute_groups/pharmaceutical_biology

[+] Diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

ders im Lichte der ausgeprägten Hemmwirkung von **3** auf den Zellzyklus von HCT-116-Zellen.^[7] Bemerkenswerterweise führte die Behandlung von HeLa-, PC-3- oder HCT-116-Zellen mit der IAF-Sonde innerhalb von Minuten nach Zugebung von 1 mL einer 50 μM Lösung zu einer vollständigen Aufnahme der Fluoreszenz. Dabei war **3** anfänglich im Zytosplasma lokalisiert, während es nach 12 h ausschließlich in Lysosomen zu finden war.

Die Inkubation von HCT-116-Zelllysaten mit **3**, anschließende co-IP mit Affigel Hz, das den anti-Farbstoff mAb XRI-TF35 enthält, erschöpfendes Waschen des Harzes und schließlich Elution von gebundenem Protein durch Behandlung des Harzes mit (7-Dimethylaminocumaryl)essig-

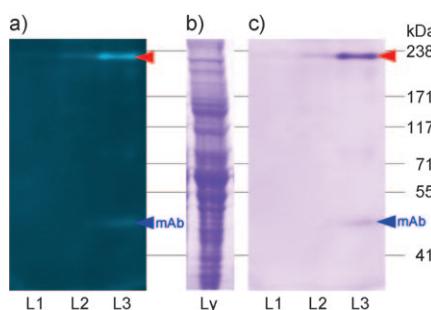


Abbildung 1. Coimmunpräzipitation mit der IAF-Sonde **3**. a) Das SDS-PAGE-Gel zeigt fluoreszierende Banden, die nach der co-IP eines HCT-116-Lysats mit **3** und dem Affigel-Hz-Harz, das den XRI-TF35-mAb enthält, erhalten werden. Nach einer Inkubationszeit von 12 h und mehrmaligem Waschen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) bei 4°C wurde das gebundene Protein bei 23 °C vom XRI-TF35-Affigel-Hz-Harz eluiert. L1: Elutionspuffer 0.1 M Tris-Cl (pH 6.8); L2: 5 μM **4** in 0.1 M Tris-Cl (pH 6.8); L3: 50 μM **4** in 0.1 M Tris-Cl (pH 6.8); Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan. b) HCT-116-Lysat, angefärbt mit GelCode blue. c) GelCode-blue-Färbung des Gels in (a). Wiedergabe aus Lit. [7].

säure (**4**) und LC/MS/MS-Analyse des eluierten Materials führten zu einem Protein, das Ähnlichkeiten mit den Proteinen der Myosinfamilie aufwies (Abbildung 1). Die Schlussfolgerung, dass es sich beim zellulären Zielprotein von **3** um Myosin handelt, konnte dann durch co-IP mit Myosin aus dem Skelettmuskel von Kaninchen, durch die Untersuchung der Auswirkungen von **3** auf die Reorganisation des Actin- und Microtubuli-Skeletts in HCT-116-Zellen sowie durch histologisches Anfärbeln verschiedenster Gewebe erhärtet werden. Besonders wichtig war hierbei die Beobachtung, dass Myosin aus dem Skelettmuskel von Kaninchen auch durch **1** und **2** selbst angefärbt werden konnte, was darauf schließen lässt, dass die für **3** beobachteten zellulären Effekte tatsächlich diejenigen der unmodifizierten Ammosamide widerspiegeln. Das Anfärbeln von Myosin mit **3** schien irreversibel zu sein, was mit der Beobachtung einherging, dass **3** auch durch einen Überschuss an Ammosamid nicht aus den Zellen verdrängt werden konnte; dagegen wird die Zellaufnahme von **3** durch die Vorbehandlung der Zellen mit unmodifiziertem **1** oder **2** vollständig unterdrückt.

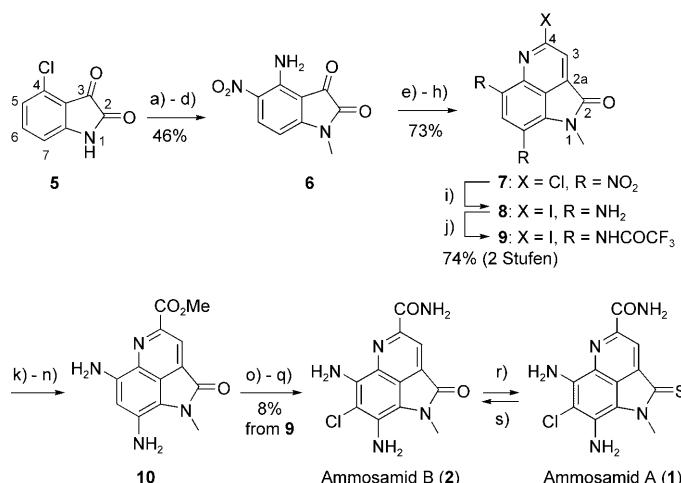
Myosine bilden eine wichtige Gruppe von Motorproteinen, die an der Muskelkontraktion und verschiedenen Zell-

prozessen, wie der Zytokinese oder der Zellmigration, beteiligt sind. Bisher wurden nur wenige niedermolekulare Verbindungen beschrieben, die Myosin selektiv inhibieren können. Eine davon ist das (*S*-)(–)-Blebbistatin (ein durch Hochdurchsatz-Screening identifiziertes, synthetisches Molekül),^[9] das wesentlich zur Aufklärung der zellulären Wirkungsweise von Myosinproteinen beigetragen hat.^[9,10] Für den Komplex zwischen Myosin II aus *Dictyostelium discoideum* und Blebbistatin gibt es eine Röntgenkristallstruktur mit einer Auflösung von 2.0 Å;^[10] in Molecular-Modeling-Studien wurde die IAF-Sonde **3** in die Blebbistatin-Bindungstasche dieser Struktur eingepasst,^[7] wodurch sich die Wechselwirkung der Ammosamide mit Myosin auf struktureller Basis erklären ließ.

Was die Bedeutung der Ammosamide als mögliche Leitstrukturen für die Entwicklung von (Tumor-)Therapeutika betrifft, so wurde die Myosin-Inhibition, soweit uns bekannt, bisher nicht ernsthaft als Therapiekonzept verfolgt, und ein solcher Ansatz könnte auch mit ernsthaften Toxizitätsproblemen verbunden sein. Unabhängig davon könnten sich aber die Ammosamide als wertvolle Hilfsmittel für die Untersuchung (bekannter wie auch unbekannter) Zellvorgänge erweisen, an denen Myosin beteiligt ist, auch wenn anhand der zurzeit vorliegenden Daten eine relevante Wirkung der Ammosamide auf weitere Zellproteine nicht ausgeschlossen werden kann. Trotz allem bestehen nämlich zwischen der IAF-Sonde **3** und den natürlichen Ammosamiden signifikante Unterschiede in der zellulären Wirksamkeit. Weitere Studien werden nötig sein, um die Spezifität der Wirkung der Ammosamide zu klären (und vielleicht zu verbessern); unter anderem müssen solche Studien auch definieren, welche Strukturmerkmale für die Myosin-gerichtete wie auch für die allgemeine antiproliferative Aktivität der Ammosamide besonders wichtig sind.

Im Allgemeinen besteht der erste Schritt für das Design und die Synthese von Naturstoffanaloga für SAR-Studien in der Entwicklung einer Totalsynthese des Naturstoffs selbst. Dementsprechend ist die von Hughes und Fenical entwickelte Totalsynthese der Ammosamide^[3] nicht nur eine wichtige Syntheseleistung, sondern bildet auch einen wesentlichen Schritt auf dem Weg zur Aufklärung der mit den Ammosamiden verbundenen biologischen Effekte und zu einer Verbesserung ihrer Eigenschaften.

Die Synthese (Schema 1) geht von 4-Chlorisatin (**5**) aus, das in vier Stufen und 46 % Gesamtausbeute in das Zwischenprodukt **6** überführt wurde. Hierbei wurde zunächst an C5 mononitriert, anschließend der Chlorsubstituent an C4 mit *tert*-Butylamin verdrängt, das Stickstoffatom der Amidgruppe methyliert und schließlich die *N*-*tert*-Butylgruppe unter Säurekatalyse abgespalten. Die Umsetzung von **6** zum Pyrrolochinolin-Grundgerüst der Ammosamide umfasste eine C₂-Verlängerung an C3 durch Wittig-Olefinition, auf die eine säurekatalysierte Esterspaltung unter gleichzeitigem Ringschluss folgte. Die anschließende Nitrierung an C7 (Nummerierung wie im Isatin) und Chlorierung ergaben **7** in 73 % Ausbeute (über vier Stufen). Die Reduktion beider Nitrogruppen mit Iodwasserstoffsäure bei gleichzeitigem Cl → I-Austausch führte zum Zwischenprodukt **8**. Da Diaminoverbindungen wie **8** in den meisten organischen Lösungsmitteln



Schema 1. a) HNO₃, H₂SO₄, 58%; b) tBuNH₂, 87%; c) NaH, MeI; d) TFA, 92% (2 Stufen); e) tBuO₂CC(H)=PPh₃, 86%; f) TFA; g) HNO₃, H₂SO₄; h) POCl₃, 85% (3 Stufen); i) wässr. HI; j) TFAA, 74% (2 Stufen); k) CuCN; l) H₂SO₄; m) KOH, MeOH; n) H₂SO₄, MeOH; o) SOCl₂, UV; p) TFAA, 8% (bezogen auf 9); q) Mg₃N₂, quant.; r) Lawessons Reagens; s) Einwirkung von Luftsauerstoff oder H₂O₂. TFA = Trifluoressigsäure, TFAA = Trifluoressigsäureanhydrid.

eine sehr geringe Löslichkeit aufwiesen (in Analogie zu den natürlichen Ammosamiden), wurden die freien Aniline in die entsprechenden Trifluoracetamide überführt, wodurch die Ausbeute erhöht werden konnte und die chromatographische Reinigung auf den nachfolgenden Stufen erleichtert wurde (z.B. **10** → **2**). Die Vorstufe **10** wurde (ausgehend von **9**) in vier Stufen erhalten: Umsetzung von **9** mit CuCN zum entsprechenden Nitril, Spaltung der Trifluoracetamid-Gruppierungen unter sauren Bedingungen, Umsetzung des Nitrils zum Imidat (KOH/MeOH) und schließlich Hydrolyse des Imidats zum Ester. Die Chlorierung von **10** unter UV-Bestrahlung (254 nm) in Thionylchlorid als Lösungsmittel und anschließende Trifluoracetylierung, Amidierung und Entschützung

ergaben Ammosamid B (**2**), das bezogen auf **9** in einer Gesamtausbeute von 8% erhalten wurde. Ammosamid B (**2**) konnte schließlich durch Behandlung mit Lawessons Reagens in das Ammosamid A (**1**) überführt werden, wenn auch nur in geringer Ausbeute (für diese letzte Umsetzung wird in Lit. [3] keine Ausbeute angegeben).

Die Gruppen von Fenical und La Clair konnten durch Anwendung eines hochinnovativen Ansatzes Myosin als Zielprotein der marinen Naturstoffe Ammosamid A und B identifizieren. Die Totalsynthese der Ammosamide von Hughes und Fenical ist ein weiterer, essenzieller Schritt hin zur Aufklärung der chemischen Biologie dieser faszinierenden Naturstoffe.

Eingegangen am 7. Mai 2010
Online veröffentlicht am 2. August 2010

- [1] *Anticancer Agents from Natural Products* (Hrsg.: G. M. Cragg, D. G. I. Kingston, D. J. Newman), CRC, Boca Raton, **2005**.
- [2] J. W. Blunt, B. R. Copp, M. H. G. Munro, P. T. Northcote, M. R. Prinsep, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, 27, 165.
- [3] C. C. Hughes, W. Fenical, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 2528.
- [4] C. C. Hughes, J. B. MacMillan, S. P. Gaudêncio, P. R. Jensen, W. Fenical, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 739; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 725.
- [5] E. M. Antunes, B. R. Copp, M. T. Davies-Coleman, T. Samaai, *Nat. Prod. Rep.* **2005**, 22, 62.
- [6] C. Christoffersen, U. Anthoni, *Sulfur Rep.* **1986**, 4, 365. Eine SciFinder-Suche nach Thio-γ-lactamen in Naturstoffen ergab keine Treffer.
- [7] C. C. Hughes, J. B. MacMillan, S. P. Gaudêncio, W. Fenical, J. J. La Clair, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 742; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 728.
- [8] A. D. Rodríguez, M. J. Lear, J. J. La Clair, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 130, 7256.
- [9] A. F. Straight, A. Cheung, J. Limouze, I. Chen, N. J. Westwood, J. R. Sellers, T. J. Mitchison, *Science* **2003**, 299, 1743.
- [10] C. Lucas-Lopez, J. S. Allingham, T. Lebl, C. P. Lawson, R. Brenk, J. R. Sellers, I. Rayment, N. J. Westwood, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 2076.