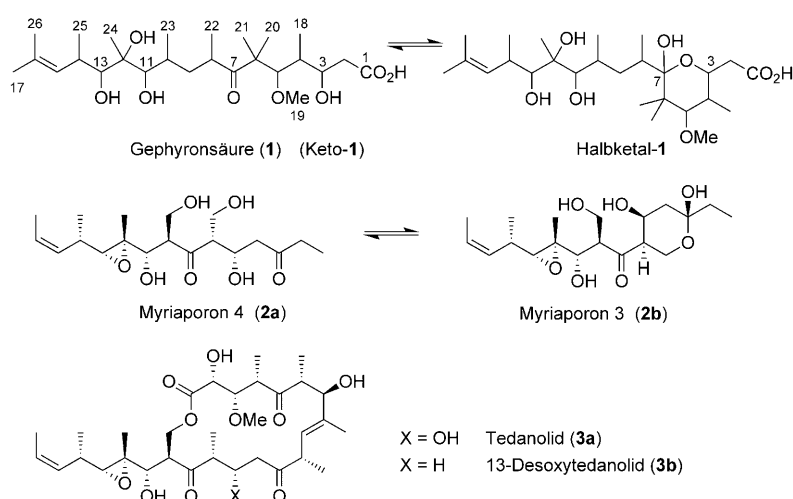


Gephyronsäure, ein fehlendes Bindeglied zwischen Polyketid-Inhibitoren der eukaryotischen Proteinsynthese (Teil I): Strukturrevision und stereochemische Zuordnung**

Lionel Nicolas, Timo Anderl, Florenz Sasse,* Heinrich Steinmetz, Rolf Jansen, Gerhard Höfle, Sabine Laschat* und Richard E. Taylor*

Kulturüberstände von *Archangium gephyra*, Stamm Ar 3895, zeigten eine antibiotische Aktivität, die zur Isolierung eines neuen Polyketids, der Gephyronsäure (**1**), führte. Die Strukturen der getrennt erhältlichen Keto- und Halbketalisomere (Schema 1) wurden ohne spektroskopische Daten in einer Publikation über die Isolierung und biologische Aktivität der Verbindung vorgestellt.^[1] Erste biologische Untersuchungen ergaben eine selektive Hemmung der eukaryotischen Proteinsynthese zusammen mit einer nanomolaren cytostatischen Wirkung gegen eine Reihe von Säugetier-Zelllinien. So hat Keto-**1** einen IC_{50} -Wert von 10 ng mL^{-1} gegen HeLa- (menschlicher Gebärmutterhalskrebs) und K-562-Zelllinien (menschliche myeloische Leukämie). Für Halbketal-**1** wurde eine ähnliche Aktivität gemessen, was für eine Gleichgewichtseinstellung unter den Assaybedingungen spricht.^[1]



Schema 1. Ursprünglich vorgeschlagene Struktur von Gephyronsäure sowie die Strukturen von Myriaporon-Isomeren und Tedanoliden.

[*] L. Nicolas, Prof. R. E. Taylor
Department of Chemistry & Biochemistry
University of Notre Dame, 251 Nieuwland Science Hall
Notre Dame, IN 46556-5670 (USA)
Fax: (+1) 574-631-6652
E-Mail: taylor.61@nd.edu

T. Anderl, Prof. S. Laschat
Institut für Organische Chemie, Universität Stuttgart
Pfaffenwaldring 55, 70569 Stuttgart (Deutschland)
Fax: (+49) 711-685-64285
E-Mail: sabine.laschat@oc.uni-stuttgart.de
Dr. F. Sasse, H. Steinmetz, Dr. R. Jansen, Prof. G. Höfle
Abteilung Chemische Biologie und Arbeitsgruppe Mikrobielle
Wirkstoffe, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig (Deutschland)
Fax: (+49) 531-6181-3499
E-Mail: florenz.sasse@helmholtz-hzi.de

[**] Diese Arbeit wurde von der National Science Foundation, der Deutschen Forschungsgemeinschaft (CHE-0924351 für R.E.T. und F.S.), dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (Stipendium für T.A.), dem Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst des Landes Baden-Württemberg (Landesgraduiertenstipendium für T.A.) und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken Prof. M. Kalesse für eine Probe von Tedanolid und Dr. J. Zajicek für seine Unterstützung bei den NMR-Messungen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201005530> zu finden.

In der Taylor-Gruppe wurde eine asymmetrische Totalsynthese der Myriaporone 3 und 4 (**2b** bzw. **2a**) erarbeitet, die deren absolute und relative Konfiguration bestätigte (Schema 1).^[2] Darüber hinaus bewiesen eingehende biologische Untersuchungen der synthetisierten Verbindungen, dass die Myriaporone **2** potente eukaryotenselektive Inhibitoren und Zytostatika sind.^[3,4]

Die verblüffenden biologischen und strukturellen Gemeinsamkeiten von Gephyronsäure und den Myriaporonen veranlassten uns, die relativen und absoluten Konfigurationen ersterer zu bestimmen, die für eine spätere Totalsynthese und weitergehende biologische Studien unerlässlich sind. Mit den hier vorgestellten vollständigen spektroskopischen Daten aus ^1H - und ^{13}C -NMR-, COSY-, ROESY-, J-HMBC-, HSQC-HECADE- und GBIRD-HSQMBC-Messungen^[5] in Verbindung mit Fragmentsynthesen gelang nicht nur eine strukturelle Neuordnung, sondern auch die eindeutige Bestimmung der Konfiguration von Gephyronsäure, die durch eine Totalsynthese erhärtet wurde.^[6]

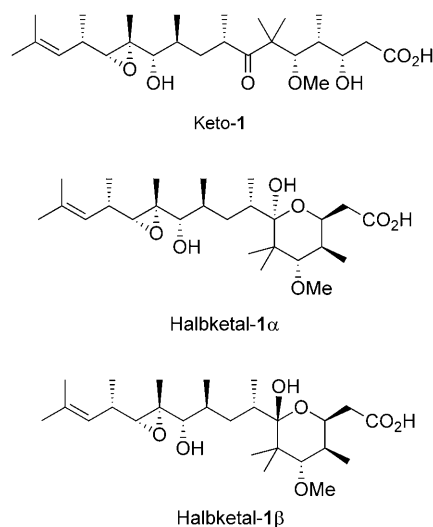
Neben dem ursprünglich von Sasse et al. berichteten offenen Ketoalkohol und der geschlossenen Halbketalform wurde kürzlich eine dritte Komponente isoliert und als Halbketal-Anomer identifiziert.

Aufgrund unserer früheren Erfahrung mit den Myriaporonen **2** und Tedanoliden **3** stellten wir schnell Widersprüche zwischen den spektroskopischen Daten und der vorgeschla-

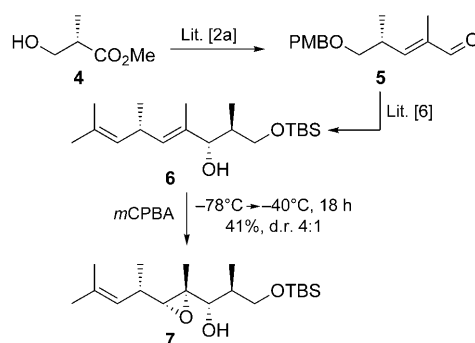
genen Struktur von Gephyronsäure fest. Zusätzlich erforderte ein neues hochaufgelöstes Massenspektrum (HREIMS) von Keto-**1** eine Strukturrevision, da ein $[M+Na]^+$ -Ion bei m/z 493.3148 sowie weitere Peaks für $[2M+Na]^+$ und $[3M+Na]^+$ beobachtet wurden, die zusammen eher auf die Summenformel $C_{26}H_{46}O_7$ hinwiesen als auf die ursprüngliche Formel $C_{26}H_{48}O_8$. Eine Verbindung mit letzterer Summenformel wurde als ammoniumhaltiger Cluster isoliert.

Die NMR-Verschiebungen der Schlüsselprotonen in den einander ähnlichen Kettensegmenten von Gephyronsäure, den Tedanoliden **3**^[7] und den Myriaporonen **2**^[8] sind in Tabelle S2 in den Hintergrundinformationen zusammengefasst.^[9] Die Verschiebung des Protons H-13 (2.64 ppm; Tabelle S2) ist besonders aufschlussreich, denn sie liegt im gleichen Bereich wie die der Naturstoffe Tedanolid (**3a**), 13-Desoxytedanolid (**3b**), Myriaporon 3 und Myriaporon 4 (**2**), die an dieser Stelle eine Epoxideinheit enthalten. Die nahezu identischen Kopplungskonstanten zwischen H-13 und H-14 sprechen für die gleiche stereochemische Anordnung.^[10] Die ^{13}C -NMR-Signale der vermuteten Alkohol-Kohlenstoffatome C12 und C13 von **1** sind auffällig hochfeldverschoben ($\delta_C = 64.4$ – 65.2 ppm bzw. $\delta_C = 68.4$ ppm) und entsprechen nahezu den für die Epoxideinheit in **2** gefundenen Werten ($\delta_C = 64.3$ und 67.9 ppm). Folglich gehören die Oxymethin-Positionen C12 und C13 von Gephyronsäure zu einem ähnlich trisubstituierten Epoxid.

Um die auf NMR-Daten basierende neue Konfiguration an C10–C14 (Schema 2)^[9] zu bestätigen, haben wir das C9–C17-Fragment **7** synthetisiert (Schema 3). (*S*)-3-Hydroxy-2-methylpropionsäuremethylester (**4**) wurde wie früher beschrieben in den Aldehyd **5** überführt.^[2a] Dieser wurde in einer Reaktionssequenz aus *anti*-Aldolreaktion nach Evans,^[6,11] Entschützung^[12] und Wittig-Olefinierung zum Allylalkohol **6** umgesetzt. Epoxidierung mit *m*CPBA lieferte den Baustein **7** in Übereinstimmung mit dem Henbest-Effekt, der von den Gruppen von Loh^[13] und Smith^[14a,b] für Tedanolid



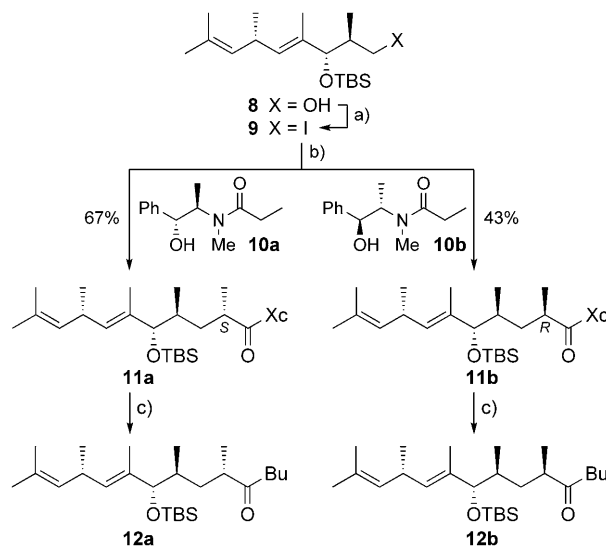
Schema 2. Neuer Vorschlag für die Konfigurationen der Gephyronsäure-Keto- und -Halbketalisomere.



Schema 3. Synthese des C9–C17-Fragments **7**.

(**3**) und von uns für die Myriaporone **2**^[2] beschrieben worden ist.

Die relative Konfiguration von C8 wurde mittels NMR-Spektroskopie bestimmt (siehe die Hintergrundinformationen) und durch die Synthese der Fragmente **12a** und **12b** über eine auxiliarvermittelte Alkylierung^[15] untermauert (Schema 4). Zuerst wurde der Allylalkohol **8**^[6] in das Iodderivat **9** überführt. Mit der von Myers et al. entwickelten eleganten Methode^[15] ließen sich die enantiomeren Pseudoephedrinamide **10a** und **10b** diastereoselektiv alkylieren. Die Reaktion des Iodids **9** mit dem (*R,R*)-Amid **10a** führte zur 1,3-*anti*-Desoxypropionat-Einheit **11a** in 67% Ausbeute, während das (*S,S*)-Auxiliar **10b** das 1,3-*syn*-Alkylierungsprodukt **11b** in 43% Ausbeute lieferte. Nach Abspaltung des chiralen Auxiliars mit *n*BuLi wurden die mit Gephyronsäure (**1**) strukturell verwandten Ketone **12a,b** erhalten.



Schema 4. Bestätigung der C8-Konfiguration durch Fragmentsynthese ausgehend vom Alkohol **8**.^[6] Reagentien und Bedingungen: a) **8** (1.0 Äquiv), Ph_3P (1.5 Äquiv), Imidazol (3.0 Äquiv), I_2 (1.5 Äquiv), MeCN/ Et_2O 1:3, 0°C, 2.5 h, 89%; b) 1. Lithiumdiisopropylamid (LDA, 3.2 Äquiv), LiCl (6.0 Äquiv), **10** (1.5 Äquiv), $-78^\circ C$, 1 h, 2. **9** (1.0 Äquiv), 0°C, 1 h, 45°C, 48 h; c) **11** (1.0 Äquiv), *n*BuLi (2.1 Äquiv), $-78^\circ C$, 20 min.

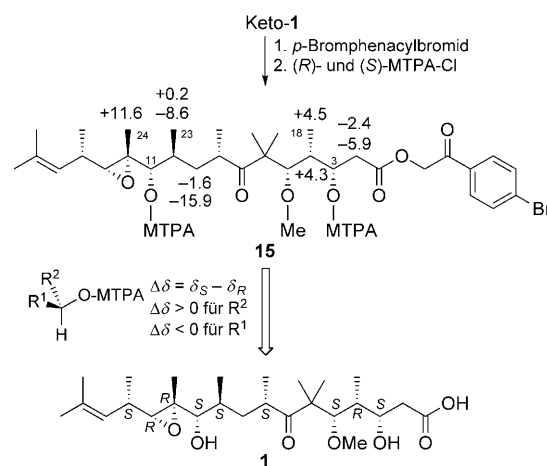
Schmidt und Breit nutzten kürzlich die NMR-Spektroskopie zur direkten Bestimmung der relativen Konfiguration von 1,3-methylverzweigten Ketten anhand chemischer Verschiebungsdifferenzen.^[16] Mit den Verschiebungsdifferenzen ($\Delta\delta$) der geminalen Methylenprotonen in den Diastereoisomeren **12a** und **12b** und einem Vergleich mit den Daten von Keto-**1** ließ sich die *anti*-Konformation des Desoxypropionatsrests C8–C10 belegen. Tatsächlich wurde für das 1,3-*anti*-Keton **12a** eine kleinere Verschiebungsdifferenz als für Keto-**1** gefunden ($\Delta\delta = 0.43$ bzw. 0.56 ppm), für das 1,3-*syn*-Keton **12b** dagegen eine größere ($\Delta\delta = 1.10$ ppm).

Wegen des fehlenden Ketonsignals in den ^{13}C -NMR-Spektren wurden die beiden isolierten Gephyronsäure-Isomere als Halbketal-**1a** und Halbketal-**1b** identifiziert, die sich in der Konfiguration an C7 unterscheiden (Schema 2, Tabelle S1). Mittels ESI-Massenspektrometrie einer Mischung der beiden Halbketale wurde ihre Summenformel zu $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{O}_7$ ermittelt, d. h., es handelt sich bei ihnen um Isomere von Keto-**1**. Die ^1H -NMR-Spektren in CDCl_3 ähneln in vielerlei Hinsicht dem von Keto-**1**, bemerkenswerte Unterschiede zeigen sich jedoch in den Verschiebungen des Methinprotons H-8 und der Protonen, die in den Halbketalen Teil des nur dort vorhandenen Pyranrings sind. Die Signale der Protonen H-3 und H-4 in den Halbketalen sind tieffeld zu $\delta = 4.83$ bzw. 1.87 ppm (Halbketal-**1a**) und $\delta = 4.19$ bzw. 2.30 ppm (Halbketal-**1b**) verschoben. Wie erwartet ist das Signal von H-8 in beiden Halbketalen hochfeldverschoben ($\delta_{\text{H}} = 2.11$ bzw. 2.13 ppm).

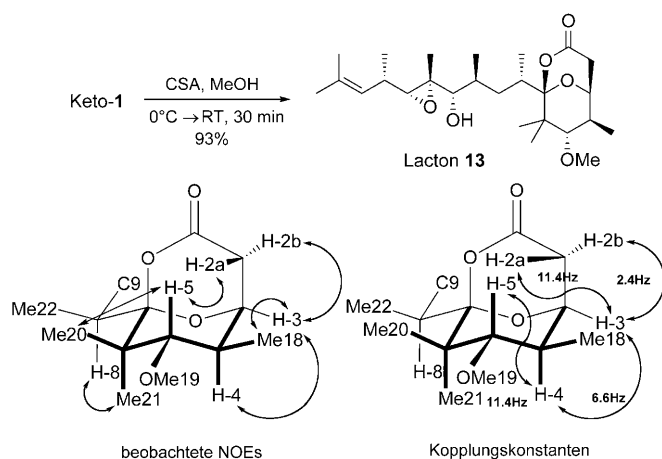
Die konformative Starrheit des Halbketal-Lactons **13**, das unter sauren Bedingungen aus **1** hergestellt wurde (Schema 5), vereinfachte die Bestimmung der relativen Konfiguration im rechten Teil von Gephyronsäure (**1**). So konnte über vicinale Kopplungskonstanten und ROESY-Korrelationen im starren Lactonsystem **13** die relative Konfiguration im C3–C5-Bereich von Keto-**1** und daraus folgend von Halbketal-**1a** und **1b** gesichert werden (Schema 5). Die große Kopplungskonstante von $J = 11.4$ Hz zwischen H-4 und H-5 sowie das Fehlen eines NOE-Kreuzsignals weisen auf deren antiperiplanare Anordnung hin. Die mittelgroße

Kopplungskonstante von $J = 6.6$ Hz zwischen H-3 und H-4 wiederum und der NOE zwischen H-3 und H-4 sowie zwischen H-3 und H-5-18 deuten auf eine axiale Anordnung der C2-Methylengruppe hin, was zusätzlich durch einen NOE zwischen H-2a und H-5 bestätigt wurde.

Die Bestimmung der absoluten Konfiguration der Hydroxysubstituenten tragenden sekundären Kohlenstoffatome über die Mosher-Methode^[17] vervollständigte die Strukturauflösung. Dazu wurde **1** zum *p*-Bromphenacyl-ester **14** umgesetzt, der mit (*S*)- und (*R*)-MTPA-Chlorid zu den entsprechenden 3,11-(*R*)- und 3,11-(*S*)-Mosher-Estern (*R*)- bzw. (*S*)-**15** derivatisiert wurde. Die Verschiebungsdifferenzen ($\Delta\delta$ -Werte) in den ^1H -NMR-Spektren (Tabelle S3) ergaben eindeutig die absoluten Konfigurationen *S* an C3 und C11 und folglich die in Schema 6 gezeigte absolute Konfiguration von Gephyronsäure (**1**). Wie aufgrund biologischer Überlegungen vorhergesagt gleich die Epoxid-Stereodomäne (C11–C14) den entsprechenden Bereichen in Myriaporonen und Tedanoliden.^[10]



Schema 6. Bestimmung der absoluten Konfiguration von Gephyronsäure (**1**). MTPA: α -Methoxy- α -trifluormethyl- α -phenylacetat; die $\Delta\delta$ -Werte sind in 10^{-2} ppm angegeben.



Schema 5. Überführung von Keto-**1** unter sauren Bedingungen in das Lacton **13** und dessen spektroskopische Charakterisierung. CSA: Camphersulfonsäure.

Wir haben somit die Konfigurationen der aus dem Myxobakterium *Archangium gephyra* isolierten Gephyronsäure-Isomere eindeutig bestimmt. Hochfeld-NMR-Analysen der Naturstoffe kombiniert mit dem Studium synthetischer Fragmente sowie die Korrelation mit den Daten der Myriaporone **2** und Tedanolide **3** stützen die faszinierende Strukturrevision. Mit der Mosher-Methode wurde die absolute Konfiguration von Gephyronsäure (**1**) ermittelt, die, wie in Teil II beschrieben ist,^[6] durch eine Totalsynthese bestätigt wurde.

Eingegangen am 3. September 2010
Online veröffentlicht am 23. Dezember 2010

Stichwörter: *Archangium* · Myxobakterien · Naturstoffe · Polyketide · Strukturaufklärung

- [1] F. Sasse, H. Steinmetz, G. Höfle, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 21–25.
- [2] a) K. N. Fleming, R. E. Taylor, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1760–1762; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1728–1730; b) eine alternative Myriaporonsynthese wurde zeitgleich berichtet: M. Pérez, C. del Pozo, F. Reyes, A. Rodríguez, A. Francesch, A. M. Echavarren, C. Cuevas, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1756–1759; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1724–1727.
- [3] J. Hines, M. Roy, H. Cheng, C. M. Agapakis, R. E. Taylor, C. M. Crews, *Mol. Biosyst.* **2006**, *2*, 371–379.
- [4] Ein vergleichender MTT-Cytotoxizitätsassay lieferte folgende IC_{50} -Werte gegen L-929-Zelllinien (Mausfibroblasten): 29 ng mL⁻¹ (Gephyronsäure), 4 ng mL⁻¹ (Myriaporon 3 und 4), 0.05 ng mL⁻¹ (Tedanolid).
- [5] Zur Bestimmung der relativen Konfiguration wurde eine Methode von Murata verwendet: a) N. Matsumori, D. Kaneno, M. Murata, H. Nakamura, K. Tachibana, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 866–876; b) M. Murata, S. Matsuoka, N. Matsumori, G. K. Paul, K. Tachibana, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 870–871.
- [6] Siehe Teil II: T. Anderl, L. Nicolas, J. Münkemer, A. Baro, F. Sasse, H. Steinmetz, G. Höfle, R. E. Taylor, S. Laschat, *Angew. Chem.* **2010**, DOI: 10.1002/ange.201005605; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, DOI: 10.1002/anie.201005605.
- [7] a) F. J. Schmitz, S. P. Gunasekera, G. Yalamanchili, M. B. Hossein, D. van der Helm, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7251–7253; b) D. O'Hagan, *Nat. Prod. Rep.* **1993**, *10*, 593–599.
- [8] K. L. Rinehart, J.-F. Cheng, J.-S. Lee, US Patent 5514708, **1996** und kürzlich J.-F. Cheng, J.-S. Lee, R. Sakai, E. A. Jares-Erijman, M. V. Silva, K. L. Rinehart, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 332–336.
- [9] Auf die strukturellen Gemeinsamkeiten von Gephyronsäure, Myriaporonen, Tedanoliden und Pederin wurde erstmals in einer kürzlich erschienenen Übersicht hingewiesen: R. E. Taylor, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 854–861. Die Konfiguration an C3–C5 und C8 blieb jedoch unklar.
- [10] Dies kann der diastereomeren Untereinheit in Tedanolid C gegenübergestellt werden, die eine deutlich kleinere Kopplungskonstante hat ($J_{bc} = 6.9$ Hz). Für Details siehe C. Chevallier, T. S. Bugni, X. Feng, M. K. Harper, A. M. Orendt, C. M. Ireland, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2510–2513.
- [11] D. A. Evans, J. S. Tedrow, J. T. Shaw, C. W. Downey, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 392–393.
- [12] R. Lira, W. R. Roush, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 533–536.
- [13] T. P. Loh, L. C. Feng, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3223–3226.
- [14] a) A. B. Smith, C. M. Adams, S. A. L. Barbosa, A. P. Degnan, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 350–351; b) A. B. Smith III, S. A. Lodise, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1249–1252; c) J. Hassfeld, M. Kalesse, *Synlett* **2002**, 2007–2010; d) G. Ehrlich, J. Hassfeld, U. Eggert, M. Kalesse, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14038–14039; e) Übersicht über Tedanolid-Synthesen: M. Roy, M. Kalesse, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 862–870.
- [15] a) A. G. Myers, H. Y. Bryant, H. Chen, L. McKinsty, D. J. Kopecky, J. L. Gleason, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6496–6511; b) A. G. Myers, H. Y. Bryant, H. Chen, J. L. Gleason, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9361–9362.
- [16] Y. Schmidt, B. Breit, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2218–2221.
- [17] J. A. Dale, H. S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512–519.