

Omnia praeclara rara. Die Ingenol-Forschung kommt in Fahrt**

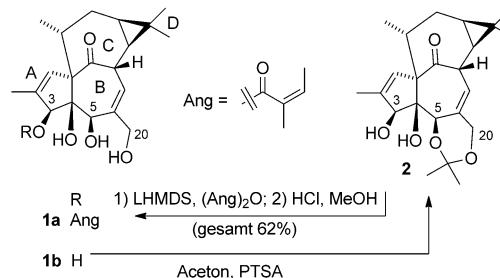
Giovanni Appendino*

Ingenol · Naturstoffe · Terpenoide · Totalsynthese · Wirkstoff-Forschung

Ingenolmebutat (**1a**, Ingenol-3-angelat, Picato), ein pflanzliches Diterpenoid, das zur Behandlung von Lichtkeratose verwendet wird, ist ein ungewöhnlicher Wirkstoff. Zum Beispiel sind viele Ingenolester potente Tumorpromotoren bei Nagetieren, was sie als Wirkstoffkandidaten für die moderne Chemoprävention unwahrscheinlich werden lässt.^[1] Die Entdeckung von Ingenolmebutat war das Ergebnis einer im pharmakologischen Sinne verdrehten Logik, die im Zeitalter des rationalen Wirkstoffdesigns archaisch anmuten mag: Das Interesse an Ingenolmebutat geht auf den volkstümlichen Gebrauch von Wolfsmilch zur Entfernung von Warzen sowie vereinzelte Berichte über die Selbstbehandlung von Hautkrebs mit dem Saft der Wolfsmilch zurück und wurde nicht etwa durch die Variation einer Zielstruktur angespornt.^[2] Die pharmazeutische Entwicklung von Ingenolmebutat ähnelt der Kopfgeburt der Athene: ein von Anfang an vollständig optimierter Wirkstoff. Dass man bei einem derartigen Low-Tech-Ansatz ein solches High-Tech-Ergebnis erhält, mutet in Anbetracht des hohen Entwicklungsstandes der heutigen Arzneimittelforschung geradezu provokant an.

Ingenolmebutat ist in der Gartenwolfsmilch (*Euphorbia peplus* L.) enthalten, einem ärgerlichen Unkraut, dessen häufiges Vorkommen jedem Gartenfreund bekannt ist. Aber warum ist Ingenolmebutat dann eine Seltenheit? Das Problem besteht darin, dass die Isolierung aus natürlichen Quellen voller Schwierigkeiten ist: Die Substanz kommt nur in sehr geringer Konzentration (ca. 1 ppm) in der Pflanze vor,^[3] die Toxizität der Pflanze erfordert hohe Sicherheitsmaßnahmen im Labor, und vom Massenanbau eines solchen Krauts geht eine ökologische Bedrohung aus, da es sich auf Feldern mit oder ohne Nutzpflanzen ausbreiten, grasendes Vieh töten oder auch nur die Rasenqualität vermindern kann.^[4] Eine Semisynthese von **1a** wurde ausgehend von der Stammverbindung, dem Polyol Ingenol (**1b**), entwickelt,^[5] das in Mengen von mehr als 100 mg kg⁻¹ aus den Samen eines anderen Wolfsmilchgewächses, *E. lathyris* L. (Kreuzblättrige Wolfsmilch), gewonnen werden kann.^[6] Kreuzblättrige Wolfsmilch wird in großem Umfang zur Gewinnung von

Lampenöl angebaut, und zur Zeit der Ölkrise in den 1970er Jahren schlug Melvin Calvin vor, daraus Treibstoff zu gewinnen.^[6] Ingenol hat drei acylierbare Hydroxygruppen, doch die chemoselektive Bildung eines 5,20-Acetonids ermöglicht die Veresterung nur an der 3-Hydroxygruppe (Schema 1). Die



Schema 1. Semisynthese von Ingenolmebutat (**1a**) aus Ingenol (**1b**). LHMDS = Lithiumhexamethyldisilazid, PTSA = *para*-Toluolsulfinsäure.

Veresterung von Angelikasäure ist ein altes Problem der organischen Synthesekemie, da sie zur Isomerisierung zum stabileren *E*-Isomer, der Tiglinsäure, neigt.^[5] Durch zweifache Aktivierung von Angelikasäure als Anhydrid und von Ingenolacetid als Lithiumalkoholat konnte dieses Problem aber gelöst werden, und die Semisynthese konnte schließlich zu einer ansehnlichen Gesamtausbeute von über 60% optimiert werden (Schema 1).^[5]

Zweifellos hat die Semisynthese von **1a** das Potential, die Gewinnung des Naturstoffs durch Isolierung zu verdrängen. Nun haben aber Baran und Mitarbeiter die Grundlagen für eine Totalsynthese als weitere Alternative gelegt.^[7] Dass Ingenol ein anspruchsvolles Syntheseziel ist, lässt sich an der Zahl der Stufen und Gesamtausbeuten früherer Synthesen erkennen.^[8] Außer im Fall von Galanthamin hat man für die Produktion von Wirkstoffen auf der Basis komplexer Naturstoffe immer dann die Totalsynthese industriell genutzt, wenn es keinen anderen Zugang gab, etwa bei Eribulinmesylat, einem synthetischen Analogon des marinen Polyethers Halichondrin B.^[9] Um über die bloße Nachahmung der Natur hinauszugehen und sich mit der Isolierung und Semisynthese messen zu können, muss eine Totalsynthese außerordentlich effizient sein. Baran und Mitarbeiter haben sich dieser Herausforderung gestellt und eine Synthese von Ingenol entwickelt, die im Prinzip an die Biogenese angelehnt ist, d.h.,

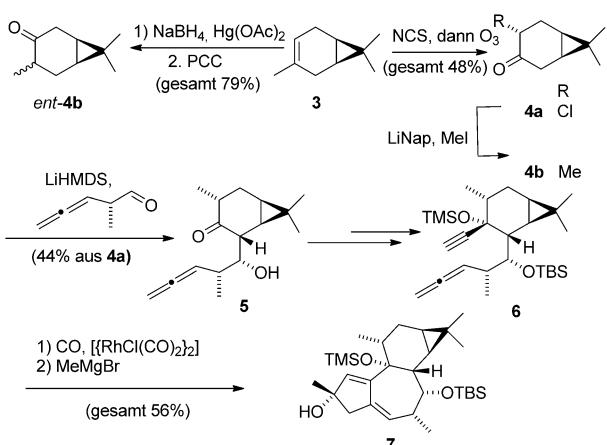
[*] Prof. G. Appendino

Dipartimento di Scienze del Farmaco
Università del Piemonte Orientale
Largo Donegani 2, 28100 Novara (Italien)
E-Mail: appendino@pharm.unipmn.it

[**] Alles Herrliche ist selten (Cicero, *Laelius über die Freundschaft*, 79).

zuerst wird das polycyclische Gerüst aufgebaut (Cyclase-Phase) und dieses im Anschluss oxidativ mit Hydroxygruppen ausgestattet (Oxidase-Phase). Dieses Syntheseprinzip, das bereits auf die Synthese des in der Rinde der Pazifischen Eibe vorkommenden Taxols angewendet wurde,^[10] könnte grund- sätzliche Bedeutung für oxygenierte Terpenoide erlangen, denn Sauerstofffunktionen können sich störend auf Cyclisie- rungsreaktionen auswirken, indem Sauerstoffbrücken an- stelle der C-C-Bindungen gebildet werden, die für den Auf- bau des polycyclischen Gerüsts aus acyclischen Olefinvor- stufen notwendig sind.

Bei der Cyclase-Phase dient das Monoterpen (+)-3-Caren (**3**) als Ausgangsverbindung, aus der die Tiglian-Vorstufe von Ingenol aufgebaut wird (Schema 2). (+)-3-Caren ist eine

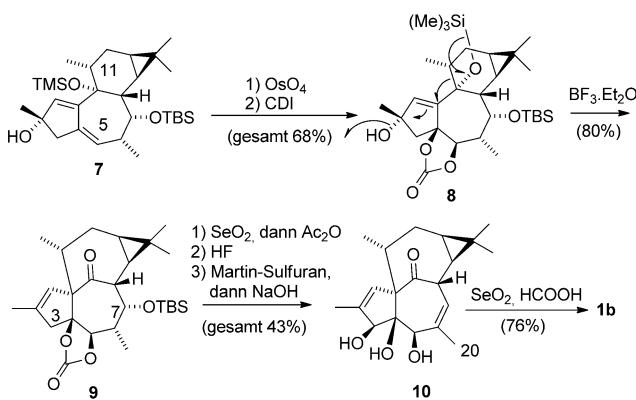


Schema 2. Cyclase-Phase der Synthese. LiNap = Lithiumnaphthalinid, NCS = *N*-Chlorsuccinimid, PCC = Pyridiniumchlorochromat, TBS = *tert*-Butyldimethylsilyl, TMS = Trimethylsilyl.

Grundchemikalie, die in Rohform aus indischem Terpentinöl gewonnen wird und dessen Struktur dem C,D-Ringteil der Phorboide entspricht. Es wurde bereits in zwei früheren Synthesen von Ingenol genutzt, bei denen eine Ringerweite- rung zu einem siebengliedrigen Derivat erfolgte,^[8] sowie für die Synthese heterocyclischer Analoga von Desoxyphorbol.^[11] Wenn schon die Wahl von (+)-3-Caren als Ausgangs- verbindung insofern naheliegend ist, so ist doch die Art und Weise außergewöhnlich, in der es in der Cyclase-Phase weiter umgesetzt wird. Um die Konfiguration von Ingenol zu er- halten, war zunächst das Methylsubstitutionsmuster von **3** neu anzugeben. Hierfür wurde das Keton **4b**, dessen Isomer *ent*-**4b** mit der verkehrten Konfiguration leicht aus natürlichem (+)-3-Caren zugänglich ist,^[11] auf einem Umweg hergestellt, und zwar durch elektrophile Chlorierung von **3** und anschließende Ozonolyse und reduktive Alkylierung. Das Ket- on **4b** erwies sich als schwierig zu reinigen und kam in der endgültigen Synthese nur als Intermediat im abgekürzten Eintopfprozess vor, bei dem das Chlorketon **4a** durch Me- thyl-Chlor-Austausch reduktiv alkyliert und dann in einer Aldolreaktion mit einem Allenylaldehyd zu **5** umgesetzt wurde. Nach Anbringen der Alkinylgruppe und Schützen der Hydroxyfunktionen wurde das Tiglianderivat **7** schließlich

durch Rh^I-katalysierte Umsetzung der Allenyl-Alkinyl-Ver- bindung **6** mit Kohlenmonoxid erhalten. Obwohl diese Alle- nyl-Pauson-Khand-Carbonylierung unter hoher Verdünnung (5 mM) durchgeführt werden musste, ließ sie sich zum Gramm-Maßstab hochskalieren. Dass **7** so verfügbar gemacht wurde, ist an sich schon eine bemerkenswerte Errun- genschaft, da ausgehend von **7** viele Abschnitte des Phorboid- Pharmakophors erkundet werden können, die aus dem Pool natürlicher Diterpenoide nicht zugänglich sind.

In der Oxidase-Phase wurden vier Hydroxygruppen in- stalliert und das System der vier aneinander gereihten Car- bocyclen in die überbrückte Version der Zielverbindung überführt (Schema 3). Eine Umlagerung vom Tiglian- zum Ingenangerüst ist wahrscheinlich ein Schritt der Biosynthese



Schema 3. Oxidase-Phase der Synthese. CDI = Carbonyldiimidazol; Martin-Sulfuran = Bis[α,α -bis(trifluormethyl)boryloxy]diphenylsulfid.

von Ingenol, doch wurde diese Reaktion bislang nur in der entgegengesetzten Richtung beobachtet: Ingenanderivate lagern unter sauren Bedingungen zu Tiglienen um, da hier- durch die mit der in,out-verbrückten Topologie der B,C- Ringverknüpfung einhergehende Spannung gelöst wird.^[12] Wie diese Reaktivität umgekehrt wurde, ist, thermodynami- schisch betrachtet, überraschend angesichts der relativen Sta- bilität von überbrückten und kondensierten Polycyclen im Allgemeinen und der In,out- und Out,out-Konfigurationen der Überbrückung in diesem speziellen Fall.

Zuerst wurde von der Dien-Einheit von **7** die besser zu- gängliche Doppelbindung im Siebenring chemoselektiv di- hydroxyliert, und nach Schützen des entstandenen Glycols als Carbonat wurde das Produkt mit BF₃·Et₂O bei niedrigen Temperaturen umgesetzt. Eine vinyloge Pinakol-Umlagerung schloss sich an, die das Ingenanderivat **8** in beachtlichen 80 % Ausbeute lieferte. Die Realisierung dieser anscheinend dop- pelt kontrathermodynamischen Umlagerung ist außerge- wöhnlich, und man fragt sich, ob ohne einen großzügigen Sponsor wie die Firma, die das Pharmakon **1a** entwickelte, ein Forschungsantrag mit dieser unvorhersehbaren Reaktion als zentralem Punkt den konservativen Begutachtungsprozess überstanden hätte. Der Abschluss der Synthese verlief ohne größere Vorkommnisse: Durch allylische Oxidation der C3-Methylengruppe, Abspaltung der 7-Hydroxygruppe und Oxidation C20-Methylgruppe wurde die Oxidase-Phase der

Synthese kurz und knapp (in nur sieben Stufen) beendet, und die Cyclopropan-Konfiguration des Monoterpen **3** legt die sechs übrigen Stereozentren fest.

Lässt sich diese Synthese im industriellen Maßstab durchführen? Vom präparativen Standpunkt aus betrachtet ist sie zwar raffiniert, doch wegen mehrerer Reaktionen bei tiefen Temperaturen auch technisch anspruchsvoll, insofern dürfte sie eher als Blaupause für robustere industriell anwendbare Modifizierungen dienen. Kritischer ist der Gebrauch äquimolarer Mengen an Metallen (gerade bei der Dihydroxylierung von **7**) in der Oxidase-Phase. Diese Einschränkung ist kaum verwunderlich, da wir es mit unserem Synthesearsenal leichter haben, C-C-Bindungen zu knüpfen als Sauerstoffatome in C-H-Bindungen einzufügen. Die Natur dagegen nutzt geschickt Cytochrome und Eisenkatalysatoren, um Kohlenstoffatome bemerkenswert effizient und selektiv zu hydroxylieren, und es ist durchaus denkbar, eine durch Biooxidationsschritte verfeinerte industrielle Variante der Synthese zu entwickeln. Die industrielle Produktion des Antimalariawirkstoffs Artemisinin beruht auf einem derartigen kombinierten Prozess, bei dem biotechnologisch ein bicyclisches Terpenoidgerüst erhalten wird, das dann synthetisch oxidativ abgebaut wird.^[13] Da die moderne Wissenschaft multidisziplinär ist, könnte der Transfer in die Industrieproduktion zweifellos von einem ähnlichen Hybridansatz profitieren. Worüber man auch noch nachdenken könnte, ist ein einfacherer Zugang zu **4b** durch Entwicklung einer günstigen Wertschöpfungskette für (–)-3-Caren. Dieses kommt in großen Mengen im Kienöl vor, das aus der Waldkiefer (*Pinus sylvestris* L.) gewonnen wird, aber gegenwärtig ist es teurer als sein Enantiomer aus dem Öl der indischen Chirkiefer (*P. roxburghii* Sarg.).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Barans Synthese von Ingenol zweifellos atemberaubend ist, was ihre Eleganz und Kürze betrifft. Sie könnte sich zu einem Musterbeispiel für die Synthese von Naturstoffen entwickeln. Außerdem ist der Schlüsselschritt, bei dem das Gerüst der Zielverbindung

gebildet wird, bemerkenswert bezüglich der biogenetischen Implikationen, und die Optimierung dieses Schritts könnte Hinweise auf die Biosynthese der Phorboide liefern, die trotz der biomedizinischen Bedeutung dieser Klasse von Diterpenoiden zurzeit eine „Black Box“ ist.

Eingegangen am 21. September 2013
Online veröffentlicht am 25. November 2013

Bitte beachten: Dieses Manuskript wurde seit seiner Veröffentlichung auf *Angewandte Chemie* Early View leicht verändert. Die Redaktion.

-
- [1] S. M. A. D. Zayed, M. Farghlay, H. Taha, H. Gotta, E. Hecker, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1998**, *124*, 131–140.
 - [2] D. Weedon, J. Chick, *Med. J. Aust.* **1976**, *1*, 928.
 - [3] J. Hohmann, F. Evanics, L. Berta, T. Bartók, *Planta Med.* **2000**, *66*, 291–294.
 - [4] Laut dem „Statewide Integrated Pest Management Program“ ist Gartenwolfsmilch bereits ein Problem in küstennahen Gebieten in Kalifornien (<http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/PESTNOTES/pn7445.html>).
 - [5] X. Liang, G. Grue-Sørensen, A. K. Petersen, T. Höglberg, *Synlett* **2012**, *23*, 2647–2652.
 - [6] a) G. Appendino, G. C. Tron, G. Cravotto, G. Palmisano, J. Jakupovic, *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 76–79; b) M. L. Bellido Caballo de Alba, G. Appendino, A. Pagani, E. Muñoz Blanco, *2013*, WO/2013/050365.
 - [7] L. Jørgensen, S. J. McKerral, C. A. Kuttruff, F. Ungeheuer, J. Felding, P. S. Baran, *Science* **2013**, *341*, 878–882.
 - [8] J. K. Cha, O. L. Epstein, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 1329–1343.
 - [9] J. M. Yu, W. Zhenga, B. M. Seletsksya, *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 1158–1164.
 - [10] J. Guerra-Bubb, R. Croteau, R. M. Williams, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 683–696.
 - [11] F. Z. Macaev, A. V. Malkov, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 9–29.
 - [12] G. Appendino, G. C. Tron, G. Cravotto, G. Palmisano, R. Annunziata, G. Baj, N. Surico, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 3413–3420.
 - [13] F. Lévesque, P. H. Seeberger, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1738–1741; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1706–1709.
-