

Julia Sünner

# Totalsynthese des Marinen Makrolids Palmerolid A

Zugang zu einem Naturstoff mit pharmakologisch  
vielversprechendem Wirkprofil

**RESEARCH**



**Springer** Spektrum

---

# **Totalsynthese des Marinen Makrolids Palmerolid A**

---

Julia Süner

# Totalsynthese des Marinen Makrolids Palmerolid A

Zugang zu einem Naturstoff  
mit pharmakologisch  
vielversprechendem Wirkprofil



**Springer** Spektrum

**RESEARCH**

Julia Süner  
Neustadt an der Weinstraße, Deutschland

Vollständiger Abdruck der unter Anleitung von Professor Dr. Martin E. Maier am Institut für Organische Chemie, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard Karls Universität Tübingen angefertigten Dissertation.

ISBN 978-3-8348-2542-1  
DOI 10.1007/978-3-8348-2543-8

ISBN 978-3-8348-2543-8 (eBook)

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Springer Spektrum

© Springer Fachmedien Wiesbaden 2012

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsgesetz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlags. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Gedruckt auf säurefreiem und chlorfrei gebleichtem Papier

Springer Spektrum ist eine Marke von Springer DE. Springer DE ist Teil der Fachverlagsgruppe Springer Science+Business Media  
[www.springer-spektrum.de](http://www.springer-spektrum.de)

**Meinen Eltern**

## Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum erfolgreichen Abschluss dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Martin E. Maier bedanken für die Bereitstellung dieses interessanten und aktuellen Themas, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die guten Ratschläge und Lösungsvorschläge bei Problemen und Fragen, die während der Durchführung dieser Arbeit aufgetreten sind.

Herrn Graeme Nicholson, Tim Nicholson und Frau Dorothee Wistuba danke ich für die zahlreichen GC/MS- und MS-Messungen.

Ein herzliches Dankeschön gilt Frau Maria Munari für die Aufarbeitung der Lösungsmittel und die uneingeschränkte Hilfe beim Klären von Fragen rund um Chemikalien und Chemikalienentsorgung.

Vielen Dank auch an Claudia Braun, die mir im Rahmen dieser Arbeit zahlreiche Zwischenstufen nachgezogen hat.

Ich danke meinen Arbeitskollegen und -kolleginnen für die geduldigen Erklärungen und Tipps beim Bedienen sämtlicher Geräte und beim synthetischen Arbeiten. Vielen Dank an Euch alle für die gute Zusammenarbeit, die Unterstützung im Laboralltag und die zahlreichen Diskussionen.

Sanja Locher und Thomas Sünner danke ich für den Rückhalt, den sie mir während der gesamten Studienzzeit gegeben haben und für das Interesse und die Diskussionsbereitschaft, die sie zu allen mich beschäftigenden Themen gezeigt haben.

Mein größter Dank gilt meiner Familie für die moralische und finanzielle Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung.

Julia Sünner

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>XI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Allgemeiner Teil</b> .....	<b>3</b>
2.1 Pharmakologische und biologische Grundlagen .....	3
2.1.1 Krebs und Krebsbekämpfung .....	3
2.1.2 Grundlagen der Zellbiologie – Aufbau und Funktion der V-ATPase.....	5
2.1.3 Ansatzpunkte zur Krebsbekämpfung: Die V-ATPase als Angriffsziel zur Tumorbekämpfung .....	6
2.1.4 V-ATPase hemmende Substanzen .....	7
2.1.5 Palmerolid A - Vorkommen und biologische Aktivität .....	10
2.2. Totalsynthesen von Palmerolid A .....	11
2.2.1 Totalsynthese nach J. K. De Brabander et al. ....	11
2.2.2 Totalsynthese nach K. C. Nicolaou et al. ....	15
2.2.3 Totalsynthese nach D. G. Hall et al. ....	18
2.2.4 Formale Totalsynthese nach K. P. Kaliappan et al. ....	23
2.3 Schlüsselreaktionen und deren Reaktionsmechanismen .....	28
2.3.1 Asymmetrische Transfer-Hydrierung (Noyori-Reduktion).....	28
2.3.2 Sharpless asymmetrische Dihydroxylierung.....	31
2.3.3 Evans-Aldol-Reaktionen .....	35
2.3.4 Kreuzkupplungsreaktionen .....	37
2.3.5 Takai-Olefinierung .....	39
2.3.6 Enamid-Darstellung .....	41
<b>3 Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>43</b>
3.1 Retrosynthetische Analyse .....	43
3.1.1 Strategie 1* und 1: Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion als Ringschlussreaktion zum Makrozyklus.....	43
3.1.2 Strategie 2: Kreuzkupplungsreaktion als Ringschlussreaktion zum Makrozyklus.....	45
3.2 Modellstudien .....	47
3.2.1 Aufbau des Kohlenstoffteilgerüsts und Differenzierung der vicinalen Hydroxyfunktionen .....	51
3.2.2 Reduktion der Dreifachbindung .....	55

---

3.3	Arbeiten zur ursprünglich vorgeschlagenen Struktur 1* .....	56
3.3.1	Strategie 1*: Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion als Ringschlussreaktion zum Makrozyklus.....	56
3.4	Arbeiten zur revidierten Struktur 1 .....	69
3.4.1	Strategie 1: Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion als Ringschlussreaktion zum Makrozyklus.....	69
3.4.2	Strategie 2: Kreuzkupplungsreaktion als Ringschlussreaktion zum Makrozyklus.....	81
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>89</b>
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>93</b>
5.1	Allgemeine Anmerkungen .....	93
5.1.1	Chemikalien und Arbeitstechniken .....	93
5.1.2	Spektroskopie und Analytik .....	94
5.2	Arbeitsvorschriften .....	96
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>179</b>
6.1	Spektren .....	179
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>219</b>



## Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
ADH	asymmetrische Dihydroxylierung
AD-mix- $\beta$	Mischung aus (DHQD) <sub>2</sub> PHAL, K <sub>2</sub> OsO <sub>2</sub> (OH) <sub>4</sub> , K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> und K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
ADP	Adenosindiphosphat
<i>et al.</i>	lat. „und andere“
ATP	Adenosintriphosphat
9-BBN	9-Borabicyclo[3.3.1]nonan
Bn	Benzyl
Bu	Butyl
Bz	Benzoyl
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
°C	Grad Celsius
c	Konzentration
CBS	Corey-Bakshi-Shibata (Reduktion)
COSY	Correlation Spectroscopy
CD	circular dichroism (dt. Zirkulardichroismus)
Cp	Cyclopentadienyl
CPBA	Chloroperoxybenzoesäure
CSA	Camphersulfonsäure
$\delta$	Chemische Verschiebung in [ppm] (NMR)
d	Dublett (NMR)
dba	Dibenzylidenaceton
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCE	Dichlorethan
DCM	Dichlormethan
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon
<i>de</i>	Diastereomeren-Überschuss
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
(DHQ) <sub>2</sub> PHAL	1,4-Bis(dihydrochinolinyl)phtalazin
(DHQD) <sub>2</sub> PHAL	1,4-Bis(dihydrochinolinyl)phtalazin
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIPEA	Diisopropylethylamin
DIPT	D-(-)-Diisopropyltartrat
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid

---

DMP	Dess–Martin–Periodinan
DMSO	Dimethylsulfoxid
dppf	1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen
<i>E</i>	trans (entgegen)
EDCCI	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide Hydrochlorid
<i>ee</i>	Enantiomeren–Überschuss
EI	Elektronenstoß–Ionisation
equiv	molare Äquivalente
Et	Ethyl
EtOAc	Ethylacetat
Et <sub>2</sub> O	Diethylether
FT–IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
ges.	gesättigt
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	hochauflösende Massenspektrometrie
HWE	Horner–Wadsworth–Emmons
Hz	Hertz
IBX	2-Iodoxybenzoesäure
IR	Infrarot
IUPAC	international union of pure and applied chemistry
<i>J</i>	Kopplungskonstante
kPa	kilo Pascal (Druck)
LAH	Lithiumaluminiumhydrid
LC	Flüssigkeitschromatographie (liquid chromatography)
LDA	Lithiumdiisopropylamid
LiHMDS	Lithiumhexamethyldisilazid
m	Multipllett (NMR)
Me	Methyl
MEM	Methoxyethoxymethyl
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minuten
MOM	Methoxymethyl
MS	Molsieb
MTPA	Methoxytrifluormethylphenyllessigsäure
<i>m/z</i>	Masse zu Ladungs–Verhältnis (MS)
NBS	N-Bromsuccinimid
nM	nanomolar

NMO	N-Methylmorpholin-N-oxid
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie
<i>N,N'</i> -DMED	Dimethylethylendiamin
PCC	Pyridiniumchlorochromat
PE	Petrolether (Siedebereich 40 bis 60°C)
PG	Schutzgruppe ( <u>protecting group</u> )
Ph	Phenyl
PhMe	Toluol
PMB	<i>para</i> -Methoxybenzyl
ppm	parts per million
PPTS	Pyridinium- <i>para</i> -toluolsulfonat
<i>p</i> TSA	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
Pr	Propyl
PS 086	[(85-88%)Methyl-(12-15 %)phenylpolysiloxan]
Pyr	Pyridin
q	Quartett (NMR)
R	Alkylrest
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor (DC)
Red-Al	Natriumbis(2-methoxyethoxy)aluminiumhydrid
RT	Raumtemperatur (ca. 23°C)
s	Singulett (NMR)
Sdp.	Siedepunkt
t	Triplett (NMR)
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl
TES	Triethylsilyl
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilyl
TfO	Trifluormethansulfonat
TMS	Trimethylsilyl
Ts	<i>para</i> -Toluolsulfonat
UV	Ultraviolett
Z	cis (zusammen)

# 1 Einleitung

Das Leben auf der Erde ist vor ungefähr 3,5 Milliarden Jahren im Meer entstanden und hat erst viel später den Weg auf das Land gefunden. Seit dieser Trennung haben marine und terrestrische Lebensformen jeweils eine eigene Entwicklung durchlaufen und sich ihrer jeweiligen Umgebung angepasst; einmal vom Wasser und den darin gelösten Salzen und Gasen geprägt und einmal vom Wassermangel und der umgebenden Atmosphäre bestimmt.<sup>[1]</sup> Die Evolution hat im Laufe dieser Zeit durch natürliche Selektion die verschiedensten chemischen Substanzen hervorgebracht, die von Organismen unter anderem zur Abwehr von Angriffen eingesetzt werden. Dabei handelt es sich oft um Stoffe, die organische Materie zersetzen oder das Zellwachstum auf unterschiedliche Art und Weise verlangsamen oder sogar gänzlich stoppen.

Diese Vielfalt an verschiedenen Substanzen nutzt der Mensch schon seit Jahrtausenden als natürliche Quelle zur Gewinnung zahlloser Wirkstoffe und Heilmittel. Angesichts des anhaltenden Mangels an geeigneten Arzneimitteln bei vielen Krankheiten und zunehmenden Resistenzentwicklungen bestimmter Krankheitserreger besteht seitens der pharmazeutischen und biochemischen Industrie ein großer, wachsender Bedarf an neuen Wirkstoffen. Deshalb wird die Suche nach interessanten Leitstrukturen in der Natur immer weiter intensiviert.

Dabei hat man sich zunächst hauptsächlich auf die leichter zugänglichen Landpflanzen konzentriert. Deshalb stammt ein Großteil der heute bekannten Naturstoffe aus der terrestrischen Flora und weniger als die Hälfte aus marinen Quellen. Wenn man jedoch bedenkt, dass ca. 70% der Erdoberfläche von Ozeanen bedeckt ist und nur ein Bruchteil davon bisher nach Naturstoffen durchsucht wurde, wird verständlich, welches noch nicht entdeckte Potential sich in den zahllosen Meeresorganismen verbirgt.

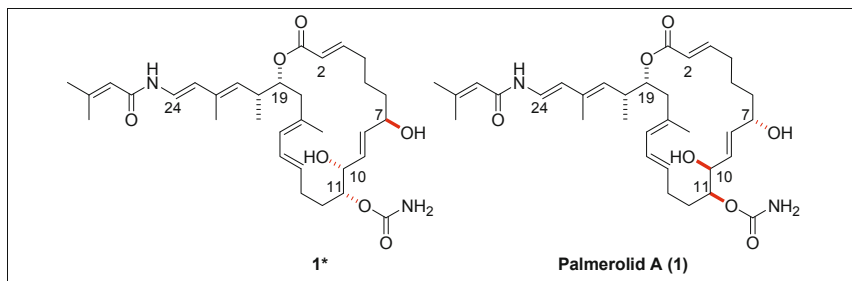
Es ist mittlerweile unumstritten, dass der marine Lebensraum eine Fülle an neuen Strukturen bietet, was an zahlreichen, erst in jüngster Zeit isolierten Substanzen belegt werden kann.<sup>[2]</sup> Dazu zählt auch das, die Grundlage für diese Arbeit darstellende, komplexe, marine Makrolid Palmerolid A (**1**).

Zellbiologische Untersuchungen ergaben für Palmerolid A (**1**), dass es durch Inhibierung der V-ATPase nicht nur sehr potent, sondern auch selektiv bestimmte, meist cancerogene Zelllinien angreift und letztlich abtötet.

Palmerolid A (**1**) wurde von Bill J. Baker et al. aus einem in antarktischen Gewässern beheimateten Manteltierchen (*synoicum adareanum*) isoliert und unter anderem spektroskopisch untersucht. Im Jahre 2006 wurden seine Ergebnisse erstmals publiziert und die Struktur **1\*** als die vermeintlich richtige, absolute Struktur dieses Naturstoffes postuliert.<sup>[3]</sup>

Durch Arbeiten von J. K. De Brabander et al.<sup>[4]</sup> und K. C. Nicolaou et al.<sup>[5]</sup> stellte sich später heraus, dass die Konstitution des Moleküls wie publiziert zwar stimmt, die absolute Stereochemie von Palmerolid A (**1**) an C7, C10 und C11 jedoch korrigiert werden muss

(Abbildung 1). Statt einer (*R*)-Konfiguration, wie zunächst angenommen, liegt an diesen drei chiralen Zentren des Naturstoffes eine (*S*)-Konfiguration vor.



**Abbildung 1:** Ursprünglich vorgeschlagene **1\*** und korrigierte Struktur von Palmerolid A (**1**)

Die Gewinnung von Substanzen aus marinen Quellen ist in kleinem Maßstab möglich; sie sind jedoch meist schwer zugänglich und nur in geringen Mengen verfügbar. Stellt sich durch erste Versuche heraus, dass eine aus einem Organismus isolierte Substanz pharmakologisches Potential besitzt, wird eine größere Menge des Wirkstoffes benötigt, um umfassendere Untersuchungen mit ihm durchführen zu können. Eine von Chemikern entwickelte Totalsynthese stellt oft eine sehr flexible und brauchbare Alternative zu anderen Zugangsmöglichkeiten wie z.B. dem Züchten der Organismen in Tanks dar. Durch eine geschickt gewählte Synthesestrategie soll nicht nur der natürlich vorkommende Wirkstoff zugänglich gemacht werden, sondern auch eine ganze Reihe von Derivaten und Analoga, die hinsichtlich ihrer pharmakologischen Eigenschaften ebenfalls untersucht werden können. Oft besitzen einige von ihnen im Vergleich zur Leitstruktur günstigere pharmakologisch wichtige Eigenschaften wie ein breiteres Wirkspektrum, geringere Toxizität, bessere Selektivität oder eine höhere Affinität zum Zielmolekül.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte eine solche Totalsynthese für den Naturstoff Palmerolid A (**1**) entwickelt und realisiert werden.

## 2 Allgemeiner Teil

### 2.1 Pharmakologische und biologische Grundlagen

#### 2.1.1 Krebs und Krebsbekämpfung

Etwa jeder vierte Mensch stirbt in den Industrieländern heutzutage an einem bösartigen (malignen) Tumor. Damit ist Krebs zu einer der häufigsten Todesursachen geworden, und die Zahl der Neuerkrankungen nimmt ständig zu. Trotz der Fortschritte auf diagnostischem und therapeutischem Gebiet liegt die Heilungschance für die am häufigsten auftretenden Tumorarten selten über 20%. Eine der aggressivsten Krebserkrankungen ist nach heutigem Erkenntnisstand der schwarze Hautkrebs, das Melanom. Darunter versteht man einen bösartigen (malignen) Tumor, der von den Melanozyten, den pigmentbildenden Zellen der Haut, ausgeht und sich bereits in sehr frühem Krankheitsstadium auf andere Organe ausbreitet. Seit den achtziger Jahren hat sich die Anzahl an Neuerkrankungen allein in Deutschland mit mehr als 150 000 Betroffenen verdreifacht.<sup>[6]</sup>

Kennzeichnend für maligne Tumore ist ein unkontrolliertes, metastasierendes (Bildung von Tochtergeschwülsten an anderen Stellen des Organismus) Wachstum, das an Gewebegrenzen nicht innehält, sondern Organe und Gefäße infiltriert und dadurch zerstört.

Das physiologische Überleben einer Zellpopulation hängt vom Gleichgewicht zwischen Zellteilung und programmiertem Zelltod (Apoptose) ab. Im Rahmen einer Tumorerkrankung ist dieses Gleichgewicht gestört und führt zu einer unkontrollierten Erhöhung der Zellzahl. Das kann zum einen an der Zunahme der Zellzahl durch Funktionsstörung im Zellzyklus, d.h. erhöhter Zellteilungsrate im Vergleich zur Apoptose liegen, oder zum anderen an einer Störung der Apoptose und damit einem ungenügenden Absterben nicht mehr benötigter oder geschädigter Zellen.

Ein Krebstumor kann mit Hilfe therapeutischer Maßnahmen vernichtet oder in seinem Wachstum gehemmt werden. Eine Rückbildung der Tumorzellen in gesundes Zellgewebe lässt sich bislang nicht erzielen. Die heutigen Möglichkeiten zur Behandlung umfassen eine operative Entfernung des Tumors, sofern er an einem bestimmten Ort im Organismus lokalisiert ist und kein lebensnotwendiges Organ komplett entfernt werden müsste, seine Bestrahlung oder eine geeignete Chemotherapie.<sup>[7]</sup>

Sämtliche Chemotherapeutika (Zytostatika) wirken bevorzugt auf proliferierende Zellen und erfassen dadurch hauptsächlich sich gerade teilende Tumorzellen, haben jedoch auch unerwünschte Nebenwirkungen auf sich schnell regenerierendes Gewebe wie das Knochenmark und Haarzellen. Zytostatika stellen eine sehr gute Therapiemöglichkeit bei delokalisierten Tumoren dar, da sie nach oraler Einnahme und Resorption im Magen oder Darm durch die Blutbahn Zugang zu verschiedensten Geweben im gesamten Organismus haben.

Man unterscheidet je nach Wirkungsweise verschiedene Klassen von Zytostatika. Sehr große Bedeutung kommt den sogenannten Alkylantien zu, die durch Alkylierung von Nukleinsäuren die DNA von Zellen verändern und dadurch ihre Replikation beeinträchtigen. Zu ihnen zählen z. B. verschiedene Stickstoff-Lost Derivate wie Cyclophosphamid, Mechlorethamin oder Chlorambucil, Alkylsulfonate wie Busulfan und Nitrosoharnstoffverbindungen wie z. B. Lomustin oder Nimustin.<sup>[8]</sup>

Andere, in der herkömmlichen Krebstherapie weit verbreitete und häufig eingesetzte Substanzen sind die sogenannten Mitosehemmstoffe. Fast alle Vertreter dieser Substanzklasse sind Polyketide, die während der Mitose-Phase des Zellzyklus in die Zellteilung eingreifen und auf unterschiedliche Art und Weise den Aufbau eines funktionsfähigen Spindelapparats verhindern.

Um das körpereigene Immunsystem zu unterstützen werden oft gleichzeitig mit den Zytostatika Zytokine verabreicht, die als Botenstoffe die Wechselwirkung zwischen Körperzellen beeinflussen und damit z. B. eine Erhöhung der Produktion an Leukozyten, den körpereigenen Abwehrzellen, vermitteln.<sup>[9]</sup>

Eine wesentliche Einschränkung in der Chemotherapie rufen häufig vorkommende Zytostatikaresistenzen hervor. Darunter versteht man eine Unempfindlichkeit der Krebszellen gegenüber der Therapie mit bestimmten Medikamenten, für die verschiedene Ursachen in Betracht gezogen werden können. Im Einzelnen sind sie aber noch nicht vollständig geklärt.<sup>[10]</sup>

Aufgrund dieser, gegen herkömmliche Chemotherapeutika häufig auftretenden Resistenzen und zur Verbesserung der Behandlungsmöglichkeiten wird immer weiter nach neuen, potenteren Substanzen zum Einsatz in der Krebstherapie gesucht. Dabei hofft man insbesondere, neue Substanzen zu finden, deren Wirkmechanismen sich von den bisher bekannten und eingesetzten Chemotherapeutika unterscheiden. Auf ein solches neues Präparat könnten bisher resistente Zellen sensibel reagieren und der Tumor würde entsprechend angegriffen werden.

So wurde im Laufe der letzten Jahre eine Reihe von Naturstoffen identifiziert, die aus pharmakologischer Sicht sehr vielversprechend scheint. Ihr charakteristischer Wirkmechanismus stellt einen neuen Ansatzpunkt in der Krebstherapie dar und beruht auf der Hemmung der als vakuolen ATPase (V-ATPase) bezeichneten Protonenpumpe.<sup>[11]</sup>

Im Jahre 2005 gelang es Bill J. Baker et al. Palmerolid A (1), ein 20-gliedriges, marines Makrolid, aus dem in der Antarktis beheimateten Manteltierchen (*synoicum adareanum*) zu isolieren.

Erste Tests an verschiedenen Zelllinien deuten darauf hin, dass auch diese Verbindung durch Hemmung der V-ATPase bestimmte Tumorzelltypen sogar selektiv angreift, während andere Zelllinien unberührt bleiben.<sup>[4]</sup> Dieses sehr interessante und bisher einzigartige Wirkprofil, einhergehend mit der Tatsache, dass der Zugang zu Palmerolid A (1) aufgrund seines natürlichen Vorkommens im Naturschutzgebiet des antarktischen Palmer-Archipels sehr beschränkt ist, hat uns dazu veranlasst, eine Totalsynthese für diesen hochpotenten Naturstoff zu entwickeln.

In den folgenden Kapiteln soll nun kurz auf die zellbiologischen Grundlagen eingegangen werden, die zum Verständnis der Funktionsweise der V-ATPase unerlässlich sind. Ausserdem soll verdeutlicht werden, warum sich durch die Inhibierung dieser Protonenpumpe möglicherweise ein neuer Ansatzpunkt in der Therapie von bestimmten Krebserkrankungen bietet.

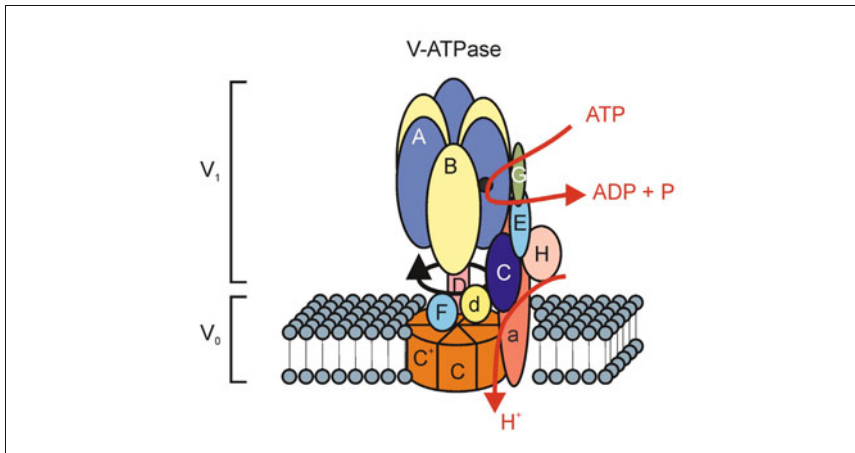
### 2.1.2 Grundlagen der Zellbiologie – Aufbau und Funktion der V-ATPase

Jede Zelle besitzt eine Membran, die sie umschließt und von ihrer Umgebung abgrenzt. Um die Funktion der Zelle zu gewährleisten muss durch diese Plasmamembran ein kontrollierter Austausch von Ionen und Molekülen zwischen dem Inneren (Cytosol) der Zelle und ihrer äußeren Umgebung (extrazelluläres Medium) möglich sein. Da dieser Austausch häufig entgegen eines Potentials verläuft, müssen spezielle Proteine in der Membran lokalisiert sein, die diese Transportprozesse energetisieren. Wird die Energie für einen solchen Transportprozess direkt durch Hydrolyse von ATP gewonnen, so spricht man von primären Transportprozessen. Bei den für den primären Transport zuständigen Proteinen handelt es sich um Ionen-transport-ATPasen. Zu ihnen zählt neben den sogenannten P- und F-ATPasen auch die für diese Arbeit interessante V-ATPase (die Bezeichnung V- leitet sich von der erstmaligen Beschreibung des Proteins in der Vakuolenmembran der Hefe ab). Sie ist ein transmembranes Protein, das in Lysosomen, zentralen Vakuolen, synaptischen Vesikeln, einer Vielzahl eukaryotischer Endomembranen und Plasmamembranen, besonders von Epithelzellen verschiedener Organe, beobachtet wird. Vieles, was bisher über die Struktur und Funktionsweise der V-ATPase bekannt ist, beruht auf ihrer Homologie zur F-ATPase und wurde von ihrem Mechanismus abgeleitet.<sup>[12]</sup>

Die V-ATPase stellt eine heteromultimere Protonenpumpe dar, die sich aus zwei funktionellen Domänen mit jeweils mehreren Untereinheiten zusammensetzt. Die periphere  $V_1$ -Domäne besteht aus acht Untereinheiten und ist für die Hydrolyse von ATP verantwortlich, während die membranständige  $V_0$ -Domäne, aufgebaut aus sechs Untereinheiten, den Ionenkanal umschließt und damit für den Protonentransport zuständig ist. Die Domänen  $V_1$  und  $V_0$  sind mechanisch durch den sogenannten „Rotor“ miteinander gekoppelt.

Im Gegensatz zur F-ATPase, die durch einen Protonenfluss entlang eines elektrochemischen Potentialgefälles Energie gewinnt, um ATP zu synthetisieren, nutzt die V-ATPase die durch Hydrolyse von ATP gewonnene Energie, um Protonen aktiv entgegen eines elektrochemischen Potentialgefälles zu pumpen. Sie wandelt also elektrochemische Energie in mechanische Energie um, um den aktiven Transport von Protonen zu ermöglichen.





**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der V-ATPase (nach <sup>[13]</sup>)

Die V-ATPase wird, analog zu der ihr verwandten F-ATPase, auch als Motorenzym bezeichnet. Durch Hydrolyse von ATP an der katalytischen Nukleotidbindungsstelle der Untereinheiten A und B der  $V_1$  Domäne wird die nötige Energie bereitgestellt, um nach Konformationsänderung dieser Untereinheiten den Rotorabschnitt D und F in Drehung zu versetzen. Dieser wiederum überträgt seine motorische Kraft auf die  $V_0$  Domäne des Proteins, indem die Rotoruntereinheit d und schließlich die ringförmig angeordnete Einheit c aus Proteolipiden in Rotation gebracht werden. Dabei verschiebt sich der Komplex c relativ zu der starren Anordnung aus „Gerüsteinheiten“ (H, C, E und a), die die beiden Domänen miteinander verbinden (**Abbildung 2**). Durch diese kleine Positionsänderung wird ein Ionenkanal freigelegt, in den Protonen vom Cytosol gelangen und an die proteolipidischen Glutamatreste binden. Durch die in Uhrzeigersinn gerichtete Drehbewegung des Komplexes c gelangen die Glutamatresüereste schließlich ladungsfrei durch die hydrophobe Lipidschicht der Membran. Ein Argininrest, der an der Untereinheit a lokalisiert ist, bewirkt letztlich die Deprotonierung des Glutamats und das Proton wird an der luminalen Seite der Membran freigesetzt. Auf diese Weise wird also durch die V-ATPase Energie durch Hydrolyse von ATP gewonnen, um den Rotor des Motorenzyms anzutreiben. Der rotierende Proteolipidring c ermöglicht dann formal gesehen das Wandern von Protonen vom Cytoplasma über die Plasmamembran in den extrazellulären Raum der Zelle.<sup>[14][15]</sup>

### 2.1.3 Ansatzpunkte zur Krebsbekämpfung:

#### Die V-ATPase als Angriffsziel zur Tumorbekämpfung

Nach bisherigem biomedizinischem Kenntnisstand wird angenommen, dass ein erniedrigter pH-Wert in unmittelbarer Umgebung einer Zelle eine Schlüsselrolle bei der Zelldifferenzie-

rung einnimmt und dadurch für die Entwicklung, das Fortschreiten und die Ausbreitung eines Tumors von großer Bedeutung ist. Außerdem hat man herausgefunden, dass ein Zusammenhang zwischen Acidität des Zellgewebes und der Resistenz dieser Zellen gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika besteht.<sup>[16]</sup>

In Krebsgewebe wurde ein gegenüber gesundem Gewebe drastisch reduzierter pH-Wert im extrazellulären Raum beobachtet. Man nimmt an, dass dieser erniedrigte Wert dafür verantwortlich ist, dass ein Großteil an gesundem Zellgewebe abstirbt, da es in der Regel unter diesen sauren Bedingungen nicht überlebensfähig ist. Maligne Tumorzellen hingegen weisen eine erhöhte Säuretoleranz auf. Diese bösartigen Krebszellen können das gesunde Gewebe leicht infiltrieren, da der Untergang von gesunder, extrazellulärer Matrix bei kleinem pH-Wert begünstigt wird. Außerdem ist bekannt, dass metastasierende Tumorzellen lysosomale Enzyme freisetzen, die in dieser sauren Umgebung bevorzugt arbeiten und das Wachstum des Tumorgewebes ihrerseits begünstigen.<sup>[17]</sup> Die Ausbreitung des malignen Gewebes wird damit erleichtert und der Tumor kann schließlich metastasieren. Um diesen Teufelskreis zu durchbrechen wird seit mehreren Jahren nach den Ursachen für den gegenüber gesunden Zellen signifikant niedrigeren pH-Wert im Extrazellulärraum malignen Gewebes gesucht.

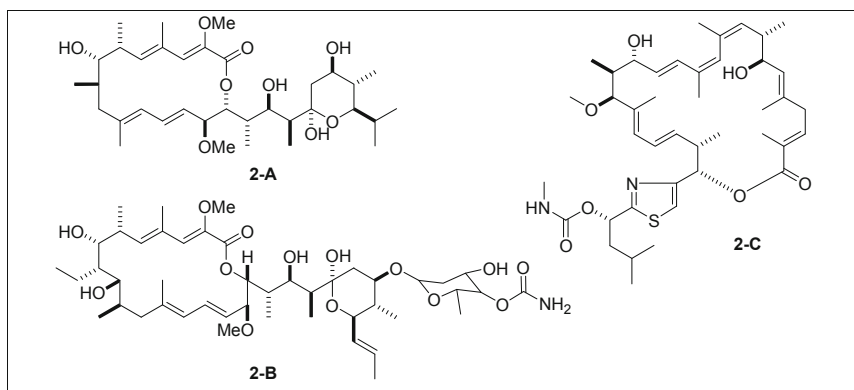
Da Tumorgewebe oft schlecht durchblutet ist, weisen maligne Zellen einen zum Großteil anaeroben Metabolismus mit erhöhter Lactatsäureproduktion auf, was zu einer Ansäuerung des extrazellulären Raums beitragen könnte. Auch weitere Umstellungen im Metabolismus der Zellen, hervorgerufen durch unkontrolliertes Zellwachstum und Hypoxie, werden als Teilursache für einen niedrigen pH-Wert in Betracht gezogen. Das Hauptaugenmerk liegt jedoch auf der Tatsache, dass man in der Zellmembran von malignen Zellen eine charakteristische Anreicherung von bestimmten Ionentransportproteinen, insbesondere der V-ATPase, findet. Wie bereits unter 2.1.2 beschrieben pumpt die V-ATPase aktiv Protonen aus dem Cytosol der Zelle ins Lumen bzw. den Extrazellulärraum. Dadurch bleibt bei gesunden Zellen der intrazelluläre pH-Wert neutral, während sich die extrazelluläre Matrix leicht ansäuert. Wird dieser Prozess nun durch eine ungewöhnlich hohe Dichte an V-ATPase in der Membran gestört, sinkt der extrazelluläre pH-Wert stärker ab, während er im Inneren ansteigt.

Aufgrund dieser Erkenntnis sieht man in der Inhibierung der V-ATPase einen neuen Ansatzpunkt für die Krebstherapie. Der Einsatz von Substanzen, die in die Mechanismen, welche für die pH-Wert Regulation einer Zelle verantwortlich sind, eingreifen, scheint eine interessante und neue Möglichkeit zu sein, zum einen dem Tumorwachstum und seiner Ausbreitung entgegenzuwirken und zum anderen bisher resistente Zellen für herkömmliche Chemotherapeutika zu sensibilisieren.<sup>[18]</sup>

#### 2.1.4 V-ATPase hemmende Substanzen

Inhibitoren für bestimmte Enzyme werden schon seit vielen Jahren erfolgreich eingesetzt, um Proteine zu charakterisieren, die zur Entstehung von Krankheiten beitragen oder ihren Verlauf negativ beeinflussen. Die Charakterisierung solcher Proteine ist oft ein erster Schritt in

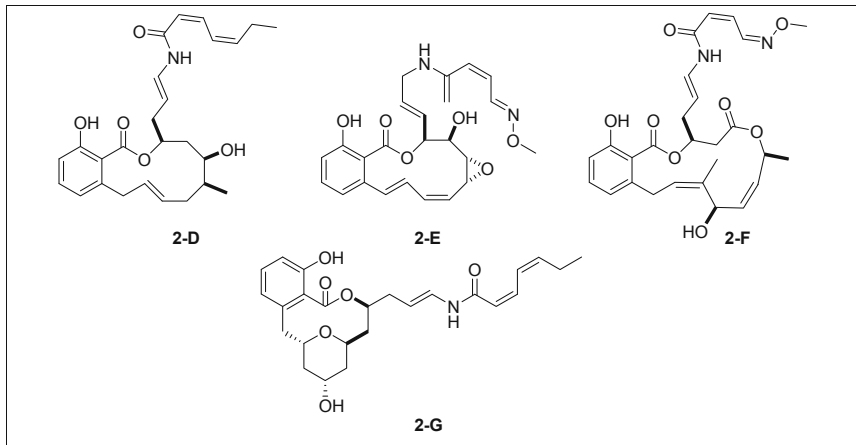
der Entwicklung von neuen Arzneimitteln, da zunächst geklärt werden muss, an welcher Stelle im Organismus ein potentieller Wirkstoff angreifen soll. Aufgrund der bereits vorgestellten Forschungsergebnisse, die die Ursache und den Verlauf verschiedener Krebserkrankungen betreffen, gibt es einen möglichen neuen Therapieansatz, der darauf beruht, V-ATPase Inhibitoren direkt als Wirkstoff einzusetzen.<sup>[19]</sup> Bei den ältesten, bekannten V-ATPase Inhibitoren (**Abbildung 3**) handelt es sich um die bereits in den frühen achtziger Jahren beschriebenen klassischen Hemmstoffe Bafilomycin<sup>[20]</sup> (**2-A**) und Concanamycin<sup>[21]</sup> (**2-B**), die unter anderem zur Struktur-Aktivitätsaufklärung am Enzym erfolgreich eingesetzt wurden.<sup>[22]</sup> Im Laufe der letzten zehn Jahre wurden weitere V-ATPase Inhibitoren entdeckt, darunter z. B. das Makrolacton Archazolid (**2-C**), das bei routinemäßigen Screenings eine hohe Aktivität gegenüber einer Vielzahl maligner Zelltypen aufwies.<sup>[23]</sup> Mit späteren Versuchen wurde belegt, dass Archazolid (**2-C**) die gleiche Bindungsstelle an der  $V_0$  Domäne der V-ATPase besetzt wie die zuerst genannten Inhibitoren.<sup>[24]</sup>



**Abbildung 3:** Strukturen von Bafilomycin A1 (**2-A**), Concanamycin A (**2-B**) und Archazolid A (**2-C**)

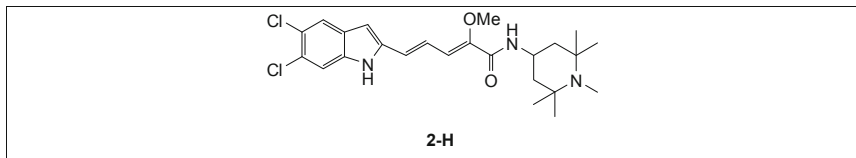
Ende der neunziger Jahre entdeckte man eine neue Klasse von Verbindungen, die wegen ihrer strukturellen Ähnlichkeiten unter dem Begriff der Benzolacton-Enamide zusammengefasst werden. Dazu gehören z. B. die Salicylhalamide, die Lobatamide, Oximidine und Apicularene (**Abbildung 4**), die alle die V-ATPase im nanomolaren Konzentrationsbereich inhibieren.<sup>[25]</sup>

Die Benzolacton-Enamide unterscheiden sich jedoch in wichtiger Weise von den zuerst genannten Substanzen wie Bafilomycin (**2-A**) und Concanamycin (**2-B**), da sie zwischen Enzymen verschiedener Spezies differenzieren. Sie zeigen hohe Aktivität gegenüber der V-ATPase verschiedener Membranzellen humanen Ursprungs, haben jedoch keinen Einfluss auf Zellen aus diversen Pilzen.



**Abbildung 4:** Strukturen von Salicylilhalamid A (**2-D**), Oximidin I (**2-E**), Lobatamid A (**2-F**) und Apicularen A (**2-G**)

Neben diesen Naturstoffen, die alle entweder aus marinen Organismen oder Bakterien isoliert wurden, kennt man heute auch einige synthetisch dargestellte, „kleinere, einfachere“ Strukturen, die die V-ATPase erfolgreich inhibieren. Ihr bekanntester Vertreter ist das Indolyl 0<sup>[26]</sup> (**2-H**) (**Abbildung 5**).



**Abbildung 5:** Struktur von Indolyl 0 (**2-H**)

In vitro Tests zeigen sowohl für die genannten Naturstoffe als auch für die synthetische Substanz ein sehr hohes, pharmakologisches Potential. Limitierend für ihren Einsatz in klinischen Tests ist jedoch ihr ebenfalls sehr toxisches Verhalten gegenüber gesunden Zellen.

Das im Jahre 2006 erstmals publizierte marine Makrolid Palmerolid A (**1**), das während dieser Doktorarbeit totalsynthetisch dargestellt wurde, zeigt in ersten Tests dagegen neben einem hohen Inhibitionspotential gegenüber der V-ATPase, insbesondere in Melanomazellen, eine signifikant kleinere Auswirkung auf verschiedene andere Zelllinien,<sup>[27]</sup> was im Hinblick auf weiterführende in vivo und spätere klinische Untersuchungen einen großen Vorteil darstellen könnte.

### 2.1.5 Palmerolid A - Vorkommen und biologische Aktivität

Das marine Ökosystem der Antarktis wird seit Millionen Jahren durch die Polarfront nach Norden begrenzt und stellt dadurch einen isolierten, einzigartigen Lebensraum für zahllose Organismen dar. Um die reichhaltige Fauna an diesem sehr speziellen, durch Kälte geprägten Ort zu erforschen, wurde 1968 die amerikanische Forschungsstation auf der zu der Inselgruppe des Palmer-Archipels gehörenden Anvers-Insel gebaut. Sie befindet sich nördlich des südlichen Polarkreises und wurde nach Nathaniel B. Palmer, der als erster Amerikaner die Antarktis betrat, Palmer-Station genannt. Der Großteil der wissenschaftlichen Forschung, die dort betrieben wird, betrifft die Meeresbiologie.<sup>[28]</sup> In den seichten Gewässern rund um die Anvers-Insel ist z. B. das Manteltierchen *synoicum adareanum* (**Abbildung 6**) beheimatet, das schon seit 1902 bekannt ist und in jüngster Zeit von Forschern der Palmer Station wiederentdeckt, identifiziert und schließlich von B. J. Baker et al. untersucht wurde. Dabei ist man auf einen bis zu diesem Zeitpunkt unbekannten Naturstoff, Palmerolid A (**1**), gestoßen. Wie bei vielen neuen, interessant erscheinenden Substanzen üblich, wurden neben der Strukturaufklärung auch zellbiologische Untersuchungen mit dieser Verbindung durchgeführt.



**Abbildung 6:**  
*synoicum adareanum*

Palmerolid A (**1**) wurde unter anderem an 60 ausgewählten Zelllinien getestet, die vom National Cancer Institute zusammengestellt wurden. In dieser Versuchsreihe zeigte sich für Palmerolid A (**1**) eine sehr hohe cytotoxische Aktivität gegenüber Melanomazellen und eine mäßige cytostatische Aktivität gegenüber leukämischen Zellen, Nerven-, Brust-, Darm- und Nierenkrebszellen, während bei vielen anderen getesteten Zelllinien kein Effekt durch Palmerolid A (**1**) zu beobachten war. Die Selektivität gegenüber den Melanomazellen mit einem  $LC_{50}$ -Wert von 18 nM deutet auf eine um drei Größenordnungen höhere Aktivität gegenüber den schwarzen Hautkrebszellen als gegenüber vielen anderen getesteten Zelllinien hin.<sup>[3]</sup> Zusammenfassend ergibt sich aus dieser ersten Versuchsreihe ein, den bisher bekannten V-ATPase-Hemmstoffen ähnliches Aktivitätsprofil. In späteren biologischen Tests an Rinderhirnzellen konnte bewiesen werden, dass es sich bei Palmerolid A (**1**) tatsächlich um einen potenten Inhibitor der vakuolen ATPase handelt ( $LC_{50}$ -Wert = 2 nM).<sup>[29]</sup> Mit verschiedenen Palmerolid A Analoga wurden später weiterführende biologische Untersuchungen gemacht, um Hinweise auf die Struktur-Aktivitätsbeziehung zu bekommen. Dabei stellte sich heraus, dass die Enamid-Einheit an der Seitenkette des Moleküls von entscheidender Bedeutung für seine biologische Aktivität zu sein scheint. Während das Norcarbam- Analogon lediglich eine um das fünffach geringere Aktivität im Vergleich zum Naturstoff aufweist, liegt die Aktivität aller getesteten Verbindungen, bei denen die Enamid-Einheit durch einen anderen Rest ersetzt wurde, bei  $> 10$  nM. Durch Anbinden eines aromatischen Rests an die intakte Enamid-Einheit im Molekül konnte dagegen sogar eine Steigerung der cytotoxischen Aktivität um das Zehnfache erreicht werden.<sup>[30]</sup> Mit Hilfe solcher Ergebnisse erhält man Hinweise, wie

eine neue, möglichst noch potentere oder, durch einfachere Struktur leichter zugängliche, trotzdem aktive Substanz aussehen könnte.

Sein außergewöhnliches Aktivitätsprofil und die Tatsache, dass Palmerolid A (**1**) aufgrund seines natürlichen Vorkommens nur in sehr limitierter Menge zur Verfügung steht, hat unser Interesse an diesem Naturstoff geweckt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine Totalsynthese für Palmerolid A (**1**) entwickelt und praktisch durchgeführt, auf die nun in den folgenden Kapiteln näher eingegangen werden soll.

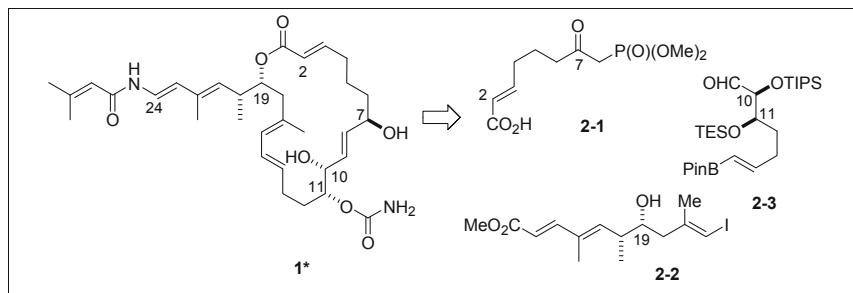
## 2.2. Totalsynthesen von Palmerolid A

Nachdem im Jahre 2006 erstmals von dem Naturstoff Palmerolid A (**1**) berichtet und die vermeintliche Struktur aufgeklärt wurde, erschienen 2007 zunächst von der Arbeitsgruppe J. K. De Brabander et al.<sup>[4]</sup> und wenig später von K. C. Nicolaou et al.<sup>[5]</sup> die ersten beiden Totalsynthesen zu diesem Naturstoff. Sie haben beide die postulierte Struktur **1\*** totalsynthetisch hergestellt und anhand von spektroskopischen Daten unabhängig voneinander festgestellt, dass sie nicht identisch mit der Struktur des Naturstoffes ist. J. K. De Brabander et al. konnten durch Vergleiche der CD-Spektren des Naturstoffes und einer synthetisierten, diastereoisomeren Verbindung Rückschlüsse auf die absolute Konfiguration des Naturstoffes ziehen und postulierten einen Strukturvorschlag von Palmerolid A (**1**), der von Nicolaou et al. aufgegriffen und schließlich durch seine Synthese bewiesen werden konnte. Gegen Ende des Jahres 2009 wurde eine weitere Totalsynthese dieses Naturstoffes von der Arbeitsgruppe D. G. Hall et al. publiziert,<sup>[31]</sup> so dass bisher, unsere mit eingeschlossen, neben diversen Publikationen zu einzelnen Fragmenten,<sup>[32]</sup> vier verschiedene Totalsynthesen für Palmerolid A (**1**) bekannt sind. Kürzlich wurde außerdem von der Arbeitsgruppe um K. P. Kaliappan eine formale Totalsynthese von Palmerolid A (**1**) vorgestellt.<sup>[33]</sup> Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über einige dieser bereits publizierten Arbeiten gegeben werden, bevor detailliert auf unseren Syntheseweg eingegangen wird.

Die Nummerierung einzelner Atome innerhalb der in diesem und den darauf folgenden Kapiteln 3 und 4 dargestellten Moleküle weicht von den IUPAC-Regeln ab. Zur besseren Übersicht orientiert sie sich an der Nummerierung der Atome im Naturstoff Palmerolid A (**1**).

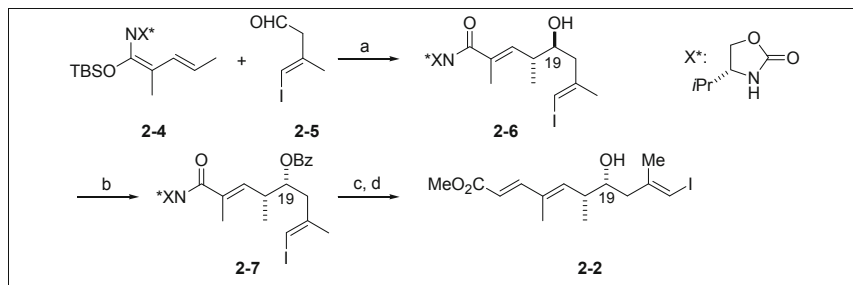
### 2.2.1 Totalsynthese nach J. K. De Brabander et al.<sup>[4]</sup>

In dieser Synthese wird das Molekül in die Hauptfragmente **2-1**, **2-2** und **2-3** zerlegt (**Abbildung 7**). Sie werden durch eine Kreuzkupplungsreaktion und eine Veresterung miteinander verbunden und anschließend durch eine intramolekulare Wittig-Horner-Emmons-Olefinierung cyclisiert. Das N-Acyldienamid in der Seitenkette wird durch eine Curtius-Umlagerung mit anschließendem Abfangen des Isocyanats durch 2-Methyl-1-propenylmagnesiumbromid<sup>[34]</sup> etabliert.



**Abbildung 7:** Retrosynthetische Analyse nach J. K. De Brabander et al.

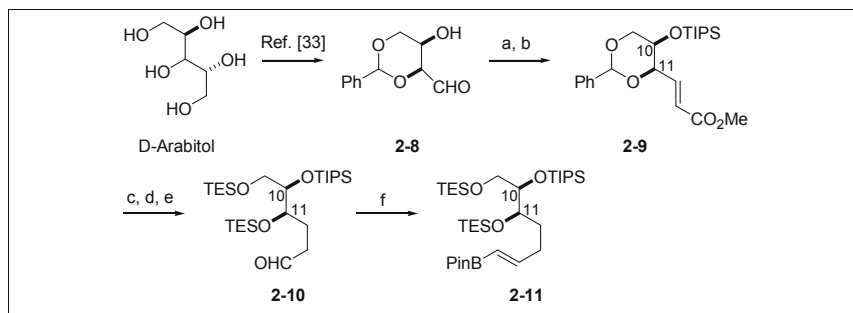
Zur Darstellung von Fragment **2-2** werden ausgehend von Verbindung **2-4** zunächst die Stereozentren an C19 und C20 durch eine vinyloge Mukaiyama-Aldol-Reaktion mit dem Aldehyd **2-5**<sup>[35]</sup> etabliert. Nach einer Mitsunobu-Inversion erhält man die gewünschte *syn* Konfiguration **2-7**. Das Auxiliar und der Benzoatrest werden in einem Schritt abgespalten und der entstehende Aldehyd wird zu seinem homologen Ester **2-2** umgesetzt (**Schema 1**).



**Schema 1:** Darstellung des Fragments **2-2**

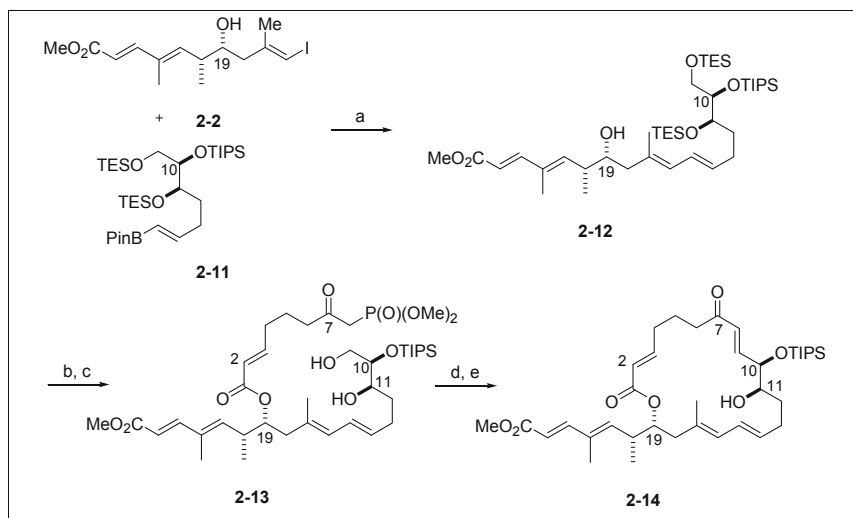
Reaktionsbedingungen: (a)  $TiCl_4$ ,  $CH_2Cl_2$ ,  $-78^\circ C$  (80%); (b)  $PhCO_2H$ , DEAD,  $PPh_3$ ,  $0^\circ C$  (66%); (c) DIBAL-H,  $CH_2Cl_2$ ,  $-78^\circ C$  (93%); (d)  $Ph_3PCHCO_2Me$ , Benzol,  $80^\circ C$  (97%).

Als Ausgangssubstanz zur Synthese von Fragment **2-3** dient *D*-Arabitol. Nach einer Acetalisierung und oxidativen Spaltung des  $\alpha$ -Diols erhält man den Aldehyd **2-8**<sup>[36]</sup>, der, silylgeschützt, in einer Wittig-Reaktion zum Alken **2-9** umgesetzt wird. Anschließende Hydrierung, gefolgt von der Silylschätzung beider Alkoholfunktionen und Ester-Reduktion führt zu Aldehyd **2-10**. Kondensation mit Pinacoldichloromethylboronat<sup>[37]</sup> unter Takai-Bedingungen liefert das zur Kreuzkupplung benötigte Vinylboran **2-11** (**Schema 2**).

**Scheme 2:** Darstellung des Fragments **2-11**

Reaktionsbedingungen: (a)  $\text{Ph}_3\text{PCHCO}_2\text{Me}$ , Toluol, Rückfluss (99%); (b) TIPSOTf, 2,6-Lutidin,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ ; (c) Pd/C,  $\text{H}_2$ , EtOAc, RT (95%, 2 Stufen); (d) TESCl, Imidazol, DMF, RT (93%); (e) DIBAL-H,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-78^\circ\text{C}$  (93%); (f) Pinacoldichloromethylboronat,  $\text{CrCl}_2$ , Lil, THF, RT (84%).

Dieses wird in einer Suzuki-Kreuzkupplung mit Fragment **2-2** zum Dien **2-12** umgesetzt.

**Scheme 3:** Verknüpfung der Fragmente **2-1**, **2-2** und **2-11**

Reaktionsbedingungen: (a) cat. Pd( $\text{PPh}_3$ )<sub>4</sub>,  $\text{Ti}_2\text{CO}_3$ , THF/ $\text{H}_2\text{O}$ , RT (79%); (b) **2-1**, 2,4,6- $\text{Cl}_3\text{BzCl}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMAP, Toluol, RT (69%); (c) PPTS, MeOH,  $0^\circ\text{C}$  (95%); (d)  $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ , TEMPO,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ , RT; (e)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 18-crown-6, Toluol,  $60^\circ\text{C}$  (70%, 2 Stufen).

Nach Veresterung mit Fragment **2-1**, dargestellt aus  $\delta$ -Valerolacton,<sup>[38]</sup> und anschließender TES-Entschützung erhält man Verbindung **2-13**, die selektiv an der primären Hy-