

Studien zum synthetischen Zugang zu Ripostatinen und deren Analoga

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. –
genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Wufeng Tang
geboren am 06.11.1981 in Jiangsu, China

2014

Die vorliegende Arbeit wurde unter den Leitungen von Prof. Dr. Markus Kalesse und Dr. Evgeny Prusov in der Zeit von Mai 2011 bis April 2014 in der Abteilung Medizinische Chemie am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig angefertigt.

Referent: Prof. Dr. Markus Kalesse

Korreferent: Prof. Dr. Andreas Kirschning

Tag der Promotion: 16.07.2014

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Professor Dr. Markus Kalesse für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, an einem so spannenden herausfordernden Thema zu arbeiten. Ich danke Ihnen, sehr geehrter Herr Dr. Evgeny Prusov für Ihre Unterstützung und die intensive Betreuung während der Promotion.

Ich danke Herrn Professor Dr. Andreas Kirschning für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Für die Korrekturvorschläge und hilfreichen Anmerkungen zu dieser Dissertation bedanke ich mich ganz herzlich bei Anne Wodtke, Nicole Bruns, Jan Geldsetzer, Johanna Trenner.

Bei den Mitarbeitern der NMR-Abteilung und des Massenspektrometriezentrums an der Uni Hannover und bei Christel Kakoschke (Abteilung Struktur und Funktion der Proteine am HZI) möchte ich mich für ihre Freundlichkeit und die Aufnahme zahlreicher NMR- und Massenspektren bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitgliedern der Abteilungen Medizinische Chemie und Mikrobielle Wirkstoffe am HZI in Braunschweig für die gute Zusammenarbeit, das tolle Arbeitsklima und die nette Atmosphäre innerhalb der Gruppe bedanken.

Ganz besonderer Dank gibt meinen Eltern dafür, dass sie immer für mich da sind und mich in allen Situationen so großartig unterstützt haben.

Kurzfassung (Deutsch)

Wufeng Tang

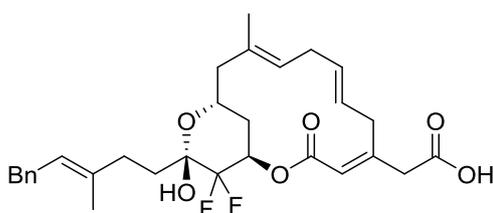
Studien zum synthetischen Zugang zu Ripostatinen und deren Analoga

Schlagworte: RNA-Polymerase-Inhibitor, Difluor-Ripostatin, Ringschlussmetathese, Carboaluminierung, Stille-Kreuzkupplung, Reformatsky-Aldolreaktion

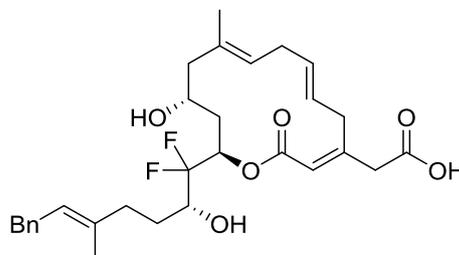
Ripostatin A und B sind 14-gliedrige Makrolactone, die aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* isoliert wurden. Sie besitzen antibiotische Eigenschaften gegen Gram-positive Bakterien (MIC ~ 1 µg/mL). Im Vergleich zum Rifampicin, ein klinischer RNA-Polymerase-Inhibitor, binden Ripostatine an eine andere Bindungsstelle der RNA-Polymerase. Die Ripostatine können als potentielle Leitstrukturen zur Entwicklung neuer Antibiotika dienen.

In der vorliegenden Dissertation werden neue synthetische Zugänge zu den Ripostatinen und deren Analoga beschrieben. Der Schlüsselschritt in der Totalsynthese von Ripostatin A und B ist der Aufbau des 1,4,7-nicht-konjugierten Triens über eine Ringschlussmetathese nach einer doppelten Stille-Kreuzkupplung. Für die Synthese des 15-Deoxyripostatins A wurden eine Prins-Reaktion und ein modifiziertes Eintopfverfahren aus einer Carboaluminierung des terminalen Alkins mit einer anschließenden Kreuzkupplung verwendet. Der Aufbau des Makrolactones des 5,6-Dihydro-Ripostatins wurde über eine intramolekulare Suzuki-Kreuzkupplung realisiert. Zur Einführung von Fluor in Difluor-Ripostatin A und B wurde zu Beginn eine Reformatsky-Aldolreaktion mit einem Halogenketon durchgeführt.

In SAR-Studien wurde durch Analyse der inhibitorischen Wirkung von Ripostatinanaloga auf die RNA-Polymerase belegt, dass die monozyklische Form des Ripostatin A die aktive Form von Ripostatin ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die C5-C6-Doppelbindung wichtig für die Aktivität ist.



Difluor-Ripostatin A



Difluor-Ripostatin B

Abstract (English)

Wufeng Tang

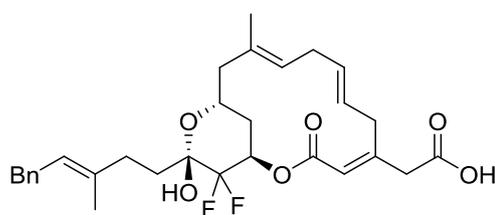
Studies on synthetic access toward Ripostatins and their analogs

Keywords: RNA-polymerase inhibitor, difluororipostatin, ring closing metathesis, carboalumination, Stille cross-coupling, Reformatsky aldol reaction

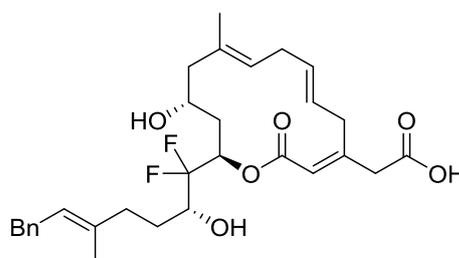
Ripostatin A and B are 14-membered macrolactones, which were isolated from the myxobacteria *Sorangium cellulosum*. They exhibit antibiotic properties against gram-positive bacteria (MIC ~ 1 µg/mL). Compared to rifampicine, one of the RNA-polymerase inhibitors counterparts already in clinical use, they bind to a different binding site of the RNA-polymerase. Therefore they can be used as lead structures to develop new antibiotics.

In this dissertation, new synthetic routes toward ripostatins and their analogs will be described. The key step of the total synthesis of ripostatin A and B is the construction of the 1,4,7-unconjugated triene through a ring closing metathesis after a double Stille cross-coupling. The Application of a Prins reaction and a one-pot procedure consisting of a carboalumination of the terminal alkyne and a subsequent cross-coupling is noteworthy step of the synthesis of 15-deoxyripostatin. The formation of the macrolactone ring of dihydroripostatin A was accomplished by using an intramolecular Suzuki cross-coupling reaction. The fluorines of difluororipostatin A and B were introduced by manipulating the haloketone through a Reformatsky aldol reaction.

The SAR derived from analyses of the RNA-polymerase inhibitory and antibacterial activities of the ripostatin analogs indicate that the monocyclic form of ripostatin A is the active form of ripostatin A and that C5-C6 double band is important for its activity.



Difluoro-Ripostatin A



Difluoro-Ripostatin B

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Antibakterielle Naturstoffe | 1 |
| 1.2 | Ripostatine: Isolierung, Strukturaufklärung und Bioaktivität..... | 3 |
| 1.3 | Ripostatine: RNA-Polymerase-Inhibitoren..... | 6 |
| 1.4 | Stand der Forschung zu den Ripostatinen..... | 8 |
| 2 | Ziel der Arbeit..... | 12 |
| 3 | Zusammenfassung..... | 13 |
| 3.1 | Totalsynthese des RNA-Polymerase-Inhibitors Ripostatin B und 15-Deoxy- Ripostatin A..... | 13 |
| 3.2 | Totalsynthese von Ripostatin A..... | 17 |
| 3.3 | Synthese und Evaluierung neuer Ripostatinanaloga..... | 21 |
| 4 | Ausblick | 28 |
| 5 | Publikationen..... | 31 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| AIDS | Acquired Immune Deficiency Syndrome |
| 9-BBN | 9-Borabicyclo[3.3.1]nonan |
| Bn | Benzyl |
| Bu | Butyl |
| Cp | Cyclopentadienyl |
| CSA | Camphersulfonsäure |
| DCC | Dicyclohexylcarbodiimid |
| DCM | Dichlormethan |
| DIAD | Diisopropylazodicarboxylat |
| DIBAL-H | Diisobutylaluminiumhydrid |
| DIP-Cl | B-Chlordiisopinocampheylboran |
| DMAP | 4-(Dimethylamino)-pyridin |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMP | Dess-Martin-Periodinan |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dppf | 1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen |
| dr | Diastereoselektivität |
| Et | Ethyl |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| IC ₅₀ | Mittlere inhibitorische Konzentration |
| Me | Methyl |
| MIC | Minimale Hemmkonzentration |
| MRSA | Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> |
| NaHMDS | Natrium-bis(trimethylsilyl)amid |
| NOE | Kern-Overhauser-Effekt |
| Ph | Phenyl |
| PPTS | Pyridinium <i>p</i> -toluenesulfonat |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAP | Ribonukleinsäure Polymerase |
| RT | Raumtemperatur |
| SAR | Struktur-Aktivität-Beziehung |
| TASF | Tris(dimethylamino)sulfonium-difluortrimethylsilicat |
| TBAF | Tetra- <i>n</i> -butylammoniumfluorid |
| TBDPS | Tributyldiphenylsilyl |
| TBS | <i>tert</i> -Butyldimethylsilyl |
| TCBC | 2,4,6-Trichlorbenzylchlorid |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| THF | Tetrahydrofuran |
| TMS | Trimethylsilyl |

1 Einleitung

1.1 Antibakterielle Naturstoffe

Seit Antibiotika wie Sulfonamide und Penicillin zur Behandlung von Infektionskrankheiten in den Jahren 1935 und 1940 eingesetzt wurden, ist die einst hohe Mortalitätsrate bei bakteriellen Erkrankungen stark zurückgegangen.^[1] Anschließend folgte zwischen 1940 und 1960 das „goldenen Zeitalter“, in welchem viele antibakterielle Substanzen zugelassen wurden. Die meisten, der in diesem Zeitraum zugelassen Strukturen waren Naturstoffe wie: β -Lactame (1940), Tetracycline (1949), Chloramphenicol (1949), Aminoglycoside (1950), Makrolide (1952), Glycopeptide (1958) und Streptogramine (1962).^[2] Mit den genannten Antibiotika wurden Millionen Menschenleben gerettet und das Leiden vieler Patienten erleichtert. In den 1970er Jahren sagte der U. S. Surgeon General (Dr. William H. Stewart) „It is time to close the book on infectious diseases, and declare the war against pestilence won“.^[3] Diese Fehleinschätzung führte zu einer nachlassenden Unterstützung der antibakteriellen Forschung durch die Industrie und es folgte im Anschluss an die erfolgreiche Entwicklung der antibakteriellen Substanzen eine jahrzehntelange Innovationslücke. Bis zum Jahr 2000 wurde ausschließlich ein Oxazolidinon (Linezolid),^[4] welches auf einen Screening-Hit der Firma DuPont zurückging, als Antibiotikum zugelassen. Infektionskrankheiten sind heute dennoch die zweithäufigste Todesursache weltweit und die dritthäufigste Todesursache in Industrienationen.^[5] Im Jahr 2005 starben in den USA etwa 19.000 Menschen aufgrund der Infektion mit Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA).^[6] Zunehmende Resistenzen treten immer häufiger nach der Entwicklung und des Einsatzes neuer Antibiotika auf. *Fluoroquinolone* wurde zur Infektionsbehandlung in Kliniken in den 1980er Jahren eingeführt. Die MRSA Stämme zeigten jedoch gegen Ciprofloxacin, die erste Generation der

¹ S. Rachakonda, L. Cartee, *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 775-793.

² H. Labischinski, *J. Med. Microbio.* **2001**, *291*, 317-318; b) M. S. Butler, A. D. Buss, *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 914-929.

³ B. Spellberg, *Clin Infect Dis.* **2008**, *47*, 294.

⁴ M. R. Barbachyn, C. Ford, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2056-2144; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2010-2023.

⁵ a) World Health Organisation (WHO) Geneva, *World Health Report-2002*, **2002**; b) C. Nathan, *Nature* **2004**, *431*, 899-902.

⁶ R. M. Klevens, M. A. Morrison, J. Nadle, S. Petit, K. Gershman, S. Ray, L. H. Harrison, R. Lynfield, G. Dumyati, J. M. Townes, A. S. Craig, E. R. Zell, G. E. Fosheim, L. K. McDougal, R. B. Car, R. B. Carey, S. K. Fridkin, *JAMA* **2007**, *298*, 1763-1771.

Fluoroquinolon Antibiotika, bereits Anfang der 1990er Jahre Resistenzen.^[7] Viele bekannte antibakterielle Wirkstoffe befinden sich bis heute in der dritten oder vierten Generation und verlieren mit der Zeit aufgrund von Monoresistenzen oder Multiresistenzen ihre Wirkung.^[8] Deshalb ist es notwendig, zur Therapie von Infektionen mit resistenten Erregern, neue Antibiotika mit neuer chemischer Struktur und neuen Targets im Bakterienstoffwechsel zu entwickeln. Sie besitzen aufgrund neuer Wirkmechanismen und neuer Targets keine Kreuzresistenzen zu anderen, sich bereits auf dem Markt befindenden Antibiotikagruppen.^[9]

Naturstoffe als Quelle von möglichen Leitstrukturen für neue Antibiotika spielen für die Suche nach antibakteriellen Wirkstoffen eine besonders wertvolle Rolle.^[10] Von 1981 bis 2002 beruhten 75 % der neu zugelassenen Antibiotika auf Leitstrukturen aus Naturstoffen, 21 % der Neuzulassungen sind rein synthetische Medikamente.^[11] Bioaktive Naturstoffe sind meist Sekundärmetabolite aus Pilzen, Pflanzen, Algen oder Mikroorganismen.^[12] Nur selten können Naturstoffe (Daptomycin, Erythromycin, Penicillin G, Tetracyclin und Vancomycin) in unveränderter Form direkt als Medikament zur Therapie von Krankheiten eingesetzt werden (Abbildung 1). In der Regel müssen chemische Optimierungsprozesse durchgeführt werden. Dabei wird die ursprüngliche Struktur modifiziert, um physikochemische, toxikologische, pharmakologische oder pharmakokinetische Eigenschaften zur Nutzung als Arzneistoff zu verbessern. Derivate mit verbesserten Eigenschaften werden daher meist durch chemische Totalsynthese oder Semisynthese gewonnen.

⁷ a) M. E. Mulligan, P. J. Ruane, L. Johnston, P. Wong, J. P. Wheelock, K. MacDonald, *Am J Med.* **1987**, *82*, 215-219; b) D. Diekema, M. Pfaller, F. Schmitz, J. Smayevsky, J. Bell, R. Jones, M. Beach, *Clin Infect Dis.* **2001**, *32*, 114-132.

⁸ F. v. Nussbaum, M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand, D. Häbich, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5194-5254; *Angew.Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5072-5132.

⁹ U. Holzgrabe, *Chemother. J.* **2004**, *13*, 142-147.

¹⁰ a) M. S. Butler, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 2141-2153; b) M. S. Butler, *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 162-195.

¹¹ D. J. Newmann, G. M. Cragg, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022-1037.

¹² a) S. Sasso, G. Pohnert, M. Lohr, C. Hertweck, *FEMS Microbiol Rev.* **2012**, *36*, 761-785; b) H. Reichenbach, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *27*, 149-156.

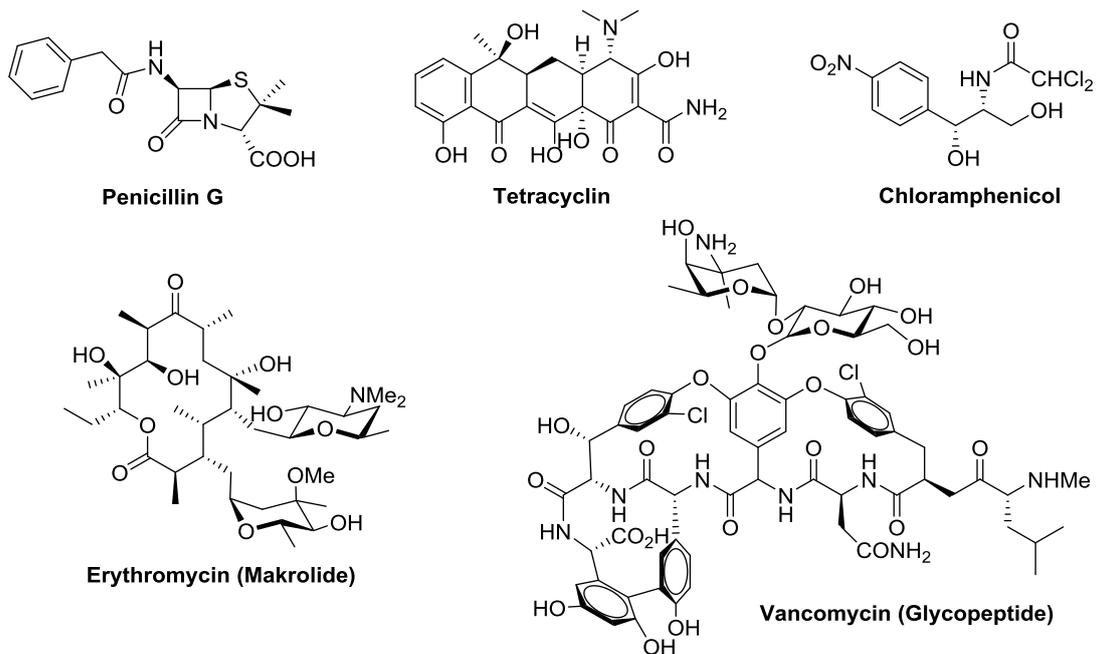


Abbildung 1: Beispiele für Leitstrukturen aus Naturstoffen.^[8]

Semisynthese ist aufgrund der erwiesenen Wirtschaftlichkeit häufig die beste Methode zur Entwicklung von neuen Antibiotika in der Industriepraxis. Die Materialverfügbarkeit der Naturstoff-Leitstruktur ist jedoch begrenzt. Ursachen dafür liegen darin, dass viele Produzentenstämme entweder nicht verfügbar sind oder nicht kultiviert werden können. Weiterhin können viele Organismen zwar unter Kulturbedingungen wachsen, produzieren aber keine antibiotischen Wirkstoffe.^[8] Trotz dessen ist eine Vielzahl antibakterieller Naturstoffe bereits auf dem Markt etabliert. Die meisten sind Fermentationsprodukte und durch anschließende chemische Synthese modifizierte Strukturen.^[13] Im Gegensatz dazu kann die Totalsynthese zur umfassenden Modifikation und Optimierung der Antibiotika angewendet werden. Sie spielt besonders bei der Entdeckung und Entwicklung von Arzneimitteln eine signifikante Rolle.^[14] Nach der Synthese der naturidentischen Wirkstoffe können mit Hilfe dieser verwandte, optimierte Analoga synthetisiert werden.

1.2 Ripostatine: Isolierung, Strukturaufklärung und Bioaktivität

Ripostatine sind durch das Myxobakterium *Sorangium cellulosum* (So ce 377) produzierte Sekundärmetabolite. Die Strukturen wurden von den Arbeitsgruppen um Höfle und Reichenbach am HZI in Braunschweig im Jahr 1995 isoliert und aufgeklärt.^[15] Durch

¹³ H. -D. Arndt, C. Hackenberger und D. Schwarzer, *Chem. Unserer Zeit*, **2010**, *44*, 130-137.

¹⁴ K. C. Nicolaou, D. Vourloumis, N. Winssinger, P. S. Baran, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 46-126; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 44-122.

¹⁵ H. Irschik, H. Augustiniak, H. Reichenbach und G. Höfle, *Liebigs Ann.* **1996**, 1657-1663.

Fermentation konnten die Ripostatine in einer Konzentration von 30 mg/L Kulturmedium produziert werden, wobei ein Komponentengemisch aus Ripostatin A, B und C (Abbildung 2) erhalten wurden. Ripostatine sind farblose ölige Substanzen mit hoher Viskosität. Aufgrund ihrer biologischen Eigenschaft die bakterielle **Ribonukleinsäure-Polymerase** zu inhibieren, werden sie als **Ripostatine** bezeichnet.

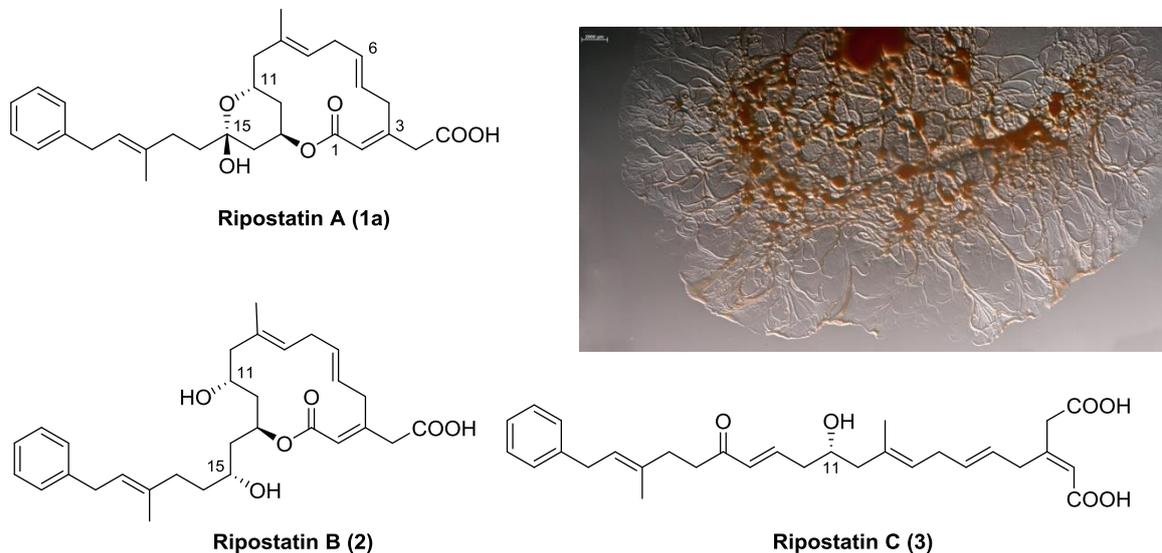


Abbildung 2: Strukturen der Ripostatine^[15] und das mikroskopische Foto von *Sorangium cellulosum* (So ce 377) auf einer Agarplatte.

Ripostatin A und B sind 14-gliedrige Makrolactone mit einer Essigsäurefunktionsgruppe und einer Phenylalkenyl-Seitenkette. Die Geometrie der drei Doppelbindungen wird als *2E*, *5E* und *8E* bezeichnet. Sie liegen als ein ungewöhnliches nicht-konjugiertes 1,4,7-Triensystem vor, welches durch NOE-Differenzspektren bestimmt wurde. Die Stereozentren von Ripostatin A (*11R*, *13R*, *15S*) und Ripostatin B (*11R*, *13S*, *15R*) wurden durch die Methode von Helmchen^[16] in Kombination mit *NOE*-Messungen aufgeklärt. Im Vergleich zum Ripostatin B ist das Ripostatin A an der C15-Position oxidiert. Es liegt in Methanol als ein 4:3 tautomerisiertes Gemisch aus der offenen Keto- und der Hemiketalform vor. Die vorhandene Ketoform kann leicht durch β-Eliminierung der Acetoxygruppe zum Ripostatin C (Abbildung 3), mit nur einem Stereozentrum an der C11-Position (*S*-Konfiguration), umgewandelt werden. Dies konnte durch die Erwärmung des Ripostatin A in einer Pufferlösung von pH 8 bei 40°C gezeigt werden. Nach einer Stunde wurden 36 % des Ripostatin A in Ripostatin C überführt. In Anbetracht der sehr milden alkalischen Bedingungen ist Ripostatin C vermutlich bei der Fermentation entstanden und keine direkt von Organismus produzierte Struktur. Im Gegensatz dazu ist das Ripostatin B unter sauren

¹⁶ G. Helmchen, *Tetrahedron* **1974**, *16*, 1527-1530.

Bedingungen stabil. Ausschließlich wird das Lacton unter stark basischen Bedingungen (pH=12) hydrolytisch geöffnet.

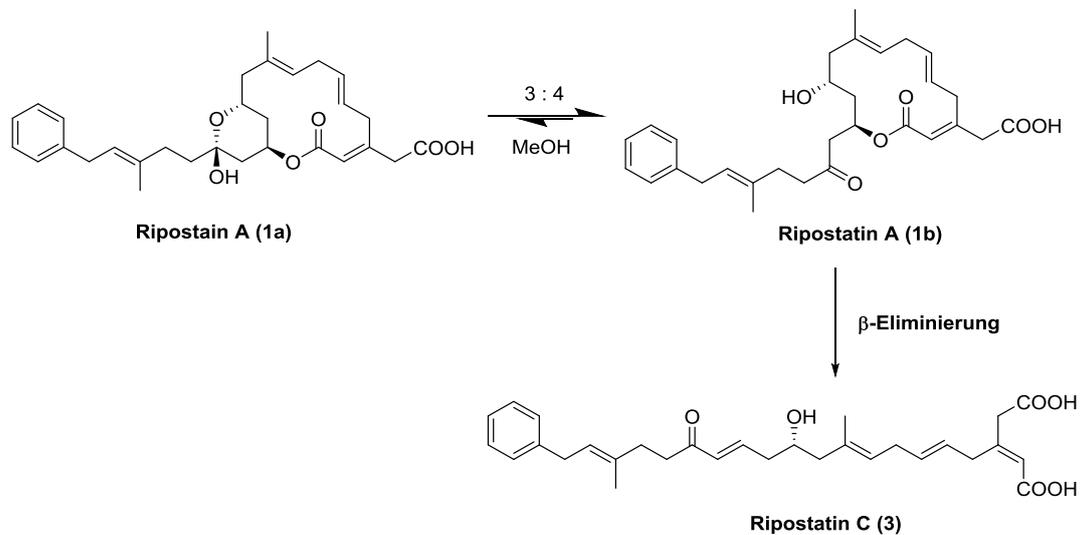


Abbildung 3: Gleichgewicht des Ripostatins A mit Hemiketal- und Ketoform in Methanol und β-Eliminierung zu Ripostatin C.^[15]

Der polyketidische Ursprung der Ripostatine konnte durch Fütterungsversuche mit ¹³C-markierten Bausteinen bestätigt werden. Dabei wurden in das Ripostatin A (1a) eine Propionateinheit, eine Phenylalanineinheit und 10 Acetateinheiten eingebaut. Acht der zehn Acetat-Einheiten dienen zum Aufbau der polyketidischen Kette, eine für die exocyclische Carbonsäure und eine für die Methylgruppe (Abbildung 4). Bei der Biosynthese von Ripostatin dient Phenylalanin als Starteinheit.

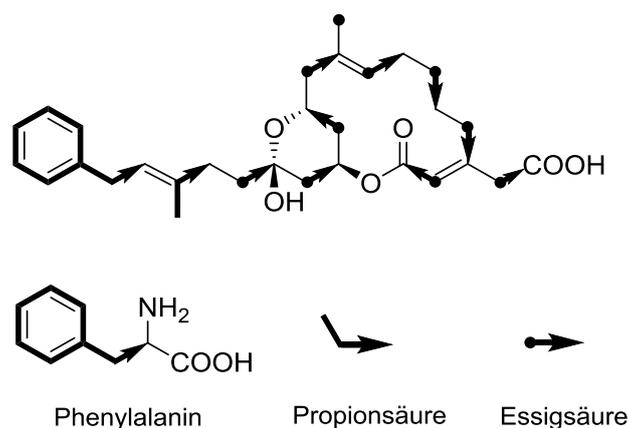


Abbildung 4: Fütterungsversuch von ¹³C-markierten Bausteinen im Ripostatin A.^[15]

Die biologische Aktivität der Ripostatine wurde am HZI in Braunschweig intensiv untersucht.^[17] Ripostatin A und B haben vergleichbare hemmende Wirkungen gegen gram-positive Bakterien, insbesondere gegen *Staphylococcus aureus* (GBF, DSM 20232), mit einem MIC-Werte um 1 µg/mL. Zusätzlich wirkt Ripostatin B (2) schwach gegen Hefen und Pilze (*Picha membranaefaciens*, *Nadsonia fulvescens*) und ist moderat zytotoxisch auf L-929 Zellen mit einem MIC-Wert um 2.8 µg/mL. Im Vergleich dazu ist das Ripostatin C in durchgeführten Antibiotikatests biologisch inaktiv.

Der Wirkungsort der Ripostatine konnte in verschiedenen Versuchen an *Staphylococcus aureus* aufgeklärt werden. Dabei wurde ein geringer Einfluss auf die DNA-Synthese, 45 Min nach der Zugabe von Ripostatin A, beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde die Proteinbiosynthese bereits 15 Min nach der Zugabe von Ripostatin A gehemmt und die bakterielle RNA-Synthese komplett inhibiert. Die Versuche ließen vermuten, dass die Ripostatine die bakterielle RNA-Polymerase hemmen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Ripostatin A die aus *E. coli* isolierte RNA-Polymerase (EC 2.7.7.6, Boehringer Mannheim) mit einem IC₅₀-Wert von 0.1 µg/mL inhibiert, wobei eine komplette Inhibierung ab 50 µg/mL erreicht wird. Die kinetischen Studien zeigten, dass während der RNA-Synthese der Schritt der Ketteninitiation und nicht der Schritt der Kettenverlängerung gehemmt wird. Aufgrund fehlender Kreuzresistenzen von Ripostatin mit Rifampicin und Sorangicin, zwei bakteriellen RNA-Polymerase-Inhibitoren, kann angenommen werden, dass die Bindungsstelle an die RNA-Polymerase eine andere als die von Rifampicin und Sorangicin ist. Bioaktivere Derivate des Ripostatins stellen daher interessante Kandidaten für die Entwicklung neuer RNA-Polymerase-Inhibitoren dar.

1.3 Ripostatine: RNA-Polymerase-Inhibitoren

Die RNA-Polymerase katalysiert die RNA-Synthese bei der Transkription der DNA. Der Transkriptionsvorgang ist ein wesentlicher Teilprozess der Genexpression und setzt sich aus der Initiation, Elongation und Termination zusammen. In Eukaryoten und Bakterien ist die RNA-Polymerase ein essentielles Enzym für das Wachstum. Während bei eukaryotischen RNA-Polymerasen eine strukturelle Vielfalt der Proteine in verschiedenen Organismen existiert, gibt es bei Bakterien nur eine hochkonservierte RNA-Polymerase.^[18] Deshalb stellt dieses Enzym ein attraktives Target für die Suche nach Antibiotika dar. Bis heute gibt es nur

¹⁷ H. Irschik, H. Augustiniak, K. Gerth, G. Höfle, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 787-792.

¹⁸ a) I. Chopra, *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2007**, *8*, 600-607; b) P. Cramer, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 89-97.

eine Substanzklasse von RNA-Polymerase-Inhibitoren (Rifamycin^[19]), welche klinisch eingesetzt wird. Das Enzym besteht aus fünf Proteinuntereinheiten ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) mit einem leicht dissoziierbaren σ -Faktor und besitzt eine Ähnlichkeit zu zwei Zangen. In dem Spalt zwischen den zwei Zangen der β und β' -Untereinheit befindet sich das Mg^{2+} -haltige aktive Zentrum, in welchem die DNA lokalisiert ist. Vor dem Beginn der Transkription öffnen sich die Zangen und schließen sich durch eine Drehung der β' -Untereinheit um die als Scharnier fungierende Switch-Region. In der offenen Form tritt die doppelsträngige DNA ein und bindet im aktiven Zentrum. Nach dem Schließen der Zangen beginnt die Initiation der Transkription.^[20]

Das Rifampin, ein semisynthetisches Rifamycin, bindet nahe der aktiven Stelle der katalytischen β -Untereinheit (*rpoB*) und inhibiert die Elongation der Transkription. Es wird zur Infektionsbehandlung von Tuberkulose, Lepra und AIDS-assoziierten Mykobakterien oft in Kombination mit einem anderen wirksamen Antibiotikum (z. B. Isoniazid) eingesetzt.^[21] Mittlerweile wurden in Krankenhäusern jedoch erste Resistenzen gegen *Staphylococcus aureus* beobachtet.^[22] Die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Leitstrukturen von RNA-Polymerase-Inhibitoren, welche mit neuen Bindungsstellen der β -Untereinheit von RNA-Polymerasen koordinieren, ist offensichtlich. Bereits bekannte Strukturen mit diesem Target sind Holomycin,^[23] Thiolutin,^[24] Corallopyronin A,^[25] Ripostatin A und Myxopyronin A^[26] (Abbildung 5). Diese Naturstoffe stellen attraktive Forschungsobjekte dar, da sie Aktivität gegen Rifampin-resistente Mutationen von *Staphylococcus aureus* zeigen.^[27]

¹⁹ E. A. Campbell, N. Korzheva, A. Mustaev, S. Nair, A. Goldfarb, *Cell* **2001**, *104*, 901-912.

²⁰ D. Haebich, F. von Nussbaum, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3447-3451; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3397-3400.

²¹ G. L. Hobby, T. F. Lenert, *Am. Rev. Respir. Dis.* **1970**, *102*, 462-465.

²² H. G. Floss, T. -W. Yu, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 621-632.

²³ B. Oliva, A. O'Neill, J. M. Wilson, P. J. O'Hanlon, I. Chopra, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2001**, *45*, 532-539.

²⁴ G. Khachato, A. J. Tipper, *J. Bacteriol.* **1974**, *119*, 795-804.

²⁵ H. Irschik, R. Jansen, G. Höfle, K. Gerth, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 145-152.

²⁶ W. Kohl, H. Irschik, H. Reichenbach, G. Höfle, *Liebigs. Ann. Chem.* **1983**, 1656-1667.

²⁷ A. O'Neill, B. Oliva, C. Storey, A. Hoyle, C. Fishwick, I. Chopra, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2000**, *44*, 3163-3166.

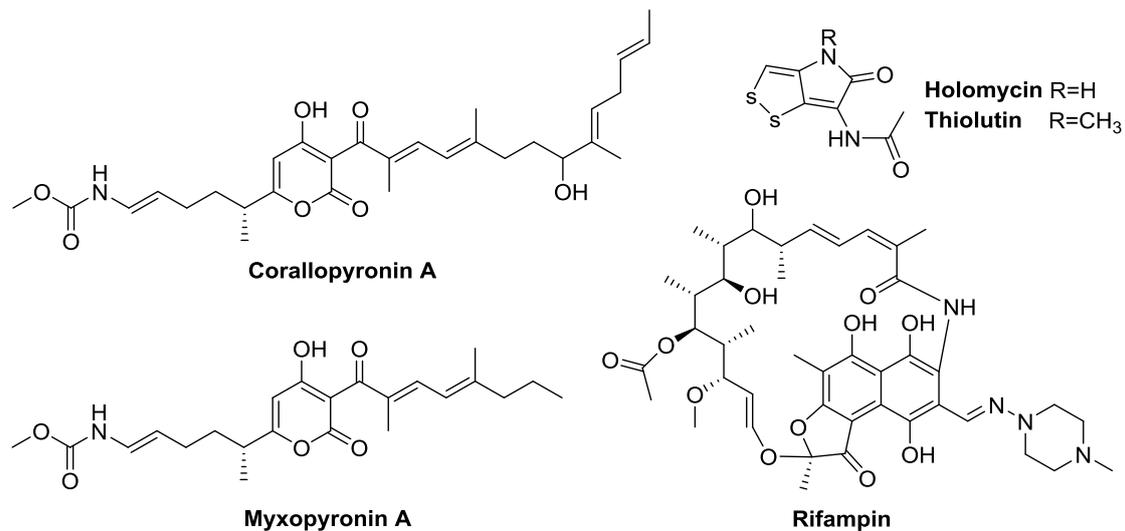


Abbildung 5: Strukturen verschiedener RNA-Polymerase-Inhibitoren.^[23, 24, 25, 26]

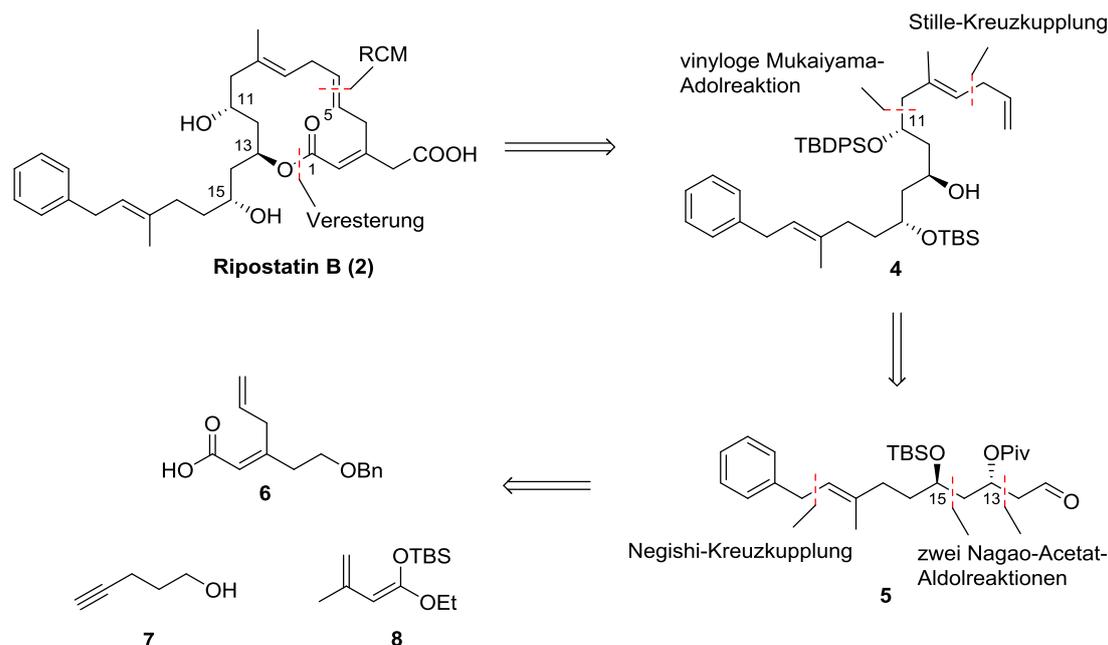
Im Jahr 2008 konnte eine neue hydrophobe Bindungsstelle an der RNA-Polymerase mithilfe von Myxopyronin A und entsprechenden Mutagenesestudien von *E. Arnold* und *Richard H. Ebright* aufgeklärt werden.^[28] Myxopyronin A bindet in der „Switch-Region“ der RNA-Polymerase am unteren Ende der β' -Untereinheit und arretiert damit die Drehung der β' -Untereinheit. Der Eintritt der doppelsträngigen Promoter-DNA in das aktive Zentrum des Enzyms wird damit verhindert. Dieser Angriffsort unterscheidet sich stark von dem des Rifamycins. Es wurde gezeigt, dass zwei weitere myxobakterielle Sekundärmetabolite auf analoge Art wirken: Corallopyronin A aus *Coralloccoccus coralloides* und das 14-gliedrige Makrolacton Ripostatin A. Corallopyronin A unterscheidet sich von Myxopyronin A durch eine längere, hydroxylierte Dienonseitenkette, während dem Ripostatin die strukturelle Ähnlichkeit zum Myxopyronin A fehlt.

1.4 Stand der Forschung zu den Ripostatinen

Zu Beginn unserer Arbeit waren nur Teilsynthesen der C1-C5- und C6-C24-Fragmente des Ripostatins B von *Kirschning et al.* aus dem Jahr 2006 veröffentlicht (Schema 1).^[29]

²⁸ J. Mukhopadhyay, K. Das, S. Ismail, D. Koppstein, M. Jang, B. Hudson, S. Sarafianos, S. Tuske, J. Patel, R. Jansen, H. Irschik, E. Arnold, R. H. Ebright, *Cell* **2008**, 135, 295-30.

²⁹ C. Kujat, M. Bock, A. Kirschning, *Synlett* **2006**, 419-422.

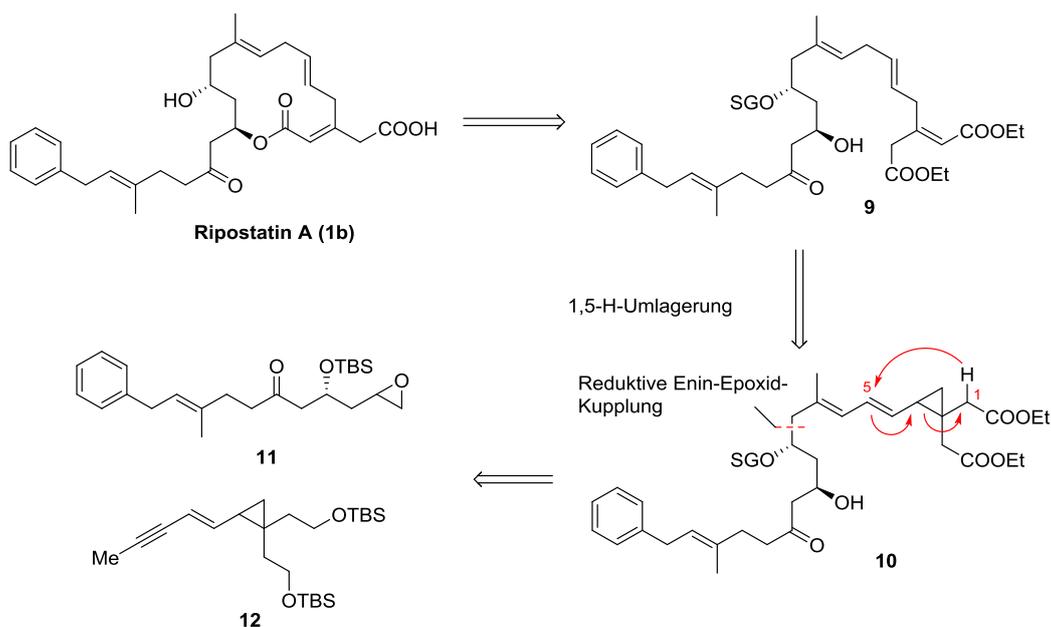


Schema 1: Retrosynthese des Ripostatins B von *Kirschning et al.*^[29]

Zum Aufbau der zwei Stereozentren C13 und C15 wurde eine zweifache Nagao-Acetat-Aldolreaktion eingesetzt. Danach wurde das *cis*-1,3-Dien-Fragment **8** mittels einer vinylogen Mukaiyama-Aldolreaktion eingeführt und dabei das Stereozentrum C11 aufgebaut. Schließlich wurde die Allylgruppe in einer Stille-Kreuzkupplung mit Allylacetat eingeführt. Die Veresterung des Alkohols **4** mit dem Säurefragment **6** gelang allerdings wegen der nahen sperrigen TBS- und TBDPS-Schutzgruppen nicht. Das nicht-konjugierte 1,4-Dien der Carbonsäure **6** isomerisierte unter den basischen Reaktionsbedingungen zu einem konjugierten 1,3-Dien.

Im Jahr 2010 stellte *Schleicher* in seiner Dissertation eine Synthesestrategie des Ripostatins A über eine reduktive Enin-Epoxid-Kupplung vor, die im Jahr 2013 publiziert wurde (Schema 2).^[30]

³⁰ a) K. D. Schleicher, Dissertation, Massachusetts Institute of Technology, **2010**; b) K. D. Schleicher, T. F. Jamison, *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 1533-1550.

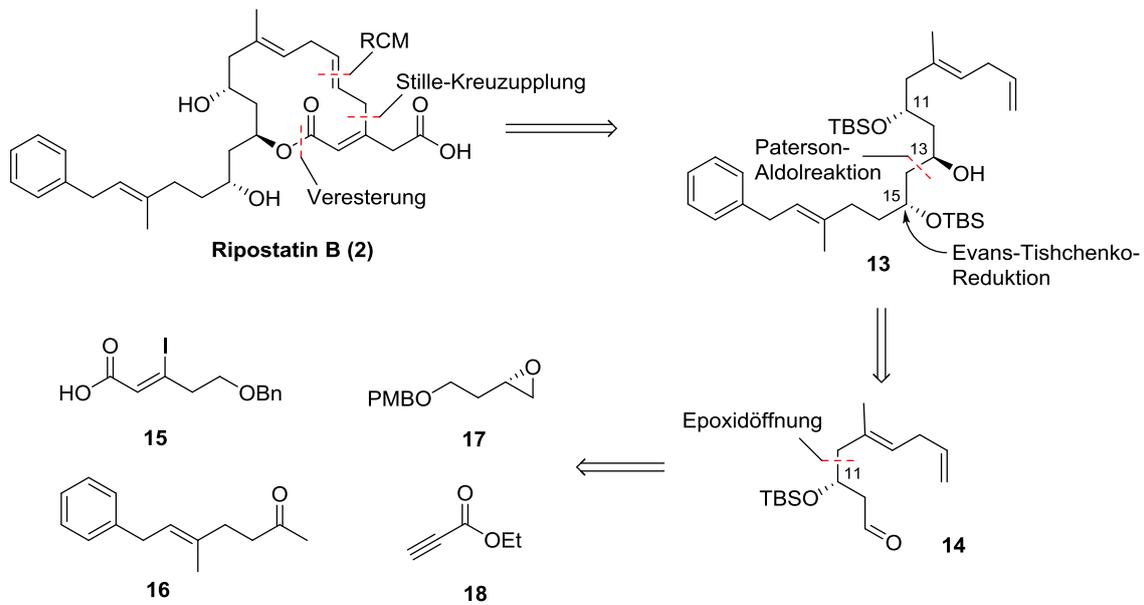


Schema 2: Retrosynthese des Ripostatins A von *Jamison et al.*; SG = Schutzgruppe.^[30b]

Zu Beginn konnte das Cyclopropanyldien von **10** aus dem Epoxid **11** und dem Enin **12** mithilfe einer Nickel(0)-katalysierten Reaktion hergestellt werden, danach sollte über eine 1,5-H-Umlagerung (rote Markierung) das Cyclopropanyldien in das 1,4,7-Trien **9** umgewandelt werden. In Testreaktionen konnte das Enin **12** mit mehreren Modellepoxiden verknüpft werden, die Regioselektivität konnte allerdings nicht ausreichend kontrolliert werden.

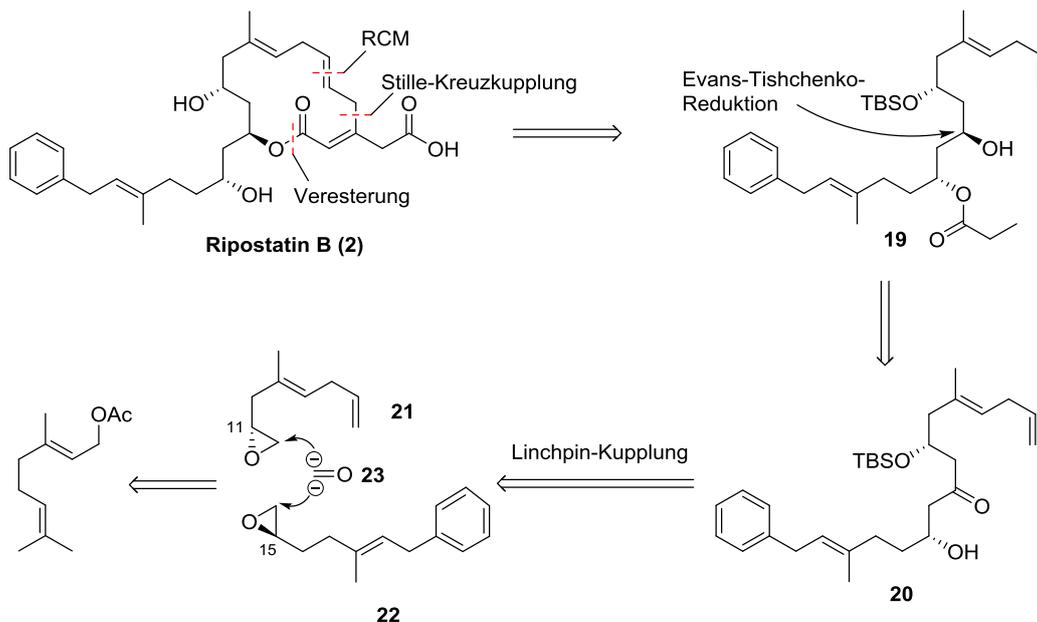
Im Jahr 2012 publizierten die Arbeitsgruppen von *Karl-Heinz Altmann* und *Mathias Christmann* jeweils unabhängig voneinander Totalsynthesen des Ripostatins B.^[31] In beiden Synthesen wurde das 1,4,7-Trien durch eine Ringschlussmetathese nach einer Stille-Kreuzkupplung aufgebaut, um das 14-gliedrige Makrolacton zu schließen. *Altmann et al.* bauten das Stereozentrum C11 über eine Epoxidöffnung des chiralen Epoxids **17** mit Ethylpropiolat **18** auf (Schema 3). Danach wurden die Stereozentren C13 und C15 mithilfe einer Paterson-Aldolreaktion aus dem Methylketon **16** und dem Aldehyd **14**, und einer anschließenden Evans-Tishchenko-Reduktion des β -Hydroxyketons aufgebaut.

³¹ a) F. Glaus, K. -H. Altmann, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 3461-3465; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3405-3409; b) P. Winter, W. Hiller, M. Christmann, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 3452-3456; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3396-3400.



Schema 3: Retrosynthese des Ripostatins B von *Altmann et al.*^[31a]

Im Vergleich dazu verwendeten *Christmann et al.* ein leicht verfügbares Geranylacetat als Startmaterial, welches in wenigen Schritten zu den Intermediaten **21** und **22** umgewandelt wurde (Schema 4). Sowohl das C11-, als auch das C15-Stereozentrum wurden über asymmetrische katalytische Methoden eingeführt. Das 1,3,5-Triol **19** wurde in einer Dreikomponenten-Linchpin-Kupplung aus den beiden chiralen Epoxiden **21** und **22** mit einem Formyl-Dianion-Äquivalent **23**, und einer Evans-Tishchenko-Reduktion aufgebaut.



Schema 4: Retrosynthese des Ripostatins B von *Christmann et al.*^[31b]

2 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines synthetischen Zugang zu den Ripostatinen, um Erkenntnisse über deren Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) zu erhalten. Die natürlichen Ripostatine sind durch Fermentation für *in-vitro*- und *in-vivo*-Analysen gut zugänglich (Ripostatin A: 25,3 mg/L; Ripostatin B: 1,0 mg/L). Im Vergleich zur Totalsynthese sind die Möglichkeiten zur Strukturmodifikation jedoch sehr beschränkt. Deshalb sollten stabilere Analoga von Ripostatin A (Abbildung 6) totalsynthetisch hergestellt werden. 15-Deoxy-Ripostatin A (**24**) fehlt die Hydroxygruppe an der C15-Position. Statt des labilen Hemiketals befindet sich im Kernstück des Moleküls ein wesentlich stabilerer Tetrahydropyranring. Das zweite Analogon, 14,14-Difluor-Ripostatin A (**25**), in dem die Wasserstoffe an C14 durch Fluor ersetzt wurden, liegt in einer stabilen Hemiketalform vor. Die Elektronendichte der Hydroxygruppe an der C15-Position wird durch die nahen elektronenziehenden Fluoratome reduziert, weswegen das cyclische Hemiketal nicht leicht geöffnet werden kann. Ebenso kann eine β -Eliminierung ohne β -Wasserstoff nicht ablaufen. Mit diesen Derivaten soll herausgefunden werden, ob die C15-Hydroxygruppe essentiell für die antibiotische Aktivität ist, und welches Tautomer von Ripostatin A (Hemiketal- oder Ketoform) die stärkere Wirkung zeigt. Zusätzlich ist das ungewöhnliche nicht-konjugierte „Skipped-Trien“-Polyensystem sowohl aus synthetischer Sicht als auch für SAR-Studien interessant. Daher wird ein drittes Analogon, das Dihydro-Ripostatin A (**26**) vorgeschlagen, in dem die C5-C6-Doppelbindung zur Einfachbindung reduziert wird. Ein besonderer Schwerpunkt soll auf der leichten Einführung verschiedener Aromaten liegen, da diese oft zur Verbesserung der pharmakologischen Eigenschaften beitragen.

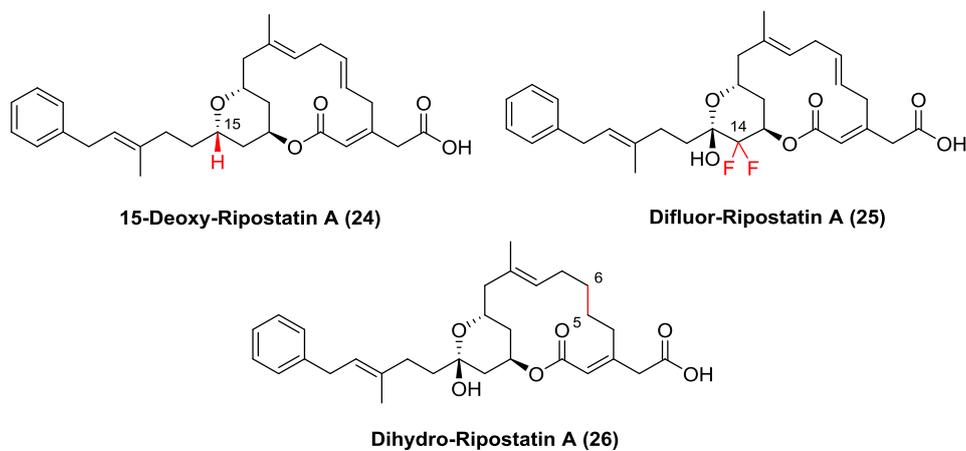
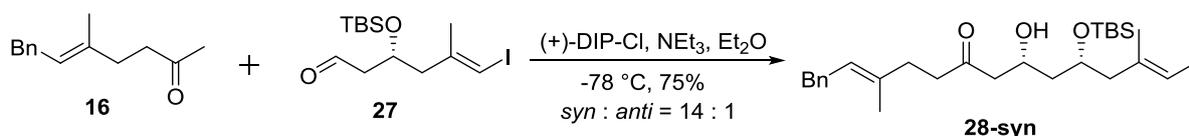


Abbildung 6: Strukturen der synthetischen Analoga des Ripostatins.

3 Zusammenfassung

3.1 Totalsynthese des RNA-Polymerase-Inhibitors Ripostatin B und 15-Deoxy-Ripostatin A^[32]

Der Schwerpunkt der Synthese des Ripostatins B liegt auf dem Aufbau des nicht-konjugierten 1,4,7-Triensystems im Makrolacton ohne Isomerisierung der Doppelbindungen. Diese Synthese geht vom β -Hydroxyketon **28-syn** aus, das aus dem Keton **16** und dem Aldehyd **27** in einer Paterson-Aldolreaktion^[33] aufgebaut wird (Schema 5). Nach der Optimierung lieferte die Reaktion bei -78 °C höheren Stereoselektivitäten für **28** (dr 14:1) in 75 % Ausbeute.



Schema 5: Paterson-Aldolreaktion aus dem Keton **16** und dem Aldehyd **27** mit (+)-DIP-Cl.

Die Synthese des Fragments ging von 3-Iodbut-1-in (**29**) als Startmaterial aus (Schema 6). Die Dreifachbindung des Iodids **29** wurde in einem Eintopfverfahren^[34] aus einer Carboaluminierung und anschließender Kreuzkupplung substituiert, das Produkt wurde daraufhin mit Essigsäure-Weinrebamid zum Keton **16** umgesetzt. Nach der Umschüttung des Homoallylalkohols **31**, welche aus (\pm)-Epichlorhydrin nach publiziertem Verfahren^[35] hergestellt wurde, wurde die Alkynylgruppe in einer Sequenz aus Carboaluminierung und Iodierung zum Vinyljodid transformiert, während die Doppelbindung über Dihydroxylierung^[36] und Periodatspaltung^[37] zum Aldehyd **27** umgesetzt wurde.

³² W. Tang, E. V. Prusov, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 3457-3460; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3401-3404.

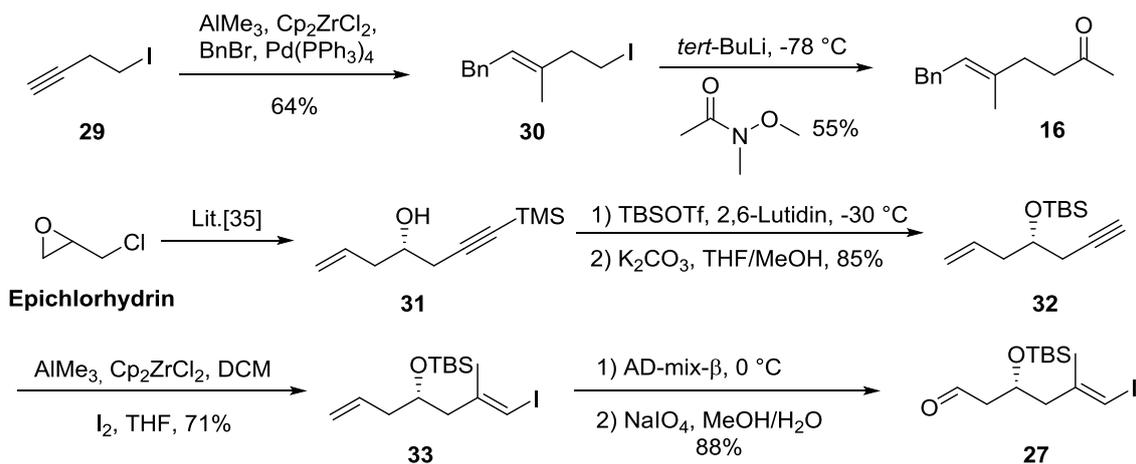
³³ a) I. Paterson, J. M. Goodman, M. A. Lister, R. C. Schumann, C. K. McClure, R. D. Norcross, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 4663-4684; b) I. Paterson, M. J. Coster, D. Y. -K. Chen, K. R. Gibson, D. J. Wallace, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2410-2419; c) C. J. Cowden, I. Paterson, *Org. React.* **1997**, *51*, 1-200.

³⁴ a) E. I. Negishi, H. Matsushita, N. Okukado, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 2715-2718; b) B. H. Lipshutz, T. Butler, A. Lower, J. Servesko, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3737-3740.

³⁵ a) S. E. Schaus, B. D. Brandes, J. F. Larrow, M. Tokunaga, K. B. Hansen, A. E. Gould, M. E. Furrow, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1307-1315; b) S. A. Burova, F. E. McDonald, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2495-2500.

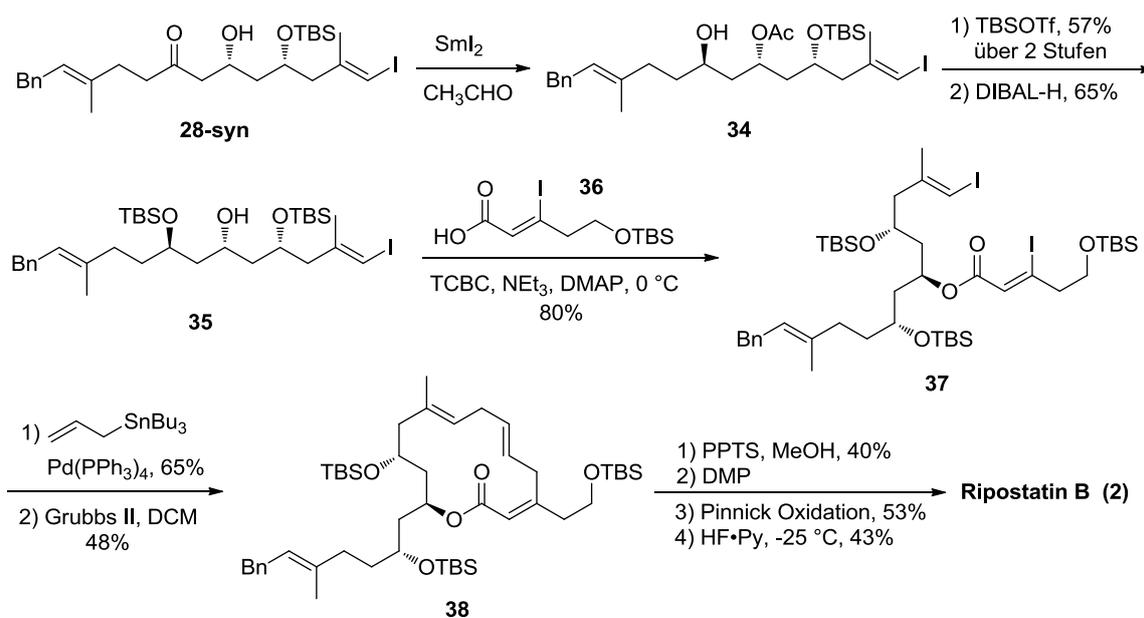
³⁶ M. Theurer, P. Fischer, A. Baro, G. S. Nguyen, R. Kourist, U. Bornscheuer, S. Laschat, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 3814-1823.

³⁷ K. C. Nicolaou, N. P. King, M. R. V. Finlay, Y. He, F. Roschangar, D. Vourloumis, H. Vallberg, F. Sarabia, S. Ninkovic, D. Hepworth, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 665-697.



Scheme 6: Synthese der Fragmente **16** und **27**.

Das β -Hydroxyketon **28-syn** wurde in einer Evans–Tishchenko-Reduktion^[38] unter Verwendung von SmI_2 zum Monoacetat-geschützten 1,3-*anti*-Diol **34** umgesetzt (Schema 7).



Scheme 7: Abschluss der Synthese von Ripostatin B.

Nach Umschüttung wurde der sekundäre Alkohol **35** in einer Yamaguchi-Veresterung^[39] mit Fragment **36** verknüpft. Das Makrolacton **38** wurde mittels Ringschlussmetathese^[40] mit

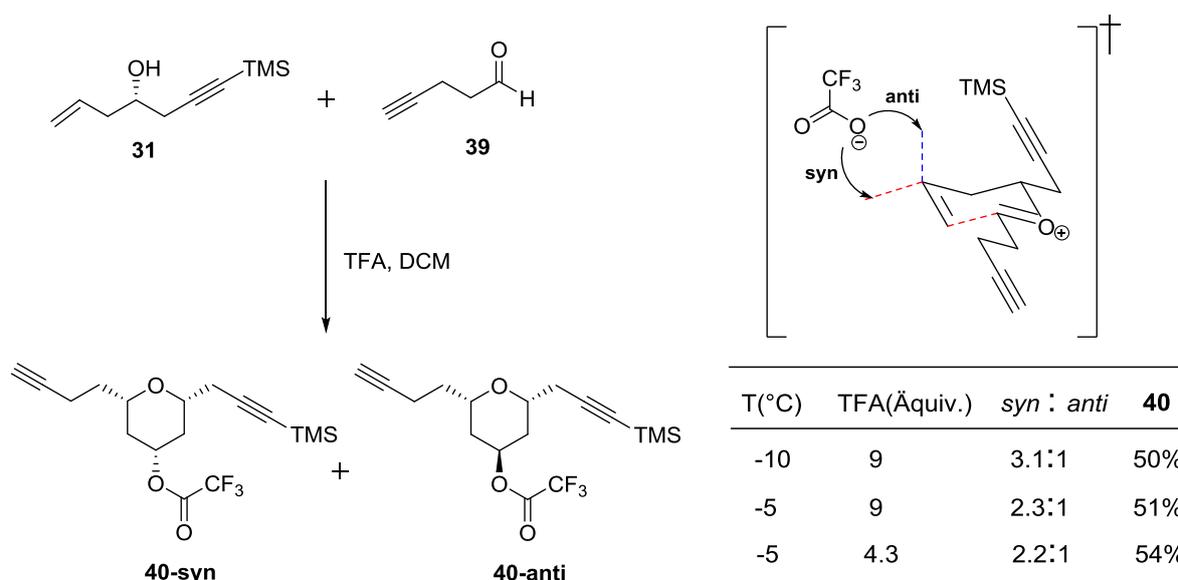
³⁸ D. A. Evans, A. H. Hoveyda, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6447-6449.

³⁹ J. Inanaga, K. Hirata, H. Saeki, T. Katsuki, M. Yamaguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, *5*, 1989-1993.

⁴⁰ a) A. Fürstner, *Angew. Chem.* **2012**, *112*, 3140-3172; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3012-3043; b) K. C. Nicolaou, P. G. Bulger, D. Sarlah, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4564-4601; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4490-4527; c) A. Gradillas, J. Perez-Castells, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6232-6247; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6086-6101.

Grubbs-II-Katalysator nach einer doppelten Stille-Kreuzkupplung^[41] des Diiodids **37** etabliert, wobei selektiv nur das (*E*)-Isomer erhalten wurde. Nach selektiver TBS-Entschützung von **38** wurde der terminale Alkohol in einer Sequenz aus der Dess-Martin-Oxidation und der Pinnick-Oxidation mit zusätzlichem HOCl-Scavenger DMSO^[42] zur Carbonsäure umgesetzt. Schließlich wurde die Totalsynthese von Ripostatin B nach globaler Entschützung mit Olah-Reagenz erfolgreich beendet. Zusammenfassend wurde die Totalsynthese des RNA-Polymerase-Inhibitors Ripostatin B (**2**) über 18 Stufen in der längsten linearen Sequenz und mit einer Gesamtausbeute von 0,22 % realisiert.

In der Syntheseroute des 15-Deoxy-Ripostatins A wurde zuerst die Kernstruktur, der stabile Tetrahydropyranring über eine Prins-Cyclisierung^[43] aus dem Homoallylalkohol **31** und dem Aldehyd **39** aufgebaut (Schema 8). Unter optimierten Bedingungen wurden die beiden Diastereomere **40-syn** und **40-anti** als 3,1:1-Gemisch hergestellt.



Schema 8: Prins-Cyclisierung zu **40-syn** und **40-anti**.

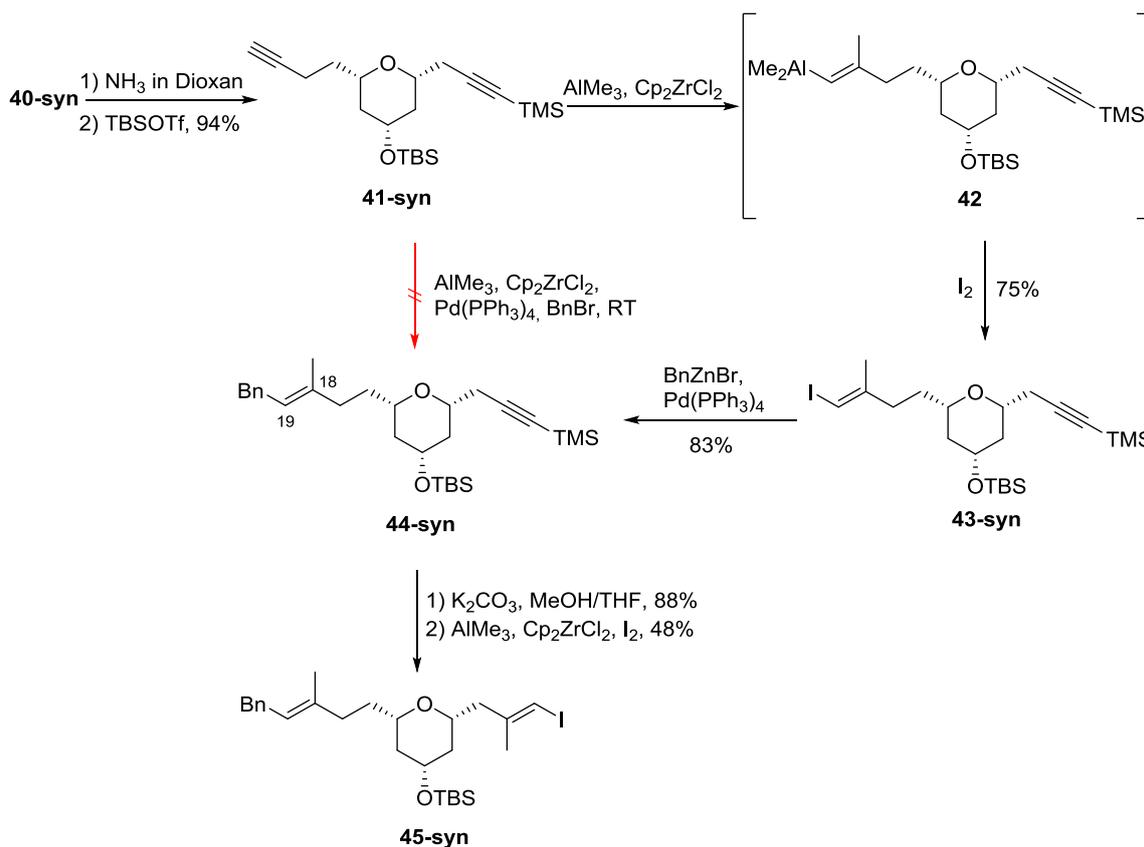
Nach Umschützung von **40-syn** sollten die Benzylgruppe und die (*E*)-Doppelbindung C18-C19 in dem bereits beschriebenen Eintopfverfahren mittels Carboaluminierung und anschließender Kreuzkupplung eingefügt werden. Trotz zahlreichen Versuchen war das

⁴¹ a) M. Abarbria, J. -L. Parrainb, A. Duchêne, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 2469-2472; b) A. Rivkin, J. T. Njardarson, K. Biswas, T. -C. Chou, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 7737-7740.

⁴² E. Dalcanale, F. Montanari, *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 567-569.

⁴³ a) V. V. Vintonyak, B. Kunze, F. Sasse, M. E. Maier, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 11132-11140; b) P. A. Wender, B. A. DeChristopher, A. J. Schrier, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 6658-6659; c) L. E. Overman, L. D. Pennington, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 7143-7157; d) I. M. Pastor, M. Yus, *Curr. Org. Chem.* **2007**, 11, 925-957.

Eintopfverfahren mit dem terminalen Alkin **41-syn** nicht erfolgreich. Die Kreuzkupplung gelang vermutlich wegen der Koordination des Tetrahydropyran-Sauerstoffs an das Vinylaluminium nicht. Daher wurde das Intermediat **42** mit Iod zum Vinyljodid **43-syn** umgesetzt, wodurch die Benzylgruppe in einer Negishi-Kreuzkupplung^[34a] zum Alken **44-syn** eingeführt werden konnte (Schema 9). Nach der Abspaltung der TMS-Gruppe wurde die andere terminale Alkinylgruppe in einer Sequenz aus Carboaluminierung und Iodierung zum Vinyljodid **45-syn** umgesetzt.

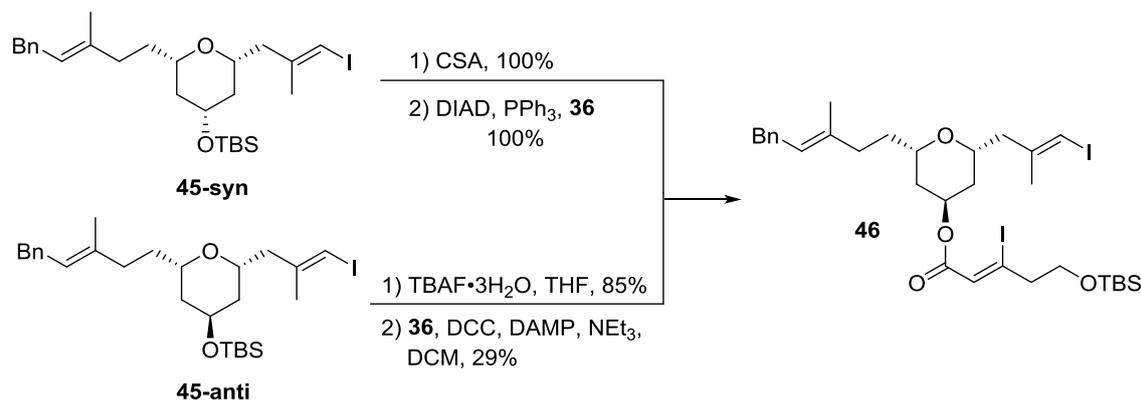


Schema 9: Einführung der Benzylgruppe und der Vinyljodidfunktion von **45-syn** durch Negishi-Kreuzkupplung und zweifache Carboaluminierung von **41-syn**.

Das Trifluoracetat **40-anti** wurde durch die identische Sequenz zum Vinyljodid **45-anti** umgesetzt (vgl. Schema 9). Der Silylether **45-syn** wurde nach TBS-Entschützung mit dem Fragment **36** in einer Mitsunobu-Reaktion^[44] zum Ester **46** verknüpft. Das Diastereomer **45-anti** konnte nach TBS-Abspaltung in einer Steglich-Veresterung^[45] ebenfalls zum Ester **46** umgesetzt werden (Schema 10).

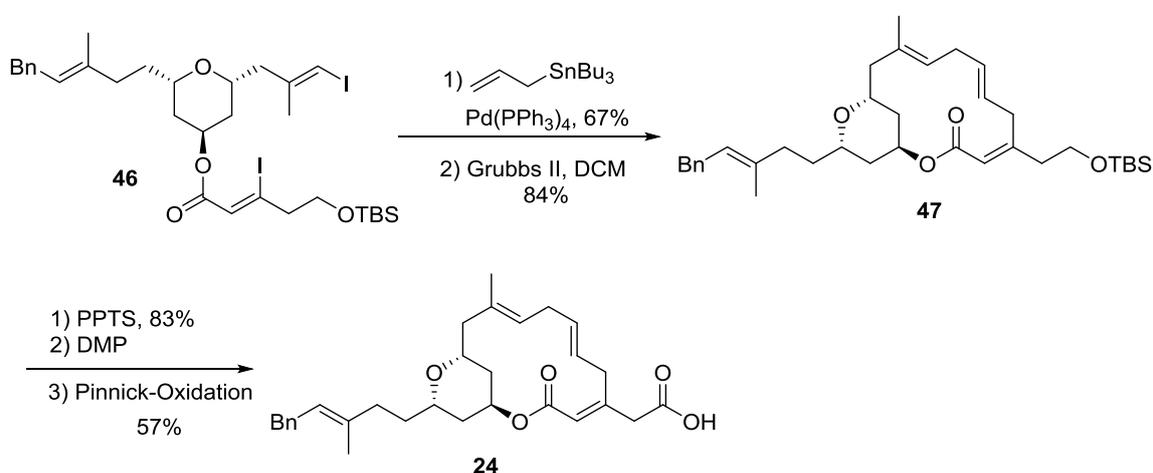
⁴⁴ S. F. Martin, J. A. Dodge, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 3017-3020.

⁴⁵ B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1978**, 90, 556-557; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1978**, 17, 522-524.



Schema 10: Mitsunobu-Veresterung von **45-syn** und Steglich-Veresterung von **45-anti** zum gemeinsamen Produkt **46**.

Das Makrolacton wurde anschließend mit einer zweifachen Stille-Kreuzkupplung des Diiodids **46** und einer anschließenden Ringschlussmetathese aufgebaut (Schema 11). Schließlich wurde die Carboxylgruppe von **24** nach der TBS-Abspaltung des geschützten Alkohols **47** über eine Dess-Martin-Oxidation mit anschließender Pinnick-Oxidation eingeführt. In mehreren biologischen Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass 15-Deoxy-Ripostatin A inaktiv gegenüber vielen Bakterienstämmen ist, sodass die C15-OH-Gruppe als essentiell für Bioaktivität angesehen werden kann.



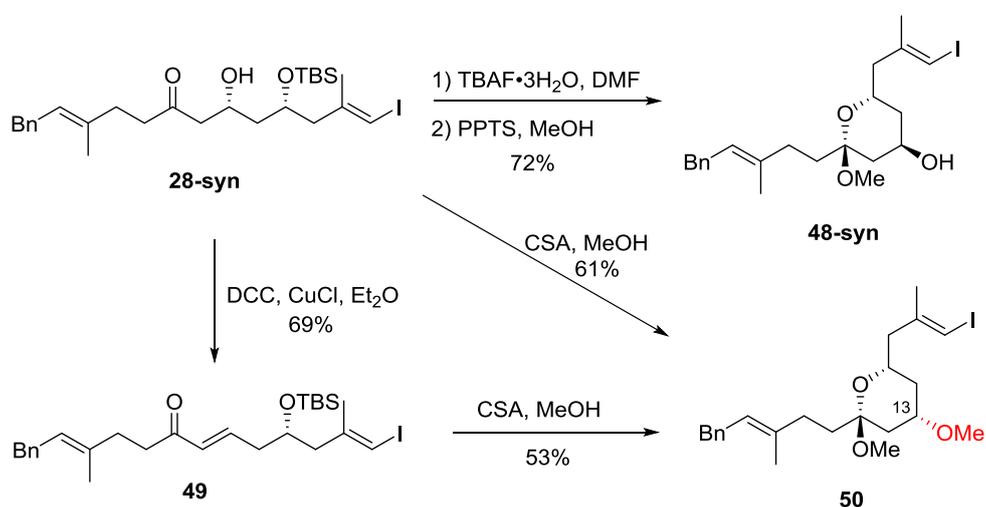
Schema 11: Abschluss der Synthese von 15-Deoxy-Ripostatin A.

3.2 Totalsynthese von Ripostatin A^[46]

Die erste Totalsynthese des RNA-Polymerase-Inhibitors Ripostatin A wurde erzielt. In der Syntheseroute des Ripostatin A wurde das β -Hydroxyketon **28-syn** wieder verwendet. Um das zyklische Hemiketal daraus aufzubauen, wurden zwei Methoden zur Abspaltung der TBS-

⁴⁶ W. Tang, E. V. Prusov, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 4690–4693.

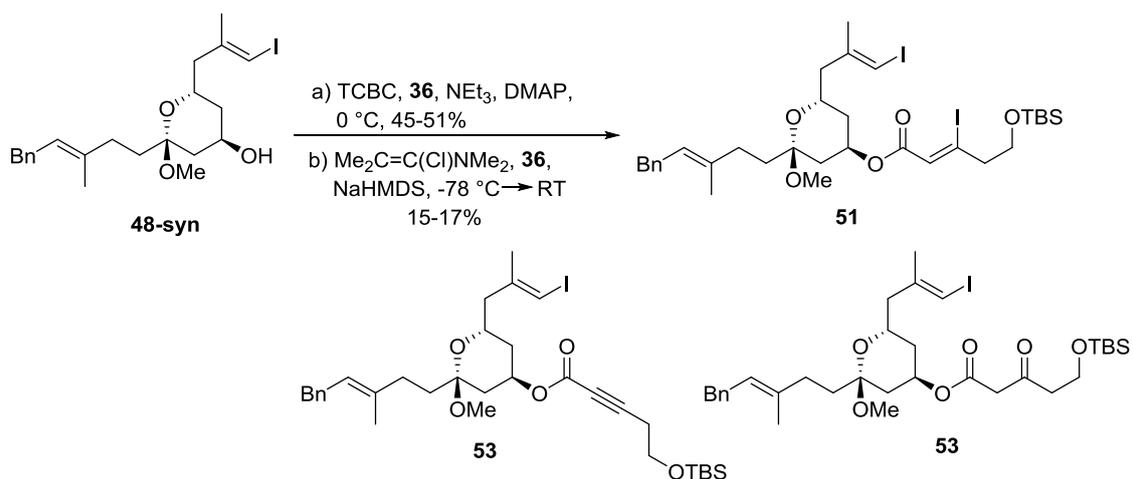
Gruppe untersucht. Bei der Umsetzung des Silylethers **28-syn** mit CSA wurde das ungewöhnliche Produkt **50** isoliert, an dessen C13-Position die Hydroxygruppe unter Inversion durch eine Methoxygruppe ersetzt war (Schema 12: rote Markierung). Wir vermuteten, dass das mit 4-Methoxy-substituierte Tetrahydropyran aus **28-syn** zuerst durch eine säurekatalysierte Wasserabspaltung über das α,β -ungesättigte Keton **49** mit anschließender Zyklisierung und Addition von Methanol aufgebaut wurde. Um diese Vermutung zu bestätigen wurde **28-syn** in einem Zwei-Stufen-Protokoll zuerst mit DCC und CuCl zum Keton **49** umgesetzt. Dann zyklisierte dieses unter CSA in Methanol zum Hemiketal **50**. In der anderen Methode wurde der Silylether **28-syn** zuerst mit TBAF in DMF^[47] zum β,δ -Dihydroxyketon entschützt, welches danach mit PPTS, MeOH und $(\text{MeO})_3\text{CH}$ zum methoxygeschützten zyklischen Hemiketal **48-syn** umgesetzt wurde.



Schema 12: TBS-Abspaltung an **28-syn** mit TBAF und PPTS oder CSA.

Das Hemiketal **48-syn** und die Iodcarbonsäure **36** wurden über die modifizierte Yamaguchi-Veresterung zusammengeführt, welche in der Totalsynthese des Ripostatins B schon verwendet wurde. Dabei wurde der Ester **51** in 45-51 % Ausbeute erhalten. Zusätzlich bildeten sich die Nebenprodukte **52** und **53**, die aus der HI-Eliminierung und anschließender Wasseraddition gebildet wurden (Schema 13).

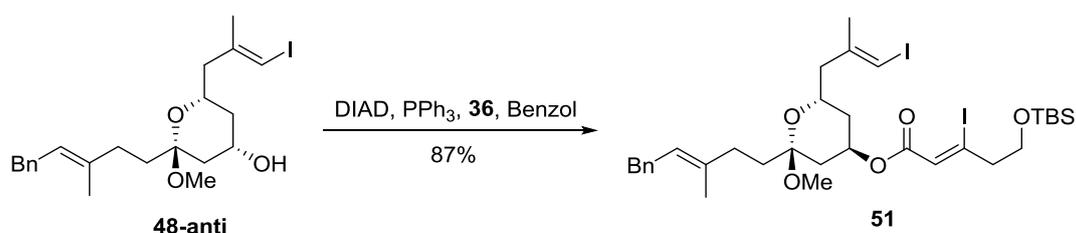
⁴⁷ V. Henryon, L. W. Liu, R. Lopez, J. Prunet, J. -P. Férézou, *Synthesis* **2001**, 2401-2414.



Schema 13: Veresterung des Hemiketals **48-syn** mit der Iodcarbonsäure **36**.

Von *Christmann et al.*^[31b] wurde herausgefunden, dass mit der Base 3,4-Dihydro-2H-pyrido[1,2- α]pyrimidin-2-on die Eliminierung nicht stattfindet. Dabei ergab die Variante für das Hemiketal **48-syn** und die Iodcarbonsäure **36** keinen Umsatz. Danach wurde der Ester **51** über eine Veresterung des Hemiketals **48-syn** mit dem Iodcarbonsäurechlorid, welches aus der Iodcarbonsäure **36** mit dem Ghosez Reagenz (1-Chloro-*N,N*,2-trimethylpropenylamin) hergestellt wurde, in Anwesenheit von NaHMDS^[48] nur in 15-17 % Ausbeute ohne Nebenprodukte erhalten.

Der Ester **51** wurde jedoch in einer Mitsunobu-Veresterung aus dem Fragment **48-anti** und der Iodcarbonsäure **36** mit 87 % Ausbeute erhalten (Schema 14).

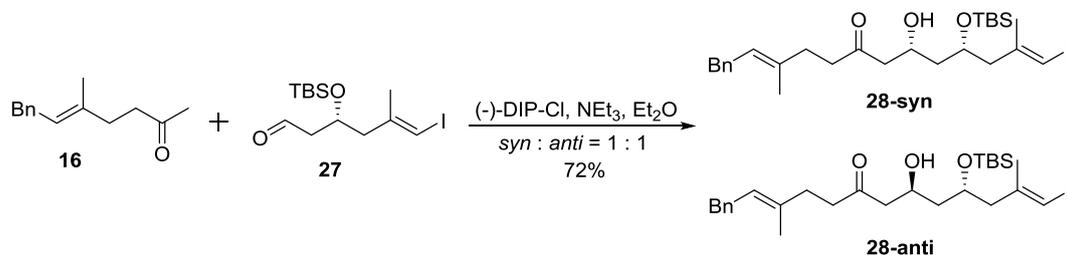


Schema 14: Mitsunobu-Veresterung von Hemiketal **48-anti**.

Da **48-anti** analog zum *syn*-Isomer aus dem β -Hydroxyketon **28-anti** erhalten werden kann, sollte die Paterson-Aldolreaktion zwischen den Fragmenten **16** und **27** mit (-)-DIP-Cl durchgeführt werden, um eine höhere Diastereoselektivität bezüglich **28-anti** zu erhalten. Dabei wurde aber nur ein 1:1 Gemisch der zwei Diastereomere erhalten (Schema 15). Mit einem anderen Lösungsmittel wie DCM wurde ein vergleichbares Verhältnis von **28-syn** und

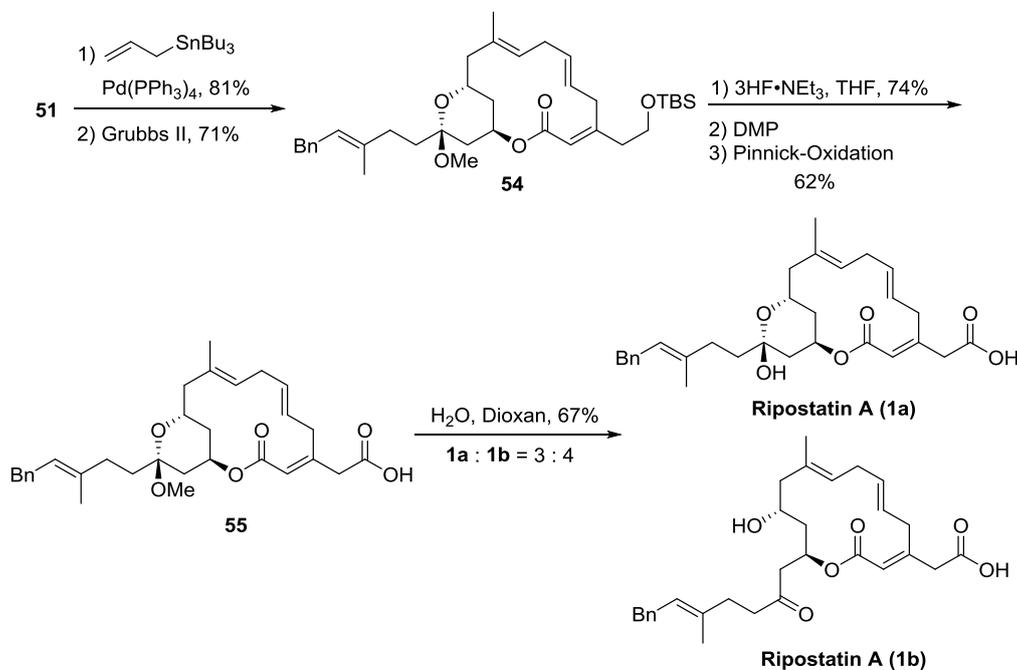
⁴⁸ W. Zhu, M. Jiménez, W. -H. Jung, D. P. Camarco, R. Balachandran, A. Vogt, B. W. Day, D. P. Curran, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9175-9187.

28-anti erhalten. Dieses Ergebnis widerspricht nicht nur dem erwarteten Ergebnis der Paterson Aldolreaktion, sondern auch dem polaren Cornforth Modell, in welchem das 1,3-*anti* Aldoladdukt günstig für das β -Silyloxyaldehyd **27** sein sollte. Dafür wurden bis jetzt keine Gründe gefunden.



Schema 15: Paterson-Aldolreaktion aus Keton **16** und Aldehyd **27** mit (-)-DIP-Cl.

Das Diiodid **51** wurde dann anschließend über eine zu Ripostatin B analoge Sequenz zum Ripostatin A umgesetzt. Die zwei Vinylgruppen wurden über eine doppelte Stille-Kreuzkupplung mit Diiodid **51** verknüpft. Danach wurde das Makrolacton **54** über eine Ringschlussmetathese geschlossen. Nach dem Eintopfverfahren aus Dess-Martin-Oxidation und Pinnick-Oxidation^[31a] und anschließender milden Hydrolyse des zyklischen Hemiketals wurde ein 4:3 Gemisch des Ripostatins A aus Keto- und Hemiketalform erhalten (Schema 16).

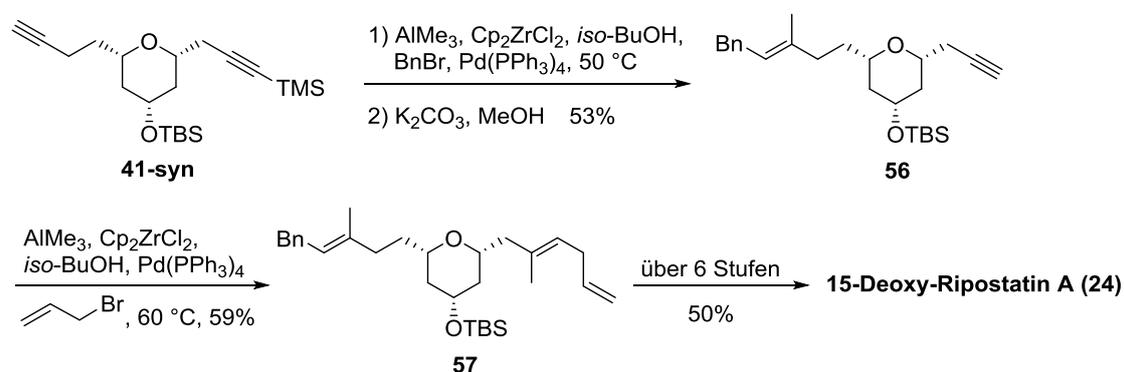


Schema 16: Fertigstellung der Synthese des Ripostatins A.

Zusammenfassend wurde die Totalsynthese des RNA-Polymerase-Inhibitors Ripostatin A (**1**) ausgehend von kommerziell erhältlichem (*S*)-Epichlorohydrin über 14 Stufen in der längsten linearen Sequenz mit einer Gesamtausbeute von 5 % realisiert.

3.3 Synthese und Evaluierung neuer Ripostatinanaloga ^[49]

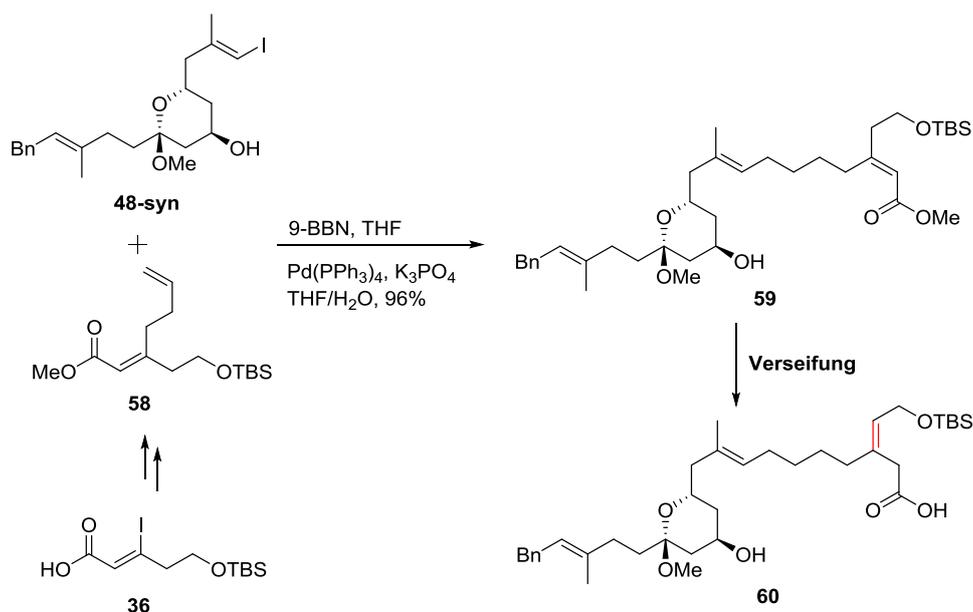
In der folgenden Arbeit wurden die Totalsynthese der Ripostatinanaloga und deren SAR vorgestellt. Die Ripostatine inhibieren die bakterielle RNA-Polymerase und könnten daher als Leitstruktur für die Entwicklung neuer Antibiotika verwendet werden, deren Wirkungsort die bakterielle RNA-Polymerase ist. Die Totalsynthese des 15-Deoxy-Ripostatin A ^[26] war schon publiziert. Dabei wurde nur ausreichend Substanz für die Zelltoxizitätstests synthetisiert. Für dessen weiterführende biologische Evaluierung wurde jedoch mehr Substanz benötigt. Deshalb wurde diese Synthese erneut durchgeführt und dabei ein Eintopfverfahren aus Carboaluminierung und Kreuzkupplung realisiert. Während früher alle Versuche bei Raumtemperatur nicht gelangen, wurde diese Kreuzkupplung bei höherer Temperatur (ca. 50 °C) erfolgreich durchgeführt. Nach der Carboaluminierung von Diin **41-syn** wurde das überschüssige Me₃Al am Hochvakuum entfernt, um die Nebenreaktionen des Me₃Al bei höherer Temperatur zu verhindern. Danach wurden das Vinylaluminium und das elektrophile Benzylbromid mit Pd(0)-Katalysator zusammengeführt (Schema 17). Nach TMS-Entschützen mit K₂CO₃ und MeOH wurde das Alkin **56** in zwei Stufen in 53 % erhalten. Analog dazu wurde das terminale Alkin **56** mit Allylbromid zum Fragment **57** in 59 % Ausbeute umgesetzt. Nach dieser Variante wurde die Synthese des 15-deoxy-Ripostatin um 2 Stufen verkürzt, wodurch aromatische Gruppen direkt nach der Carboaluminierung eingeführt werden können.



Schema 17: Eintopfverfahren von Carboaluminierung und Kreuzkupplung von Diin **41-syn**.

⁴⁹ W. Tang, S. Liu, D. Degen, R. H. Ebright, E. V. Prusov, *Chem. Eur. J.* **2014**, online veröffentlicht.

Für SAR-Studien des Ripostatins wurde die C5-C6-Doppelbindung des 1,4,7-nicht-konjugierten Polyensystems durch eine Einfachbindung ersetzt. In der Syntheseroute dieses Dihydro-Ripostatin A wurden der synthetische Zugang sowohl über die inter- als auch über die intramolekulare Suzuki-Kreuzkupplung^[50] versucht. Dafür wurden das zyklische Hemiketal **48-syn** und das terminale Alken **58**, das über Negishi-Kreuzkupplung^[51] und anschließende Veresterung von Iodcarbonsäure **36** synthetisiert wurde, benötigt. In der optimierten intermolekularen Suzuki-Kreuzkupplung^[52] wurden die Fragmente **48-syn** und das terminale Alken **58** mit einer ausgezeichneten Ausbeute von 96 % zusammengeführt (Schema 18). Danach wurde der Methylester **59** in verschiedenen Verseifungsreaktionen mit LiOH, KOH, TMSOK,^[53] Me₃SnOH^[54] oder einem Enzym (Schweineleberesterase)^[55] getestet. Die Verseifung ergab jedoch entweder keinen oder nur geringen Umsatz zum isomerisierten Produkt **60** (rote Markierung).



Schema 18: Intermolekulare Suzuki-Kreuzkupplung zwischen Hemiketal **48-syn** und Ester **58**.

⁵⁰ a) P. J. Mohr, R. L. Halcomb, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1712-1713; b) S. R. Chemler, S. J. Danishefsky, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2695-2698; c) M. M. Heravi, E. Hashemi, *Monatsh. Chem.* **2012**, *143*, 861-880.

⁵¹ a) M. Abarbri, J.-L. Parrain, A. Duchêne, J. Thibonnet, *Synthesis* **2006**, 2951-2970; b) M. Abarbri, J. Thibonnet, J.-L. Parrain, A. Duchêne, *Synthesis* **2002**, 543-551.

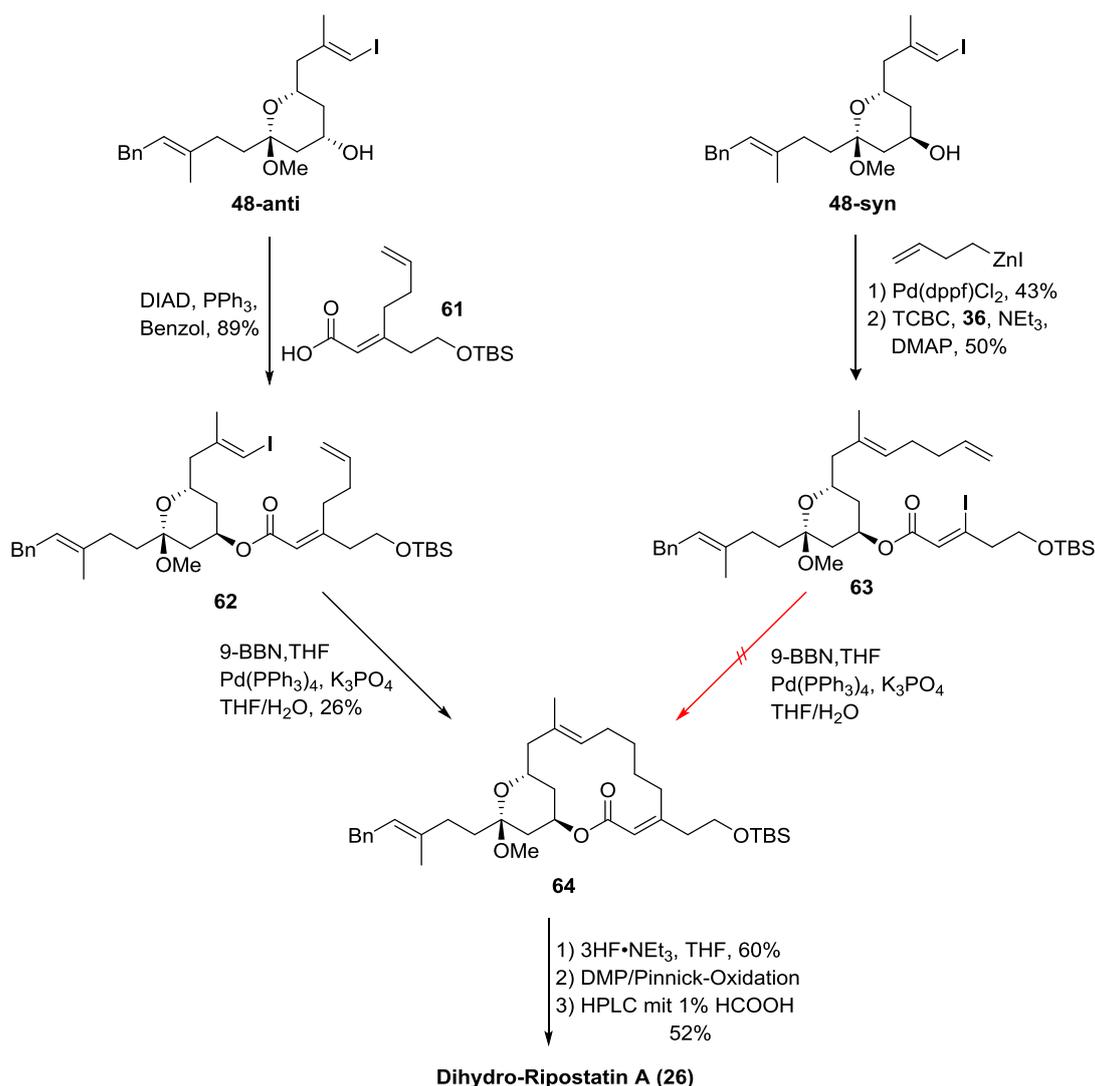
⁵² T. Ishiyama, N. Miyauchi, A. Suzuki, *Org. Synth.* **1993**, *71*, 89.

⁵³ H. Fuwa, H. Yamaguchi, M. Sasaki, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 7492-7503.

⁵⁴ M. Penner, V. Rauniyar, L. T. Kaspar, D. G. Hall, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14216-14217.

⁵⁵ D. Menche, F. Arıkan, O. Perlova, N. Horstmann, W. Ahlbrecht, S. C. Wenzel, R. Jansen, H. Irschik, R. Müller, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14234-14243.

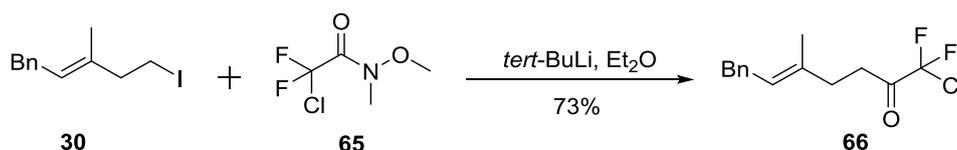
Deshalb wurde die Syntheseroute verändert, indem nach der Veresterung eine intramolekulare Suzuki-Kreuzkupplung durchgeführt werden sollte. Dabei gab es zwei mögliche Verknüpfungen, um das Makrolacton aufzubauen (Schema 19): Kupplung der terminalen Doppelbindung mit Vinyljodid **62** (links) oder **63** (rechts). Das Hemiketal **48-anti** wurde zuerst über eine Mitsunobu-Reaktion zum Ester **62** umgesetzt, danach wurde das Makrolacton **64** über eine intramolekulare Suzuki-Kreuzkupplung mit nur geringer Ausbeute von 26 % erhalten. Obwohl das Vinyljodid **63** wegen des konjugierten Acrylates aktiver als Vinyljodid **62** ist, führte die intramolekulare Kupplung nicht zum Erfolg.



Schema 19: Intramolekulare Suzuki-Kreuzkupplung aus den Vinyljodiden **62** und **63**.

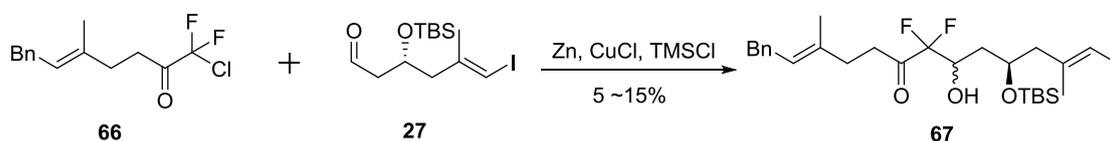
Nach Entfernung der TBS-Schutzgruppe wurde in einem beschriebenen Eintopfverfahren von zwei Oxidationen und anschließender HPLC Reinigung das Dihydro-Ripostatin A (**26**) erhalten. Dabei fand die Hydrolyse des Methylacetats direkt in der HPLC mit 1 % Ameisensäure in Laufmittel statt.

Weiterhin wurde ein Fluor-substituiertes Ripostatin-Derivat synthetisiert, an dessen C14-Position die beiden Wasserstoffatome mit Fluor ersetzt wurden. Aufgrund der Nähe der elektronenziehenden Fluoratome sollte die Elektronendichte der benachbarten Hydroxygruppe reduziert und die zyklische Hemiketalform stabilisiert werden. Für die Einführung von Fluor stellt die Reformatsky-Aldolreaktion^[56] den Schlüsselschritt dar. Dafür sollte zuerst das α -Difluorketon **66** aus einer Reaktion zwischen dem Alkenyliodid **30** und dem Weinrebamid **65** hergestellt werden (Schema 20).



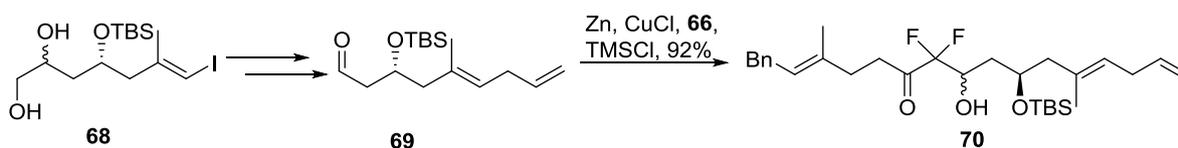
Schema 20: Synthese des α -Difluorketons **66**.

Die anschließende Adolreaktion mit Aldehyd **27** lieferte β -Ketoalkohol **67** in 5-15 % Ausbeute (Schema 21). Versuche, die Ausbeute über Temperaturänderung oder Zugabe von Lewisäure zu verbessern, blieben erfolglos. Eine mögliche Nebenreaktion könnte die Umsetzung der Vinyljodidfunktionalität des Aldehyds **27** mit Zink zum Vinylzinkiodid und anschließende Polymerisation mit der Aldehydfunktion sein.



Schema 21: Reformatsky-Aldolreaktion des α -Difluorketons **66** mit dem Aldehyd **27**.

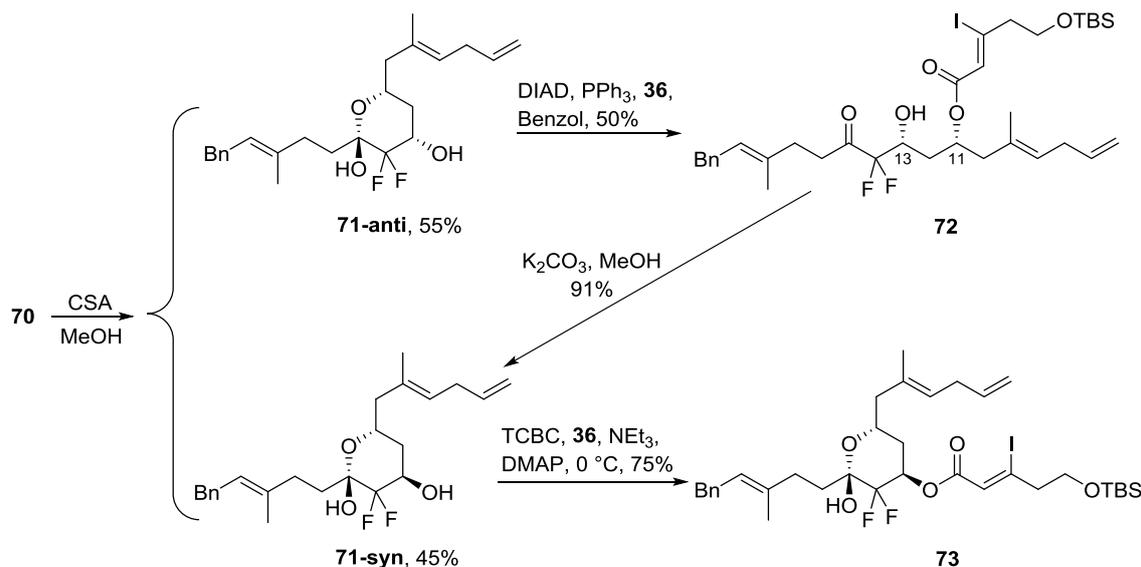
Deshalb wurde Aldehyd **69** über eine Stille-Kreuzkupplung des Diols **68** und anschließender Periodatspaltung synthetisiert. Nach Reformatsky-Aldolreaktion wurde ein Diastereomerengemisch des β -Hydroxyketons **70** in 92 % Ausbeute erhalten (Schema 22).



Schema 22: Reformatsky-Aldolreaktion des α -Difluorketons **66** mit dem Aldehyd **69**.

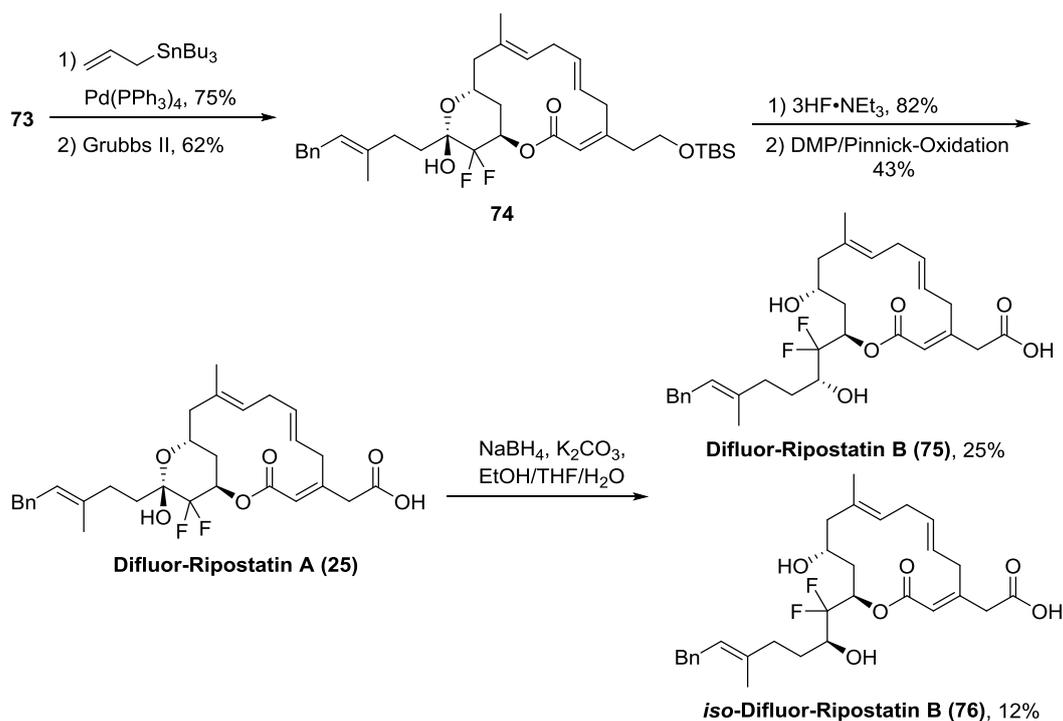
⁵⁶ a) M. Kuroboshi, T. Ishihara, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 6481-6484; b) M. Kuroboshi, T. Ishihara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1990**, 63, 428-437.

Nach der Entfernung der TBS-Schutzgruppe mit CSA wurden die zwei zyklischen Difluorhemiketale **71-syn** und **71-anti** gebildet (Schema 23). In einer Mitsunobu-Veresterung von **71-anti** wanderte die Acylgruppe nach der Inversion an der C13-Position zur C11-Position, und man konnte dabei den Ester **72** mit einer C13 Hydroxygruppe erhalten. Der Ester **72** konnte unter basischen Bedingungen zum zyklischen Hemiketal **71-syn** hydrolysiert werden, welches über eine Yamaguchi-Veresterung mit Fragment **36** zum Ester **73** umgesetzt wurde.



Schema 23: Mitsunobu-Veresterung des Hemiketals **71-anti** und Yamaguchi-Veresterung des Hemiketals **71-syn**.

Das Makrolacton **74** wurde über eine Ringschlussmetathese nach einer Stille-Kreuzkupplung ausgebildet. Nach einer TBS-Entschützung und einer beschriebenen doppelten Oxidation konnte die Totalsynthese von Difluor-Ripostatin A (**25**) erfolgreich abgeschlossen werden (Schema 24).



Schema 24: Fertigstellung der Synthese von Difluor-Ripostatin A und Reduktion zum Difluor-Ripostatin B.

Das Difluor-Ripostatin B und *iso*-Difluor-Ripostatin B konnten über eine Reduktion mit NaBH_4 und K_2CO_3 erhalten werden. Dabei war auf Grund der Stabilisierung der Hemiketalstruktur durch die Fluoratome die Anwesenheit einer Base wichtig.

Die Ripostatine und Analoga wurden auf RNA-Polymerase-Aktivitäten und antibakterielle Aktivitäten getestet (Tabelle 1).^[57]

Tabelle 1: Aktivität der Ripostatine und deren Analoga.^[57]

| | 1 (synth.) | 2 (synth.) | 24 | 26 | 25 | 75 | 76 |
|--|-------------------|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <i>E. coli</i> RNAP, μM^a | 0.026 | 0.018 | >25 | 0.11 | 38 | 0.035 | 3.1 |
| <i>S. aur.</i> RNAP, μM^a | 0.88 | 0.081 | 160 | n.d. | 65 | 0.068 | 45 |
| <i>M. tub.</i> RNAP, μM^a | 270 | 300 | 70 | n.d. | 68 | 3000 | 200 |
| <i>S. aur.</i> , $\mu\text{g}/\text{mL}^b$ | 12.5 | 6.25 | >50 | n.d. | 50 | 12.5 | >50 |
| <i>E. coli</i> <i>tolC</i> , $\mu\text{g}/\text{mL}^b$ | 0.39 | 0.39 | 12.5 | n.d. | 12.5 | 0.78 | 6.25 |

[a] IC_{50} -Wert; [b] MIC-Wert; [c] n.d. (kein Ergebnis)

⁵⁷ Biologische Ergebnisse der Ripostatinanaloga und Kristallstruktur des Enzymkomplexes von Difluor-Ripostatin B von R. H. Ebright et al.

Im Gegensatz zu Ripostatin A (**1**) zeigen das 15-Deoxy-Ripostatin A (**24**) und 14,14-Difluor-Ripostatin A (**25**) geringere Inhibierungen der RNA-Polymerase beziehungsweise der bakteriellen Aktivitäten. Entgegen dem Ripostatin A liegen beide Verbindungen vorwiegend in bicyklischer Form vor. Ripostatin A hingegen tautomerisiert zwischen bicyklischer und monozyklischer Form (Abbildung 3). Die geringen biologischen Aktivitäten der bicyklischen Ripostatinanaloga weisen darauf hin, dass die monozyklische Form des Ripostatins A die aktivere Form ist.

Dihydro-Ripostatin A (**26**) besitzt eine schwache inhibitorische Aktivität gegen die *E. coli* RNA-Polymerase. Wir nehmen an, dass die C5-C6-Doppelbindung wichtig für die Aktivität, aber nicht unbedingt notwendig für die Interaktion zwischen dem Ripostatin und der Bindetasche ist. Das 14,14-Difluor-Ripostatin B (**75**) zeigt ähnliche RNA-Polymerase-Inhibierung und antibakterielle Aktivität im Vergleich zum Ripostatin A und B. Dabei konnte die erste Kristallstruktur des entsprechenden Enzymkomplexes von 14,14-Difluor-Ripostatin B erhalten werden, welches mit der RNA-Polymerase in ähnlicher Weise wie Myxopyronin A mit den Aminosäureresten der Bindetasche interagiert (Abbildung 7).

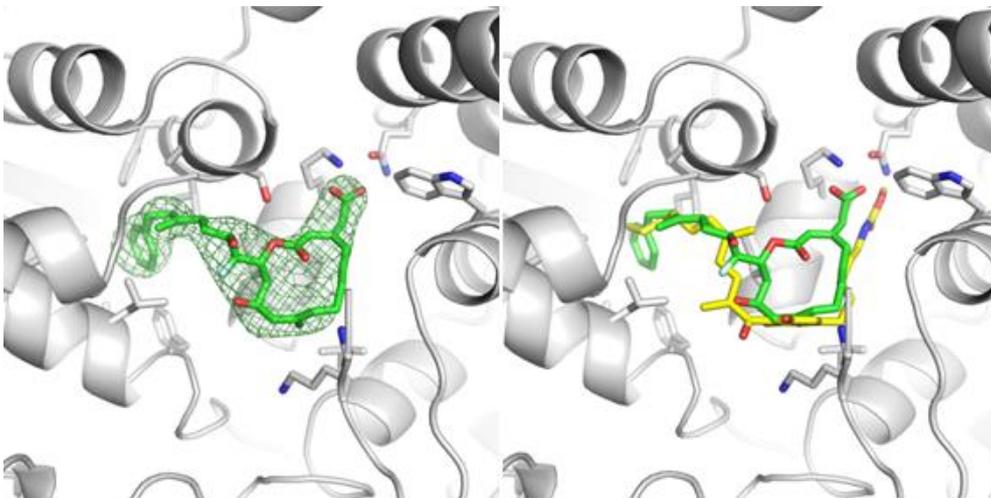
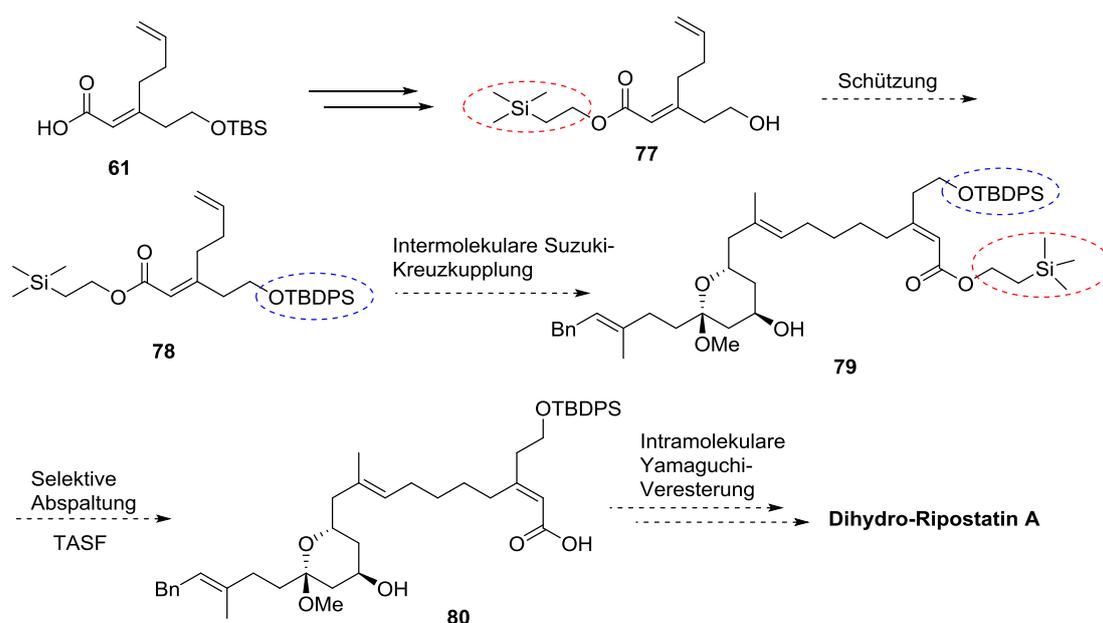


Abbildung 7: Kristallstruktur des entsprechenden Enzymkomplexes (4 Å) von Difluor-Ripostatin B (grün) und Myxopyronin A (gelb).^[57]

4 Ausblick

In zukünftigen Studien soll eine Reihe von weiteren Ripostatin-Derivaten dargestellt werden, um die Untersuchung der SAR fortzuführen. Mit den vorgestellten Arbeiten wurde ein synthetischer Zugang zu den Analoga von Ripostatin A und B geschaffen. Als Vorschlag zur Optimierung der Synthese von Dihydro-Ripostatin A könnte die Hydrolyse des Esters mithilfe einer anderen Schutzgruppe verbessert werden, da die intermolekulare Suzuki-Kreuzkupplung mit ausgezeichneten Ausbeuten (Schema 18) im Vergleich zur intramolekularen Kupplung durchgeführt werden kann. In der vorgeschlagenen Synthese von Dihydro-Ripostatin A wird die Carboxylgruppe mit einer 2-(Trimethylsilyl)ethylgruppe^[58] (rote Markierung) geschützt (Schema 25). Nach einer intermolekularen Suzuki-Kreuzkupplung kann die 2-(Trimethylsilyl)ethylgruppe mit TASF selektiv abgespalten werden.^[59] Danach kann die intramolekulare Yamaguchi-Veresterung durchgeführt werden, um das Makrolacton aufzubauen.



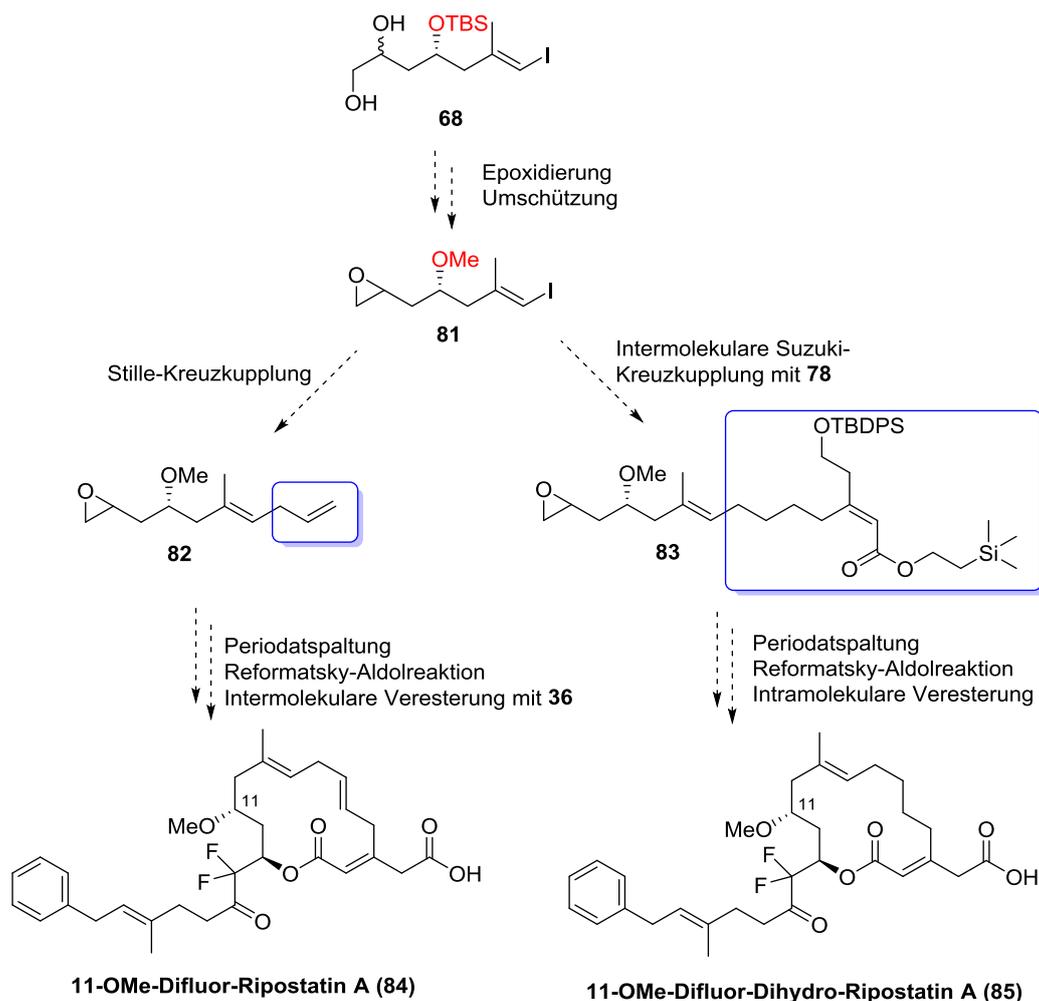
Schema 25: Vorgeschlagene Synthese des Dihydro-Ripostatins A mit intermolekularer Suzuki-Kreuzkupplung und intramolekularer Yamaguchi-Veresterung.

Da die monozyklischen Analoga von Difluor-Ripostatin B höhere Aktivitäten im Vergleich zur Hemiketalstruktur besitzen und ein Interesse darin besteht, ob die Hydroxygruppe an C11 über eine Wasserstoffbrückenbindung eine starke Interaktion mit der RNA-Polymerase zeige,

⁵⁸ E. Fleury, M. -I. Lannou, O. Bistri, F. Sautel, G. Massiot, A. Pancrazi, J. Ardisson, *J. Org. Chem.* **2009**, 79, 7034-7045.

⁵⁹ K. A. Scheidt, H. Chen, B. C. Follows, S. R. Chemler, D. S. Coffey, W. R. Roush, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 6436-6437.

wurde die Synthese von an C11-OH methylierten Derivaten von Ripostatin A vorgeschlagen. In der Synthese wird das Diol **68**, das in der Synthese von Ripostatin A verwendet wurde, über eine Epoxidierung und eine Umschützung zum Vinyljodid **81** umgesetzt. Das Iodid wird nach Periodatspaltung^[60] über eine Stille-Kreuzkupplung mit Vinylstannan oder über eine intermolekulare Suzuki-Kreuzkupplung mit Fragment **78** zusammengeführt. Die beiden Fragmente **82** und **83** werden in mehreren Schritten zu den Endprodukten 11-OMe-Difluor-Ripostatin A (**84**) und 11-OMe-Difluor-Dihydro-Ripostatin A (**85**) umgesetzt (Schema 26).



Schema 26: Vorgeschlagene Synthese von 11-OMe-Difluor-Ripostatin A und 11-OMe-Difluor-Dihydro-Ripostatin A.

Mit dem hier erarbeiteten Syntheseweg könnten verschiedene aromatische oder heterozyklische Strukturfragmente (wie z.B. Isoxazol^[61] oder Triazol^[62]) anstatt des

⁶⁰ C. M. Binder, D. D. Dixon, E. Almaraz, M. A. Tius, B. Singaram, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 2764-2767.

⁶¹ E. McClendon, A. O. Omollo, E. J. Valente, A. T. Hamme II, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 533-535.

Phenylrestes eingeführt werden, und so z.B. Isoxazolo-Difluor-Ripostatin B (**86**) und Triazolo-Difluor-Ripostatin B (**87**) dargestellt werden (Abbildung 8). Weiterhin wäre die Modifikation der Carbonsäuregruppe denkbar, welche durch ein Methylcarbamat (wie Myxopyronin A) ersetzt werden könnte, da die Carbamatfunktion und Aminosäurereste mit einem Wassermolekül über Wasserstoffbrückenbindungen in der Bindetasche immobilisiert werden können. [28]

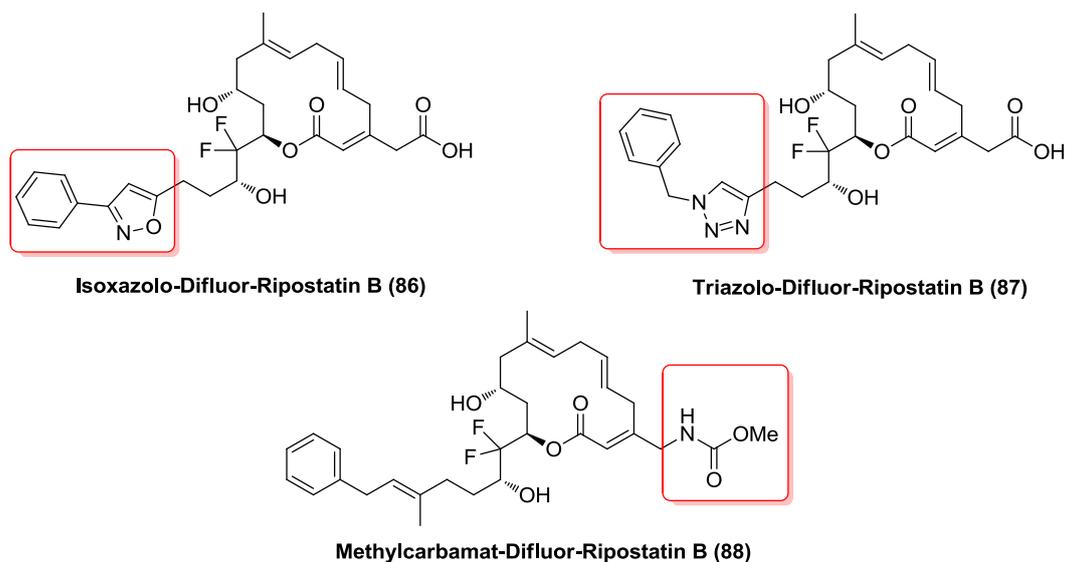


Abbildung 8: Vorgeschlagene Modifikationen von Ripostatin B.

⁶² a) B. H. Lipshutz, B. R. Taft, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 8415-8418 ; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 8235-8238; b) J. Barluenga, C. Valdés, G. Beltrán, M. Escribano, F. Aznar, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7047-7050; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6893-6896.

5 Publikationen

- [1] **Wufeng Tang** and Evgeny V. Prusov, Total Synthesis of RNA-Polymerase-Inhibitor Ripostatin B and 15-Deoxyripostatin A, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 3457-3460; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3401–3404.
DOI: 10.1002/ange.201108749
- [2] **Wufeng Tang** and Evgeny V. Prusov, Total Synthesis of Ripostatin A, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 4690–4693.
DOI: 10.1021/ol302219x
- [3] **Wufeng Tang**, Shuang Liu, David Degen, Richard H. Ebright and Evgeny V. Prusov, Synthesis and Evaluation of Novel Analogues of Ripostatins, *Chem Eur. J.* **2014**, online veröffentlicht.
DOI: 10.1002/chem.201403176

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Wufeng Tang
Geschlecht: männlich
Geburtsdatum/-ort: 06.11.1981 in Jiangsu, China
Staatsangehörigkeit: chinesisch

Schule

09/1988 – 07/2000 Schulausbildung in China.
07/2000 Abitur in China.

Studium

09/2000-07/2004 **Bachelorstudium**, Pädagogische Chemie, Pädagogische Universität Nanjing, Jiangsu, China, „Synthese von 2-Carboxyethyl(Phenyl)Phosphinsäure als phosphorhaltiges Flammenschutzmittel“.

10/2006-06/2010 **Diplomstudium**, Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.

07/2010-12/2010 **Diplomarbeit** bei Prof. Dr. Markus Kalesse, Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, „Totalsynthese von 15-Desoxy-Ripostatin A“.

01/2011 **Diplomprüfung** in Organischer, Anorganischer, Technischer und Physikalischer Chemie

05/2011-07/2014 **Promotionsstudium** bei Prof. Dr. Markus Kalesse, Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, „Studien zum synthetischen Zugang zu Ripostatinen und deren Analoga“.