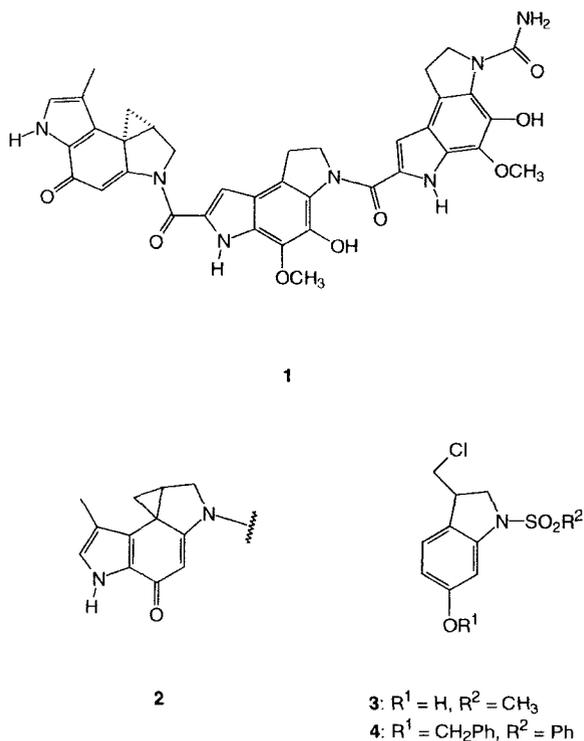


**Tumorselektiv aktivierbare Prodrugs des Cytostaticums CC-1065\*\***

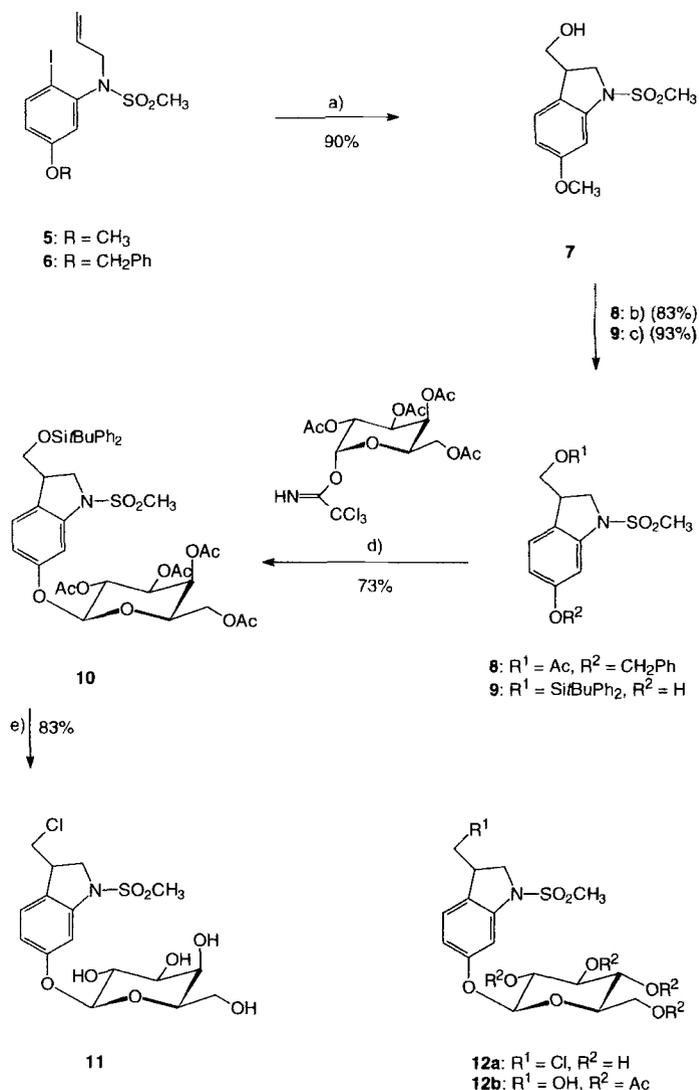
Lutz F. Tietze\*, Robert Hannemann, Wilm Buhr, Michael Lögers, Pia Menningen, Monika Lieb, Dorothea Starck, Thomas Grote, Angela Döring und Ingrid Schubert

Ein Problem der modernen Krebstherapie ist die geringe therapeutische Breite der verfügbaren Cytostatica. Daher kommt es häufig zu schwerwiegenden Nebenwirkungen, die dosislimitierend sind und möglicherweise auch einen Abbruch der Behandlung erforderlich machen können<sup>[1]</sup>. Ein vielversprechender Ansatz für eine selektive Krebstherapie ist die Nutzung genetischer und phänotypischer Unterschiede zwischen malignen und normalen Zellen<sup>[2]</sup>. So haben wir durch In-vitro und In-vivo-Untersuchungen festgestellt, daß sich die erhöhte Glykolyserate von Krebszellen bei Hyperglykämie und die damit verbundene Senkung des pH-Wertes<sup>[3]</sup> zur selektiven Freisetzung eines Cytostaticums aus einem säurelabilen, nicht-toxischen Prodrug im malignen Tumor nutzen läßt<sup>[4]</sup>. Wir beschreiben hier die Synthese neuartiger glycosidischer Prodrugs des cytotoxisch hochwirksamen Antibioticums CC-1065 **1**, die durch enzymatische Hydrolyse mit Glycohydrolasen gespalten werden. Das Cytostaticum im Tumor kann durch Konjugate aus Glycohydrolasen und monoklonalen Antikörpern<sup>[5]</sup> selektiv freigesetzt werden, die an tumorassoziierte Antigene an der Oberfläche maligner Zellen binden.



Das verwendete Cytostaticum seco-CI<sup>[6]</sup> **3** ist die vereinfachte seco-Form der pharmakophoren Gruppe **2** des Antibioticums CC-1065 **1**, das 1978 erstmals aus *Streptomyces zelensis* isoliert wurde und eines der wirksamsten Cytostatica ist<sup>[7]</sup>. Unsere Untersuchungen ergaben, daß Verbindungen wie **4**, die an der phenolischen Hydroxygruppe verethert sind, im Vergleich zu **3** eine viel geringere Cytotoxizität aufweisen. Es wurden deshalb das seco-CI-Galactosid **11** und das seco-CI-Glucosid **12a** hergestellt und ihre Cytotoxizität mit und ohne Zusatz der entsprechenden Glycohydrolasen untersucht.

Das Iodbenzol **5**, das in wenigen Stufen aus kommerziell erhältlichem 4-Methoxy-3-nitroanilin zugänglich ist, ließ sich durch Heck-Reaktion und nachfolgende Hydroborierung in das Indolinderivat **7** überführen (Schema 1). Dieses ergab nach mehreren Schutzgruppen-Manipulationen in einer Gesamtausbeute von 70% das Phenolderivat **9**, das für die nachfolgenden Glycosidierungen eingesetzt wurde. Der etwas umständliche Schutzgruppen-Austausch an den Hydroxygruppen wurde durchgeführt, da das für die Heck-Reaktion erforderliche Substrat **5** einfach und in sehr guten Ausbeuten zugänglich ist und



Schema 1. Synthese der seco-CI-Glycoside **11** und **12a**. a) 1. Pd(OAc)<sub>2</sub>, Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, PPh<sub>3</sub>, DMF, 3 h, 25 °C; 2. BH<sub>3</sub>·SMMe<sub>2</sub>, THF, 3 h, 0 °C; 3. NaOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, 50 °C; b) 1. Ac<sub>2</sub>O, NaOAc; 2. BBr<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 24 h, -15 °C; 3. PhCH<sub>2</sub>Br, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Aceton, DMF, 20 h, 25 °C; c) 1. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, 30 min, 25 °C; 2. *t*BuPh<sub>2</sub>SiCl, NEt<sub>3</sub>, DMAP, 24 h, 25 °C; 3. Pd/C, H<sub>2</sub> (3 bar), Essigester, 16 h, 25 °C; d) BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, 4 Å Molsieb, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2 h, -10 °C; e) 1. TBAF/SiO<sub>2</sub>, 20 h, 0 °C; 2. PPh<sub>3</sub>, CCl<sub>4</sub>, 5 h, 50 °C; 3. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, 10 min, 25 °C.

[\*] Prof. Dr. L. F. Tietze, Dr. R. Hannemann, Dr. W. Buhr, Dr. M. Lögers, Dipl.-Chem. P. Menningen, Dipl.-Chem. M. Lieb, Dr. D. Starck, Dr. T. Grote, A. Döring, Dr. I. Schubert Institut für Organische Chemie der Universität Tammanstraße 2, D-37077 Göttingen Telefax: Int. + 551/39-9476

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 416) und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. T. G., M. L., P. M. und D. S. danken dem Fonds für Doktorandenstipendien.

die Heck-Reaktion mit dem Benzyloxyderivat **6** nur mäßige Ergebnisse lieferte.

Für die Glycosidierung wurde die Koenigs-Knorr-Reaktion<sup>[8]</sup>, die Umsetzung mit Tetraacetyltrimethylsilylglycosiden in Gegenwart von Trimethylsilyltriflat<sup>[9]</sup> und die Umwandlung mit den Tetraacetylglycosyltrichloracetimidaten nach Schmidt<sup>[10]</sup> angewendet; das Verfahren nach Schmidt führte zu den besten Ergebnissen. Umsetzung von **9** mit dem Tetraacetyl- $\alpha$ -D-galactosyltrichloracetimidat in Gegenwart von Bortrifluorid-Ether lieferte mit 73% Ausbeute und hoher Selektivität das  $\beta$ -D-Galactosid **10** ( $\alpha$ -Galactosid < 3%); dieses führte nach Abspalten der Silylschutzgruppe mit TBAF auf Kieselgel, Überführen der Hydroxymethylgruppe in die Chlormethylgruppe<sup>[11]</sup> nach Appel und Abspalten der Acetylgruppen durch Solvolyse mit Methanol und Kaliumcarbonat zum gewünschten Prodrug **11**<sup>[12]</sup>. Auf ähnliche Weise konnte das  $\beta$ -D-Glucosid **12a** mit 52% Gesamtausbeute aus **9** hergestellt werden.

Da für die Synthese von **11** und **12a** racemisches **9** eingesetzt wurde, erhielt man bei der Glycosidierung zwei Diastereomere im Verhältnis 1:1, die im Falle des Glucosids auf der Stufe von **12b** durch Säulenchromatographie an Kieselgel getrennt werden konnten. Nach Solvolyse der Acetylgruppen und enzymatischer Spaltung der beiden Diastereomere von **12b** lassen sich die beiden Enantiomere von **9** herstellen und für die Synthese der *seco*-CI-Glycoside einsetzen. Es wurde hier darauf verzichtet, und die biologischen Untersuchungen wurden mit den Diastereomeregemischen von **11** und **12a** durchgeführt.

Die Toxizitätsprüfungen<sup>[13]</sup> von **3**, **4**, **11** und **12a** an humanen Bronchialcarcinomzellen der Linie A 549<sup>[14]</sup> ergaben, daß **4** nahezu keine Cytotoxizität aufweist, während **3** mit einem ED<sub>50</sub>-Wert von 1.8  $\mu$ M erheblich zelltoxisch ist (Abb. 1). Die Analysen mit den Glycosiden **11** und **12a** führten zu unerwarteten Ergebnissen. So schränkten diese Verbindungen in den üblichen Inkubationsmedien trotz der Blockierung der phenolischen Hydroxygruppe die Proliferationsfähigkeit der Zellen signifikant ein. Die Überprüfung der Medien auf eventuelle Glycohydrolase-Aktivitäten<sup>[15]</sup>, hervorgerufen durch den Zusatz von fetalem Kälberserum (FKS) oder des Serumersatzstoffes (Basal Medium Supplement, BMS), ergaben für das FKS-Medium eine  $\beta$ -D-Galactosidase-Aktivität von 0.73 mU/mL und eine  $\beta$ -D-

Glucosidase-Aktivität von 1.00 mU/mL sowie für das BMS-Medium Aktivitäten von 0.03 mU/mL bzw. 0.05 mU/mL. Mit DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) ohne Zusatz von FKS oder BMS waren dagegen weder eine Galactosidase- noch eine Glucosidase-Aktivität festzustellen (Abb. 2). Kon-

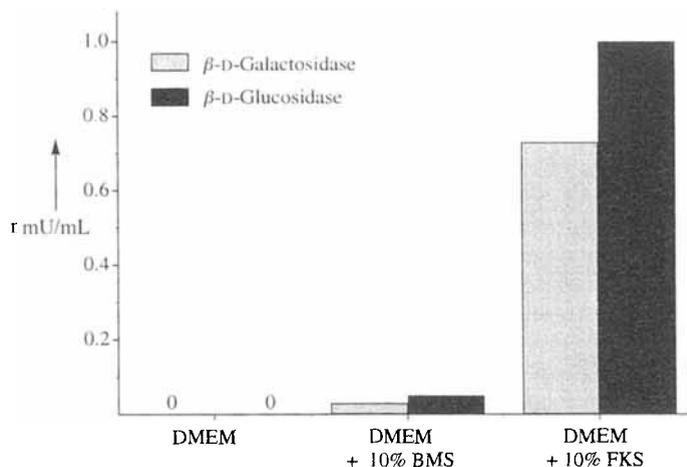


Abb. 2.  $\beta$ -D-Galactosidase- und  $\beta$ -D-Glucosidase-Aktivität in unterschiedlichen Medien.

trollversuche ergaben, daß das Zellwachstum nicht beeinträchtigt wird, wenn man den Zellen vor und nach dem 24-stündigem Entzug von FKS oder BMS für die Dauer der Exposition mit **11** und **12a** erneut supplementiertes Kulturmedium anbietet.

Erwartungsgemäß wird mit **11** und **12a** in nichtsupplementiertem DMEM die Proliferation nicht signifikant gehemmt, während sich die toxische Wirkung der Prodrugs in den anderen Medien mit den jeweiligen Enzymaktivitäten korrelieren ließ (Abb. 3). Mit DMEM, das mit BMS angereichert war, wurde für das *seco*-CI-Galactosid **11** ein ED<sub>50</sub>-Wert von 62  $\mu$ M und für das *seco*-CI-Glucosid **12a** ein ED<sub>50</sub>-Wert von 14  $\mu$ M festgestellt; dies spiegelt die höhere Aktivität oder Konzentration der  $\beta$ -D-Glucosidase im Vergleich zur  $\beta$ -D-Galactosidase wider.

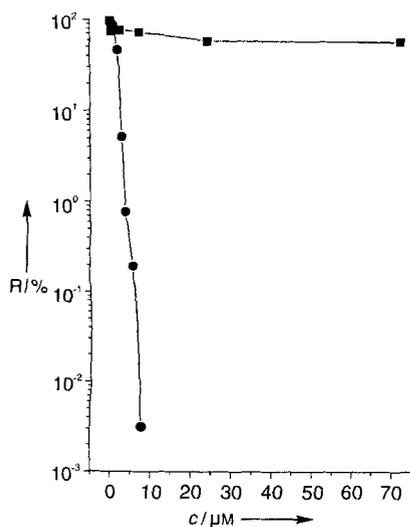


Abb. 1. In-vitro-Cytotoxizität der Verbindungen **3** (●) und **4** (■) auf humane Bronchialcarcinomzellen der Linie A 549 nach 24-stündiger Inkubationsdauer. Die relative Klonbildungsrate der Zellpopulation wurde ermittelt, indem ihre Fähigkeit, Kolonien zu bilden, bei Einwirkung von **3** und **4** mit der ohne **3** und **4** verglichen wurde; c: Konzentration; R: relative Klonbildungsrate.

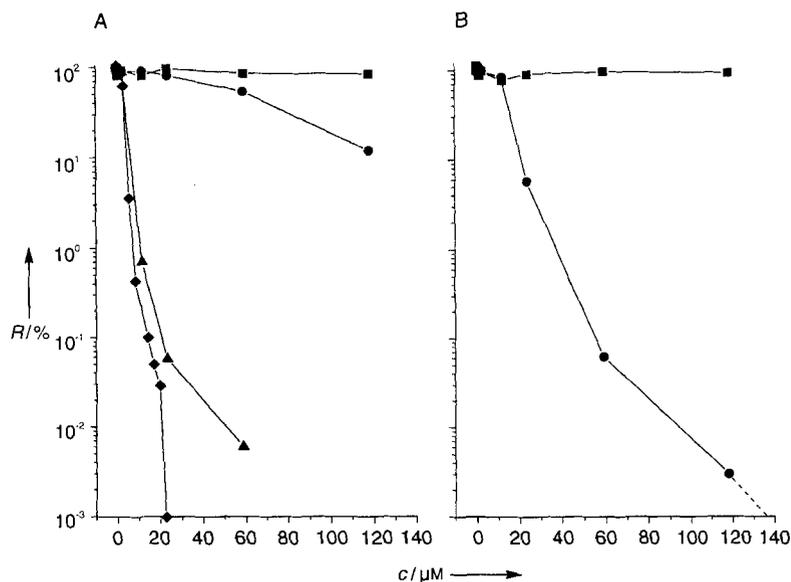


Abb. 3. In-vitro-Cytotoxizität von **11** (A) und **12a** (B) auf die Zelllinie A 549 in unterschiedlichen Medien bei 24stündiger Inkubationsdauer des Toxins: ■ DMEM, ● DMEM + 10% BMS, ▲ DMEM + 10% FKS, ◆ DMEM + 0.2 U/mL  $\beta$ -D-Galactosidase; c: Konzentration; R: relative Klonbildungsrate.

Mit DMEM (unter Zusatz von 10% FKS) wurde ein ED<sub>50</sub>-Wert von 3.6 µM für **11** ermittelt. Eine ähnliche toxische Wirkung auf die Tumorzellen (ED<sub>50</sub> = 3.3 µM) tritt auch bei gezielter Zugabe von 0.2 U/mL β-D-Galactosidase zum seco-CI-Galactosid **11** im Inkubationsmedium DMEM auf, da **11** in beiden Medien schnell unter Freisetzung von **3** gespalten wird.

Das cytotoxisch hochwirksame seco-CI-Derivat **3** des Antitumorikums CC-1065 **1** kann durch Überführung in O-Glycoside effektiv detoxifiziert werden; durch enzymatische Spaltung der Glycoside kann die Cytotoxizität wieder generiert werden. In-vivo-Experimente mit den Prodrugs unter Verwendung der Konjugate aus Glycohydrolasen und monoklonalen Antikörpern sind Gegenstand unserer aktuellen Arbeiten.

Experimentelles

Adhärenz wachsende Zellen einer humanen Tumorzelllinie wurden in den Konzentrationen 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> und 10<sup>5</sup> Zellen/Kavität in Triplikaten in 6-Multiwellplatten ausgesät und mit frisch verdünnter Prüfsubstanz in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Als Lösungsvermittler diente DMSO (Endkonzentration 0.2%). Nach einer Expositionsdauer von 24h wurde die Prüfsubstanz entfernt, und die Zellen wurden mit frischem Kulturmedium versehen. Nach 12d Kultivierung bei 37°C und 7.5% CO<sub>2</sub> in Luft wurde das Medium abgesaugt; die Klone wurden getrocknet, anschließend mit Löfflers Methylenblau angefärbt und makroskopisch ausgezählt. Die relative Klonbildungsrate wurde nach folgender Formel bestimmt: relative Klonbildungsrate [%] = (Zahl der Klone nach Exposition)/(Zahl der Klone in der Kontrolle) × 100.

Die Zellen für die Toxizitätstests wurden in Stammkulturen bei 37°C und 7.5% CO<sub>2</sub> in Luft in DMEM (Biochrom) kultiviert, das mit 4 mM L-Glutamin (Gibco), 44 mM NaHCO<sub>3</sub> (Biochrom) und 10% fetalem Kälberserum FKS (inaktiviert durch Hitze, 30 min bei 56°C, Gibco) supplementiert war. Während der Exposition der Zellen mit den Prüfsubstanzen wurden unterschiedliche Inkubationsmedien eingesetzt. Das Grundmedium DMEM enthielt entweder (a) 4 mM L-Glutamin und 44 mM NaHCO<sub>3</sub> oder (b) zusätzlich 10% BMS (Biochrom) oder (c) zusätzlich 10% FKS oder (d) zusätzlich 0.2 U/mL β-D-Galactosidase (G 5635 Sigma).

Eingegangen am 20. Mai 1996 [Z 9134]

**Stichworte:** Cytostatica • Enzyme • β-Galactosidase • β-Glucosidase • Heck-Reaktionen

[1] a) P. Erbar, *Onkologie: Einführung in die Pathophysiologie, Klinik und Therapie maligner Tumoren*, Schattauer, 1994; b) D. M. Prescott, A. S. Flexer, *Krebs-Fehlsteuerung von Zellen – Ursachen und Konsequenzen*, Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg 1990; c) V. Schirmacher, *Krebs-Tumoren, Zellen, Gene*, Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg, 1987.  
 [2] a) L. F. Tietze in *Molecular Aspects of Chemotherapy*, (Hrsg.: E. Borowski, D. Shugar), Pergamon, 1990, S. 55–70; b) L. F. Tietze, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 1988, 36, 728–737.  
 [3] I. F. Tannock, D. Rotin, *Cancer Res.* 1989, 49, 4373–4384.  
 [4] a) L. F. Tietze, A. Fischer-Beller, *Carbohydr. Res.* 1994, 254, 169–182; b) L. F. Tietze, M. Beller, R. Fischer, M. Lögers, E. Jähde, K. H. Glüsenkamp, M. F. Rajewsky, *Angew. Chem.* 1990, 102, 812–813; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1990, 29, 782–783; c) L. F. Tietze, M. Neumann, T. Möllers, R. Fischer, K. H. Glüsenkamp, M. F. Rajewsky, E. Jähde, *Cancer Res.* 1989, 49, 4179–4184; d) L. F. Tietze, R. Fischer, H. J. Guder, A. Goerlach, M. Neumann, T. Krach, *Carbohydr. Res.* 1987, 164, 177–194.  
 [5] L. N. Jungheim, T. A. Shepherd, *Chem. Rev.* 1994, 94, 1552–1566.  
 [6] a) L. F. Tietze, W. Buhr, *Angew. Chem.* 1995, 107, 1485–1487; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995, 34, 1366–1368; b) L. F. Tietze, T. Grote, *J. Org. Chem.* 1994, 59, 192–196; c) T. Sakamoto, Y. Kondo, M. Uchiyama, H. Yamanaka, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1993, 1941–1942; d) L. F. Tietze, T. Grote, *Chem. Ber.* 1993, 126, 2733–2737; e) S. L. Buchwald, *J. Org. Chem.* 1992, 57, 6380–6382; f) D. L. Boger, T. Ishizaki, H. Zarrinmayeh, S. A. Munk, P. A. Kitos, O. Suntornwat, *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 8961–8971; g) R. Baird, S. Winstein, *J. Am. Chem. Soc.* 1963, 85, 567–578; D. L. Boger, D. S. Johnson, *Angew. Chem.* 1996, 108, 1542–1580; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1996, 35, 1438–1474.  
 [7] a) V. L. Reynolds, J. P. McGroven, L. H. Hurley, *J. Antibiot.* 1986, 39, 319–334; b) J. P. McGroven, G. L. Clarke, E. A. Pratt, T. F. DeKoning, *ibid.* 1984, 37, 63–70; c) L. J. Hanka, A. Dietz, S. A. Gerpheide, S. L. Kuentzel, D. G. Martin, *ibid.* 1978, 31, 1211–1217.  
 [8] a) G. J. Boons, *Tetrahedron* 1996, 52, 1095–1121; b) K. Toshima, K. Tatsuta, *Chem. Rev.* 1993, 1503–1531; c) H. Paulsen, *Angew. Chem.* 1982, 94, 184–201; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1982, 21, 155–172.  
 [9] L. F. Tietze, R. Fischer, H. J. Guder, *Tetrahedron Lett.* 1982, 23, 4661–4664.

[10] R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* 1986, 98, 213–236; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1986, 25, 212–235.  
 [11] J. Hooz, S. S. H. Gillani, *Can. J. Chem.* 1968, 46, 86–87.  
 [12] **11**: <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 2.96 (s, 3H, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.34 (s, 4H, OH), 3.56 (dd, J = 10.0, 7.5 Hz, 1H, 2-H<sub>a</sub>), 3.64–3.96 (m, 9H, 3-CH<sub>a</sub>, 3-CH<sub>b</sub>, 3-H, 2'-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H<sub>a</sub>, 6'-H<sub>b</sub>), 4.12 (mc, 1H, 2-H<sub>b</sub>), 4.84 (d, J = 7.5 Hz, 1H, 1'-H), 6.82 (dd, J = 9.0, 3.0 Hz, 1H, 5-H), 7.16 (d, J = 3.0 Hz, 1H, 7-H), 7.25 (d, J = 9.0 Hz, 1H, 4-H); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>), δ = 34.71 (C-3), 43.20 (C3-C), 47.73 (SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 55.68 (C-2), 62.27 (C-6', 70.12, 72.21, 74.87, 76.92 (C-2', C-3', C-4', C-5'), 102.9 (C-1'), 103.9 (C-5), 112.8 (C-7), 126.3 (C-3 a), 126.9 (C-4), 144.8 (C-7 a), 160.1 (C-6).  
 [13] Die In-vitro-Cytotoxizität wurde im Zellkulturlabor des Instituts für Organische Chemie anhand eines Klonbildungsrate-Assays bestimmt.  
 [14] Die Zelllinie A 549 (ATCC CCL 185) wurde freundlicherweise vom Institut für Zellbiologie der Universität Essen zur Verfügung gestellt.  
 [15] Die Bestimmung der Enzymaktivitäten der β-D-Galactosidase erfolgte colorimetrisch mit p-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid und die der β-D-Glucosidase mit p-Nitrophenyl-β-D-glucopyranosid in Citrat-Puffer bei 405 nm.

Molekulare Redoxschaltungen durch Ligandenaustausch\*\*

Christophe Canevet, Jaqueline Libman und Abraham Shanzer\*

Das wachsende Interesse an Technologien, die auf molekularen Vorgängen beruhen<sup>[1]</sup>, regt derzeit die intensive Erforschung von funktionalen Molekülen an, wozu molekulare Drähte<sup>[2, 3]</sup>, Dioden<sup>[4, 5]</sup>, Lichtumwandler<sup>[6]</sup> und Schalter<sup>[7–14]</sup> zählen. Kürzlich wurden einige molekulare Schalter vorgestellt, die auf äußere Impulse wie Photonen, Protonen oder Elektronen reagieren. Beispiele sind photochrome Stoffe, die reversible, lichtinduzierte Cyclisierungen eingehen<sup>[11]</sup>, Rotaxane, bei denen Makrocyclen auf einem stabförmigen Molekül hin- und herwandern<sup>[12]</sup>, Catenate, bei denen Redoxprozesse eines Gastions Schwingbewegungen der beiden Ringe relativ zueinander auslösen<sup>[13]</sup> und dreisträngige Helices, bei denen eine elektroneninduzierte Wanderung eines Eisenatoms von einem Hohlraum in den Nachbarhohlraum auftritt<sup>[14]</sup>. Hier stellen wir einen neuartigen Redoxschalter vor, der zwei Zustände einnehmen kann, zwischen denen durch Ligandenaustauschprozesse hin- und hergeschaltet wird. Kernstück dieses Schalters ist ein Molekül, das zwei Sätze von ionenbindenden Gruppen aufweist: einen Satz harte und einen weiche Ionen bindende Gruppen. Diese sind an einem Calix[4]arenring<sup>[15]</sup> alternierend angeordnet, so daß sie entweder einen Innenraum bilden, in dem harte Ionen gebunden werden oder einen, der weiche Ionen komplexiert. Es kann jeweils nur ein Innenraum gleichzeitig existieren. Calix[4]aren wurde als Anker gewählt, da es beide Sätze der ionenbindenden Gruppen auf dieselbe Seite des Ringes dirigiert, was es beiden ermöglicht, sich durch eine Drehbewegung einander zu nähern. Nach Beladen mit Fe<sup>III</sup>-Ionen treten die beiden harte Ionen bindenden Gruppen, Hydroxamate, zusammen, um das harte Metallion zu koordinieren, während die weichen Gruppen sich voneinander entfernen.

\* Prof. A. Shanzer, C. Canevet, Dr. J. Libman  
 Weizmann Institute of Science, Department of Organic Chemistry  
 Rehovot 76100 (Israel)  
 Telefax: Int. + 89344142  
 E-mail: coshanzr@weizmann.weizmann.ac.il

\*\* Diese Arbeit wurde von der Israel Academy of Sciences and Humanities und der Minerva-Stiftung finanziell unterstützt. Dr. S. J. Harris, Dublin University, Irland, sind wir für Diskussionen und Ratschläge auf dem Gebiet der Calix[4]aren-Chemie dankbar. Diese Arbeit wurde durch das französisch-israelische l'Arc-en-Ciel-Programm unterstützt.