

- [1] P. Murer, D. Seebach, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2297; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1995.
- [2] a) J. Issberner, R. Moors, F. Vögtle, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2507; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2413; b) G. R. Newkome, *Advances in dendritic macromolecules*, Vol. 1 + 2, Jai, Greenwich, **1994**, **1995**; c) J.-J. Lee, W. T. Ford, *Macromolecules* **1994**, *27*, 4632; d) R. G. Duan, L. L. Miller, D. A. Tomalia, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10783; e) P. G. H. M. Muijselaar, H. A. Claessens, C. A. Cramers, J. F. G. A. Jansen, E. W. Meijer, E. M. M. de Brabander-van den Berg, S. van de Wal, *J. High Resol. Chromatogr.* **1995**, *18*, 121; f) V. Percec, P. Chu, G. Ungar, J. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11441; g) D. Bradley, *Science* **1995**, *270*, 1924; h) J. M. Tour, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 537; i) G. R. Newkome, C. N. Moorefield, F. Vögtle, *Dendritic molecules: concepts, syntheses, perspectives*, VCH, Weinheim, **1996**.
- [3] a) O. Boussif, F. Lezoalich, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J.-P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7297; b) J. F. Kukowska-Latalo, A. U. Bielinska, J. Johnson, R. Spindler, D. A. Tomalia, J. R. Baker, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4897.
- [4] a) H.-M. Müller, D. Seebach, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 483; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 477; b) U. D. Lengweiler, M. G. Fritz, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 670.
- [5] Herstellung von **4** durch Reduktion von 1,3,5-Benzol-tricarbonsäuretrimethylester mit Lithiumaluminiumhydrid, chromatographische Trennung der mono- und disubstituierten Verbindungen, gefolgt von Silylierung der Hydroxygruppe und basischer Hydrolyse der Estergruppen sowie anschließender Umwandlung zum Säurechlorid mit (COCl)<sub>2</sub> (mit diesem Reagens wurde auch **9** hergestellt und die Tricarbonsäure **6** für die Kupplung mit desilyliertem **7/10** aktiviert).
- [6] Die Hydrogenolyse erfolgte in DMF mit Pd/C als Katalysator und 1,4-Cyclohexadien als Wasserstoffquelle; a) A. M. Felix, E. P. Heimer, T.-J. Lambros, C. Tzougraki, J. Meienhofer, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 4194; b) J. S. Bajwa, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2299; c) G. M. Anantharamaiah, K. Sivanandaiah, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1977**, 490.
- [7] a) A. L. Iordanskii, T. E. Rudakova, G. E. Zaikov, *Interaction of polymers in bioactive and corrosive media*, VSP BV, Utrecht, The Netherlands, **1994**; b) E. Wintermantel, S.-W. Ha, *Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen*, 1. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, **1996**. Nach der Definition dieser Autoren gelten Polymere als biologisch abbaubar, wenn der Abbau auf wenigstens einem der folgenden Wege erfolgt: 1. Polymerauflösung, 2. unspezifische Hydrolyse, 3. enzymatischer Abbau, 4. Dissoziation von Polymer-Polymer-Komplexen.
- [8] Isolierung und Reinigung der PHB-Depolymerase aus *A. faecalis*, deren Gen in *E. coli* überexprimiert wurde, erfolgte nach dem Protokoll von T. Saito, K. Suzuki, J. Yamamoto, T. Fukui, K. Miwa, K. Tomita, S. Nakanishi, S. Odani, J.-I. Suzuki, K. Ishikawa, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 184.
- [9]  $v_{\max}^{\text{PPP}}$  [U mg<sup>-1</sup>]: **2a** 0, **2b** 24.5, **5a** 0, **5b** 1.9/0.32, **6a** 0.5, **6b** 38.6/0.24, geschütztes Dendrimer erster Generation mit dimerem HB-Verlängerungsbaustein: 0, entschütztes Dendrimer erster Generation mit dimerem HB-Verlängerungsbaustein: 0.32; geschütztes Dendrimer erster Generation mit tetramerem HB-Verlängerungsbaustein: 0.84/ < 0.1, entschütztes Dendrimer erster Generation mit tetramerem HB-Verlängerungsbaustein (zweistufige Kinetik): 25.7/0.18, **11a** 0, **11b** < 0.1, **12a** 0.24 (alles PHB-Depolymerase).
- [10] Die Signale von **9** der 18 HB-Methin-Protonen im intakten entschützten Dendrimer erster Generation mit dimerem HB-Verlängerungsbaustein (grüner Ring in Formel **11/12**; vgl. Abb. 1a); <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5.19–5.38 (m, 9H, HC) verschoben sich in charakteristischer Weise nach dem enzymatischen Abbau über 72 h (<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 4.23–4.18 (m, 3H, HC); 4.08–4.02 (m, 6H, HC)). Dabei entspricht das Integral des letzten Signales sowie dessen chemische Verschiebung den zu erwartenden 6 Äquiv. freier HB.
- [11] Entschütztes Dendrimer erster Generation mit dimerem HB-Verlängerungsbaustein:  $v_{\max}^{\text{PPP}}$  [U mg<sup>-1</sup>]: 0.3 (PHB-Depolymerase), 10<sup>-3</sup> (Esterase), 10<sup>-3</sup> (Lipase), 0.4 (Trypsin); für nähere Angaben über die verwendeten Enzyme siehe Lit.[8] und Experimentellesb).
- [12] a) A. M. Muzafarov, M. Golly, M. Möller, *Macromol.* **1995**, *28*, 8444; b) A. M. Muzafarov, A. Rebrov, O. B. Gorbacevich, M. Golly, H. Gankema, M. Möller, *Macromol. Symp.* **1996**, *102*, 35.
- [13] Die Drehwerte der Dendrimere weisen keine signifikante Abhängigkeit von der Generation oder der Zahl der HB-Moleküle in den Verlängerungseinheiten auf.
- [14] Die Aktivitätsangabe [U] bezieht sich auf das Standardsubstrat des jeweiligen Enzyms.

## Synthese und DNA-Bindungseigenschaften von Hybriden aus der Kohlenhydrat-Einheit von Calicheamicin $\gamma_1^I$ und dem Aglycon von Daunorubicin: Calichearubicine A und B\*\*

Kristopher M. Depew, Steven M. Zeman, Serge H. Boyer, Derek J. Denhart, Norihiro Ikemoto, Samuel J. Danishefsky\* und Donald M. Crothers

Zahlreiche wichtige medizinische Wirkstoffe enthalten eine Kohlenhydrat- oder kohlenhydratverwandte Einheit und bestehen somit aus einem Aglycon und einem Kohlenhydratbaustein. Meist weisen die einzelnen Bestandteile keine biologische Aktivität auf<sup>[1]</sup>. In Überlegungen zum Mechanismus und damit zum Ursprung der Wirkstoffaktivität wurde üblicherweise nur das Aglycon berücksichtigt, während der kohlenhydrathaltige Bestandteil als notwendig für den Biotransport oder für andere mit der Wirkstoffverfügbarkeit verbundenen Faktoren angesehen wurde.

Die Art des Zusammenspiels von Aglycon und kohlenhydrathaltiger Einheit ist vermutlich je nach Wirkstoff unterschiedlich; die kohlenhydrathaltige Einheit nimmt in einigen Fällen eine wichtige Funktion ein, indem sie die für die Wirkstoff-Rezeptor-Erkennung relevanten Merkmale liefert. Ein Beispiel, bei dem diese Einheit eine für den Rezeptorkontakt wichtige Rolle spielt, sind die Endiin-haltigen Antibiotica<sup>[2]</sup> wie Calicheamicin  $\gamma_1^I$  **1**<sup>[3]</sup> (Abb. 1). Wie von uns<sup>[4]</sup>, von Nicolaou et al.<sup>[5]</sup> und

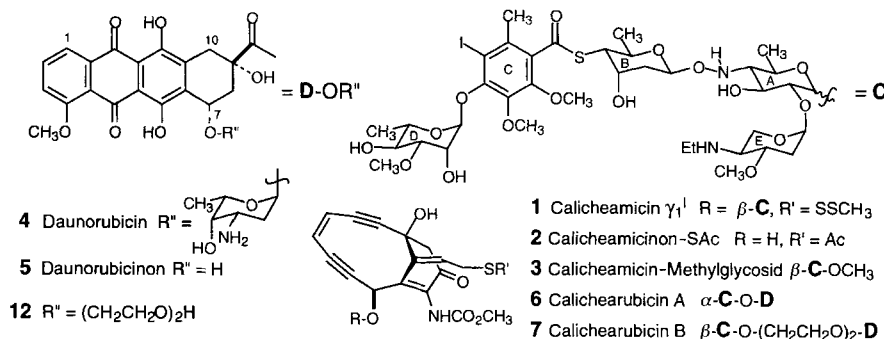


Abb. 1. Anthracyclin- und Calicheamicin-Antibiotica sowie Calichearubicine.

von anderen<sup>[6–8]</sup> nachgewiesen wurde, trägt der Kontakt der fünf Ringe der Kohlenhydrat-Einheit mit der kleinen Furche von DNA stark zur Sequenzselektivität von Calicheamicin  $\gamma_1^I$  bei. Derartige Wechselwirkungen begünstigen ebenfalls Kontakte von Esperamicin A<sub>1</sub> mit dessen Ziel-DNA<sup>[9]</sup>. Obwohl auch die Aglycone, z. B. das Calicheamicinon **2** (Abb. 1), cytotoxisch sind und die Fähigkeit haben, den DNA-Doppelstrang zu spalten, ist die Kohlenhydrat-Einheit für die Sequenzselektivität

[\*] S. J. Danishefsky<sup>[a–c]</sup>, K. M. Depew<sup>[b]</sup>, S. M. Zeman<sup>[a]</sup>, S. H. Boyer<sup>[a]</sup>, D. J. Denhart<sup>[b]</sup>, N. Ikemoto<sup>[c]</sup>, D. M. Crothers<sup>[a]</sup>

[a] Department of Chemistry, Yale University  
225 Prospect Street, New Haven, CT 06511 (USA)

[b] Department of Chemistry, Columbia University  
Havemeyer Hall, New York, NY 10027 (USA)

[c] Laboratory for Bioorganic Chemistry  
The Sloan-Kettering Institute for Cancer Research  
1275 York Ave., New York, NY 10021 (USA)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (Grant CA28824 und HL28549) gefördert. Promotionsstipendien wurden von K. M. D. (Lilly), S. H. B. (Kent) und D. J. D. (NSERC, Kanada) erhalten. Wir danken Dr. John Decatur für die Aufnahme der 2D-NMR-Spektren, Vinka Parmakovich und Barbara Sporer für massenspektrometrische Untersuchungen.

vität unerlässlich<sup>[4c]</sup>. Tatsächlich kann eine geringe Sequenzselektivität erzielt werden, wenn die nicht verknüpften Kohlenhydrat-Einheiten (wie **3**) und Aglycone gemeinsam inkubiert werden. Dies veranschaulicht die Bedeutung des komplexen Kohlenhydratnetzwerkes für die molekulare Erkennung<sup>[4a]</sup>.

Auch Anthracycline, z. B. Daunorubicin **4**<sup>[10]</sup>, enthalten Kohlenhydrat-Einheiten, die die Intercalation des Aglycons, einer aus vier Ringen bestehenden Anthrachinon-Einheit, in die Basenpaare bewirken. Ein Aglycon für sich (z. B. Daunorubicinon **5**) ist weder als Wirkstoff noch als Intercalator aktiv<sup>[10a]</sup>. Durch eine relativ unspezifische salzbrückenähnliche Wechselwirkung zwischen der Kohlenhydrat-Einheit und dem Phosphatrückgrat wird die Reaktion mit der DNA erleichtert<sup>[11]</sup>. Im Unterschied zu den Endiin-Wirkstoffen weist Daunorubicin keine bemerkenswerte Sequenzselektivität bei der Intercalation auf<sup>[10d, 10g]</sup>.

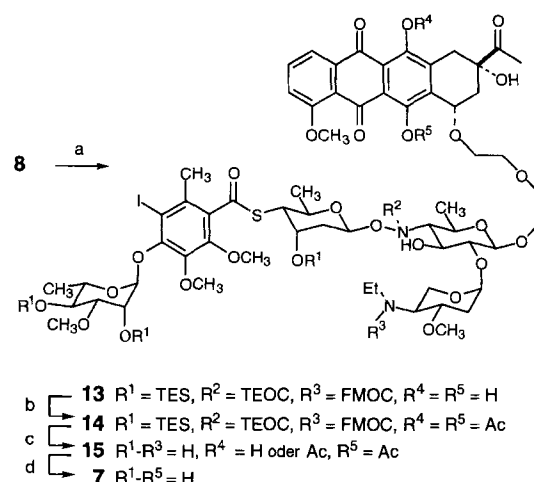
Auf diesen Ergebnissen aufbauend, entwarfen wir die Synthese eines Hybrids, das sowohl das Daunorubicinon-Aglycon **5** als auch die Kohlenhydrat-Einheit von Calicheamicin enthält. Solche Verbindungen werden im folgenden Calichearubicine genannt<sup>[12]</sup>. Wir beschreiben hier Synthese und Eigenschaften der Calichearubicine A und B (**6** bzw. **7**). Im Calichearubicin A ist **5** mit der Kohlenhydrat-Domäne von Calicheamicin  $\gamma_1^I$  glycosidisch verknüpft. Verbindung **7** enthält einen Bis(ethylen)glycol-Spacer, der zwischen diesen beiden Einheiten inseriert ist.

Die Synthese dieser Verbindungen war keine geringe Herausforderung und wurde mit Methoden durchgeführt, die von uns für beide Wirkstoffgruppen entwickelt worden waren. Wir nutzten unsere Erfahrungen<sup>[13]</sup>, die wir bei der Synthese des Glycosyldonors vom Schmidt-Typ<sup>[14]</sup>, des Trichloracetimidats **8**, gewonnen hatten (Schema 1). Der Glycosyldonor von Calicheamicin  $\gamma_1^I$  liegt in der geeigneten Oxidationsstufe vor, und alle Schutzgruppen sollten durch kurzes Behandeln mit Fluorid abgespalten werden. Tatsächlich führte die Verknüpfung<sup>[13]</sup> von **5** mit **8** zu **9** und dessen  $\beta$ -Anomer im Verhältnis 5:1. Das Anthracyclin überstand allerdings nicht die zur Abspaltung der Schutzgruppe notwendige Fluoridbehandlung<sup>[15]</sup>. Offensichtlich ist

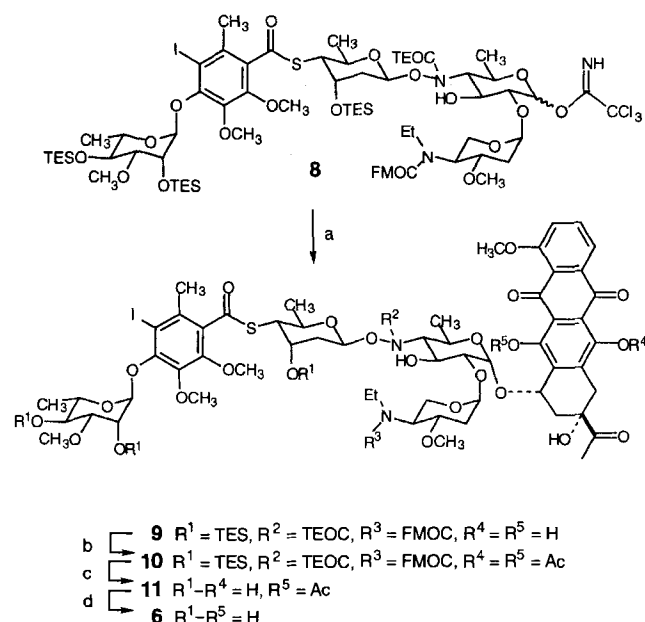
die Anthracyclinon-Einheit weniger stabil gegenüber diesem Reagens (das uns in der Synthese von Calicheamicin  $\gamma_1^I$  von großem Nutzen war) als die Endiin-Einheit von **1**.

Durch unsere Forschungsarbeit auf dem Gebiet der Anthracycline konnten wir eine Lösung für dieses unerwartete Problem finden. Wir haben festgestellt<sup>[16]</sup>, daß durch die Acetylierung der phenolischen Hydroxygruppen in Daunorubicin **4** eine Stabilisierung gegenüber der reaktiv induzierten Bildung des Chinonmethids erzielt wird. Daher wurde die Verbindung **9** zu **10** acetyliert. Durch Fluoridbehandlung von **10** wurden alle mit der Kohlenhydrat-Einheit verbundenen Schutzgruppen sowie die Acetylgruppe an C11 unter Bildung von **11** abgespalten. Offensichtlich wird durch nur einer Acetylschutzgruppe (an C6) eine Stabilisierung gegenüber der Fluoridbehandlung erzielt. Calichearubicin A **6** wurde durch Hydrolyse von **11** mit 0.1 N Lithiumhydroxidlösung erhalten.

In ähnlicher Weise führte die Verknüpfung von **12**<sup>[17]</sup> mit **8** zu **13** und dessen  $\alpha$ -Anomer im Verhältnis 1:5 in 30% Ausbeute (Schema 2). Für gleichzeitige Intercalation und Wechselwir-



Schema 2. Synthese von Calichearubicin B **7**. a) **12**,  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , 4Å-Molekularsieb,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-78^\circ\text{C}$  ( $\beta:\alpha = 5:1$ , 35%); b)  $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Py}$  (2/5),  $0^\circ\text{C}$ , 10 min (79%); c) TBAF, THF,  $-5^\circ\text{C}$  (90%); d) 5 Äquiv. 0.1 N LiOH, THF (Verdünnung auf 0.0015 M), 6 h (35%).



Schema 1. Synthese von Calichearubicin A **6**. a) **5**,  $\text{AgOTf}$ , 4Å-Molekularsieb,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $\alpha:\beta = 5:1$ , 45%); b)  $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Py}$  (2/5),  $0^\circ\text{C}$ , 10 min (89%); c) Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF), THF,  $-5^\circ\text{C}$  (92%); d) 3 Äquiv. 0.1 N LiOH, THF (Verdünnung auf 0.0015 M), 12 h (44%); Py = Pyridin, TEOC = Trimethylsilylethoxycarbonyl, TES = Triethylsilyl, Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl, Tf = Trifluormethansulfonat.

kung mit der kleinen Furche ist ein fünfatomiger Spacer mit  $\beta$ -glycosidischer Verknüpfung notwendig, wie vorläufige Molecular-Modeling- und Minimierungs-Studien ergaben; diese beruhen auf NMR-Spektren<sup>[8]</sup> von **1** (in Lösung), das an einer d(TCCT)·d(AGGA)-Sequenz gebunden vorlag, sowie auf der Struktur<sup>[11]</sup> von **4** im Kristall, das in ein Pyrimidin/Purin-Paar eines DNA-Oligomers intercaliert war. Glücklicherweise wurde mit  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ <sup>[18]</sup> ein Verhältnis von **13** zu dessen  $\alpha$ -Anomer von 1:4 erzielt (35% Ausbeute). Nach Acetylierung und Trennung der Anomere wurde **14** erhalten, das wie beschrieben zu Calichearubicin B **7** umgesetzt wurde.

Die Wechselwirkungen zwischen **6** und **7** mit doppelsträngiger DNA (dsDNA) wurden spektrophotometrisch untersucht. Als spektroskopischer Standard diente der dsDNA-**4**-Komplex<sup>[10]</sup>. Bei Intercalation in dsDNA beträgt die bathochrome Verschiebung für **4** + 29 nm<sup>[19]</sup> bezogen auf das Absorptionsmaximum, das für nichtintercaliertes **4** bei 479 nm liegt<sup>[19, 20]</sup> (Tabelle 1). Da **6** und **7** die gleichen Chromophore wie **4** enthalten, wurde angenommen, daß durch Vergleich der Absorptionsspektren während der Zugabe von DNA zu diesen Hybriden auf die Intercalation von **6** (oder **7**) in dsDNA geschlossen werden kann.

Tabelle 1. Absorptionsmaxima und -verschiebungen freier und DNA-gebundener Anthracycline (pbp = Paare von Basenpaaren) [21].

Wirkstoff	$\lambda_{\text{max}}$ (Wirkstoff)	$\lambda_{\text{max}}$ (DNA(pbp)/Wirkstoff) [a]	$\Delta\lambda_{\text{max}}$
4	479	508	+ 29
6	483	484.5	+ 1.5
7	482	508	+ 26

[a] [DNA(pbp)]:[Wirkstoff] = 1:5.

Anders als für den natürlichen Wirkstoff **4** wird für die synthetische Verbindung **6** im Rahmen des Meßfehlers keine Rotverschiebung festgestellt (siehe Tabelle 1). Demnach scheint das Hybrid **6** unter diesen Bedingungen<sup>[21]</sup> nicht zur Intercalation in dsDNA fähig zu sein. Die Rotverschiebung für das Hybrid **7** ist dagegen nahezu genauso groß wie die für **4**. Somit wird die Anthracyclin-Domäne in **7** durch die Ethoxyethylbrücke so ausgerichtet, daß eine starke Intercalation ermöglicht wird.

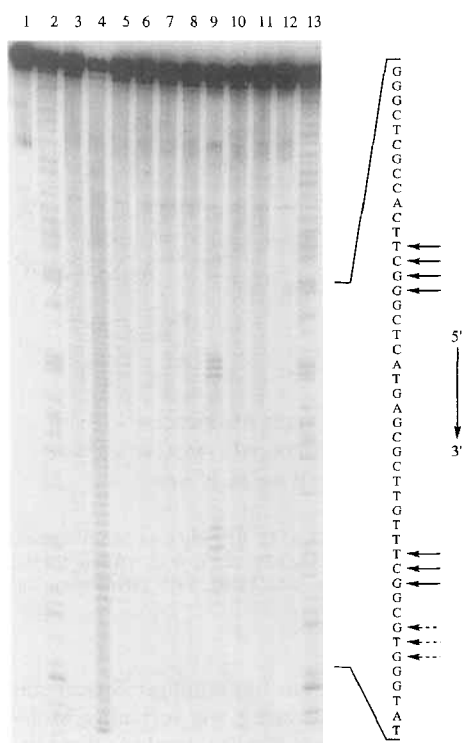


Abb. 2. Durch **7** hervorgerufene Verstärkung der  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -MPE-Spaltung: Aus dem Autoradiogramm eines 12%-Polyacrylamidgels (8 M Harnstoff, 9 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan(Tris)-HCl, 90 mM Borsäure, 3 mM EDTA) wird die Bindung des Wirkstoffes an einen Bereich des 155-bp-*SphI*/*SgrAI*-Spaltstückes von pBR322 deutlich, das durch Einwirkung der Restriktionsendonuclease erhalten wurde. Die Plasmid-DNA wurde mit *SphI* gespalten, am 3'-Ende  $^{32}\text{P}$ -markiert und durch *SgrAI* weiter in Fragmente gespalten. Das durch Gel- und Elektroelution gereinigte Fragment wurde bei 25 °C in einer Lösung (10  $\mu\text{L}$ ) vorinkubiert, die 10 mM Tris-HCl (pH = 7.6), 25 mM NaCl, Wirkstoff und 1 mM ultraschallbehandelte DNA aus Kalbsthymusdrüse (Phosphat-Puffer) enthält. Nach 25 min wurden Dithioerythrit (30 mM) und frisch zubereitetes  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -MPE (5  $\mu\text{M}$ ) zu den Lösungen (Konzentrationen 2.5 mM und 0.4  $\mu\text{M}$ ) gegeben, und die Reaktionsmischung (Gesamtvolumen 12  $\mu\text{L}$ ) wurde 15 min bei 10 °C inkubiert. Die DNA wurde bei jeder Reaktion mit Ethanol ausgefällt und durch Gelelektrophorese in ihre Komponenten getrennt. Das Gel wurde bei 80 °C getrocknet. Es wurde ein Autoradiogramm angefertigt (Zeitdauer: 5 d, Fuji-Röntgenfilm) und dieses photographiert: Spur 1 enthält unbehandeltes markiertes Fragment; Spuren 2 und 13 eine Maxam-Gilbert-A+G-Sequenz; Spur 3: mit  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -MPE behandeltes Fragment, das als Kontrolle dient und keinen Wirkstoff enthält; Spuren 4–6: jeweils 1, 10 bzw. 100  $\mu\text{M}$  **6**; Spuren 7–9: jeweils 1, 10 bzw. 100  $\mu\text{M}$  **7**; Spuren 10–12: jeweils 1, 10 bzw. 100  $\mu\text{M}$  **4**. Rechts: Bereiche der Sequenz, die verstärkter Spaltung unterliegen; die durchgezogenen und unterbrochen gezeichneten Pfeile deuten auf mehr bzw. weniger starke Spaltung hin, die durch **7** hervorgerufen wird.

Von besonderem Interesse war die Frage, ob durch die Kohlenhydrat-Domäne die Eigenschaft der Sequenzselektivität auf das Anthracyclin übertragen wird. Um diese Frage zu beantworten, wurden  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -MPE-Footprinting-Analysen<sup>[22]</sup> (MPE = Methidiumpropyl-EDTA) am 155 Basenpaaren langen ([ $^{32}\text{P}$ -3']-endmarkiertem) *SphI*/*SgrAI*-Fragment von pBR322 durchgeführt. Dieses Fragment enthält sowohl Bereiche, für die Calicheamicin  $\gamma_1^{\text{I}}$  Spezifität aufweist<sup>[6a, 7]</sup>, als auch andere, willkürlich gewählte DNA-Sequenzen, um (eventuelle) neue Affinitäten bewerten zu können. Die Ergebnisse mit **4**, **6** und **7** sind in Abbildung 2 dargestellt. In einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  weist **7** Bindungsspezifität in Bereichen verstärkter  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -MPE-Spaltung auf und nicht in den vor Spaltung geschützten Bereichen, wie es für Standard-Footprinting-Analysen typisch ist. Dies wurde schon in  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -MPE-Studien mit dem Kohlenhydrat **3** allein festgestellt und auf eine Ausweitung der kleinen Furche<sup>[4a]</sup> oder auf stellenweise Entspiralisierung der Helix zurückgeführt. Zwar tritt die durch **7** hervorgerufene verstärkte Spaltung nicht in den von Calicheamicin  $\gamma_1^{\text{I}}$  bevorzugten Sequenzen auf, aus Abbildung 2 wird allerdings deutlich, daß diese Hypersensitivität mit der 3'-Seite anderer Homopyrimidin/Homopurin-Bereiche (d(CTTC)·d(GAAG) und d(TTTC)·d(GAAA)) korreliert. Ein Modell, das die gleichzeitige Intercalation und die Wechselwirkung des Kohlenhydrates mit der kleinen Furche der DNA berücksichtigt, ist in Abbildung 3 veranschaulicht.

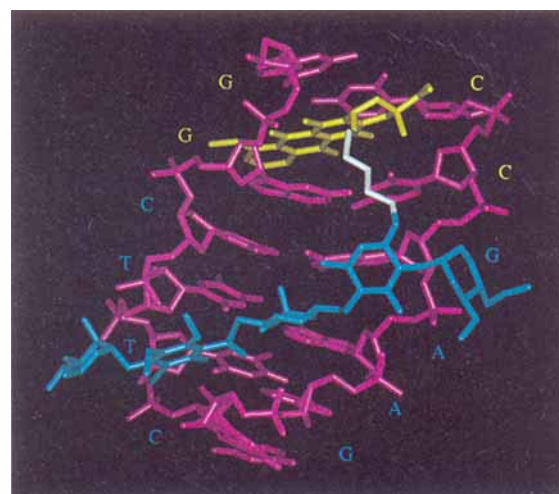


Abb. 3. Modell eines möglichen Wirkstoff-DNA-Komplexes, der Calichearubin **7** und d(CCGAAG)·d(CTTCGG) (magenta) enthält. Die Kohlenhydrat-Domäne [8] (blaugrün), die an die kleine Furche bindet, und die Intercalationsdomäne [11 d] (gelb) sind über einen Ethoxyethyl-Linker (weiß) verknüpft.

Jeder dieser hypersensitiven Bereiche enthält ein Pyrimidin/Purin-Motiv, für das **4** mäßige Selektivität aufweist<sup>[10f, b]</sup>. Hohe Konzentrationen an **4** (Spur 12) führen zu schwach ausgeprägten Banden, was ein Blockieren der  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -MPE-Spaltung an der Oberfläche aufgrund unspezifischer Bindung an DNA-Phosphate nahelegt. Das synthetische Hybrid **7** scheint also Merkmale der einzigartigen Spezifität der Stammverbindungen in sich zu vereinen.

Es ist daher sinnvoll, weitere Verknüpfungen zwischen anderen Wirkstoff-Kohlenhydrat-Domänen herzustellen. Molekular-Modeling-Rechnungen sind damit ein nützliches Werkzeug zur Identifizierung vielversprechender Wirkstoffe.

## Experimentelles

**Calichearubicin A 6:** Durch eine Lösung von **11** (5.6 mg, 0.004 mmol) in THF (2.7 mL, 0.0015 M) wurde 20 min Argon geleitet. Nach Zugabe von 3 Äquiv. einer 0.1 N LiOH-Lösung (mit Argon gesättigt, 0.12 mL) wurde das Gemisch 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Farbe der Lösung änderte sich hierbei von hellgelb nach dunkelblau. Sobald eine Probe der Lösung beim Auftragen auf eine DC-Platte eine rote Farbe annahm, wurde das Reaktionsgemisch zu einer gesättigten  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung gegeben und anschließend mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wurde abgetrennt, mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Danach wurde filtriert, eingeeignet und auf einer präparativen DC-Platte chromatographiert ( $10 \times 20 \text{ cm}^2 \times 0.25 \text{ mm}$ ;  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 9/1), um 2.4 mg (44 %) orangerotes, amorphes **6** zu erhalten ( $R_f = 0.32$ ,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 1).  $[\alpha]_D^{25} = +16$  ( $c = 0.275$  in  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): A, B, C, D und E (in Klammern) beziehen sich auf die einzelnen Ringe der Kohlenhydrate (siehe Abb. 1). Die Numerierung der Protonen bezieht sich auf die Wasserstoffatome des Aglycons (siehe Abb. 1):  $\delta = 14.18$  (s, 1H, C6-OH), 13.41 (br. s, 1H, C11-OH), 8.07 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, H1), 7.82 (t,  $J = 8.1$  Hz, 1H, H2), 7.40 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, H3), 6.68 (br. s, 1H, NH-O), 5.72 (s, 1H, H1 (D)), 5.61 (br. s, 1H, H7), 5.25 (d,  $J = 4$  Hz, 1H, H1 (A)), 5.19 (br. s, 1H, H1 (E)), 5.08 (d,  $J = 7$  Hz, 1H, H1 (B)), 4.64 (m, 1H, H5 (A)), 4.50 (br. s, 1H, H2 (D)), 4.30 (t,  $J = 10$  Hz, 1H, H3 (A)), 4.21 (m, 1H, H5 (D)), 4.10 (m, 1H, H5 (B)), 4.08 (s, 3H, C4-OCH<sub>3</sub>), 3.95 (br. s, 1H, H3 (B)), 3.84 (s, 6H, 2C-OCH<sub>3</sub> (C)), 3.83 (m, 1H, H3 (D)), 3.73 (dd,  $J = 9.4, 7.7$  Hz, 1H, H2 (A)), 3.65 (pseudo-t,  $J = 9.8$  Hz, 2H, H4 (B), H4 (D)), 3.58 (s, 3H, C-OCH<sub>3</sub> (D)), 3.38 (s, 3H, C-OCH<sub>3</sub> (E)), 3.38 (d,  $J = 18$  Hz, 1H, H10b), 3.13 (d,  $J = 18$  Hz, 1H, H10a), 3.00–2.80 (br. s, 3H, NH,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ ), 2.64 (d,  $J = 18.5$  Hz, 1H, H8b), 2.45 (s, 3H, C9-C(O)CH<sub>3</sub>), 2.31 (s, 3H, C-CH<sub>3</sub> (C)), 2.31 (m, 1H, H4 (A)), 2.17 (m, 1H, H2<sub>ax</sub> (E)), 1.98 (dd,  $J = 14.0, 4.0$  Hz, 1H, H8a), 1.71 (m, 1H, H2<sub>ax</sub> (E)), 1.59 (br. d,  $J = 9$  Hz, 1H, H2<sub>ax</sub> (B)), 1.46 (m, 1H, H2<sub>ax</sub> (B)), 1.46 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, H6 (A)), 1.39 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, H6 (B)), 1.31 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, H6 (D)), 1.25 (br. s, 3H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ ); H3, H4, H5<sub>ax</sub> und H5<sub>eq</sub> (Protonen von Ring E) konnten nicht zugeordnet werden; selektive ROESY-Spektren von H1 (A) → H2 (A), H4 (A), H7; IR ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\tilde{\nu} = 3686, 3608, 3500, 3029, 2960, 2931, 1715, 1671, 1602, 1587, 1455, 1416, 1381, 1283, 1234, 1072, 1038, 989, 910 \text{ cm}^{-1}$ ; HR-MS (FAB):  $m/z$ : 1343.3511  $[M + H]^+$ ; ber. für  $\text{C}_{58}\text{H}_{76}\text{N}_2\text{O}_{24}\text{S}$ : 1343.3550.

**Calichearubicin B 7:** Die Versuche wurden wie für **6** beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme, daß 5 Äquiv. einer 0.1 N LiOH-Lösung zugegeben wurden und das Reaktionsgemisch 6 h gerührt wurde. Nach dem Aufarbeiten und nach chromatographischer Reinigung wurde **7** als orangeroter, amorpher Feststoff in 35 % Ausbeute erhalten:  $R_f = 0.20$  ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 9/1);  $[\alpha]_D^{25} = +23$  ( $c = 0.2$  in  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 13.93$  (s, 1H, C6-OH), 13.29 (s, 1H, C11-OH), 7.94 (dd,  $J = 7.7, 1.0$  Hz, 1H, H1), 7.71 (pseudo-t,  $J = 8.1$  Hz, 1H, H2), 7.35 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, H3), 6.36–6.30 (br. s, 1H, NH-O), 5.73 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H, H1 (D)), 5.30 (br. s, 1H, H1 (E)), 5.04 (m, 2H, H7, H1 (B)), 4.77 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H, H2 (D)), 4.34 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, H1 (A)), 4.31 (br. s, 1H, H3 (B)), 4.19 (m, 1H, H5 (D)), 4.07 (m, 1H, H5 (B)), 4.01 (s, 3H, C4-OCH<sub>3</sub>), 3.97 (m, 3H, H3 (A), O7-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.89 (s, 3H, C-OCH<sub>3</sub> (C)), 3.84 (s, 4H, H3 (D), C-OCH<sub>3</sub> (C)), 3.76–3.73 (m, 5H, H4 (B), H5<sub>ax</sub> (E), H5<sub>eq</sub> (E), O7-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.70 (m, 1H, H5 (A)), 3.73–3.60 (m, 4H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-A), 3.65 (t,  $J = 9.5$  Hz, 1H, H4 (D)), 3.57 (s, 3H, C-OCH<sub>3</sub> (D)), 3.47 (t,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H2 (A), H3 (E)), 3.38 (br. s, 3H, C-OCH<sub>3</sub> (E)), 3.24 (d,  $J = 18$  Hz, 1H, H10b), 2.96 (d,  $J = 18$  Hz, 1H, H10a), 2.90–2.70 (br. m, 4H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ , H4 (E)), 2.50 (m, 1H, H8b), 2.43 (s, 3H, C9-C(O)CH<sub>3</sub>), 2.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (C)), 2.36 (m, 1H, H2<sub>ax</sub> (E)), 2.32 (m, 1H, H4 (A)), 2.04 (m, 1H, H2<sub>ax</sub> (B)), 1.96 (m, 1H, H8a), 1.78 (m, 1H, H2<sub>ax</sub> (B)), 1.62 (m, 1H, H2<sub>ax</sub> (E)), 1.41 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, H6 (B)), 1.31 (d,  $J = 6.1$  Hz, 3H, H6 (A)), 1.30 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, H6 (D)), 1.11 (m, 3H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ ); IR ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\tilde{\nu} = 3594, 3469, 2930, 2856, 1718, 1677, 1619, 1580, 1460, 1416, 1402, 1354, 1321, 1287, 1239, 1071, 993, 965, 907, 825 \text{ cm}^{-1}$ ; HR-MS (FAB):  $m/z$ : 1431.4094  $[M + H]^+$ ; ber. für  $\text{C}_{62}\text{H}_{83}\text{N}_3\text{O}_{26}\text{S}$ : 1343.3550.

Eingegangen am 10. Juni 1996 [Z 9225]

**Stichworte:** Anthracycline · DNA-Spaltung · Kohlenhydrate · Totalsynthesen · Wirkstoffdesign

- H. Kawaguchi, M. Konishi, B. Krishnan, H. Ohkuma, K.-i. Saitoh, T. W. Doyle, *ibid.* **1987**, 109, 3461; f) J. Golik, G. Dubay, G. Groenewold, H. Kawaguchi, M. Konishi, B. Krishnan, H. Ohkuma, K.-i. Saitoh, T. W. Doyle, *ibid.* **1987**, 109, 3462.
- [4] a) J. Aiyar, S. J. Danishefsky, D. M. Crothers, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 7552, zit. Lit.; b) J. Aiyar, S. A. Hitchcock, D. Denhart, K. K. C. Liu, S. J. Danishefsky, D. M. Crothers, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 925; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 855; c) J. Drak, N. Iwasawa, S. J. Danishefsky, D. M. Crothers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 7464.
- [5] a) K. C. Nicolaou, S.-C. Tsay, T. Suzuki, G. F. Joyce, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 7555; b) L. G. Paloma, J. A. Smith, W. J. Chazin, K. C. Nicolaou, *ibid.* **1994**, 116, 3697; c) T. Li, Z. Zeng, V. A. Estevez, K. U. Baldenius, K. C. Nicolaou, G. F. Joyce, *ibid.* **1994**, 116, 3709.
- [6] a) N. Zein, A. M. Sinha, W. J. McGahren, G. A. Ellestad, *Science* **1988**, 240, 1198; b) N. Zein, M. Poncin, R. Nilakantan, G. A. Ellestad, *ibid.* **1989**, 244, 697; c) S. Walker, R. Landovitz, W. D. Ding, G. A. Ellestad, D. Kahne, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 4608; d) D. Kahne, *Chem. Biol.* **1995**, 2, 7, zit. Lit.
- [7] a) S. C. Mah, C. A. Townsend, T. D. Tullius, *Biochemistry* **1994**, 33, 614; b) S. C. Mah, M. A. Price, C. A. Townsend, T. D. Tullius, *Tetrahedron* **1994**, 50, 1361.
- [8] N. Ikemoto, R. A. Kumar, T.-T. Ling, G. A. Ellestad, S. J. Danishefsky, D. J. Patel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 10506.
- [9] N. Ikemoto, R. A. Kumar, P. C. Dedon, S. J. Danishefsky, D. J. Patel, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 9387.
- [10] a) F. Arcamone, S. Penco, *Gann Monogr. Cancer Res.* **1989**, 36, 81; b) B. R. J. Abdella, J. Fisher, *Environ. Health Perspect.* **1985**, 64, 3; c) F. Arcamone in *Doxorubicin Anticancer Antibiotics. Medicinal Chemistry Series of Monographs*, Vol. 17 (Hrsg.: G. Stevens), Academic Press, New York, **1981**; d) F. Arcamone, G. Rganceschi, P. Orezzi, G. Cassinelli, W. Barbieri, R. Mondelli, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 5334; e) J. B. Chaires, N. Dattagupta, D. M. Crothers, *Biochemistry* **1982**, 21, 3933; f) J. B. Chaires, K. R. Fox, J. E. Herrera, M. Britt, M. J. Waring, *ibid.* **1987**, 26, 8227; g) D. P. Remeta, C. P. Mudd, R. L. Berger, K. J. Breslauer, *ibid.* **1993**, 32, 5064; h) C. J. Roche, J. A. Thompson, D. M. Crothers, *ibid.* **1994**, 33, 926; i) V. Berlin, W. A. Haseltine, *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 4747; j) M. W. Van Dyke, R. P. Hertzberg, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, 79, 5470; k) M. H. Moore, W. N. Hunter, B. L. d'Estaintot, O. Kennard, *J. Mol. Biol.* **1989**, 206, 693; l) C. M. Nunn, L. van Mervelt, S. Zhang, M. H. Moore, O. Kennard, *ibid.* **1991**, 222, 167.
- [11] a) G. J. Quigley, A. H.-J. Wang, G. Ughetto, G. van der Marel, J. H. van Boom, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 7204; b) A. H.-J. Wang, G. Ughetto, G. J. Quigley, A. Rich, *Biochemistry* **1987**, 26, 1152; c) C. A. Fredrick, L. D. Williams, G. Ughetto, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. Rich, A. H.-J. Wang, *ibid.* **1990**, 29, 2538; d) Y.-G. Gao, Y.-C. Liaw, Y.-K. Li, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. H.-J. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 4845; e) A. H.-J. Wang in *Molecular Aspects Anticancer Drug-DNA Interaction* (Hrsg.: S. Neidle, M. J. Waring), MacMillan, Basingstoke, Großbritannien, **1993**, S. 32.
- [12] Der Name Calichearubicin wird von Calicheamicin und Daunorubicin abgeleitet. Er bezieht sich auch auf die rubinrote Farbe der Verbindung.
- [13] a) S. A. Hitchcock, M. Y. Chu-Moyer, S. H. Boyer, S. H. Olson, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5750; b) S. A. Hitchcock, S. H. Boyer, M. Y. Chu-Moyer, S. H. Olson, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 928; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 858; c) R. L. Halcomb, S. H. Boyer, M. D. Wittman, S. H. Olson, D. J. Derhart, K. K. C. Liu, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5720.
- [14] R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 213; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 212.
- [15] S. H. Boyer, Dissertation, Yale University, New Haven, CT, **1994**.
- [16] G. A. Sulikowski, E. Turos, S. J. Danishefsky, G. M. Shulte, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 1373.
- [17] J. V. Jizba, P. Sedmera, J. Vokoun, H. Lipavska, M. Podojil, Z. Vanek, *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1984**, 49, 653.
- [18] a) R. L. Halcomb, S. H. Boyer, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 314; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 338; b) K. C. Nicolaou, K. Ajito, H. Komatsu, B. M. Smith, T. Li, M. G. Egan, L. Gomez-Paloma, *ibid.* **1995**, 107, 614 bzw. **1995**, 34, 576.
- [19] E. J. Gabbay, D. Grier, R. E. Fingerle, R. Reimer, R. Levy, S. W. Pearce, W. D. Wilson, *Biochemistry* **1976**, 15, 2062.
- [20] A. Di Marco, F. Zunino, R. Silvestrini, C. Gambarucci, R. A. Gambetta, *Biochem. Pharmacol.* **1971**, 20, 1323.
- [21] Lösungen von **6** und **7** (Anfangskonzentration jeweils 100  $\mu\text{M}$ ) wurden mit einer DNA-Lösung (ultraschallbehandelte DNA aus Kalbsthymusdrüse) titriert und spektrophotometrisch untersucht. Für jede Versuchsreihe wurde die durch DNA-Zugabe verursachte Volumenänderung bei der Berechnung des  $[\text{DNA}]/[\text{Wirkstoff}]$ -Verhältnisses berücksichtigt. Die DNA-Konzentration ist in Paaren von Basenpaaren (bpb) angegeben, da diese Einheit das kleinste zur Intercalation notwendige Strukturmotiv ist (Tabelle 1).
- [22] a) R. P. Hertzberg, P. B. Dervan, *Biochemistry* **1984**, 23, 3934; b) M. W. Van Dyke, P. B. Dervan, *Nucleic Acids Res.* **1983**, 11, 5555; c) *Biochemistry* **1983**, 22, 2373.