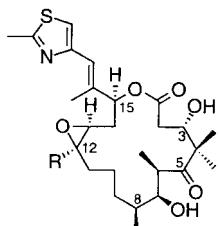


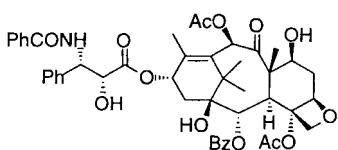
Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Epothilone und erster In-vivo-Vergleich mit Paclitaxel**

Dai-Shi Su, Aaron Balog, Dongfang Meng,
Peter Bertinato, Samuel J. Danishefsky,*
Yu-Huang Zheng, Ting-Chao Chou, Lifeng He und
Susan B. Horwitz

Die hohe Cytotoxizität und die gute Stabilisierung von Mikrotubuli haben zu großem Interesse an den bakteriellen Naturstoffen Epothilon A **1** und B **2** geführt.^[1] In ihrer biologischen Aktivität erinnern sie an Paclitaxel (Taxol) **3**, einem klinisch be-



1, R = H: Epothilon A
2, R = Me: Epothilon B



3: Paclitaxel

reits gegen Gebärmutter- und Brustcarcinome eingesetzten und gegenwärtig gegen weitere Tumore getesteten Therapeuticum.^[2] Die Anwendung von Paclitaxel wird jedoch durch Verabreichungsprobleme und das Auftreten von Mehrfachresistenz (multiple drug resistance, MDR) beeinträchtigt. Die Synthese vieler Analoga hat ergeben, daß größere Veränderungen am Paclitaxelgrundgerüst zum Verlust der biologischen Aktivität führen. Unseres Wissens nach konnte bisher keine strukturell weniger komplexe Verbindung Paclitaxel in seiner therapeutischen Wirksamkeit ersetzen.

Die Epothilone weisen eine höhere Wasserlöslichkeit auf als Paclitaxel und zeigten in ersten In-vitro-Studien besseres Verhalten gegenüber einigen MDR-Zelllinien. Um eingehendere Untersuchungen durchführen zu können, zielten unsere Bemühungen und die anderer zunächst auf die Synthese von **1** und **2**.^[3–9] Die erste stereoselektive Synthese von **1** wurde von uns durch eine Boralkyl-Suzuki-Kupplungsstrategie zum Aufbau des Makrocyclus durch Knüpfung der Bindung zwischen C11 und C12 erreicht.^[3c, e] Unserer Totalsynthese folgten drei wei-

tere, bei denen der C12-C13-Ringschluß durch eine nicht-stereoselektive Olefinmetathese verwirklicht wurde.^[3d, 4, 5] Vor kurzem wurde über einen weiteren Zugang zu **1** berichtet, bei dem die C12-C13-Bindung durch eine stereoselektive Wittig-Reaktion geknüpft wird.^[4e]

Die erste Synthese von Epothilon B **2** wurde wiederum durch eine hochselektive Boralkyl-Suzuki-Kupplung zum Aufbau des trisubstituierten, cyclischen Olefins erreicht.^[3e] Eine auf einer nichtstereoselektiven Wittig-Reaktion beruhende Strategie zur Synthese von **2** wurde vor kurzem bekannt.^[4d] Einen bedeutenden Fortschritt konnten wir durch die Verwendung von Dimethylidioxiran zur Epoxidierung der C12-C13-Doppelbindungen in den Desoxyepothilonen **4** und **5** erzielen.^[3c–e]

Zwar sind wir bisher noch nicht in der Lage, die Epothilone in einem für pharmazeutische Zwecke ausreichenden Maßstab herzustellen, doch konnten wir erste In-vitro- und In-vivo-Tests mit den synthetischen Epothilonen und deren Derivaten durchführen. Gegenwärtig untersuchen wir Verbindungen mit ähnlicher Leitstruktur, die auf dem Weg zu **1** und **2** anfallen. Bisher haben wir noch keine von den vollständigen Naturstoffen durch weitere Umwandlungen abgeleitete Verbindungen hergestellt. Derzeit versuchen wir, die für die Aktivität notwendigen und entbehrlichen Strukturteile auf der Basis von Struktur-Wirkungs-Beziehungen (structure–activity relationships, SAR) herauszufinden. Die daraus gewonnenen Einsichten sollen als Grundlage für Molecular-modeling-Studien dienen. Darüber hinaus wollen wir In-vivo-Ergebnisse für den direkten Vergleich von Epothilon B mit Paclitaxel sammeln.

Um die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Epothilone genauer zu untersuchen, ist es sinnvoll, die Wirkstruktur in einen Acylsektor (willkürlich als der Bereich C1–C8 definiert), einen O-Alkylsektor (C9–C15) und einen von C15 ausgehenden Arylsektor zu unterteilen (siehe Schema 1). Unseren ersten Studien zufolge ist der Acylsektor bezüglich Modifikationen intolerant. So führen die Inversion der Konfiguration an C3 (*S* → *R*) oder die Reduktion der C5-Oxogruppe zu schwerwiegenden Aktivitätseinbußen. Die Entfernung aller Funktionalitäten an C3, C5, C6, C7 und C8 schlägt sich im Verlust der Cytotoxizität und der Aktivität im Tubuli/Mikrotubuli-System nieder.^[10] Wie wir kürzlich festgestellt haben, führt die Entfernung der 8-Methylgruppe zu einem erheblichen Verlust der biologischen Funktion.^[11] Wir berichten nun, daß die Ringverengung durch Entfernung der „C9“-Methyleneinheit (siehe den 15gliedrigen Cyclus **18**) auch zu einem erheblichen Aktivitätsverlust führt, was durch Tubulin-Polymerisations/Depolymerisations-Tests, die ein guter Indikator für die biologische Funktion sind, gemessen wird.^[12]

Den O-Alkylsektor betreffend konnten wir unsere ursprünglichen Ergebnisse^[13] ausbauen und können nun feststellen, daß Epothilon B **2** sowohl in den Tubulin-Polymerisations/Depolymerisations-Tests als auch bezüglich der In-vitro-Cytotoxizität wesentlich wirksamer ist als Epothilon A **1** (Abb. 1, Tabelle 1). Des Weiteren konnten wir zeigen, daß die (*Z*)-Desoxyverbindungen **4** und **5** ähnlich aktiv sind wie die Naturstoffe **1** und **2**. Wiederum war die Wirksamkeit der „A“-Vorstufe **4** bemerkenswerterweise weisen sogar die den (*Z*)-Verbindungen **4** und **5** weniger ähnlichen (*E*)-Desoxyverbindungen **6** und **7** eine signifikante biologische Aktivität auf.^[3d, e, 4d] Hervorzuheben bleibt, daß Epothilon B ungefähr 4000mal reaktiver gegenüber der resistenten menschlichen Leukämiezelllinie CCRF-CEM/VBL (Zellkultur-Toxizitätsstudie) ist als Paclitaxel.

Der Arylsektor wurde nun genauer untersucht.^[14] So wird ein Ethyl-, Propyl- oder Hexylsubstituent an C12 toleriert, wie mit **8**, **10**, **12–14** festgestellt wurde.^[15] Interessanterweise geht

[*] Prof. S. J. Danishefsky,^[+] Dr. D.-S. Su, Dr. A. Balog, D. Meng,^[+]

Dr. P. Bertinato
Laboratory for Bioorganic Chemistry,

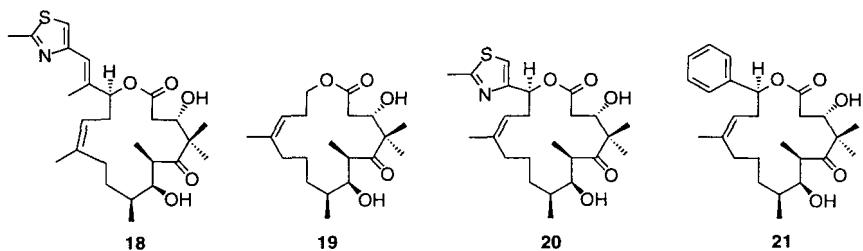
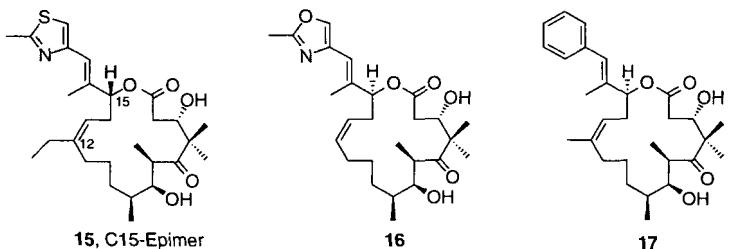
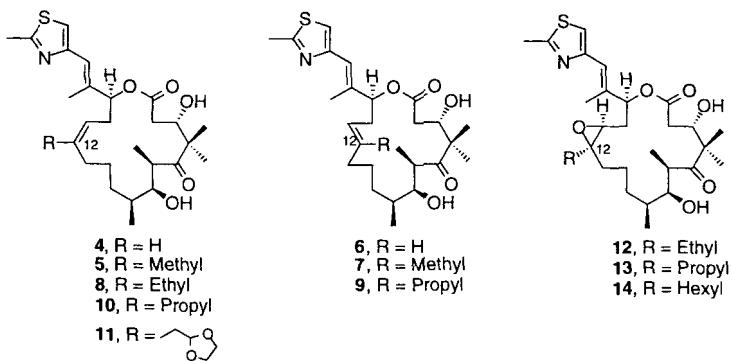
Sloan-Kettering Institute for Cancer Research
1275 York Avenue, New York, NY 10021 (USA)
Telefax: Int. + 212/772-8691

Dr. Y.-H. Zheng, Dr. T.-C. Chou
Laboratory for Biochemical Pharmacology, Sloan-Kettering Institute, New York, NY (USA)

L. He, S. B. Horwitz
The Department of Molecular Pharmacology, The Albert Einstein College of Medicine, Philadelphia, PA (USA)

[+] Weitere Adresse:
Columbia University, Department of Chemistry
Havemeyer Hall, New York, NY 10021 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health gefördert (Grants CA-28824 (S. J. D.) und CA-39821 (S. B. H.) sowie Postdoktorandenstipendien an A. B. (CA-GM 72231) und P. B. (CA-62948)). Wir danken Dr. George Suknick (NMR Core Facility, Sloan-Kettering Institute, New York) für die NMR-spektroskopischen und massenspektrometrischen Analysen, Prof. Dr. Gerhard Högle von der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig, für die für Vergleichsanalysen zur Verfügung gestellten natürlichen Epothilone A und B sowie Prof. Gunda Georg von der University of Kansas, Lawrence, KS (USA), der uns auf die Epothilon-Problematik aufmerksam machte.



weder in **11**, das eine polare Acetalfunktion an C12 trägt, noch in der (*E*)-Desoxyverbindung **9** die biologische Aktivität verloren.^[16] Darüber hinaus ist die Aktivität – zwar vermindert – auch dann noch vorhanden, wenn die Konfiguration an C15 invertiert ist (**15**). Der O-Alkylsektor ist also bemerkenswert tolerant gegenüber Veränderungen, was durch die grundlegende Erhaltung seiner In-vitro-Funktion bestätigt wird.

Untersuchungen des Arylsektors^[14] ergaben, daß auch dieser gegenüber Änderungen recht tolerant ist, wie dem Austausch

Tabelle 1. Relative Wirksamkeiten von Epothilonverbindungen gegenüber werkstoffsensitiven und -resistenten CCRF-CEM-Zelllinien [18].

Verbindung	CCRF-CEM IC ₅₀ [μ M]	CCRF-CEM/VBL IC ₅₀ [μ M]
Paclitaxel 3	0.002	4.140
Epothilon A 1	0.003	0.020
Epothilon B 2	0.0002	0.001
4	0.022	0.012
5	0.009	0.017
6	0.052	0.035
7	0.090	0.262
8	0.021	0.077
9	0.090	0.254
10	0.039	0.067
11	0.003	0.009
12	0.001	0.007
13	0.004	0.006
14	0.027	0.049
15	0.055	0.197
16	0.030	0.049
17	0.098	0.146
18	10.0	8.95
19	>10.0	>10.0
20	3.52	1.20
21	1.80	>5.00

des Schwefel- gegen ein Sauerstoffatom. So ist **16**, das einen Oxazolring statt eines Thiazolrings enthält, in Tubulin-Polymerisations- (Abb. 1)^[17] und Cytotoxizitäts-Tests (Tabelle 1)^[18] ebenso wirksam wie **4**. Dadurch ermutigte, wagten wir eine drastischere Veränderung der Aryldomäne: den Einbau einer Phenyl- statt der Thiazoleinheit. Beachtenswerterweise beträgt die Aktivität von **17** in Tubulin-Polymerisations-

Tests 60 % der Aktivität von **2**. Obwohl in Cytotoxizitäts-Tests der Aktivitätsverlust von einer Größenordnung festzustellen ist, ist **17** immer noch hoch cytotoxisch.

Basierend auf diesen Daten stellte sich die Frage, ob der Arylsektor für die Aktivität überhaupt notwendig ist oder ob man ihn nicht durch ein Wasserstoffatom an C15 ersetzen kann. Die entsprechende Verbindung **19** wies jedoch kaum noch Cytotoxizität ($IC_{50} > 10 \mu\text{M}$) und keine Aktivität in Tubulin-Polymerisations-/Depolymerisations-Tests auf. Um die Frage, ob ein Doppelbindungs-Spacer zwischen dem aromatischen Ring und C15 benötigt wird, zu klären, wurden **20** und **21** synthetisiert. Interessanterweise ist deren Cytotoxizität deutlich niedriger ($IC_{50} > 1 \mu\text{M}$). Demnach kann der Arylsektor nun genauer definiert werden: Er muß einen olefinischen Spacer zwischen C15 und einer stark abänderbaren, aromatischen Untereinheit enthalten.

Selbstverständlich wird es notwendig sein, mehrere dieser Verbindungen zu synthetisieren und zu testen, um ein genaues SAR-Profil mit einer Auflösung bis zu einem Kohlenstoffatom zu erstellen. Es ist jedoch schon jetzt klar, daß der Acylsektor die empfindlichste Region gegenüber Strukturveränderungen ist (Schema 1). Dagegen weisen der O-Alkyl- und der Arylsektor bemerkenswerte Toleranz sowohl in Tubulin- als auch in MDR-Cytotoxizitätsstudien auf.

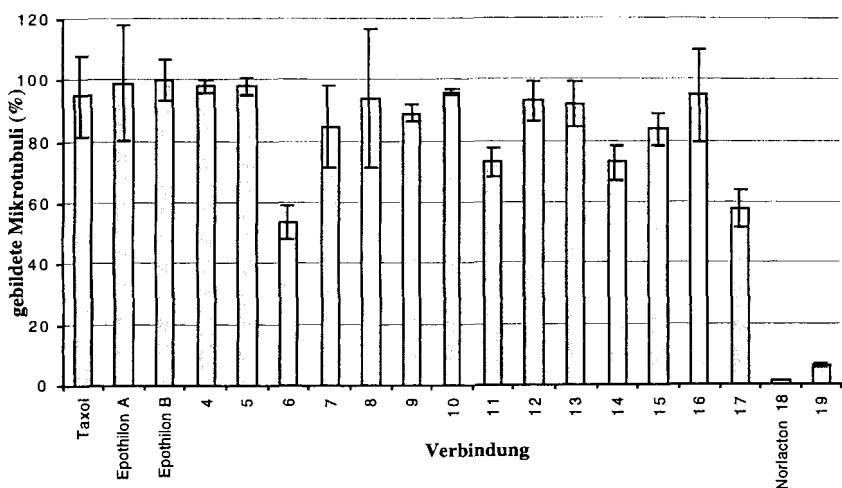
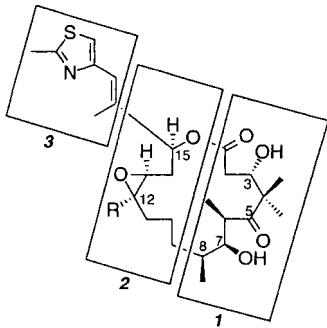


Abb. 1. Bildung von Mikrotubuli in Gegenwart von $10 \mu\text{M}$ Verbindung (in Gegenwart von $10 \mu\text{M}$ Epothilon B gebildete Mikrotubuli entsprechen 100%).



Schema 1. Die drei willkürlich ausgewählten Sektoren der Epothilone: der Aryl- (1), der Alkyl- (2) und der Acylsektor (3). Der Sektor 1 reagiert sehr empfindlich auf Veränderungen, die Sektoren 2 und 3 sind diesbezüglich recht tolerant.

Ausgangspunkt unserer In-vivo-Untersuchungen der Epothilone war ein erster direkter Vergleich von synthetischem Epothilon B **2** mit natürlichem Paclitaxel **3**. Da eine der Schwächen von Paclitaxel die mangelnde Wirksamkeit gegenüber resistenten Zelllinien ist, untersuchten wir die beiden Wirkstoffe in bezug auf ihr In-vivo-Verhalten in resistentem Tumorgewebe.^[19] Zu diesem Zweck implantierten wir subcutan CCRF-CEM/VBL-Tumorgewebe in SCID-Mäuse, die daraufhin wiederholt mit **2** (0.7 mg kg^{-1}) und **3** (2 mg kg^{-1}) behandelt wurden. Obwohl höhere Konzentrationen von Paclitaxel als von Epothilon B (Molverhältnis ca. 1.7:1) verabreicht wurden, nahm die Tumogröße im Falle von Epothilon B wesentlich stärker ab (Tabelle 2).

Tabelle 2. Chemotherapeutische Effekte nach der täglichen Behandlung von CB-17-SCID-Mäusen, denen wirkstoffresistente menschliches CCRF-CEM/VBL-Xenograft A implantiert worden war, mit Epothilon B und Paclitaxel[a].

Wirkstoff	Dosis [mg kg ⁻¹] [c]	Tumorgewicht [b]			
		Tag 7	Tag 12	Tag 17	Tag 22
Kontrolle	0	1.0	1.0	1.0	1.0
Epothilon B	0.7	1.0	0.32	0.40	0.33
Paclitaxel	2.0	1.0	0.60	0.58	0.70

[a] Mehrfachresistente CCRF-CEM/VBL-Tumorgewebe ($50 \mu\text{L}$ pro Maus) wurde am Tag 0 subcutan implantiert. Die Wirkstoffe wurden in DMSO gelöst durch Injektionen an den Tagen 7, 8, 9, 10, 14 und 15 intraperitoneal verabreicht. Pro Gruppe wurden sieben CB-17-SCID-Mäuse untersucht. [b] Das Tumorgewicht ist bezogen auf das der Kontrollreihe angegeben. Am Tag 7 betrug das Tumorgewicht in jeder Gruppe ungefähr 1 mm^3 . Das durchschnittliche Tumorgewicht der Kontrollgruppe betrug an den Tagen 12, 17 und 22 $35, 107$ bzw. 278 mm^3 . [c] Am Tag 12 hatte sich das durchschnittliche Körpergewicht nach der Behandlung mit Epothilon B und Paclitaxel um 2.7 bzw. 3.4% vermindert.

In der nachfolgenden Studie wurden Epothilon B und Paclitaxel wöchentlich gegeben (Tabelle 3).^[22] Dabei wurde den SCID-Mäusen sowohl sensitives (CCRF-CEM) als auch resistentes Tumorgewebe (CCRF-CEM/VBL) implantiert. Zum Vergleich wurde Epothilon B intraperitoneal (H_2O) und intravenös (DMSO) verabreicht. Epothilon B und Paclitaxel verringern die Größe der sensiblen Tumore in ähnlichem Maße. Gegen die resistenten Tumore zeigt Epothilon B eine deutlich bessere Wirkung als Paclitaxel. Es sollte angemerkt werden, daß Epothilon B auch gegen resistentes Tumorgewebe effektiver ist als gegen sensitives.

Tabelle 3. Chemotherapeutische Effekte nach wöchentlicher Verabreichung von Epothilon B und Paclitaxel an CB-17-SCID-Mäuse, denen wirkstoffresistente menschliches CCRF-CEM und CCRF-CEM/VBL implantiert worden war[a].

Tumor	Wirkstoff	Gabe	Dosis [mg kg ⁻¹] [b]	Tumorgewicht [c]			
				Tag 10	Tag 15	Tag 20	Tag 25
CCRF-CEM	Kontrolle	i.p.	0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Epothilon B	i.p. (H_2O)	1.5 3.0[d]	0.40 0.41	0.40 0.35	0.37 0.38	0.34 0.50
	Epothilon B	i.v. (DMSO)	1.5 3.0[e]	0.38 0.28	0.34 0.38	0.42 0.29	0.37 0.24
	Paclitaxel	i.p. (DMSO)	20.0[f] 30.0[g]	0.33 0.43	0.28 0.25	0.31 0.23	0.34 0.25
CCRF-CEM/ VBL	Kontrolle	i.p.	0	1.0	1.0	1.0	1.0
	Epothilon B	i.p. (H_2O)	1.5[h] 3.0[i]	0.23 0.26	0.34 0.25	0.27 0.20	0.26 0.22
	Epothilon B	i.v. (DMSO)	1.5 3.0	0.21 0.24	0.19 0.27	0.27 0.14	0.26 0.20
	Paclitaxel	i.p. (DMSO)	20.0[j] 30.0[k]	0.77 0.58	0.51 0.46	0.60 0.42	0.59 0.61

[a] CCRF-CEM- und CCRF-CEM/VBL-Tumorgewebe ($50 \mu\text{L}$ pro Maus) wurde am Tag 0 subcutan implantiert. Der Wirkstoff wurde an den Tagen 5, 12 und 19 verabreicht (i.p. = intraperitoneal, i.v. = intravenös). Jede Gruppe bestand aus fünf CB-17-SCID-Mäusen. [b] Am Tag 20 nahm das durchschnittliche Körpergewicht nach Epothilon-B-Gaben von 1.5 und 3.0 mg pro kg um 5.0 bzw. 6.6% ab. [c] Das Tumorgewicht ist bezogen auf das der Kontrollreihe angegeben. Am Tag 5 betrug das Tumorgewicht in jeder Gruppe ungefähr 8 mm^3 . Das Durchschnittsvolumen der CCRF-CEM-Kontrollgruppe betrug an den Tagen 10, 15 und 20 $57, 145$ bzw. 335 mm^3 , das der CCRF-CEM/VBL-Kontrollgruppe $62, 173$ bzw. 386 mm^3 . [d]–[k] Durch Wirkstoffvergiftung starben einige der Mäuse: zwei am Tag 23 (d), zwei am Tag 19 (e), drei an den Tagen 13, 21 und 21 (f), drei an den Tagen 6, 6 und 21 (g), eine am Tag 24 (h), zwei am Tag 24 (i), zwei am Tag 13 (j) und vier am Tag 6 (k).

Bis jetzt ist es uns noch nicht gelungen, ein Analogon des Naturstoffs Epothilon B mit höherer In-vitro-Wirksamkeit zu entwickeln, die Ethylverbindung **12** kommt dem Naturstoff allerdings in jeder Beziehung gleich. Wir haben die Bereiche bestimmt, die auf molekulare Veränderungen ansprechen (siehe Schema 1). In allen bisher durchgeföhrten In-vivo-Experimenten sind Epothilon B und Paclitaxel gegenüber CCRF-CEM-Tumorgeweben gleich wirksam. Erste In-vivo-Ergebnisse mit hochresistenten MDR-Tumorimplantaten deuten auf eine leichte, aber dennoch wichtige Überlegenheit von Epothilon B gegenüber Paclitaxel hin. Zwar ist es noch zu früh zu behaupten, daß wir eine dem Paclitaxel überlegene Alternative gefunden haben, doch sind die vorliegenden Ergebnisse ein vielversprechender Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen der Epothilone. Derzeit konzentrieren wir uns auf die Verbesserung der aktivsten Verbindungen und eine grundlegende Überarbeitung unserer Synthesestrategie, um alle interessanten Verbindungen auf einem möglichst effizienten Weg herstellen zu können.

Eingegangen am 8. Juli 1997 [Z10647]

Stichworte: Cytostatica · Epothilone · Naturstoffe · In-vivo-Untersuchungen · Struktur-Wirkungs-Beziehungen

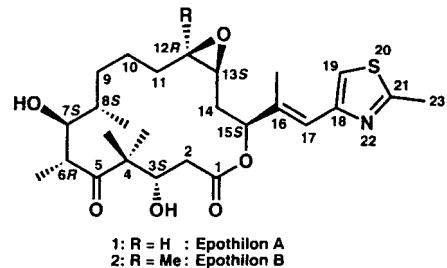
- [1] G. Högle, N. Bedorf, H. Steinmetz, D. Schomberg, K. Gerth, H. Reichenbach, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1671; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1567.
- [2] a) „Taxane Anticancer Agents, Basic Science and Current Status“: *ACS Symp. Ser.* **1995**, 583; b) „The Chemistry and Pharmacology of Taxol® and its Derivatives“: *Pharmacochim. Libr.* **1995**, 22; c) K. C. Nicolaou, W.-M. Dai, K. Guy, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 38; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 15.
- [3] Modellreaktionen: a) D. Meng, E. J. Sorensen, P. Bertinato, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7998; b) P. Bertinato, E. J. Sorensen, D. Meng, S. J. Danishefsky, *ibid.* **1996**, *61*, 8000; Totalsynthesen: c) A. Balog, D. Meng, T. Kamenecka, P. Bertinato, D.-S. Su, E. J. Sorensen, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2976; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2801; d) D. Meng, D.-S. Su, A. Balog, P. Bertinato, E. J. Sorensen, S. J. Danishefsky, Y.-H. Zheng, T.-C. Chou, L. He, S. B. Horwitz, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2733; e) D.-S. Su, D. Meng, P. Bertinato, A. Balog, E. J. Sorensen, S. J. Danishefsky, Y.-H. Zheng, T.-C. Chou, L. He, S. B. Horwitz, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 775; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 757.

- [4] Modellreaktionen: a) K. C. Nicolaou, Y. He, D. Vourloumis, H. Vallberg, Z. Yang, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2554; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2399; Totalsynthesen: b) Z. Yang, Y. He, D. Vourloumis, H. Vallberg, K. C. Nicolaou, *ibid.* **1997**, *109*, 170 bzw. **1997**, *36*, 166; c) K. C. Nicolaou, F. Sarabia, S. Ninkovic, Z. Yang, *ibid.* **1997**, *109*, 539 bzw. **1997**, *36*, 525; d) K. C. Nicolaou, N. Winssinger, J. Pasto, S. Ninkovic, F. Sarabia, Y. He, D. Vourloumis, Z. Yang, T. Li, P. Giannakakou, E. Hamel, *Nature (London)* **1997**, *387*, 268.
- [5] Modellreaktionen: a) D. Schinzer, A. Limberg, O. M. Böhm, *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 1477; Totalsynthese: b) D. Schinzer, A. Limberg, A. Bauer, O. M. Böhm, M. Cordes, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 543; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 523.
- [6] T. Gabriel, L. Wessjohann, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1363.
- [7] E. Claus, A. Pahl, P. G. Jones, H. M. Meyer, M. Kalesse, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1359.
- [8] J. Mulzer, A. Mantoulidis, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 9179.
- [9] R. E. Taylor, J. D. Haley, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2061.
- [10] Unveröffentlichte Ergebnisse mit den in Lit. [3a, b] beschriebenen Verbindungen.
- [11] A. Balog, P. Bertinato, D.-S. Su, D. Meng, E. Sorensen, S. J. Danishefsky, Y.-H. Zheng, T.-C. Chou, L. He, S. B. Horwitz, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4529.
- [12] Mit gleicher Berechtigung könnte man auch von der Entfernung der C10- oder der C11-Methylengruppe beim Übergang zur Nor-Verbindung **18** sprechen; hier betrachten wir diesen Übergang als „C9-Verlust“ und damit als Veränderung der Substituenten an C8.
- [13] a) D. M. Bollag, P. A. McQueney, J. Zhu, O. Hensens, L. Koupal, J. Liesch, M. Goetz, E. Lazarides, C. M. Woods, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2325; b) R. J. Kowalski, P. Giannakakou, E. Hamel, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 2534.
- [14] Alle beschriebenen Analoga wurden auf dem von uns bereits beschriebenen Weg synthetisiert: D. Meng, P. Bertinato, A. Balog, D.-S. Su, T. Kamenecka, E. Sorensen, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, im Druck.
- [15] Die an C12 n-Hexyl-substituierte (Z)-Desoxyverbindung weist ebenfalls eine beträchtliche biologische Aktivität auf. Allerdings ist ihre Löslichkeit in DMSO sehr gering, weshalb die Resultate mit dieser Verbindung nicht in Abb. 1 berücksichtigt wurden.
- [16] Zur Herstellung des *trans*-Epoxids, dessen biologische Aktivität sehr hoch ist, wurde **9** mit Dimethyldioxiran umgesetzt. Leider konnte die absolute Konfiguration des *trans*-Epoxids nicht bestimmt werden.
- [17] Das Microtubuli-Protein (MTP) aus Kalbshirnen wurde durch zweifachen temperaturabhängigen Ab- und Aufbau gereinigt [20]. Die Konzentration von Tubulin in MTP wurde zu ca. 85% bestimmt. Der Aufbau wurde mit oder ohne 10 μM Wirkstoff und MTP (1 mg mL⁻¹) in einem Puffer aus 0.1 M 2-(N-Morpholin)ethansulfinsäure (MES), 1 mM 1,2-Di(2-aminoethoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA), 0.5 mM MgCl₂ und 3 M Glycerin (pH = 6.6) durchgeführt. Bei dieser Konzentration wird ein Verhältnis von ca. 1:1 von Wirkstoff zu Tubulindimer erreicht. Der Verlauf des Proteinaufbaus wurde spektrophotometrisch bei 350 nm und 35 °C über 40 min anhand der Turbiditätsänderung als Maß für die Polymermasse verfolgt [21]. Aus jeder Reaktionsmischung wurde ein Aliquot (200 μL) entnommen, das bei 28000 Umdrehungen pro Minute und 27 °C 30 min zentrifugiert wurde. Die Protein-Konzentration in den Mikrotubuli-Pelleten wurde durch Messung der in der überstehenden Phase verbliebenen Proteine bestimmt. Der durch die Behandlung mit 10 μM Epothilon B erhaltene Wert an Mikrotubuli wurde als 100% definiert.
- [18] Die Cytotoxizität der Verbindungen wurde durch das Wachstum von menschlichen lymphoblastischen Leukämiezellen CCRF-CEM oder deren gegenüber Vinblastin und Taxol resistenten Unterstämmen (CCRF-CEM/VBL) durch XTT-Mikrokultur-Tetrazolium/Fromazan-Tests bestimmt. Der IC₅₀-Wert wurde aus fünf oder sechs Tests (bei unterschiedlichen Konzentrationen) computergestützt ermittelt [23].
- [19] Das mehrfachresistente CCRF-CEM/VBL-Tumorgewebe wurde CB-7-SCID-Mäusen subcutan implantiert, die nach 7, 8, 9, 10, 14 und 15 d mit jeweils 0.7 mg kg⁻¹ Epothilon B intraperitoneal behandelt wurden. Die mittlere Tumogröße verringerte sich an den Tagen 12, 17 und 22 um 68, 60 bzw. 67%. In parallel durchgeführten Vergleichsexperimenten führten 2 mg kg⁻¹ Paclitaxel zu einer Verringerung der Tumogröße um 40, 42 bzw. 30%.
- [20] R. C. Weisenberg, *Science* **1972**, *177*, 1104.
- [21] F. Gaskin, C. R. Cantor, M. L. Shelanski, *J. Mol. Biol.* **1974**, *89*, 737.
- [22] Die Experimente wurden auch mit täglichen (0.7 und 1.0 mg kg⁻¹) und halbtäglichen Gaben (0.15 und 0.25 mg kg⁻¹) von Epothilon B durchgeführt. Die Wirksamkeit war bei täglicher oder halbtäglicher Gabe ähnlich hoch wie bei wöchentlicher, jedoch war hier eine etwas höhere Toxizität festzustellen.
- [23] J. Chou, T. C. Chou, *IBM-PC Software Manual*, Biosoft, Cambridge, 1987.

Gezielt entworfene Epothilone: kombinatorische Synthese, Induktion der Tubulin-Polymerisation und cytotoxische Wirkung gegen taxolresistente Tumorzellen**

Kyriacos Costa Nicolaou,* Dionisios Vourloumis, Tianhu Li, Joaquin Pastor, Nicolas Winssinger, Yun He, Sacha Ninkovic, Francisco Sarabia, Hans Vallberg, Frank Roschangar, N. Paul King, M. Ray V. Finlay, Pareskevi Giannakakou, Pascal Verdier-Pinard und Ernest Hamel

Die Isolierung von Epothilon A **1** und B **2** aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* (Stamm 90) durch Höfle et al.^[1] und die Entdeckung ihrer cytotoxischen Aktivität gegenüber Tumorzellen lösten intensive Forschungen in Chemie und Biologie aus. Bollag et al.^[2] berichteten 1995 über den Wirkungsmechanismus dieser Verbindungen durch Induktion der Tubulin-Polymerisation und Stabilisierung der Mikrotubuli, der dem von Taxol (Paclitaxel) ähnelt.^[3] Die Entdeckung ihrer einzigartigen Wirkung gegen taxolresistente Tumorzelllinien^[4] machen diese neuartigen Substanzen zu interessanten Kandidaten für die Krebs-Chemotherapie. Höfle et al. veröffentlichten 1996 die vollständige Aufklärung der Konfiguration durch spektroskopische Methoden und Röntgenstrukturanalyse.^[5] Kurz darauf erschien eine Flut von Zugängen zu^[6] und Totalsynthesen von Epothilon A **1**^[7–11, 13] und B **2**.^[10, 12, 13] Außer den Natur-



[*] Prof. Dr. K. C. Nicolaou, Dr. D. Vourloumis, Dr. T. Li, Dr. J. Pastor, N. Winssinger, Y. He, Dr. S. Ninkovic, Dr. F. Sarabia, Dr. H. Vallberg, Dr. F. Roschangar, Dr. N. P. King, Dr. M. R. V. Finlay
Department of Chemistry and The Skaggs Institute for Chemical Biology
The Scripps Research Institute

10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)
Telefax: Int. + 619/784-2469

E-mail: kcn@scripps.edu
und

Department of Chemistry and Biochemistry
University of California, San Diego
9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093 (USA)

Dr. P. Giannakakou
Medicine Branch, Division of Clinical Sciences
National Cancer Institute, National Institutes of Health
Bethesda, MD 20892 (USA)

Dr. P. Verdier-Pinard, Dr. E. Hamel
Laboratory of Drug Discovery Research and Development
Developmental Therapeutics Program, Division of Cancer Treatment
Diagnosis and Centers National Cancer Institute
Frederick Cancer Research and Development Center
Frederick, MD 21702 (USA)

[**] Wir danken Dr. D. H. Huang und Dr. G. Siuzdak für ihre Hilfe bei den NMR-spektroskopischen und den massenspektrometrischen Messungen. Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health, vom Skaggs Institute for Chemical Biology, von der CaP CURE Foundation sowie von den Firmen Merck, DuPont-Merck, Schering Plough, Hoffmann-La Roche und Amgen gefördert. N. P. K. dankt der George E. Hewitt Foundation, F. R. der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), D. V. der Firma Novartis, F. S. der Fundación Ramón Areces (Spanien) und M. R. V. F. der Fulbright Foundation für ein Postdoktorandenstipendium.