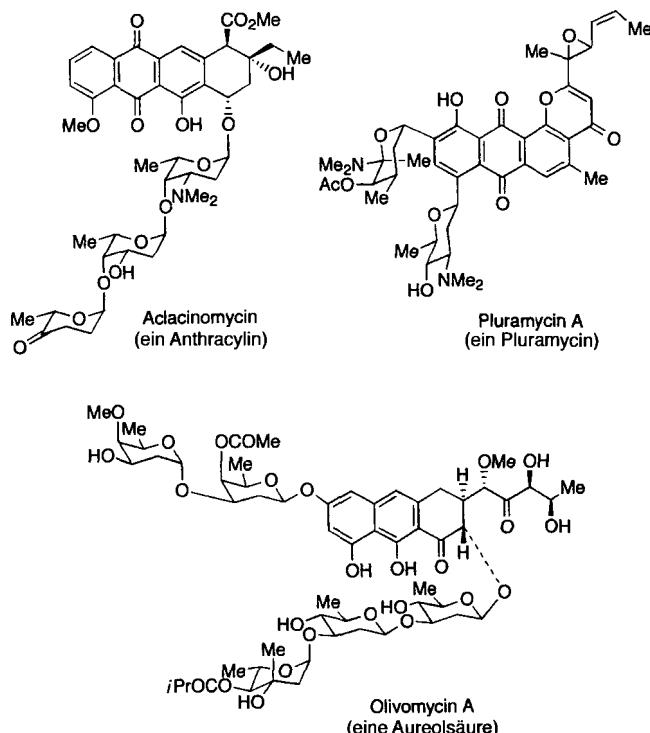


Nichtnatürliche Anthrachinon-Kohlenhydrat-Hybride: Design, Synthese, DNA-Bindung und Cytotoxizität**

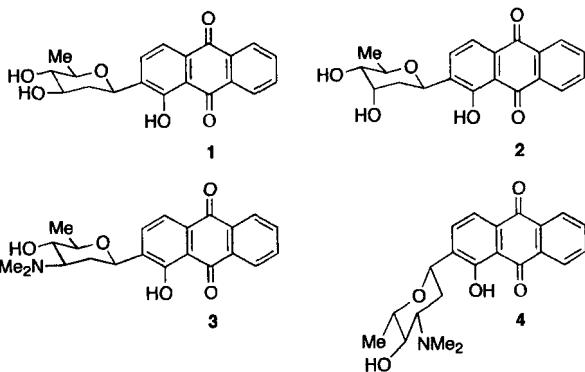
Kazunobu Toshima,* Hiromi Ouchi, Yoriko Okazaki, Takaaki Kano, Makoto Moriguchi, Akira Asai und Shuichi Matsumura

Neuartige DNA-bindende Moleküle und besonders solche mit hoher Wirksamkeit und Sequenzspezifität sind aus chemischer wie biologischer Sicht sehr interessant und haben mit Blick auf Anwendungen in der Medizin ein beträchtliches Potential.^[1-7] Daher ist die Planung und die Synthese derartiger nichtnatürlicher Verbindungen ein wichtiges Ziel in der heutigen Chemie. Einige klinisch bedeutende Antitumor-Antibiotika wie Anthracycline,^[8] Aureolsäuren^[9] und Pluramycin,^[10] die stark und sequenzselektiv an DNA binden, kommen auch in der Natur vor (Schema 1). Diese Wirkstoffe gehören zwar zu verschiedenen Antibioticaklassen, chemisch gesehen haben sie aber den Aufbau aus Arenen und Kohlenhydraten gemeinsam. Bei der DNA-Bindung wirken die aromatischen Einheiten als DNA-intercalierenden Verbin-

dungen, während die Kohlenhydratreste an die DNA-Furche binden. Auch die aktiven Formen der Endiin-Antibiotika, die DNA effizient spalten, können als Aren-Kohlenhydrat-Hybride angesehen werden.^[11] Angesichts dieser aktiven natürlichen Verbindungen suchten wir nach Möglichkeiten zur Synthese nichtnatürlicher DNA-bindender Verbindungen mit Aren- und Kohlenhydratdomänen. Wir berichten hier über Design, chemische Synthese, DNA-Bindungseigenschaften und Cytotoxizität der neuen Anthrachinon-Kohlenhydrat-Hybride **1–4**.^[11]



Schema 1. Natürliche vorkommende DNA-bindende Antitumor-Antibiotica, die aus Aren- und Kohlenhydratbausteinen bestehen.



Als Arenbaustein für die neuen DNA-bindenden Hybride wählten wir Anthrachinon, dessen aromatisches Gerüst vielen DNA-bindenden Antitumor-Antibiotica gemeinsam ist. Für den Kohlenhydratteil schienen einige 2,6-Didesoxyzucker geeignet zu sein, da diese Verbindungen auch in vielen natürlichen DNA-bindenden Antitumor-Antibiotica vorkommen und die Hydrophobie^[12-14] von 2,6-Didesoxyzuckern für die Bindung an die DNA-Furche von Vorteil wäre.

Die Anthrachinon-Kohlenhydrat-Hybride **1–4** wurden über eine kurze Reaktionssequenz synthetisiert, deren Schlüsselschritt die Aryl-C-Glycosylierung mit einem kürzlich in unserer Arbeitsgruppe entwickelten ungeschützten Zucker ist (Schema 2).^[15] Die C-Glycosylierungen von 9,10-Dimethoxy-1-hydroxyanthracen **5** mit den freien 2,6-Didesoxyzuckern D-Olivose **6** und D-Digitoxose **7** führten in Gegenwart von Trimethylsilyltrifluormethansulfonat(TMSOTf)/Silberperchlorat als Katalysator in Acetonitril bei Raumtemperatur regio- und stereospezifisch zu den ungeschützten Aryl- β -C-Glycosiden **10** bzw. **11**. Entsprechende Umsetzungen von **5** mit dem Aminozucker **8** oder dessen Enantiomer **9** unter TMSOTf-Katalyse in CH₂Cl₂ bei 40 °C lieferten regio- und stereospezifisch die freien Aryl- β -C-Glycoside **12** bzw. **13**. Durch anschließende Oxidation der Glycoside **10–13** mit Cer(IV)ammoniumnitrat (CAN) in MeCN/H₂O bei -17 °C wurden die gewünschten Anthrachinon-Kohlenhydrat-Hybride **1–4** erhalten.

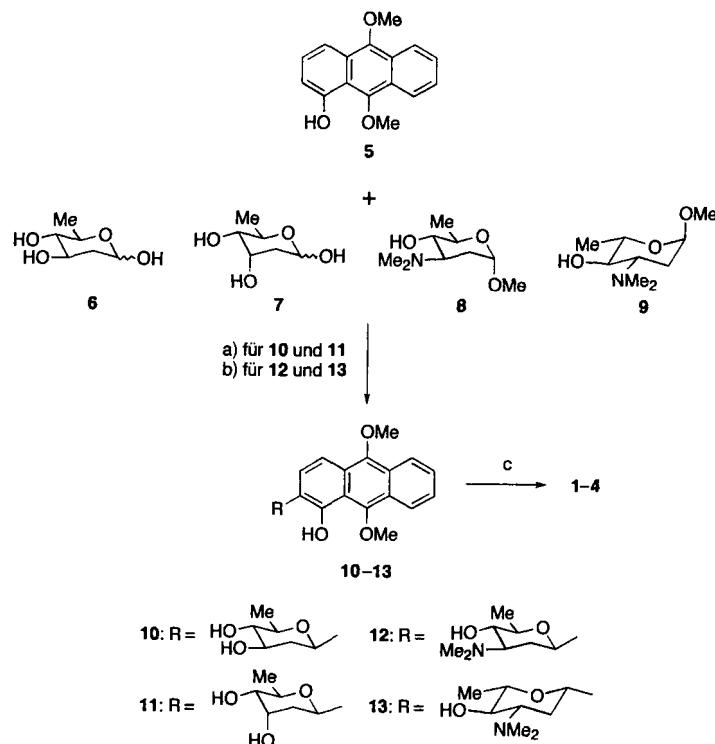
Die DNA-Bindungseigenschaften von **1–4** wurden zunächst durch DNase-I-Footprint-Analyse mit der am 5'-Ende einfach ³²P-markierten Doppelstrang-M13mp18-DNA untersucht. Bei **1** und **2**, die jeweils einen neutralen Zucker enthalten, wurde gegenüber der Kontrolle keine signifikante Änderung im Spaltungsmuster festgestellt. Dagegen unterscheidet sich das Spaltungsmuster mit den Hybriden **3** und **4**, die einen Aminozucker enthalten, beträchtlich von dem im Kontrollversuch, wobei die Spaltung durch DNaseI in den 5'-TGC-Regionen deutlich vermindert ist (Abb. 1). Daraus geht eindeutig hervor, daß **3** und **4** sequenzselektiv an DNA binden.^[16] Außerdem fanden wir, daß das Vermögen, an DNA zu binden, beim D-Aminozucker-Hybrid **3** interessanterweise

[*] Prof. Dr. K. Toshima, H. Ouchi, Y. Okazaki, T. Kano, M. Moriguchi, Prof. Dr. S. Matsumura

Department of Applied Chemistry
Faculty of Science and Technology, Keio University
3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama 223 (Japan)
Telefax: Int. + 45/563-0446
E-mail: toshima@aplc.keio.ac.jp

Dr. A. Asai
Tokyo Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.
Tokyo 194 (Japan)

[**] Diese Arbeit wurden vom japanischen Ministerium für Erziehung, Wissenschaft, Sport und Kultur gefördert (Grant-in-Aid Nr. 08219236). Wir danken Herrn Naoyuki Hiraoka (Tokyo Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.) für sachkundige technische Assistenz.



Schema 2. Synthese von 1–4. a) TMSOTf (0.2 Äquiv.), AgClO₄ (0.2 Äquiv.), MeCN, 25 °C, 0.5 h, 75 % (10), 25 % (11); b) TMSOTf (1.2 Äquiv.), CH₂Cl₂, 40 °C, 18 h, 63 % (12), 64 % (13); c) CAN (2.5 Äquiv.), MeCN/H₂O, –17 °C, 0.5 h, 42 % (1), 36 % (2), 44 % (3), 44 % (4).

stärker ist als beim L-Aminozucker-Hybrid 4. Für die Komponenten von 3, 1-Hydroxyanthrachinon und den Aminozucker 8, konnten im DNase-I-Footprint-Assay hingegen keine DNA-bindenden Eigenschaften nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse belegen zweifelsfrei die Bedeutung der aus Anthrachinon und Aminozucker aufgebauten Hybridstruktur für die DNA-Bindung.

Die Untersuchung der DNA-Entspiralisierung mit linearisierter pBR322-DNA und T4-DNA-Ligase^[17] bestätigte, daß die Hybride 3 und 4 unter Intercalation an DNA binden. Zunächst entwindet die DNA-intercalierende Verbindung bei diesem Assay linearisierte DNA, wodurch sich der Windungsgrad der Doppelhelix ändert. Durch Bildung einer ringförmigen DNA aus der an die intercalierende Verbindung gebundenen DNA mit T4-Ligase wird die Verknüpfungszahl der entwundenen DNA eingefroren. Wird die intercalierende Verbindung entfernt, wird der ursprüngliche Windungsgrad wiederhergestellt, während die Zahl der Verknüpfungen konstant bleibt; dadurch wird die DNA zu einer linksgängigen Superhelix spiralisiert. Abbildung 2 zeigt die Trennung der Produkte aus dem DNA-Entspiralisierungsassay mit den DNA-bindenden Hybriden 3 und 4 an einem Agarosegel. Die DNA-Sequenzen des Kontrollversuchs erscheinen als eine Population von Topoisomeren mit leicht rechtsgängiger Superhelix (Spur 2). Bei der Ligation in Gegenwart steigender Konzentrationen der intercalierenden Verbindung werden die resultierenden DNA-Sequenzen gegenüber denen im Kontrollversuch zunehmend negativ superspiralisiert. Auf dem Gel erscheinen die Topoisomere zunächst entspannter, danach mehr und mehr negativ superspiralisiert. Unter den Bedingungen dieses Assays wandelten 3 und 4 die Topoisomere bei niedriger Konzentration in entspanntere Formen und bei hoher Kon-

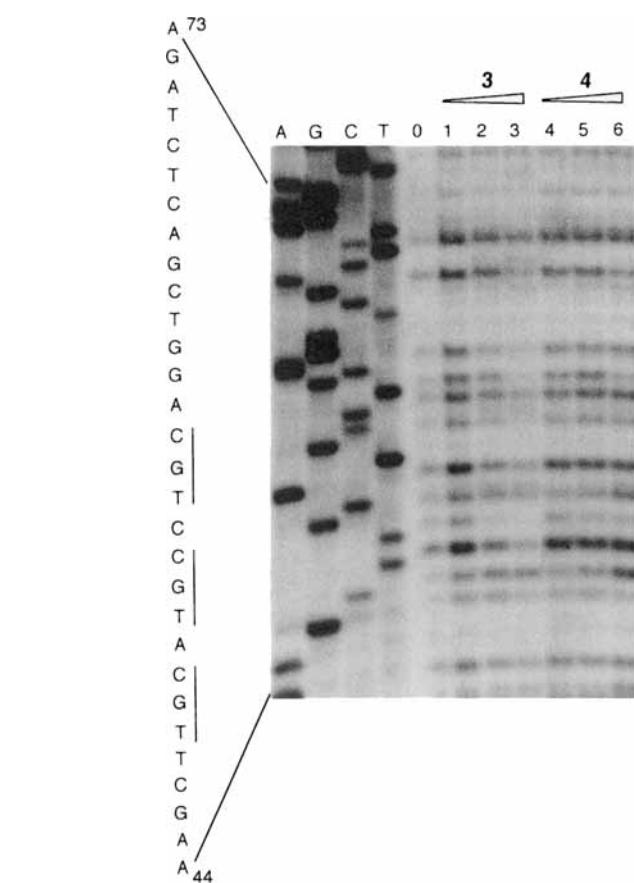


Abb. 1. DNase-I-Footprinting der mit 3 und 4 verbundenen, am 5'-Ende markierten M13mp18ds-DNA. Die DNase-I-Digestion wurde in 1 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Proben wurden durch Elektrophorese an einer Gelplatte (15 % Polyacrylamid/8 M Harnstoff) untersucht (gezeigt sind die Basen 44–73). Spuren A, G, C und T: Sanger-Reaktionen von A, G, C bzw. T; Spur 0: Kontrolle ohne Zusatz; Spuren 1–6: 3 (20, 200, 2000 μ M), 4 (20, 200, 2000 μ M).

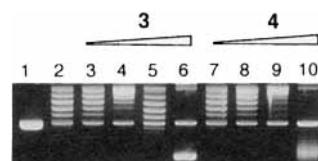


Abb. 2. Wirkungen von 3 und 4 im DNA-Unterspiralisierungsassay mit T4-Ligase. Die Unterspiralisierungen wurden gemäß Lit.[17] durchgeführt. Linearisierte Plasmid-DNA wurde mit T4-DNA-Ligase in Gegenwart der Hybride in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Die durch das Hybrid induzierte Entwindung der DNA wurde auf einem Agarosegel ohne Ethidiumbromid nachgewiesen. Spur 1: lineare DNA; Spur 2: Kontrolle ohne Zusatz; Spuren 3–10: 3 (0.4, 2.0, 10, 50 μ M), 4 (0.4, 2.0, 10, 50 μ M).

zentration in die vollständig negativ spiralierte Form um. Ferner zeigte sich, daß das Intercalationsvermögen von 3 etwa fünfmal größer ist als das von 4. Dies beweist, daß die Fähigkeit zur Intercalation in DNA eindeutig von der Konfiguration des Kohlenhydratteils in den Hybriden abhängt.

Die Cytotoxizität der DNA-bindenden Hybride wurde an HeLa-S3-Zellen untersucht, die den Verbindungen 3 und 4 jeweils 72 h ausgesetzt waren.^[18] Die IC₅₀-Werte von 3 und 4 betrugen 9 bzw. 58 μ M, womit die Cytotoxizität von 3 etwa sechsmal höher war als die von 4. Dies hängt eindeutig mit dem – verglichen mit 4 – ca. fünfmal größeren Intercalationsvermögen von 3 zusammen. Die cytotoxische Wirkung der

Anthrachinon-Kohlenhydrat-Hybride korreliert also mit ihrer Fähigkeit, DNA zu binden.^[19]

Wir haben hier außer der Planung und der Synthese neuartiger Anthrachinon-Kohlenhydrat-Hybride auch deren DNA-Bindungsprofile und cytotoxischen Aktivitäten beschrieben. Es zeigte sich, daß sogar eine einfache synthetische Verbindung stark und sequenzselektiv an DNA binden kann. Die hier beschriebenen Umsetzungen und die biologischen Untersuchungen liefern wichtige Informationen für das Design neuer nichtnatürlicher DNA-bindender Wirkstoffe auf der Basis von Hybriden aus einer intercalierenden Verbindung und einem Kohlenhydrat.

Eingegangen am 16. Juni,
veränderte Fassung am 11. August 1997 [Z 10548]

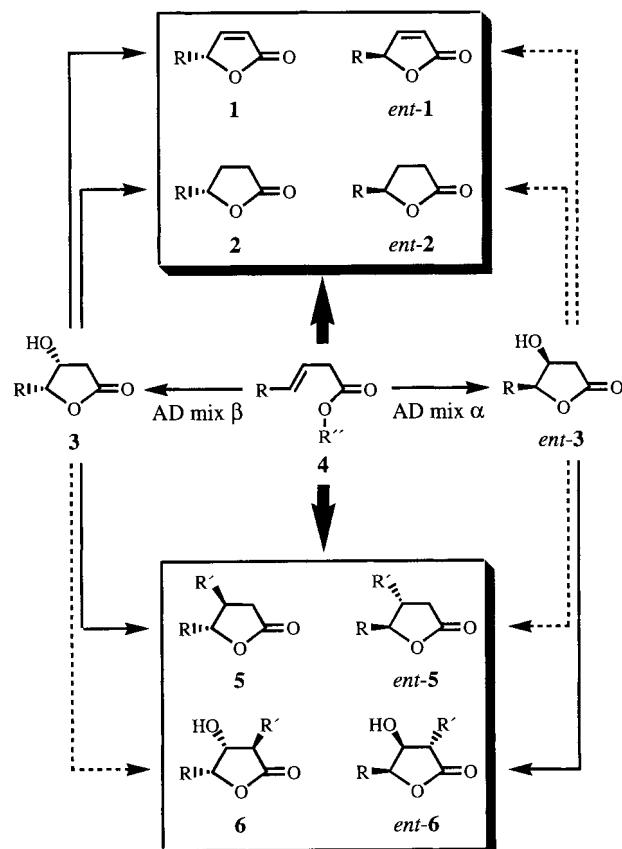
Stichwörter: Anthrachinone · DNA-Erkennung · DNA-Hybride · Intercalation · Kohlenhydrate

- [1] a) K. C. Nicolaou, W.-M. Dai, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1453; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1387; b) K. C. Nicolaou, A. L. Smith, E. W. Yue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5881; c) K. C. Nicolaou, A. L. Smith, *Acc. Chem. Res.* **1992**, *25*, 497.
- [2] a) P. B. Dervan in *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol. 2 (Hrsg.: F. Eckstein, D. M. J. Lilley), Springer, Heidelberg, **1988**, S. 49–64; b) P. B. Dervan in *Oligodeoxynucleotides: Antisense of Gene Expression* (Hrsg.: J. S. Cohen), CRC, Boca Raton, FL, **1989**, S. 197–210.
- [3] J. W. Lown, *Chemtracts: Org. Chem.* **1993**, *6*, 205.
- [4] a) P. E. Nielsen, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 1; b) P. E. Nielsen, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 505.
- [5] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 543.
- [6] C. Helene, J.-J. Toulme in *Oligodeoxynucleotides: Antisense of Gene Expression* (Hrsg.: J. S. Cohen), CRC, Boca Raton, FL, **1989**, S. 137–172.
- [7] O. Kennard, *Pure Appl. Chem.* **1993**, *65*, 1213.
- [8] a) F. Arcamone in *Doxorubicin Anticancer Antibiotics. Medicinal Chemistry Series of Monographs*, Vol. 17 (Hrsg.: G. Stevens), Academic Press, New York, **1981**; b) *Anthracycline and Anthrancenedione Based Anticancer Agents* (Hrsg.: J. W. Lown), Elsevier, Amsterdam, **1988**.
- [9] J. D. Skarbek, M. K. Speedie in *Antitumor Compounds of Natural Origin: Chemistry and Biochemistry* (Hrsg.: A. Aszalos), CRC, Boca Raton, FL, **1981**, S. 191–235.
- [10] M. R. Hansen, L. H. Hurley, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 249.
- [11] a) D. J. Mincher, G. Shaw, E. D. Clercq, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1983**, 613; b) D. J. Mincher, G. Shaw, *ibid.* **1984**, 1279.
- [12] S. Walker, K. G. Valentine, D. Kahne, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6428.
- [13] W. Ding, G. A. Ellestad, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6617.
- [14] M. Uesugi, Y. Sugiyara, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4622.
- [15] K. Toshima, G. Matsuo, M. Nakata, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 997.
- [16] a) J. B. Chaires, W. Priebe, D. E. Graves, T. G. Burke, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5360; b) J. B. Chaires, S. Satyanarayana, D. Suh, I. Fokt, T. Przewloka, W. Priebe, *Biochemistry* **1996**, *35*, 2047.
- [17] a) G. Camilloni, F. D. Seta, R. Negri, A. G. Ficca, E. D. Mauro, *EMBO J.* **1986**, *5*, 763; b) Y. Yamashita, S. Kawada, N. Fujii, H. Nakano, *Biochemistry* **1991**, *30*, 5838.
- [18] D. A. Scudiero, R. H. Shoemaker, K. D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T. H. Nofziger, M. J. Currens, D. Seniff, M. R. Boyd, *Cancer Res.* **1988**, *48*, 4827.
- [19] *Anthracycline Antibiotics* (Hrsg.: W. Priebe), American Chemical Society, Washington DC, **1995** (ACS Symp. Ser. 574).

Synthese optisch aktiver Butenolide und γ -Lactone aus β,γ -ungesättigten Carbonsäureestern mit der asymmetrischen Dihydroxylierung nach Sharpless**

Christian Harcken und Reinhard Brückner*

Die asymmetrische Dihydroxylierung („AD“) von Olefinen nach Sharpless ist ein unverzichtbares Rüstzeug der heutigen organischen Syntheseschemie.^[1] Oft sind die unmittelbar entstehenden Reaktionsprodukte, optisch aktive Glycole, noch gar nicht die eigentlichen Zielmoleküle. Vielmehr werden sie häufig durch Folgereaktionen so stark modifiziert, daß man den Strukturen der Endprodukte kaum mehr ansieht, wie gut sich eine AD zu ihrem Aufbau eignete. Die hier vorgelegte Studie zeigt, daß enantiomerenreine oder enantiomerenangereicherte, γ -chirale Butenolide und γ -chirale γ -Lactone – Verbindungen, für die man schon viele Synthesen kennt, aber noch effizientere benötigt^[2,3] – ebenfalls interessante Folgeprodukte von ADs sind (Schema 1). ADs von β,γ -ungesättigten Estern **4** ergaben in Übereinstim-



Schema 1. Ausgehend von **4** in zwei bis drei Stufen zugängliche Furanonderivate. Konkrete Beispiele für die Umsetzungen, die durch ausgezogene Reaktionspfeile gekennzeichnet sind, sind in den Schemata 2–5 zu finden. Die gestrichelten Reaktionspfeile beziehen sich auf analoge, aber noch nicht durchgeführte Umsetzungen in der jeweils enantiomeren Serie.

[*] Prof. Dr. R. Brückner, Dipl.-Chem. C. Harcken
Institut für Organische Chemie der Universität
Tammannstraße 2, D-37077 Göttingen
Telefax: Int. + 551/392944
E-mail: rbrueck@gwdg.de

[**] Diese Untersuchungen wurden vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Der BASF AG danken wir für Chemikalienspenden.