

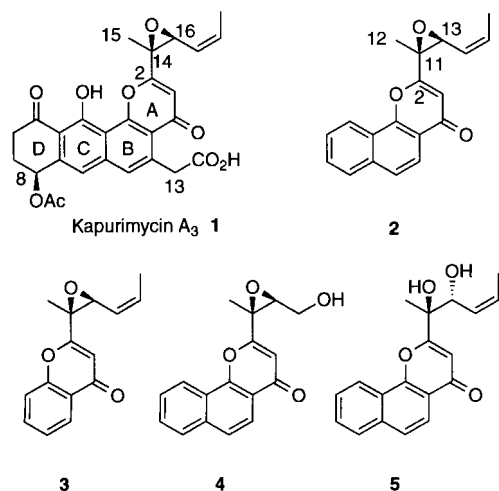
Stichwörter: Energietransfer • Molekulare Schalter • Photochemie • Photoschaltbare Systeme • Rhenium

- [1] V. Balzani, F. Scandola, *Supramolecular Photochemistry*, Horwood, Chichester, 1991.
 [2] J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry*, VCH, Weinheim, 1995.
 [3] A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, C. P. McCoy, *Nature* 1993, 364, 42.
 [4] L. Fabbri, A. Poggi, *Chem. Soc. Rev.* 1995, 24, 197.
 [5] H. D. Becker, K. A. Amin, *J. Org. Chem.* 1989, 54, 3182.
 [6] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.* 1978, 90, 556; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1978, 17, 522.
 [7] a) G. Tapolsky, R. Duesing, T. J. Meyer, *Inorg. Chem.* 1990, 29, 2285; b) L. A. Worl, R. Duesing, P. Chen, L. Delle Ciana, T. J. Meyer, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1991, 849.

Ein ABC-Ringanalogen von Kapurimycin A₃: Synthese und Wirksamkeit in der DNA-Alkylierung**

Kazuhiko Nakatani,* Akimitsu Okamoto und
Isao Saito*

Das Antitumor-Antibiotikum Kapurimycin A₃ **1**^[1] ist strukturell eng mit der Familie der Pluramycine verwandt.^[2] Es alkyliert DNA, indem seine Epoxiduntereinheit Guanin an N7 angreift, wodurch ein Kapurimycin-DNA-Addukt entsteht.^[3] Die hohe Effizienz bei der selektiven Alkylierung an N7 von Guanin läßt den Schluß zu, daß sich die Epoxiduntereinheit in der großen Furche der DNA befindet und über eine präkovalente Intercalation des aromatischen Systems auf N7 des Guanin ausgerichtet ist, wie es bereits für Aflatoxin B₁^[4] und Altromycin B^[5,6] vorgeschlagen wurde. Um die Faktoren für eine so effiziente und selektive Guanin-alkylierung zu bestimmen und um neue DNA-Alkylierungsreagentien mit einer Epoxiduntereinheit zu entwickeln,

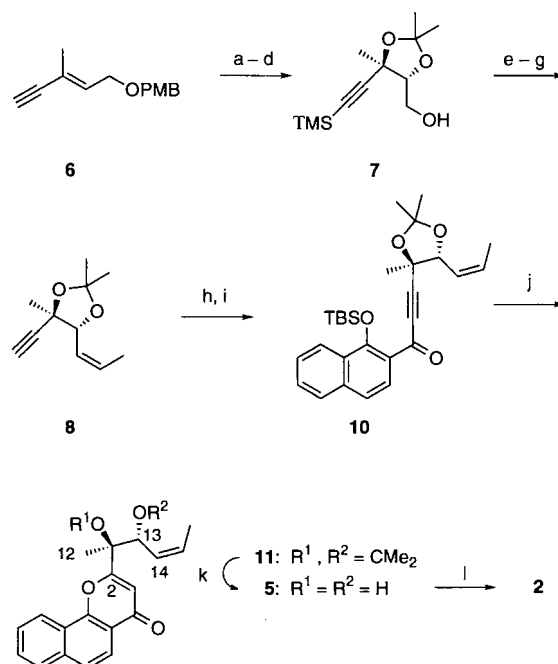


[*] Dr. K. Nakatani, Prof. I. Saito, A. Okamoto
 Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry
 Faculty of Engineering, Kyoto University
 Kyoto 606-01 (Japan)
 CREST, Japan Science and Technology Corporation
 Telefax: Int. + 75/753-5676
 E-mail: saito@sbchem.kyoto-u.ac.jp

[**] Wir danken Drs. Y. Uosaki, M. Hara und H. Saito, Kyowa Hakko Kogyo CO., LTD., für hilfreiche Diskussionen und eine großzügige Spende an Kapurimycin A₃.

haben wir sowohl die Derivate **2** und **3**, die die wesentliche Teilstruktur von Kapurimycin enthalten, als auch den entsprechenden Epoxyalkohol **4** und das Diol **5** synthetisiert und ihre Aktivität zur DNA-Alkylierung untersucht. Wir zeigen hier, daß das ABC-Ringanalogen von Kapurimycin A₃, **2**, die Minimalstruktur besitzt, die für die Wirksamkeit und Sequenzselektivität von Kapurimycin A₃ bei der Guaninalkylierung erforderlich ist.

Das ABC-Ringanalogen **2**, das die gleiche absolute Konfiguration wie **1** (14*S*,16*S*) aufweist,^[7] wurde über einen hoch konvergenten Weg hergestellt. Dabei erfolgt eine Kupplung von 1-*tert*-Butyldimethylsilyloxy-2-naphthaldehyd **9** mit der Vorstufe **8** für die chirale Seitenkette, gefolgt von einem effizienten Ringschluß zum Pyranon (Ring A; Schema 1).



Schema 1. Synthese des ABC-Ringanalogs **2**. a) AD-mix- β , 76%; b) Me₂C(OMe)₂, 95%; c) Li-1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazolid (LiHMDS), Me₃SiCl (TMSCl), 89%; d) 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-1,4-benzochinon (DDQ), 99%; e) Dess-Martin-Oxidation, 94%; f) Ph₃P=CHCH₃, 78%, *Z:E* = 5:1; g) NaOMe, 80%; h) LiHMDS, CeCl₃, 1-*tert*-Butyldimethylsilyloxy-2-naphthaldehyd **9**, 47%; i) MnO₂, 76%; j) KF, [18]Krone-6, DMF, 80%; k) kat. HCl, AcOH, 98%; l) Diethylazodicarboxylat (DEAD), Ph₃P, 76%.

Eine asymmetrische Dihydroxylierung des *p*-Methoxybenzyl-ethers **6**, der aus einem kommerziell erhältlichen Alkohol mit AD-mix- β ^[8] erhalten wurde, lieferte das entsprechende Diol. Dieses wurde zum Alkohol **7** umgesetzt, der nach Umkristallisation eine Enantiomerenreinheit von 93% *ee* aufwies, wie ¹H-NMR-spektroskopisch anhand des α -Methoxy- α -(trifluormethyl)phenyllessigsäure(MPTA)-Esters bestimmt wurde. Die Oxidation von **7** und die anschließende Wittig-Olefinierung mit Ethylidientriphenylphosphoran lieferten das Alken (*Z:E* = 5:1),^[9] das zur Seitenkettenvorstufe **8** desilyliert wurde. Die Addition von **9** an lithiiertes **8** lieferte das entsprechende Kupplungsprodukt, das mit Mangandioxid zum Keton **10** oxidiert wurde. Der Pyranonring wurde durch Umsetzung von **10** mit KF und [18]Krone-6 in wasserfreiem DMF selektiv aufgebaut, wie bereits früher beschrieben,^[10] unter Bildung der tricyclischen Verbindung **11** in hoher Ausbeute.^[11] Die Hydrolyse des Acetals führte zum Diol **5**,

das in einer intramolekularen Mitsunobu-Reaktion^[12] zur gewünschten Verbindung (11*S*,13*S*)-**2** umgesetzt wurde.^[13] Die Kapurimycinanaloga **3** und **4** wurden auf ähnlichem Weg synthetisiert.

Die Aktivität dieser Kapurimycinanaloga in der DNA-Spaltung wurde mit der Relaxationsmethode an einer superhelicalen Plasmid-DNA untersucht (Abb. 1). Die Superhelix

wurde mit der DNA-Entspiralisierungsmethode^[16] mit den Verbindungen **12** und **13** geprüft, die beide keine

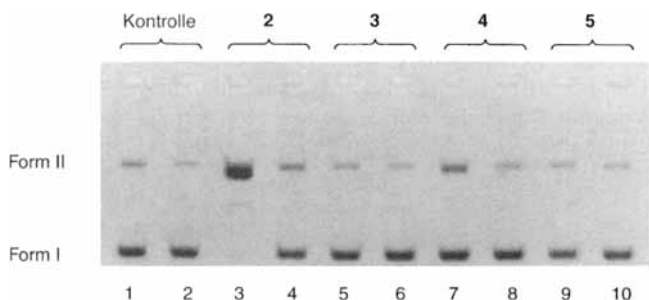
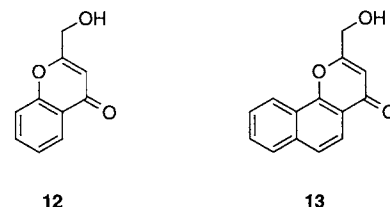


Abb. 1. Spaltung superspiralisierter ringförmiger pBR322-DNA (Form I) durch die Kapurimycinanaloga **2–5** in gespaltene ringförmige DNA (Form II). Eine pBR322-DNA-Superhelix (40 µM) in Tris/HCl-Puffer (5 mM, pH 7.6) wurde in Gegenwart von **2**, **3**, **4** oder **5** (10 µM) 5 h bei 37 °C inkubiert. Ungebundene Moleküle wurden durch Ethanolfällung entfernt und die zurückgewonnene DNA in Tris/HCl-Puffer (Bedingung A) gelöst. Um die Strangbrüche zu vervollständigen wurde die DNA-Lösung anschließend 24 h bei 37 °C inkubiert (Bedingung B). Die unter Bedingung A behandelte DNA (Spuren mit gerader Zahl) und die unter Bedingung B behandelte DNA (Spuren mit ungerader Zahl) wurden durch Elektrophorese an einem 1proz. Agarosegel analysiert, das 0.2 µg mL⁻¹ Ethidiumbromid enthält. Spur 1: Kontrollversuch für Bedingung B; Spur 2: Kontrollversuch für Bedingung A; Spur 3 und 4: **2**; Spur 5 und 6: **3**; Spur 7 und 8: **4**; Spur 9 und 10: **5**.

der Plasmid-DNA wurde mit dem Kapurimycinanalogon versetzt (5 h, 37 °C) und anschließend 24 h bei 37 °C inkubiert, um die an den alkylierten Guaninresten thermisch eingeleiteten Strangbrüche zu vervollständigen. Eine deutliche Spaltungsbande trat auf, wenn die DNA mit **2** 24 h bei 37 °C inkubiert wurde (Spur 3). Die Analyse der Nucleosidzusammensetzung von Kalbsthymus-DNA nach Umsetzung mit **2** und anschließender enzymatischer Spaltung ergab, daß der 2'-Desoxyguanosin-Gehalt deutlich verringert war (28%), während die Menge der anderen Nucleoside unverändert blieb. Diese Ergebnisse deuten stark darauf hin, daß das ABC-Ringanalogen **2** eine DNA-Spaltung über eine selektive Modifikation der Guaninbase induziert. Das vollständige Fehlen von DNA-Spaltungsaktivität beim Diol **5** (Spur 9 und 10) zeigt an, daß die Epoxideinheit von **2** für die DNA-Alkylierung entscheidend ist.^[3b] Die schwache Spaltungsbande, die bei der Umsetzung von DNA mit dem Epoxyalkohol **4** erhalten wird (siehe Spur 7 im Vergleich mit Spur 3), weist darauf hin, daß die Alkenylgruppe, die direkt an den Epoxidring gebunden ist, die nucleophile Ringöffnung der Epoxidgruppe beachtlich beschleunigt. Während die beobachteten Geschwindigkeiten für die hydrolytische Spaltung des Epoxidrests in Tris(hydroxymethyl)aminomethan(Tris)/HCl-Puffer (pH = 7.5) bei 37 °C für **1**, **2** und **3** mit Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) von 3.5, 5.6 bzw. 5.9 h recht ähnlich waren, wurde **4** unter diesen Bedingungen beträchtlich langsamer gespalten ($t_{1/2}$ > 150 h).^[15] Diese Beobachtungen könnten die äußerst geringe DNA-Spaltungsaktivität von **4** erklären. Von besonderer Bedeutung ist die große Differenz zwischen den Spaltungsaktivitäten von **2** und **3** (Spur 3 und 5), die nur durch die An- bzw. Abwesenheit des C-Rings erklärt werden kann. Das deutet auf eine stärkere Intercalation des ABC-Ringsystems von **2** in den DNA-Duplex hin. Diese Vermu-



Epoxiduntereinheit für die DNA-Alkylierung enthalten. Abbildung 2 zeigt deutlich, daß die Superhelix von pBR322-DNA stärker entspiralisiert ist, nachdem sie mit **13** versetzt worden war.

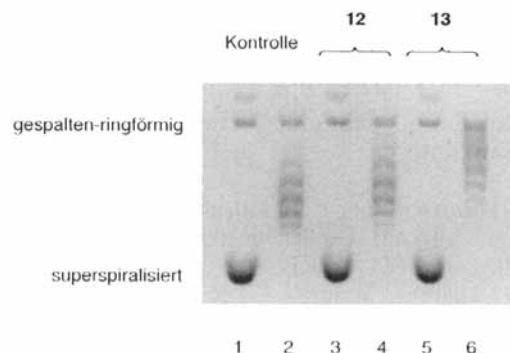


Abb. 2. Entspiralisierung der DNA durch die Kapurimycinanaloga **12** und **13**. Die superspiralisierte pBR322-DNA (40 µM; Spur 1) wurde zuerst mit Topoisomerase I (topo I; 4 Einheiten) 30 min in einem Puffer (10 mM Tris/HCl, pH = 7.9, 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 150 mM NaCl, 0.1 mM Spermidin, 5% Glycerin, 0.1% Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA) versetzt und anschließend 30 min in Abwesenheit (Spur 2) und Anwesenheit von **12** und **13** (100 µM; Spur 4 bzw. 6) inkubiert. In Spur 3 und 5 wurde DNA mit **12** bzw. **13** ohne topo I inkubiert. Die resultierenden DNA-Sequenzen wurden durch Elektrophorese an einem 1proz. nativen Agarosegel bei 1.3 V cm⁻¹ 15 h analysiert. Spur 1: DNA-Superhelix; Spur 2: DNA nach Umsetzung mit topo I; Spur 3: **12**; Spur 4: **12** + topo I; Spur 5: **13**; Spur 6: **13** + topo I.

Die DNA-Spaltung durch das ABC-Ringanalogen **2** wurde im Hinblick auf die Wirksamkeit und Sequenzselektivität bei der Guaninalkylierung mit der des natürlichen Kapurimycins **1** verglichen (Abb. 3, 4). Wie aus Abbildung 3 hervor-

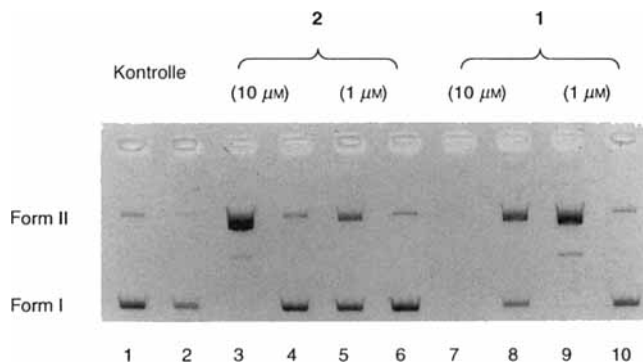


Abb. 3. Spaltung superspiralisierter, ringförmiger pBR322-DNA durch Kapurimycin **A₃ 1** und das ABC-Ringanalogen **2**. Die DNA wurde mit den Verbindungen **5** h bei 37 °C umgesetzt (Spuren mit gerader Zahl) und anschließend 24 h wie unter Abb. 1 beschrieben inkubiert (Spuren mit ungerader Zahl). Spur 1 und 2: Kontrolle; Spur 3 und 4: **2** (10 µM); Spuren 5 und 6: **2** (1 µM); Spur 7 und 8: **1** (10 µM); Spur 9 und 10: **1** (1 µM). In Spur 7 fehlen die DNA-Banden, da unter den gegebenen Bedingungen eine exzessive Spaltung durch **1** eintritt.

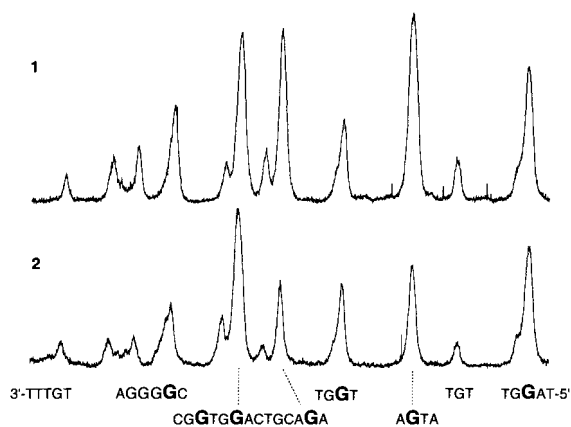


Abb. 4. Sequenzselektivität bei der Guaninalkylierung durch natürliches Kapurimycin A₃ **1** (oben) und durch das ABC-Ringanalogen **2** (unten). Angegeben sind die DNA-Sequenzen, die starke G-Spaltungsbanden liefern (fett hervorgehobene Guaninbausteine).

geht, spaltet **1** die DNA schon bei einer Konzentration von 1 μM (Spur 9), während man für eine ähnlich effiziente Spaltung durch **2** dieses in einer Konzentration von 10 μM benötigt (Spur 3 und 9). Dagegen ergibt sich für die Sequenzselektivität bei der Guaninalkylierung mit **2** eine starke Bevorzugung des Guaninrestes am 5'-Ende von 5'-Gpu-3'-Sequenzen, die sehr der Selektivität von natürlichem Kapurimycin A₃ **1** ähnelt (Abb. 4).^[17] Trotz des Fehlens von Ring D und anderen funktionellen Gruppen weist also das stark vereinfachte ABC-Ringanalogue **2** eine sehr ähnliche 5'-Selektivität bei der Guaninalkylierung eines DNA-Duplexes auf wie **1**.

Wir haben somit einen hochstereoselektiven und -konvergenten Syntheseweg für eine Reihe von Verbindungen entwickelt, die die Gerüststruktur von Kapurimycin A₃ enthalten und dessen absolute Konfiguration in der Seitenkette aufweisen. Weiterhin haben wir gezeigt, daß das vereinfachte Analogue **2** mit einer Minimalstruktur von Kapurimycin A₃ als effektives Guaninalkylierungsreagens für Duplex-DNA mit einer starken 5'-Gpu-3'-Präferenz dienen kann.

Experimentelles

Analyse der Nucleosidzusammensetzung von Kalbsthymus-DNA: Kalbsthymus-DNA (200 μM) wurde mit **2** (1 mM) in Tris/HCl (pH = 7.5) 24 h bei 37 °C inkubiert und die Mischung mit Schlangengift-Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase zersetzt. Die resultierende Nucleosidmischung wurde durch HPLC analysiert (Cosmosil-C18-AR-Säule, Elution mit 2–5proz. Acetonitril in 50 mM Ammoniumformiat-Lösung (linearer Gradient) in 30 min).

Geschwindigkeiten der hydrolytischen Spaltung: Lösungen von **1–4** (je 100 μM) in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH = 7.5) wurden bei 37 °C inkubiert. Die Menge an Ausgangsverbindung wurde regelmäßig HPLC-chromatographisch ermittelt.

Analyse der Sequenzselektivität bei der Guaninalkylierung: Ein ³²P-5'-markiertes DNA-Fragment (513-bp-EcoR-I-Rsa-I-Fragment von pBR322-DNA) wurde in Gegenwart von **1** (1 μM) und **2** (10 μM) 24 h bei 37 °C in Tris/HCl-Puffer (pH = 7.6) inkubiert. Die durch Ethanol-fällung zurückgewonnene DNA wurde in Gegenwart von 10% Piperidin erhitzt (90 °C, 30 min) und durch Elektrophorese mit 8proz. Polyacrylamid und 7 M Harnstoff (1900 V, 1.5 h) analysiert. Das Gel wurde getrocknet und auf einem Röntgenfilm mit einer Intensivierungsfolie bei –70 °C entwickelt. Die Intensität der Spaltungsbanden wurde densitometrisch bestimmt. Die in Abb. 4 gezeigte DNA-Sequenz lautet: 3'-TTTGT TTATC CCCAA GGCGC GTGTA AAGGG GCTTT TCACG GTGGA CTGCA GATTC TTTGG TAATA ATAGT ACTGT AATTG GTA-5'.

Stichwörter: Alkylierungen • Cytostatica • DNA-Spaltung • Kapurimycin A₃ • Wirkstoffdesign

- [1] a) M. Hara, T. Mokudai, E. Kobayashi, K. Gomi, H. Nakano, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1513–1518; b) M. Yoshida, M. Hara, Y. Saitoh, H. Sano, *ibid.* **1990**, *43*, 1519–1523.
- [2] Überblick über die Antibiotica der Pluramycin-Familie: U. Séquin, *Fortschr. Chem. Naturst.* **1986**, *50*, 57–122.
- [3] a) M. Hara, M. Yoshida, H. Nakano, *Biochemistry* **1990**, *29*, 10449–10455; b) K. L. Chan, H. Sugiyama, I. Saito, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *52*, 7719–7722.
- [4] a) M. P. Stone, S. Gopalakrishnan, T. M. Harris, D. E. Graves, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1988**, *5*, 1025–1041; b) S. Gopalakrishnan, S. Byrd, M. P. Stone, T. M. Harris, *Biochemistry* **1989**, *28*, 726–734; c) M. P. Stone, S. Gopalakrishnan, K. D. Raney, V. M. Raney, S. Byrd, T. M. Harris in *Molecular Basis of Specificity in Nucleic Acid-Drug Interactions* (Hrsg.: B. Pullman, J. Jortner), Kluwer, Dordrecht, **1990**, S. 451–480; d) K. D. Raney, S. Gopalakrishnan, S. Byrd, M. P. Stone, T. M. Harris, *Chem. Res. Toxicol.* **1990**, *3*, 254–261; e) K. D. Raney, T. M. Harris, M. P. Stone, *ibid.* **1993**, *6*, 64–68.
- [5] M. R. Hansen, L. H. Hurley, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 249–258.
- [6] a) D. Sun, M. Hansen, J. J. Clement, L. H. Hurley, *Biochemistry* **1993**, *32*, 8068–8074; b) M. Hansen, H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2421–2429; c) D. Sun, M. Hansen, H. Hurley, *ibid.* **1995**, *117*, 2430–2440, zit. Lit.
- [7] Die absolute Konfiguration von **1** wurde als 8*S*, 14*S* und 16*S* bestimmt; Y. Uosaki, H. Saito, *Abstr. Pap. 69th Annu. Meeting Chem. Soc. Jpn.* **1995**, S. 1013.
- [8] K. B. Sharpless, W. Amberg, Y. L. Bennani, G. A. Crispino, J. Hartung, K.-S. Jeong, H.-L. Kwong, K. Morikawa, Z.-M. Wand, D. Xu, K.-L. Zhang, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2768–2771.
- [9] Die *E*- und *Z*-Isomere konnten an keiner Stelle im Verlauf der Synthese voneinander getrennt werden.
- [10] a) K. Nakatani, A. Okamoto, M. Yamanuki, I. Saito, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4360–4361; b) K. Nakatani, A. Okamoto, I. Saito, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 9427–9446.
- [11] Die relative Konfiguration der beiden asymmetrischen Zentren in **11** wurde durch einen ausgeprägten NOE-Effekt zwischen C12-Me und C14-H bestätigt.
- [12] O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981**, 1–28.
- [13] Die absolute Konfiguration von **5** wurde nach einer modifizierten Mosher-Methode [14] mit dem MPTA-Ester von **5** zu (1*S*,13*R*) bestimmt.
- [14] I. Ohtani, T. Kusumi, Y. Kashman, H. Kakisawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092–4096.
- [15] Die Hydrolyse von **2** lieferte das Diol **5** als einziges Produkt unter Inversion der Konfiguration an C13. Die Reaktion verläuft dementsprechend über einen S_N2-Mechanismus.
- [16] R. Kuroda, E. Takahashi, C. A. Austin, L. M. Fisher, *FEBS Lett.* **1990**, *262*, 293–298.
- [17] Einen weiteren Beweis für die Guaninalkylierung durch **2** lieferte die Sequenzanalyse. Die verschmierten Spaltungsbanden, die nach Inkubation der DNA mit **2** und anschließendem Erhitzen erhalten wurden, wanderten nicht zusammen mit den G-Banden aus der Maxam-Gilbert-Sequenzierung, während die klaren G-Banden in Abb. 4 nach Erhitzen der gleichen Proben mit Piperidin erhalten wurden. Die beobachtete Verschiebung der Bande ist ein typisches Zeichen für die Alkylierung an N7 von Guanin.

Eingegangen am 5 Juni 1997 [Z 10512]