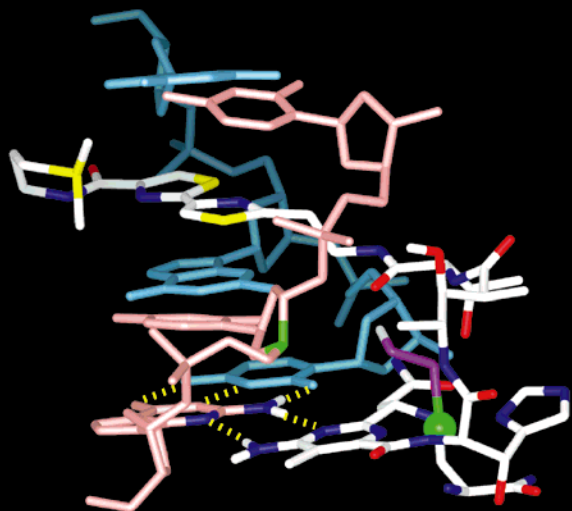
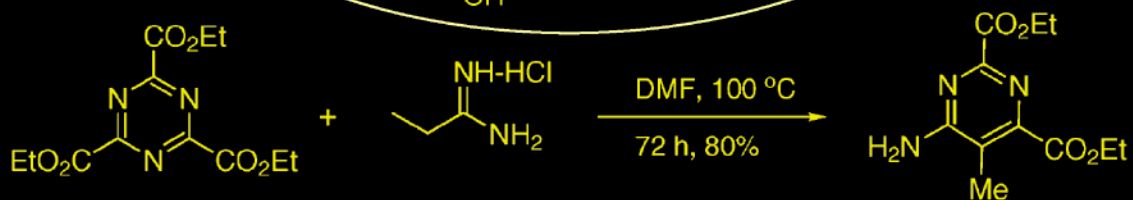
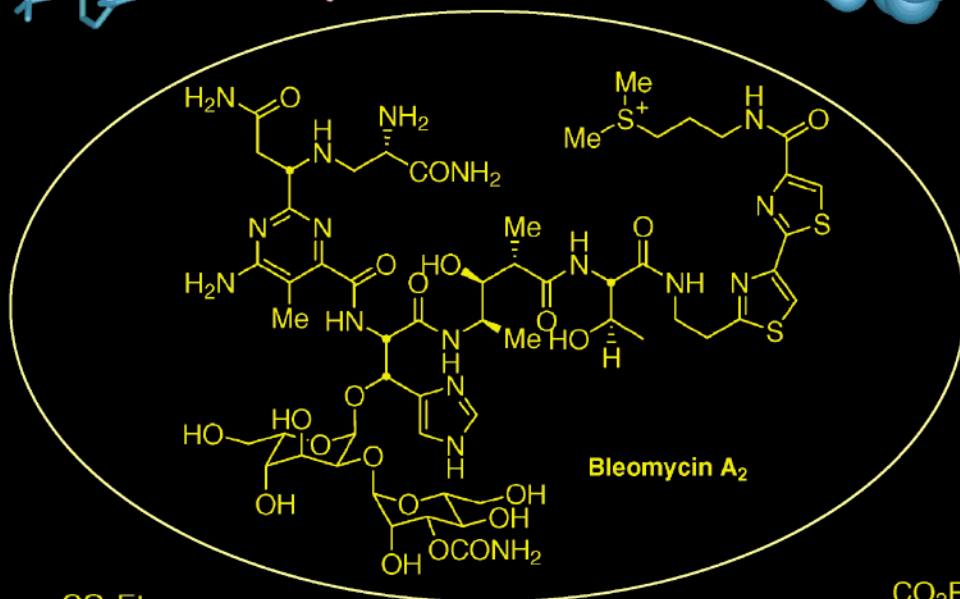
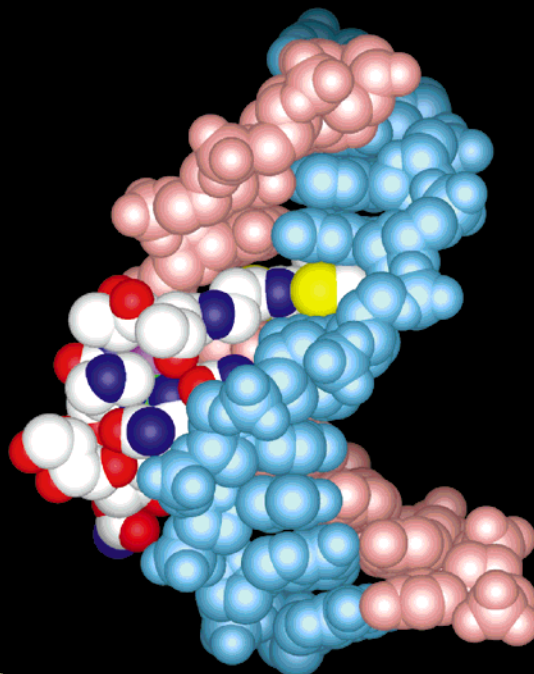




3' 5'
G C
G C
T A
C G
C G
G C
G C
A T
C G
C G



Bleomycin: Untersuchungen zu Synthese und Wirkungsmechanismus

Dale L. Boger* und Hui Cai

Bleomycin A₂ ist als Antitumorwirkstoff im klinischen Einsatz. Seine Wirkung beruht auf der sequenzselektiven Spaltung von DNA, einem sowohl Metallionen- als auch O₂-abhängigen Prozeß. Die wichtigsten Schritte der Entwicklung einer modular konzipierten Totalsynthese von Bleomycin A₂, die sich auch zur Herstellung eines

breiten Spektrums analoger Verbindungen eignet, werden beschrieben. Rund 50 analoge Verbindungen wurden nach diesem Synthesekonzept hergestellt, um zu klären, wie die einzelnen Molekülteile und deren Substituenten zum Wirkmechanismus beitragen. Diese Untersuchungen verdeutlichen in Verbindung mit Strukturmo-

dellen, welche bemerkenswerte Kombination aus funktionellen, strukturellen und konformativen Eigenschaften dieser Naturstoff verkörpert.

Stichwörter: Bioorganische Chemie • Bleomycin • Cytostatika • DNA-Spaltung • Totalsynthesen

1. Einleitung

Bleomycine gehören zur Gruppe der Glycopeptid-Antibiotika mit cytotoxischer Wirkung; sie wurden vor über 30 Jahren von Umezawa und Mitarbeitern aus *Streptomyces verticellus* isoliert (Abbildung 1).^[1] Bleomycin A₂ **1**, das sich von anderen natürlichen Bleomycinen nur im kationischen C-Terminus unterscheidet, ist der Hauptbestandteil (70%) des Antitumorwirkstoffs Blenoxan, der bei der klinischen Behandlung von Hodgkin-Lymphom, von Karzinomen der Haut, des Kopfes und des Halses sowie von Hodenkrebs eingesetzt wird.^[2–15] Durch eine Reihe von chemischen Abbauexperimenten, die mittlerweile als klassisch zu bezeichnen sind, und die röntgenkristallographische Charakterisierung der dabei entstehenden Produkte gelang Umezawa und Mitarbeitern die vollständige Aufklärung der Struktur von Bleomycin A₂, einschließlich der Zuordnung der relativen und absoluten Konfiguration.^[16] Die einzige Unrichtigkeit bei der röntgenographischen Strukturbestimmung der Abbauprodukte betraf den N-Terminus. Die ihm zunächst zugeordnete Struktur enthielt eine β -Lactamgruppe, was 1978 revidiert wurde,^[17] und seine aus spektroskopischen Messungen abgeleitete absolute Konfiguration wurde durch unsere Synthesestudien bestätigt.^[18]

Es wird angenommen, daß die biologische Wirkung von Bleomycin A₂ auf der Bindung an die DNA und deren

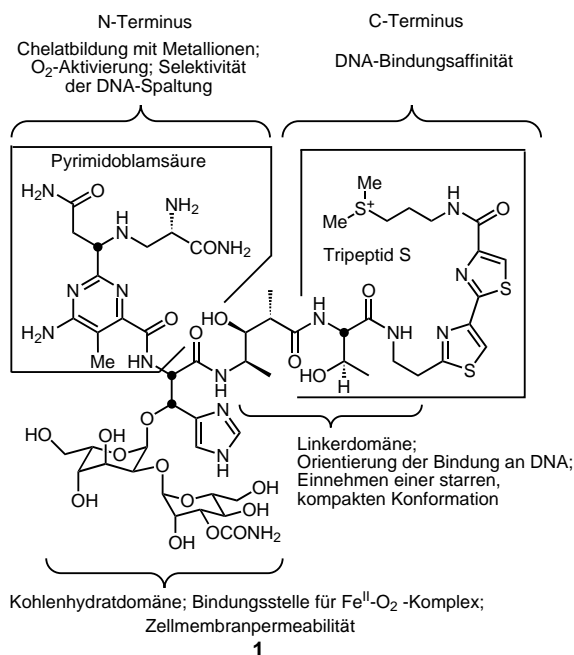
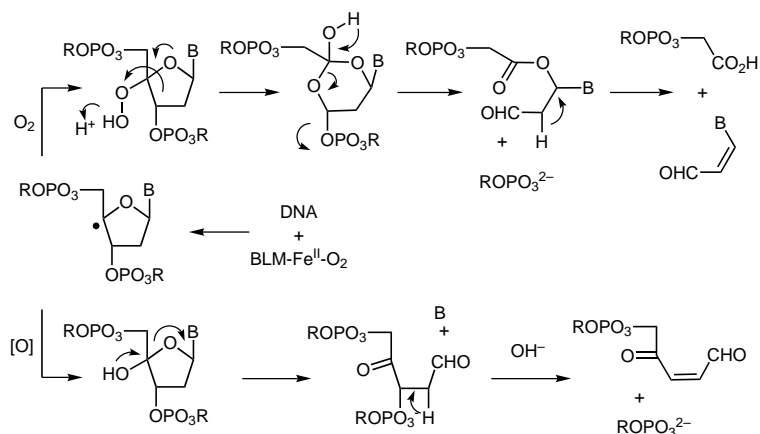


Abbildung 1. Struktur von Bleomycin A₂ **1**. Die Funktionen der einzelnen Molekülteile sind angegeben.

Spaltung beruht, einem Prozeß, der Metallionen- und O₂-abhängig ist.^[19–26] Es spaltet doppelsträngige DNA selektiv an 5'-GC- oder 5'-GT-Sequenzabschnitten durch Abstraktion des C4'-H-Atoms in der kleinen Furche und anschließende Fragmentierung des Desoxyriboserückgrats (Schema 1 und Abbildung 2).^[27–32] Es wird zwar sowohl die Spaltung von einzelsträngiger als auch von doppelsträngiger DNA (ss- bzw. ds-DNA) festgestellt, letzteres wird aber von vielen als der

[*] Prof. D. L. Boger, Hui Cai
Department of Chemistry
Skaggs Institute for Chemical Biology
The Scripps Research Institute
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)
Fax: (+1) 619-784-7550
E-mail: boger@scripps.edu



Schema 1. Primäre Mechanismen bei der von Bleomycin A₂ **1** induzierten DNA-Spaltung. B = Nucleobase, BLM = Bleomycin A₂.

biologisch wichtigere Prozeß angesehen.^[10b, 33–41] Nach neueren Befunden spaltet Bleomycin A₂ auch RNA^[42, 43] und DNA-RNA-Hybride,^[44] d.h., weitere Nucleinsäuren stehen als Zielmoleküle möglicherweise mit seinen biologischen Eigenschaften in Verbindung.

Jede Struktureinheit von Bleomycin A₂ leistet einen wichtigen Beitrag zu seiner biologischen Aktivität (Abbildung 1). Durch frühe und umfangreiche strukturelle,^[45–65] biophysikalische,^[66–71] chemische^[6, 72–75] und biologische^[76, 77] Untersuchungen von Bleomycin A₂ und seinen Derivaten wurde die N-terminale Pyrimidineinheit einschließlich ihrer β -Aminoalaninamid-Seitenkette und des angeknüpften β -Hydroxy-L-histidins als die Metallbindungsdomäne identifiziert, außerdem wurde gezeigt, daß die DNA-Bindungsaffinität ihren Ursprung im wesentlichen im C-Terminus hat, der eine Bithiazoleinheit und eine positiv geladene Sulfoniumgruppe enthält. Welche Rolle die Kohlenhydratdomäne spielt, ist weniger eingehend untersucht worden; bekannt ist, daß sie

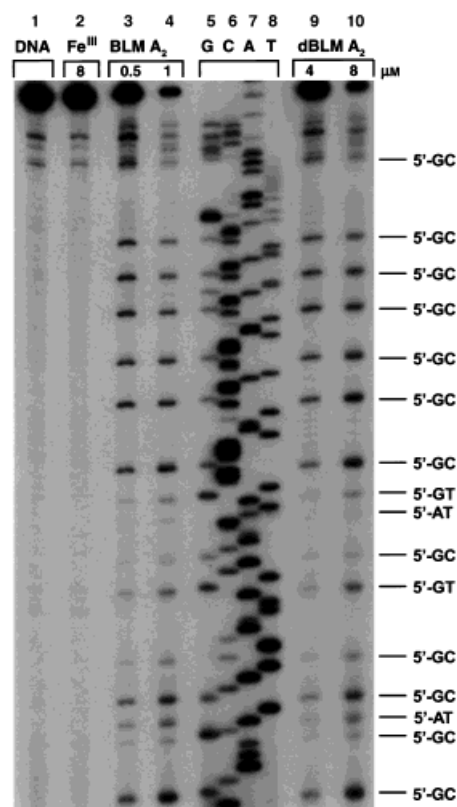
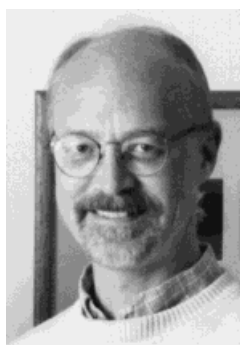


Abbildung 2. Sequenzselektive DNA-Spaltung durch Bleomycin A₂ (BLM A₂) **1** und Deglycobleomycin A₂ (dBLM A₂) **41**. Die Produkte wurden in einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch getrennt und autoradiographisch detektiert. Die unbehandelte DNA wurde als Vergleichsprobe aufgetragen (Bahn 1), ihre Sequenz ist in den Bahnen 5–8 abzulesen. Durch Inkubation mit Fe^{III}-Ionen alleine findet keine Spaltung statt (Bahn 2). Durch Inkubation mit BLM A₂ und dBLM A₂ in Gegenwart von Fe^{III} wird die DNA gespalten (Bahnen 3 und 4 bzw. 9 und 10), die Spaltstellen sind rechts neben dem Autoradiogramm angegeben.

Dale L. Boger, geboren 1953, erhielt 1975 seinen B.Sc. in Chemie an der University of Kansas und promovierte 1980 an der Harvard University. Unmittelbar nach Abschluß seiner Dissertation kehrte er als Mitglied der Fakultät des Department of Medicinal Chemistry an die University of Kansas zurück (1979–1985), wechselte dann zum Department of Chemistry an die Purdue University (1985–1991) und arbeitet seit 1991 als Richard and Alice Cramer Professor of Chemistry am Scripps Research Institute. Er forscht auf dem Gebiet der Organischen und Bioorganischen Chemie; seine Arbeiten umfassen die Entwicklung von Synthesemethoden, die Totalsynthese von Naturstoffen, die Chemie der Heterocyclen, die Bioorganische Chemie, die Medizinische Chemie, die Untersuchung von DNA-Wirkstoff- und Protein-Ligand-Wechselwirkungen sowie von Antitumorwirkstoffen.



D. L. Boger



H. Cai

Hui Cai, geboren 1968 in Yiyang, Hunan (Volksrepublik China), erhielt 1989 ihren B.Sc. in Chemie sowie 1992 ihren M.Sc. in Polymerchemie bei Prof. Fumian Li an der Universität Peking. Zur Zeit arbeitet sie am Scripps Research Institute unter Anleitung von Prof. Boger an ihrer Doktorarbeit zur Synthese und Untersuchung von Enzyminhibitoren und DNA-Spaltungsreagentien. Ihre Forschung konzentriert sich auf das Design und die Synthese neuer Verbindungen als potentielle Antitumorwirkstoffe.

die biologische Wirkung erhöht.^[45, 76, 78, 79] Sie beeinflusst zwar die Selektivität der DNA-Spaltung nicht, erhöht aber die Spaltungseffizienz. Es wird auch vermutet, daß sie die zelluläre Aufnahme erleichtert. Bisher ist die Kristallstruktur von DNA-gebundenem Bleomycin A₂ nicht bestimmt worden; auf der Grundlage von NMR-spektroskopisch bestimmten Strukturen in Lösung wurden aber einige Modelle entwickelt, um die molekulare Grundlage der Chelatisierung von Metallionen sowie der DNA-Bindung und -Spaltung aufzuklären.^[52, 53]

Trotz der in den letzten drei Jahrzehnten gemachten Anstrengungen waren zu Beginn unserer Untersuchungen noch immer viele Schlüsselfragen unbeantwortet, z. B. die nach der Natur der metallbindenden Liganden und deren Anordnung in den Metallkomplexen. Die möglichen Funktionen der Linkerdomäne und ihrer Substituenten sowie des Disaccharids waren noch nicht untersucht worden; sogar der Ursprung der DNA-Spaltungsselektivität und mechanistische Aspekte der Spaltung von Doppelstrang-DNA waren schwer verständlich und umstritten. Sowohl die C-terminale Bithiazoleinheit^[26, 80a] als auch die N-terminale Metallbindungsdomäne^[68, 72, 80b] sind als derjenige Molekülteil vorgeschlagen worden, der die Spaltungsselektivität steuert; eine Bindung der Bithiazoleinheit in der kleinen Furche^[26, 80a] ist ebenso in der Diskussion wie ihre Intercalation.^[66, 67c, 77a, 81, 94] Bemühungen zur Klärung dieser Frage wurden durch die begrenzte Zugänglichkeit von Strukturanaloga der komplex aufgebauten Bleomycine erschwert. Dies war die Ausgangssituation, als wir unser Projekt zum Thema Bleomycin A₂ begannen, das zur Entwicklung einer effizienten Totalsynthese führte, die dann für den Entwurf, die Synthese und das Testen von fast 50 wichtigen Analoga herangezogen wurde. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen haben wir in diesem Aufsatz zusammengefaßt.

2. Totalsynthese von (+)-P-3A und Bleomycin A₂

Die Pionierarbeiten der Arbeitsgruppen von Umezawa und Ohno^[82] sowie von Hecht^[83] zur Totalsynthese von Deglyco-bleomycin A₂ und Bleomycin A₂ wurden bereits zusammenfassend dargestellt;^[6] sie dienten zur Bestätigung der Struktur des Naturstoffes und zeigten Schwierigkeiten bei seiner Synthese auf. Die Konfiguration am benzyllischen C2-Atom der Pyrimidoblamsäure ließ sich bei diesen beiden Verfahren nicht kontrollieren; die Diastereomerenzuordnung erfolgte durch Vergleich mit dem Naturstoff, so daß eine Bestätigung der ursprünglichen Zuordnung nicht möglich war. Wegen des hohen Substitutionsgrades und der Funktionalisierung war sogar die Herstellung der Pyrimidoblamsäure eine Herausforderung, und die Gesamtausbeuten bei den Ansätzen waren niedrig. Der Auf- und Einbau des Disaccharids erwiesen sich als problematisch, und die Glycosidierung eines geschützten β -Hydroxy-L-histidins verlief in mäßigen Ausbeuten (ca. 20%) und ohne Diastereoselektivität am neu eingeführten anomeren Zentrum. Konkurrenzreaktionen der hochfunktionalisierten Zwischenprodukte wurden durch das Einführen von Schutzgruppen verhindert, was zur Länge und Komplexität der Synthesen beitrug. Diese Schwierigkeiten standen

einer Ausweitung der Arbeiten auf die Herstellung einer größeren Zahl von wichtigen Analoga des Naturstoffes entgegen. Seit den Veröffentlichungen der Arbeitsgruppen von Umezawa und Ohno sowie von Hecht, die 1982 in den Totalsynthesen gipfelten, ermöglichten Fortschritte in der Synthesechemie, sich diesen Herausforderungen erneut zu stellen und einen Ansatz zu entwickeln, der sich für die Synthese von Analoga eignet. Zu den Schlüsselementen unseres Ansatzes gehören die kurze und diastereoselektive Synthese der vollständig substituierten Pyrimidineinheit; die Nutzung aktueller Fortschritte auf dem Gebiet der Stereokontrolle bei der direkten Einführung von acht stereogenen Zentren, die sich nicht in einem Saccharidbaustein befinden; der konvergente Aufbau des C-Terminus sowie der diastereoselektive Einbau des Disaccharids mit neuen Glycosidierungsmethoden.

2.1. Aufbau der Pyrimidineinheit und Totalsynthese von (+)-P-3A^[18b, 84]

Ein Hauptaugenmerk unserer Bemühungen richtete sich auf die Synthese des Pyrimidingrundgerüsts mit den daran geknüpften Seitenketten, die zusammen die Metallbindungsdomäne bilden. Als primäres Synthesziel diente dabei (+)-P-3A **2**, eine von Mikroorganismen produzierte Verbindung, die bei Untersuchungen zur Biosynthese der Bleomycine isoliert und deren Struktur über eine Röntgenstrukturanalyse ihres Cu^{II}-Komplexes **2a** aufgeklärt wurde (Abbildung 3).^[85] Mit Ausnahme der Methylgruppe am Atom C5 umfaßt es das

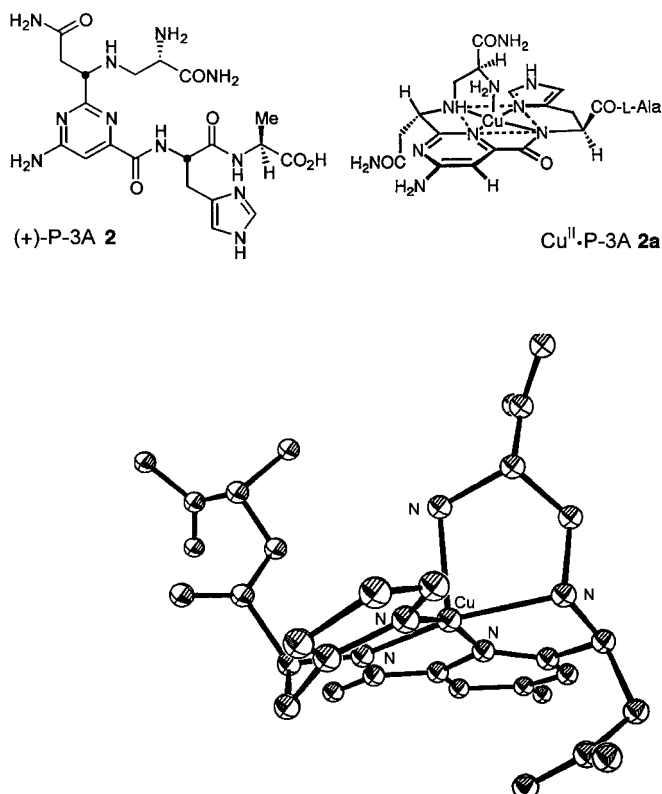
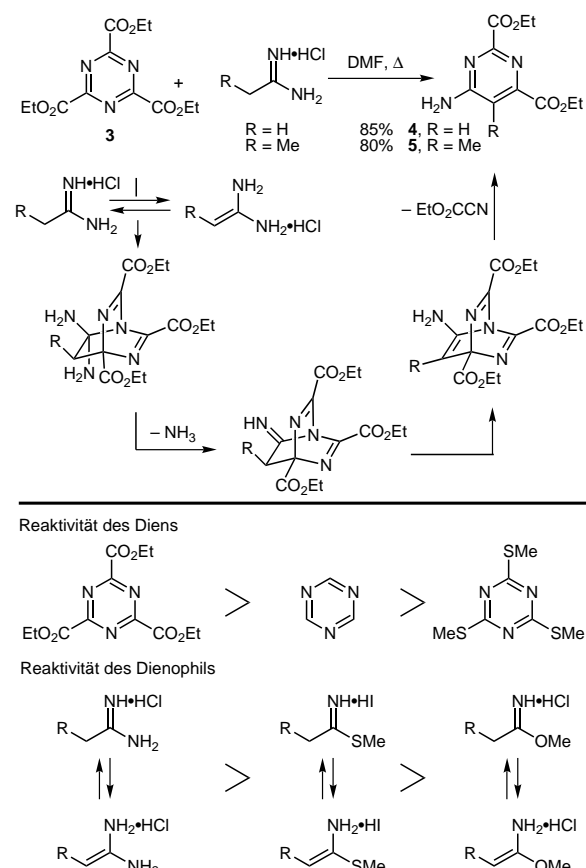


Abbildung 3. ORTEP-Darstellung der Struktur von Cu^{II}·P-3A **2a** im Kristall.

vollständige, funktionalisierte Pyrimidingrundgerüst von Bleomycin A₂ und repräsentiert das einfachste Beispiel dieser Wirkstoffklasse. Obwohl die Sachlage noch immer nicht geklärt ist, nimmt man an, daß der Cu^{II}-Komplex von P-3A ein Modell für die metallgebundenen Atome in den Eisen- und Kupferkomplexen von Bleomycin A₂ und seinen aktivierten Zwischenprodukten ist. Wahrscheinlich erfolgt die Sauerstoffkomplexierung und -aktivierung in *trans*-Position zur axialen NH₂-Gruppe des verzerrt planar-quadratischen Metallkomplexes. Seit der Veröffentlichung der Kristallstruktur durch Umezawa im Jahr 1978 sind spektroskopische Untersuchungen verschiedener Metallkomplexe sowie einfacher Modelle beschrieben worden.^[31a, 68, 73, 74] Obwohl die meisten von ihnen, darunter auch Untersuchungen an Co^{III}-OOH-Modellkomplexen,^[52] die im Komplex Cu^{II}·P-3A als Liganden fungierenden Atome bestätigen, wurden für die Metallionenkoordination von Bleomycin A₂ auch Alternativen vorgeschlagen. Aus Untersuchungen an Zn^{II}-^[53, 60a, 61a] und Fe^{II}-(CO)-Metallkomplexen^[60b] wurde die Möglichkeit abgeleitet, daß die in der Disaccharideinheit befindliche Carbamoylgruppe die axiale Aminogruppe als Ligand ersetzen könnte; die Komplexierung des deprotonierten Amids wurde in Frage gestellt.^[61a,b]

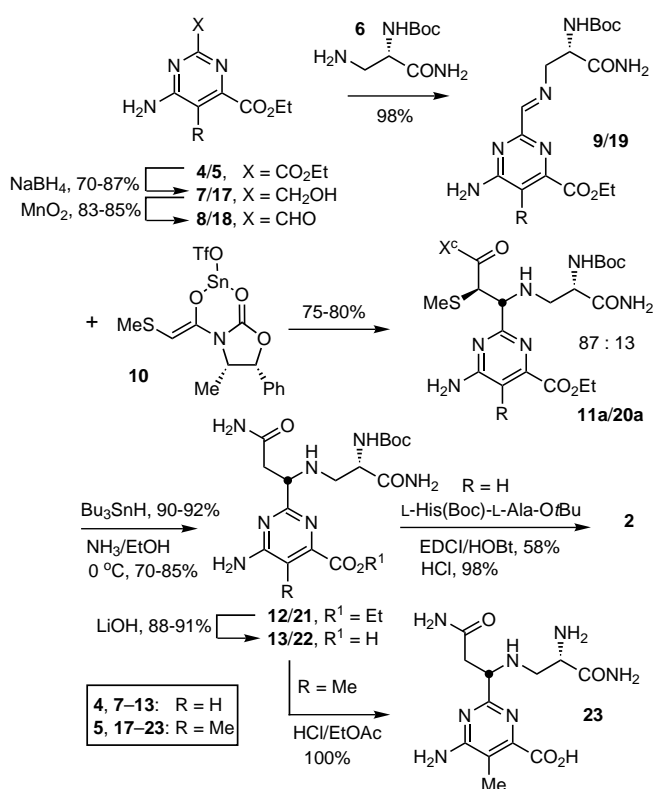
Der Schlüssel zur Synthese von **2** war die Herstellung eines vollständig substituierten Pyrimidins als Grundgerüst der Verbindung. Einen effizienten einstufigen Zugang sollte eine elektronisch inverse Diels-Alder-Reaktion von 1,3,5-Triazinen^[86] ermöglichen (Schema 2). Die thermische Reaktion von



Schema 2. Diels-Alder-Reaktion von 1,3,5-Triazinen mit Amidinen. DMF = Dimethylformamid.

in situ erzeugten Amidinen mit symmetrischen 1,3,5-Triazinen^[87] liefert substituierte 4-Aminopyrimidine in ausgezeichneten Ausbeuten; dabei wird folgende Reaktionssequenz durchlaufen: Tautomerisierung des Amidins zum 1,1-Diaminoethen, dessen [4+2]-Cycloaddition mit dem 1,3,5-Triazin, Abspaltung von Ammoniak aus dem Diels-Alder-Addukt, Imin-Enamin-Tautomerisierung und Retro-Diels-Alder-Reaktion unter Abspaltung von Cyanameisensäureethylester. Ein Vergleich von Amidinen, Thioimidaten und Imidaten zeigt, daß sich Amidine für den Einsatz in dieser Reaktionsfolge in einzigartiger Weise eignen. Die Reaktion wird am besten mit den Amidinhydrochloriden bei mittleren Reaktionstemperaturen (90–110 °C) in polaren, aprotischen Lösungsmitteln durchgeführt. Sie wird nicht durch das Dienophil/Dien-Verhältnis beeinflusst, wohl aber durch die Effekte der Substituenten am Triazin, die für eine elektronisch inverse Diels-Alder-Reaktion charakteristisch sind.^[87]

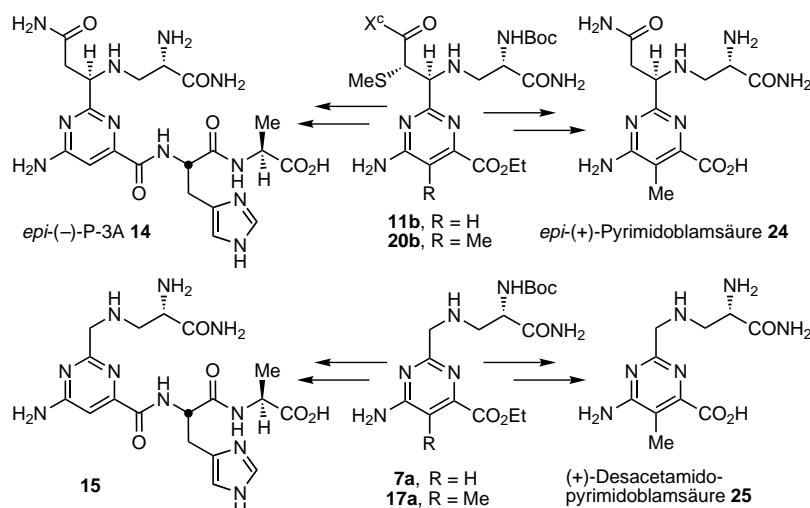
Über diese Cyclisierung wurde 2,4,6-Tris(ethoxycarbonyl)-1,3,5-triazin **3** mit Acetamidinhydrochlorid zu **4** umgesetzt (Schema 2). Eine selektive Differenzierung zwischen den Ethylestergruppen an C2 und C4 gelang durch Reduktion des elektrophileren C2-Esters mit NaBH₄ bei tiefer Temperatur und lieferte **7** (Schema 3). Zu lösen blieb nur das strategische Problem der stereokontrollierten Einführung der Acetamido-Seitenkette an C2. Die nichtselektiven Ansätze bei früheren Arbeiten erforderten eine Trennung der resultierenden 1:1-Diastereomerenmischung. Bei unseren Versuchen zeigte sich, daß optisch aktive *N*-Acyloxazolidinone eine diastereoselektive Imin-Addition eingehen, die sich für die Einführung der



Schema 3. Totalsynthese von (+)-P-3A **2** und (–)-Pyrimidoblamsäure **23**. Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, EDCI = 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, HOBt = 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol, Tf = Trifluormethansulfonyl, X^c = chirales Oxazolidinonyl.

C2-Acetamido-Seitenkette nutzen lässt.^[88] So entstand bei der Oxidation von **7** mit MnO_2 und der nachfolgenden Kondensation des Aldehyds **8** mit *N*⁶-Boc- β -Amino-L-alaninamid **6** das Imin **9**. Die Behandlung von **9** mit dem Zinn-(*Z*)-enolat **10** lieferte das gewünschte *anti*-Iminaddukt **11a** neben einer kleinen Menge des alternativen *anti*-Additionsprodukts **11b** (87:13), das abgetrennt werden konnte. Reduktive Entschwefelung des Hauptdiastereomers **11a** und Aminolyse lieferten **12**. Die Verknüpfung von **13**, das durch Hydrolyse der Ethylestergruppe von **12** erhalten wurde, mit L-His(Boc)-L-Ala-*Or*Bu ließ sich bequem ohne Schützen der unreaktiven Arylamino- oder der sterisch gehinderten sekundären Aminogruppe durchführen. Die abschließende säurekatalysierte Abspaltung der Schutzgruppen lieferte (+)-P-3A **2**.

Das bei der Addition in geringerer Menge gebildete *anti*-Produkt **11b** mit der nicht dem Naturstoff entsprechenden Konfiguration am benzylichen C2-Atom wurde in *epi*(-)-P-3A **14**^[18b] überführt. Durch Überführen der primären Hydroxygruppe von **7** in eine Tosylatgruppe und deren Substitution mit der primären Aminogruppe von **6** wird das sekundäre Amin **7a** erhalten, das in (-)-Desacetamido-P-3A **15** umgewandelt wurde (Schema 4).^[84]

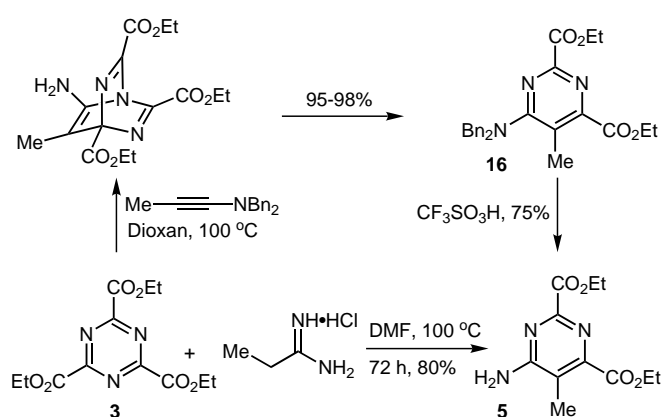


Schema 4. Synthese von *epi*(-)-P-3A **14**, (-)-Desacetamido-P-3A **15**, *epi*(+)-Pyrimidoblamsäure **24** und (+)-Desacetamidopyrimidoblamsäure **25**.

2.2. Synthese von (-)-Pyrimidoblamsäure^[18d]

Das Grundgerüst von (-)-Pyrimidoblamsäure wurde über zwei komplementäre [4+2]-Cycloadditionen von 2,4,6-Tris(ethoxycarbonyl)-1,3,5-triazin **3** aufgebaut (Schema 5). Die thermische Umsetzung von **3** mit 1-(*N,N*-Dibenzylamino)propin zu **16** und dessen säurekatalysierte Debenzylierung lieferte **5**. Alternativ konnte **5** auf direkterem Weg in einer Eintopfreaktion über eine elektronisch inverse Diels-Alder-Reaktion zwischen **3** und Propionamidin-Hydrochlorid hergestellt werden.

Die Differenzierung zwischen den Esterfunktionen an C2 und C4 gelang durch selektive Reduktion der sterisch besser zugänglichen und elektronisch reaktiveren Ethoxycarbonylgruppe an C2 in **5** und lieferte **17** (Schema 3). Die diastereo-



Schema 5. Synthese des Pyrimidin-Grundgerüsts. Bn = Benzyl.

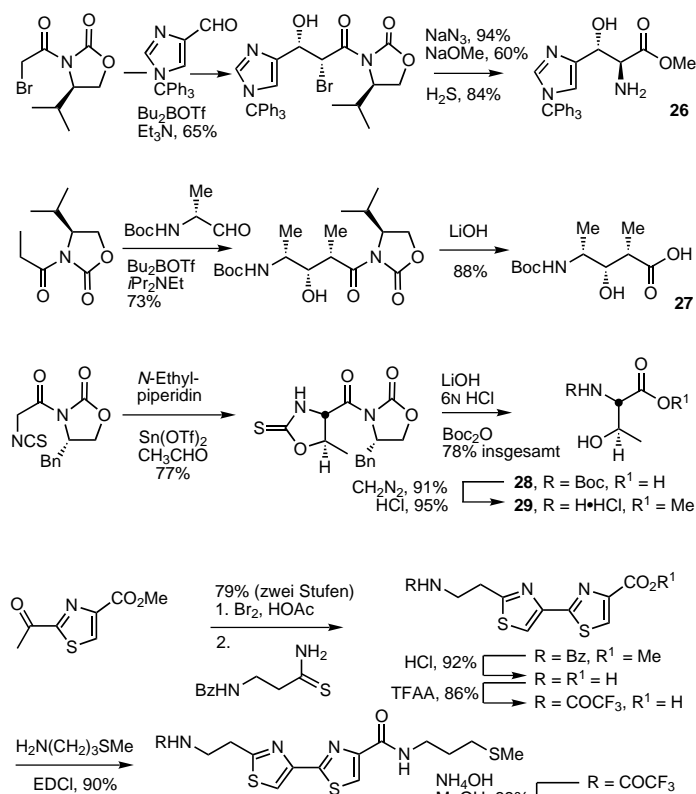
selektive Addition des Zinn-(*Z*)-enolats **10** an das Imin **19**, das durch Oxidation von **17** mit MnO_2 zum Aldehyd **18** und dessen anschließende Kondensation mit **6** erhalten wurde, lieferte **20a** als Hauptprodukt der *anti*-Addition (Diastereomerenverhältnis 87:13). Reduktive Entschwefelung, Aminolyse, Esterhydrolyse und Abspalten der *N*-Boc-Gruppe lieferte (-)-Pyrimidoblamsäure **23**. Ein wichtiges

Ergebnis dieser Arbeiten war die Bestätigung der absoluten Konfiguration am benzylichen C2-Atom, die Umezawa aufgrund spektroskopischer Befunde zugeordnet hatte.

Das bei der Imin-Addition als Nebenprodukt gebildete *anti*-Diastereomer **20b** wurde in *epi*(+)-Pyrimidoblamsäure **24** umgewandelt. Nach dem Schützen der primären Hydroxygruppe als Tosylat läßt sich **17** mit **6** zum Substitutionsprodukt **17a** umsetzen, aus dem (+)-Desacetamidopyrimidoblamsäure **25** hergestellt wurde (Schema 4).

2.3. Aufbau des C-Terminus: Synthese von Tri-, Tetra- und Pentapeptid S^[18c, 89]

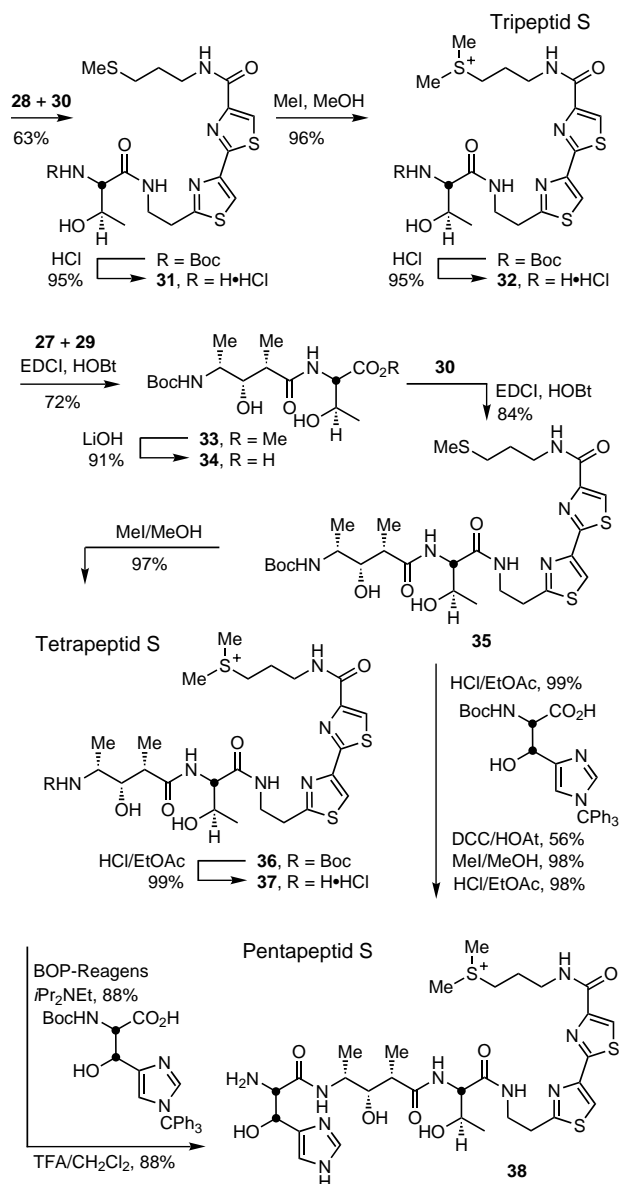
Die kurzen diastereokontrollierten Synthesen der Bestandteile des C-Terminus, **26**–**30**, sind in Schema 6 dargestellt. Die *erythro*- β -Hydroxy-L-histidin-Einheit **26** wurde in vier Stufen in Anlehnung an den Ansatz von Ohno et al.^[90] hergestellt, der dahingehend modifiziert wurde, daß die konkurrierende Retro-Aldolreaktion während des Azidaustausches unterdrückt wurde. Die (2*S*,3*S*,4*R*)-4-Amino-3-hydroxy-2-methylpentansäure-Einheit **27** wurde in einer zweistufigen Synthese über eine diastereoselektive *syn*-Aldoladdition eines Bor-(*Z*)-enolats an *N*-Boc-D-2-Amino-1-propanal und nachfolgende hydrolytische Abspaltung des chiralen Auxiliars erhalten. Ähnlich wurden die L-Threonin-Einheiten **28** und **29** durch diastereoselektive *syn*-Aldoladdition eines *N*-Acyloxazolidinonzinn-(*Z*)-enolats mit Acetaldehyd nach einem von Evans et al.^[91] beschriebenen Verfahren synthetisiert. Das Bithiazol **30** wurde mit geringfügigen Modifikationen nach der Methode von Sakai et al.^[92] hergestellt; dabei erwies sich eine direkte Carbodiimid-vermittelte Kondensa-



Schema 6. Synthese der Bestandteile des C-Terminus. Bz = Benzoyl, TFAA = Trifluoressigsäureanhydrid.

tion von 3-(Methylthio)propylamin als günstiger als die beschriebene zweistufige Reaktion unter Verwendung des Säurechlorids. Das abschließende Abspalten der Schutzgruppe nach einer Vorschrift von Hecht et al.^[83b] lieferte **30**.

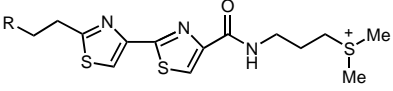

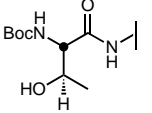
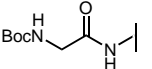
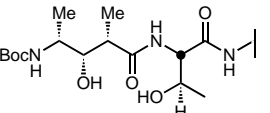
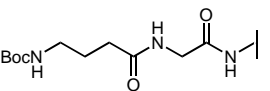
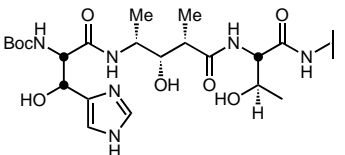
Tripeptid **S** **32** wurde durch Verknüpfen von **28** mit **30** aufgebaut, gefolgt von S-Methylierung und Abspaltung der N-Boc-Schutzgruppe (Schema 7). In Ergänzung zu einer von Umezawa et al.^[82] sowie Hecht et al.^[83] beschriebenen linearen Synthese von Tetrapeptid **S** durch Verknüpfen einer Tripeptid-S-Vorstufe mit **27** verfolgten wir bei unseren Arbeiten eine konvergente Synthesestrategie. Die Verknüpfung von **27** mit **29** (\rightarrow **33**) mit nachfolgender Hydrolyse der Methylestergruppen (\rightarrow **34**), Kupplung von **34** mit **30**, S-Methylierung und Abspaltung der N-Boc-Schutzgruppe lieferte Tetrapeptid **S** **37**. Die Sulfoniumgruppe war bei früheren Syntheserversuchen zu einem späteren Zeitpunkt eingeführt worden; nach unseren Erfahrungen ermöglichte ihre frühe Einführung eine konvergentere Synthese, vereinfachte die Reinigung der Kupplungsprodukte und verhinderte das Eintreten konkurrierender Nebenreaktionen. In einer ähnlichen Reaktionsfolge wurde Pentapeptid **S** **38** erhalten: Abspalten der N-Boc-Schutzgruppe von **35**, Kupplung mit *N*^α-Boc-β-Hydroxy-L-His(CPh₃), S-Methylierung und säurekatalysiertes Abspalten der Schutzgruppen. Auch durch die direkte Verknüpfung von **37** mit *N*^α-Boc-β-Hydroxy-L-His(CPh₃) und säurekatalysiertes Entschützen entsteht Pentapeptid **S** in einer Reaktionsfolge, die durch den Einbau der Sulfoniumgruppe nicht beeinflusst wird.^[105] Bemerkenswerterweise wurde so der vollständig funktionalisierte C-Terminus ohne Schutzgruppen erhalten.



Schema 7. Synthese von Tri-, Tetra- und Pentapeptid **S**. BOP=1-Benzotriazolyl-oxyltris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat, DCC = *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid.

Eine ungeklärte Frage im Hinblick auf den C-Terminus und seine Analoga war, welche Rolle die verknüpfende Kette und ihre Substituenten für die Eigenschaften von Bleomycin A₂ spielen. Von zentraler Bedeutung für jede Interpretation ist ihr Einfluß auf die Affinität und Selektivität der DNA-Bindung. Folgerichtig wurden die Bindungskonstanten für Kälberthymus-DNA und die Größe der Bindungsstellen für Bleomycin A₂, Deglycobleomycin A₂, die Boc-geschützten Derivate von Di-, Tri-, Tetra- und Pentapeptid **S** sowie ihre Analoga bestimmt; dies gelang durch Messen der Fluoreszenzlöschung des Bithiazols bei der DNA-Bindung.^[18c] Die Boc-Derivate wurden bei den Untersuchungen den freien Aminen gegenübergestellt, weil sie den Molekülteilen der natürlichen Verbindung entsprechen. Repräsentative Ergebnisse der Vergleichsstudien, bei denen über 15 Analoga des C-Terminus untersucht wurden, was frühere Untersuchungen^[66, 77, 93, 94] ergänzt und erweitert, sind in Tabelle 1 zusammen-

Tabelle 1. Parameter der Bindung von Bleomycin A₂ **1** und seiner wichtigsten Untereinheiten an Kälberthymus-DNA.

Verbindung	Formel	K_B [10^5 M^{-1}] ^[a]	L [bp] ^[b]
Bleomycin A ₂	1	1.0	3.8
Deglycobleomycin A ₂	41	1.1	3.9
			
Dipeptid S	R = 	0.10	2.2
Tripeptid S	R = 	0.26	3.6
	R = 	0.18	2.7
Tetrapeptid S	R = 	0.21	3.7
	R = 	0.20	3.5
Pentapeptid S	R = 	0.23	4.2

[a] K_B = apparente Bindungskonstante. [b] L = Länge der Bindungsstelle auf der DNA.

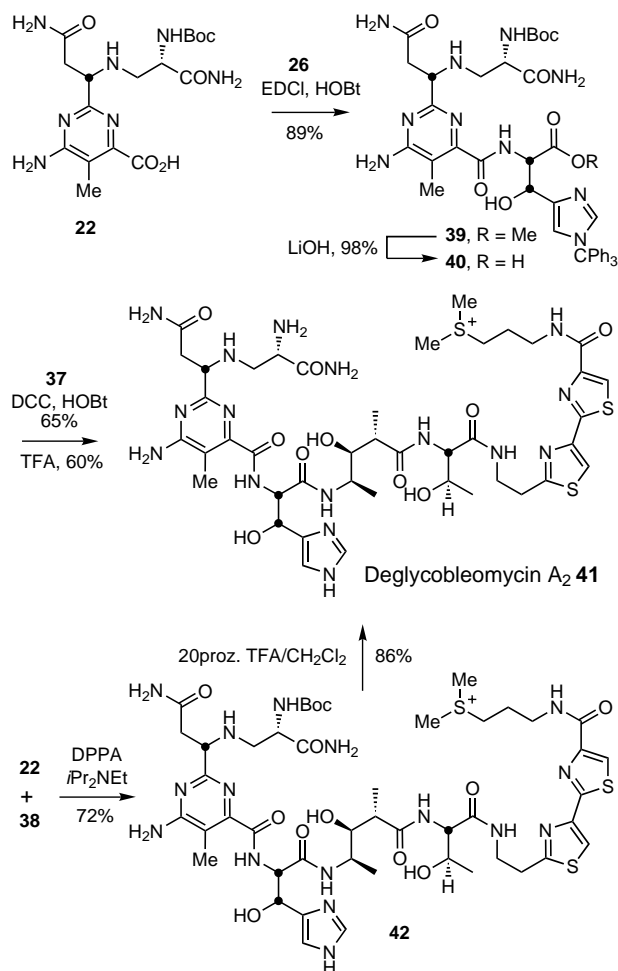
mengestellt. *N*-Boc-Tripeptid S, *N*-Boc-Tetrapeptid S und *N*-Boc-Pentapeptid S weisen nahezu identische Bindungskonstanten auf, die größer als die von *N*-Boc-Dipeptid S und nur geringfügig kleiner als die von Bleomycin A₂ oder Deglycobleomycin A₂ sind. Die Vergleiche zeigen, daß das Disaccharid nicht zur Bindungsaffinität beiträgt, die Affinität zum Großteil auf Tripeptid S zurückzuführen ist, die substituierte Pentansäure- sowie die β -Hydroxy-L-histidin-Einheit nicht zur DNA-Bindungsaffinität beitragen und daß die für Deglycobleomycin A₂ gemessene Affinität auf die N-terminale Pyrimidoblamsäure-Einheit zurückzuführen ist. Das Entfernen des Hydroxyethyl-Substituenten aus Tripeptid S verringert die Bindungsaffinität, nicht aber das Entfernen aller Substituenten von Tetrapeptid S. Dieser Befund läßt vermuten, daß die L-Threonin-Einheit produktiv mit der DNA wechselwirkt, daß der L-Threonin-Hydroxyethyl-Substituent die Bindung schwächt und daß die übrigen Substituenten der verknüpfenden Kette nicht zur Bindung beitragen. Dies legt die Vermutung nahe, daß ihr Einfluß auf die Spaltungseffizienz, möglicherweise mit Ausnahme des L-Threonin-Substituenten, nicht auf stabilisierende Wechselwirkungen mit der DNA bei der Bindung zurückzuführen ist. Darüber hinaus

entsprechen die Längen der Bindungsstellen gut dem geschätzten Wert für die Größe von Bleomycin A₂, der mit anderen Techniken ermittelt wurde.^[66, 77, 93, 94] In Übereinstimmung mit Schlußfolgerungen, die aus den Werten der Bindungskonstanten gezogen wurden, ließen die Längen der Bindungsstellen auch vermuten, daß die Tripeptid-S-Einheit vollständig an die DNA gebunden ist und daß der L-Threonin-Substituent nachweisbar die Wechselwirkung mit der DNA beeinflusst, daß aber die übrigen Tetrapeptid-S- oder Pentapeptid-S-Substituenten weder die Länge der Bindungsstelle noch den Bindungsmodus von Tripeptid S wesentlich verändern. Alternative Substitutionsmuster der Pentansäure-Einheit hatten wenig Einfluß auf die Bindungsaffinität ($K_B = 0.18 - 0.23 \times 10^{-5}$ gegenüber $0.21 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$) oder die Länge der Bindungsstelle (3.5–3.9 gegenüber 3.7 Basenpaaren (bp)). Größere Änderungen wurden bei Verbindungen ohne den Hydroxyethyl-Substituenten von Tripeptid S gemessen.

Diese Untersuchungen wurden vor der Entwicklung neuer Strukturmodelle auf NMR-spektroskopischer Grundlage durchgeführt.^[52, 53] Dennoch wurden die Beobachtungen dahingehend interpretiert, daß die deutliche Verringerung der DNA-Spaltungseffizienz, die bei Verbindungen mit modifizierten verknüpfenden Ketten festgestellt wird, nicht das Resultat einer veränderten Bindungsaffinität oder eines anderen Tripeptid-S-Bindungsmodus war. Sie ist wohl eher auf konformative Effekte der Substituenten in der verknüpfenden Kette zurückzuführen und auf die Einnahme einer kompakten Konformation bei der DNA-Bindung, die an der Verknüpfungsstelle zwischen der Threonin- und der Valeriansäure-Einheit einen Knick beinhaltet.^[18c] Mit der Verfügbarkeit neuer Strukturmodelle könnte dies nun mit größerer Sicherheit ihrer Rolle bei der Präorganisation von Bleomycin A₂ in eine solche kompakte, für die DNA-Spaltung günstige Konformation zugeschrieben werden (siehe Abschnitt 3.3).

2.4. Totalsynthesen von Deglycobleomycin A₂^[18a,c]

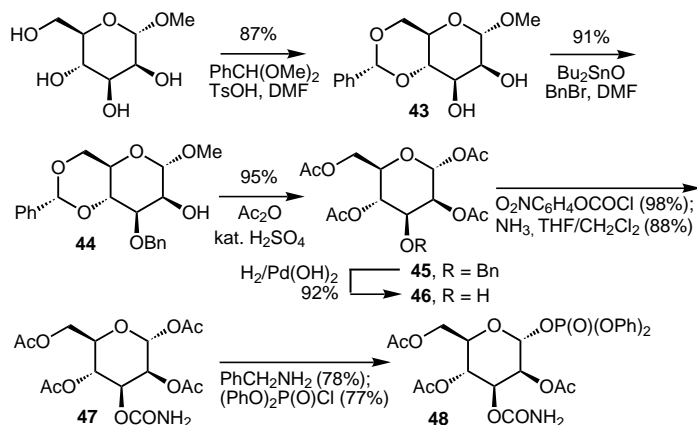
Mit der Verfügbarkeit der entscheidenden Zwischenprodukte stand der Synthese von Deglycobleomycin A₂ **41** nichts mehr im Weg. Die Verknüpfung von *N*^α-Boc-Pyrimidoblamsäure **22** mit **26** lieferte **39** (Schema 8). Die Hydrolyse der Esterfunktion und die Verknüpfung von **40** mit Tetrapeptid S **37**, das bereits die intakte Sulfoniumgruppe enthielt, führte nach Abspalten der Schutzgruppen zu Deglycobleomycin A₂ **41**. Alternativ läßt sich Pentapeptid S **38** in Anwesenheit von DPPA mit **22** glatt zu *N*^α-Boc-Deglycobleomycin A₂ **42** umsetzen.^[105] Diese Reaktion läßt sich in Anwesenheit der Sulfoniumgruppe durchführen, mit nur einer Schutzgruppe in den Reaktanten, ohne Schutzgruppe am Imidazol und ohne das Auftreten einer Imidazol-Acylierung als Konkurrenzreaktion. Durch säurekatalysiertes Abspalten der Boc-Schutzgruppe von **42** wurde Deglycobleomycin A₂ **41** erhalten. Zur Herstellung von Deglycobleomycin-A₂-Analoga bedienten wir uns der konvergenteren Synthese über **40**, während sich der Weg über **42** für die Synthese von Verbindungen mit modifizierten Pyrimidoblamsäure-Einheiten anbot.



Schema 8. Totalsynthesen von Deglycobleomycin A₂ **41**. DPPA = Diphenylphosphorylazid.

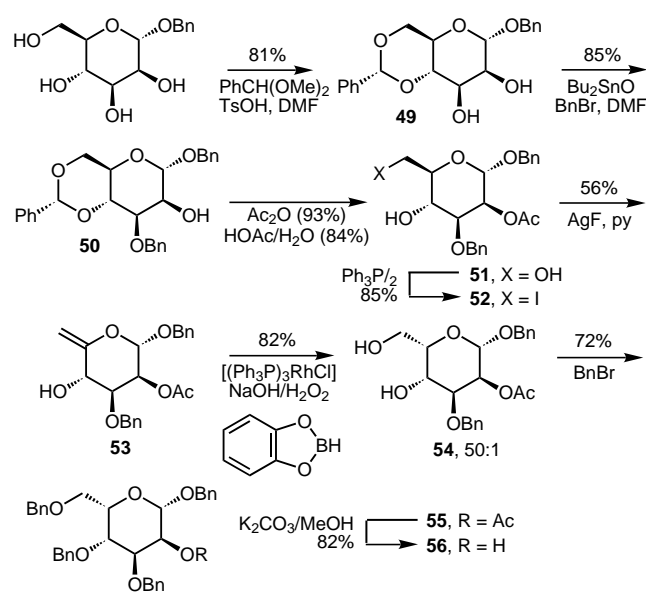
2.5. Herstellung des Disaccharids und Totalsynthese von Bleomycin A₂^[18f]

Die D-Mannose-Einheit **48** wurde ausgehend von D-Mannose durch selektive Funktionalisierung an C3 hergestellt. Das Zwischenprodukt **48**, das im weiteren Verlauf der Synthese als Glycosyldonor dient, trägt eine Acetatgruppe an C2, um den stereochemischen Verlauf der Glycosidierung zum Disaccharid kontrollieren zu können. Bei der Umsetzung von **43** mit Bu₂SnO erhalten wurde, mit Benzylbromid wurde ausschließlich die äquatoriale Alkoholgruppe an C3 alkyliert (→**44**) (Schema 9). **44** wurde in einem Reaktionsschritt zum Pentaacetat **45** peracyliert. Nach Vorschriften von Hecht et al.^[83] wurde **45** mit dem Pearlman-Katalysator zu **46** debenzilyliert und dieses dann in das *p*-Nitrophenylcarbonat umgewandelt, das bei der anschließenden Aminolyse **47** in 62% Gesamtausbeute (bezogen auf D-Mannose) lieferte. Die Aktivierung von **47** als Glycosyldonor erfolgte durch Umsetzen mit HBr/HOAc zum Glycosylbromid oder durch sukzessives Umsetzen mit Benzylamin und (PhO)₂P(O)Cl zum Glycosyldiphenylphosphat **48**.



Schema 9. Synthese der D-Mannose-Einheit. Ts=Toluol-4-sulfonyl.

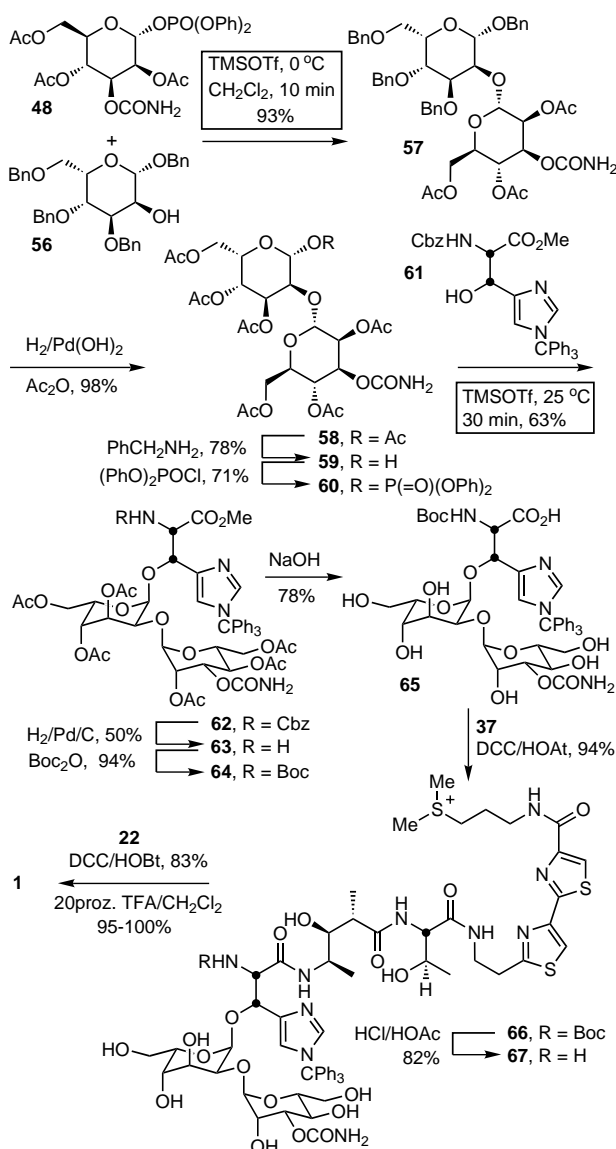
Bei früheren Versuchen, ein geeignet geschütztes L-Gulose-derivat zu synthetisieren, wurde neben einer sechsstufigen Reaktionsfolge ausgehend von der seltenen L-Gulose (3–4% Gesamtausbeute) ein Ansatz entwickelt, bei dem die Konfigurationen der Stereozentren von α-D-Glucufuranose sukzessiv vom Kopf zum Schwanz hin invertiert und die Oxidationsstufen von C1 und C6 „vertauscht“ wurden.^[82, 83] Ausgehend von einer D-Mannose-Vorstufe mit der richtigen Konfiguration an C1–C4 erforderte unsere Strategie nur eine einfache Inversion der Konfiguration an C5 zur Umwandlung von D-Mannose in L-Gulose. Die Hydroxygruppen an C4 und C6 von Benzyl-α-D-mannopyranosid wurden durch Bildung des Acetals **49** geschützt; anschließend wurde die äquatoriale C3-Hydroxygruppe des intermediär gebildeten 2,3-O-Dibutylstannylens selektiv benzyliert und so **50** erhalten (Schema 10). Der Acetylierung der C2-Alkoholfunktion folgte die Hydrolyse des Acetals und die Umwandlung von **51** in das entsprechende primäre Iodid; die Eliminierung von HI lieferte **53**. Bei der Rh^I-katalysierten Hydroborierung von **53** wurde nach oxidativer Aufarbeitung **54** mit einer Diastereoselektivität von ≥50:1 und unter Umkehr der Konfiguration



Schema 10. Synthese der L-Gulose-Einheit. py=Pyridin.

an C5 erhalten. Durch Benzylierung von **54** und anschließende Methanolyse der Acetatgruppe wurde **56** und damit ein geeigneter L-Gulose-Glycosylacceptor für die Synthese des Disaccharids erhalten.

Die Disaccharidsynthese mit **56** als Glycosylacceptor und **48** als Glycosyldonor verlief glatt unter Bildung von **57** (Schema 11). Im Vergleich zum Glycosylbromid ermöglicht



Schema 11. Die letzten Stufen der Totalsynthese von Bleomycin A₂ **1**. Cbz = Benzyloxycarbonyl, HOAt = 7-Aza-1-hydroxy-1*H*-benzotriazol, TMS = Trimethylsilyl.

die Verwendung des Diphenylphosphats **48** die Herstellung von **57** unter milderer Reaktionsbedingungen (0°C gegenüber 25°C), in viel kürzeren Reaktionszeiten (10 min gegenüber 10–36 h) und in besseren Ausbeuten (94 % gegenüber 74–78 %). Bemerkenswerterweise übersteht die Carbamoylgruppe diese Glycosidierungsreaktion ohne Schutzgruppe und ohne daß Nebenreaktionen auftreten. Die strenge Retention der α -Konfiguration der glycosidischen Bindung kann durch eine Nachbargruppenbeteiligung der Acetatgruppe am

C2-Atom der Mannose erklärt werden, die die Retention der Konfiguration an C1' gewährleistet. Die Debenzylierung von **57** mit anschließender Acetylierung lieferte **58** in hervorragenden Ausbeuten; die Aktivierung als α -Glycosyldiphenylphosphat **60** gelang durch sukzessive Behandlung mit Benzylamin und $(\text{PhO})_2\text{P}(\text{O})\text{Cl}$. Die O-Glycosidierung wurde mit **60** und *N*-Cbz- β -Hydroxy-L-His(CPh₃)-methylester **61** durchgeführt und lieferte das Addukt **62** unter außergewöhnlich milden Bedingungen (25°C, 30 min) in hervorragender Ausbeute (63 %) als Gemisch des gewünschten α - und des unerwünschten β -verknüpften Anomers (>13:1). Frühere Versuche, zur Aktivierung Glycosylhalogenide einzusetzen, erforderten nicht nur längere Reaktionszeiten, sie verliefen auch mit deutlich schlechteren Ausbeuten und lieferten ein Gemisch von Diastereomeren. Die hohe Diastereoselektivität der erstgenannten Glycosidierung kann zum einen der geringen Reaktivität des Glycosylacceptors zugeschrieben werden, die die Bildung des stabileren α -Anomers begünstigt; zum anderen fördern den Mechanismus beeinflussende Charakteristika des Glycosylphosphatacceptors die Inversion der Konfiguration am anomeren Reaktionszentrum. Das selektive Abspalten der Cbz-Gruppe ohne die konkurrierende Hydrogenolyse der Triphenylmethyl(Trityl)-Schutzgruppe, Schützen des Amins mit der *N*-Boc-Gruppe und eine vollständige Esterhydrolyse lieferten Verbindung **65**, die für die sukzessive Verknüpfung mit Tetrapeptid S und *N*⁶-Boc-Pyrimidoblamsäure geeignet geschützt ist.

Die Kupplung von **65** mit Tetrapeptid S **37** lieferte **66** in ausgezeichneter Ausbeute, wobei die Sulfoniumgruppe bereits vorhanden war, ohne daß ein Schützen der Hydroxygruppen des Disaccharids oder derer von Tetrapeptid S erforderlich gewesen wäre. Aus der Behandlung von **66** mit schwacher Säure resultierte unter den von Sieber und Riniker^[95] beschriebenen Bedingungen und nach Abspalten der Boc-Schutzgruppe **67**, ohne daß Deglycosidierung oder Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe eintraten. Die Verknüpfung von **67** mit *N*^α-Boc-Pyrimidoblamsäure **22** und das abschließende säurekatalysierte Abspalten der Schutzgruppen lieferten Bleomycin A₂ **1**, das sich als in jeder Hinsicht identisch mit dem Naturstoff erwies.

3. Untersuchungen zu den Funktionen der Bleomycin-A₅-Molekülteile

Mit der Entwicklung einer modularen und konvergenten Totalsynthese von Bleomycin A₂ wurde die Grundlage geschaffen, eine Vielzahl von Analoga herzustellen, die sich nur an einer einzigen Stelle von der Ausgangsverbindung unterscheiden. Mit ihrer Hilfe sollten Schlüsselfragen hinsichtlich Metallionenchelatisierung, Sauerstoffaktivierung, DNA-Bindung und Ursache der sequenzselektiven DNA-Spaltung beantwortet werden.

3.1. Die Kohlenhydratdomäne

Von allen Bleomycin-A₂-Molekülteilen ist über die Rolle des Disaccharids am wenigsten bekannt. Zwar wirkt es sich

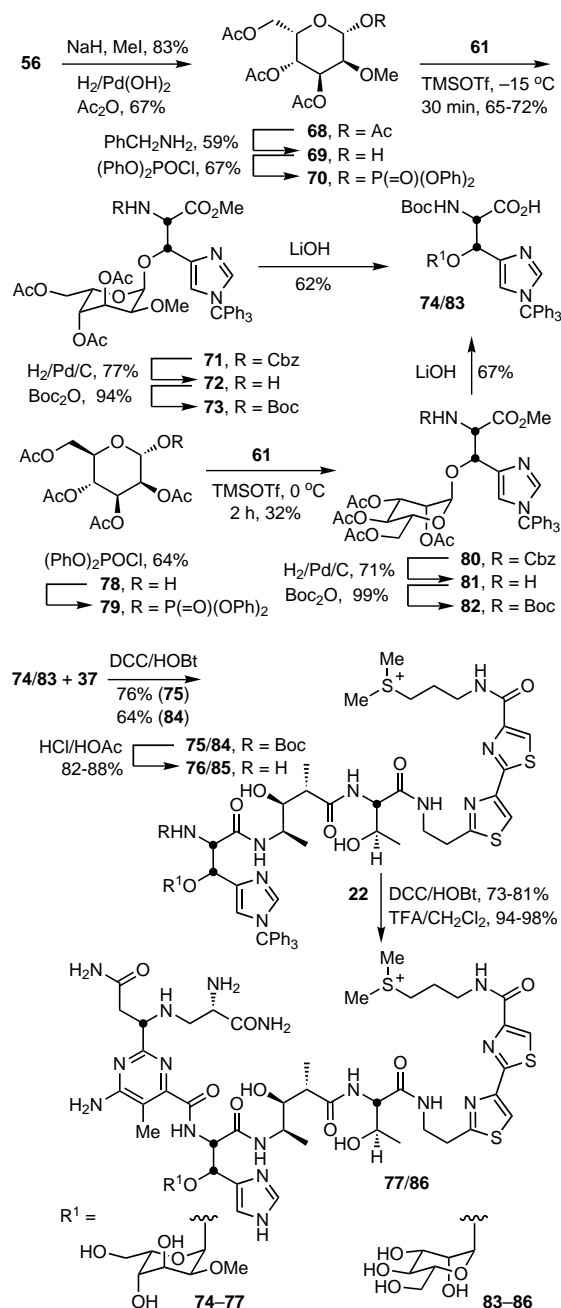
nicht stark auf die Spaltungsselektivität (5'-GC, 5'-GT) aus, ist aber für feine Unterschiede in der relativen Selektivität hinsichtlich der verfügbaren Bindungsstellen verantwortlich.^[76, 96] Es ist auch bekannt, daß die Disaccharid-Einheit die biologische Wirksamkeit erhöht und wesentliche Beiträge zur Effizienz der DNA-Spaltung und zum Verhältnis von ds-DNA- zu ss-DNA-Spaltung leistet. Wenngleich es viele andere plausible Erklärungen gibt, ist die Carbamoylgruppe am C3-Atom der Mannose mit der Metallionenkomplexierung in Zusammenhang gebracht worden; sie soll die Struktur und Reaktivität der Metallkomplexe beeinflussen.^[6, 45a, 61a,b] Einem anderen Vorschlag nach bildet das sterisch anspruchsvolle Disaccharid zusammen mit der Acetamido-Seitenkette an C2 eine Seite einer Tasche und schützt so die reaktiven Zwischenprodukte.^[45b, 73f, 78] Um diese Fragen zu klären, wurde der Einfluß der einzelnen Disaccharid-Bestandteile durch Synthese und Testen von drei wichtigen Analoga untersucht.

3.1.1. Demannosylbleomycin A₂^[97]

Da dem Analogon **77** die endständige α -D-Mannopyranosid-Einheit fehlt, kann man mit seiner Hilfe den Einfluß dieses Molekülteils aufzuklären, einschließlich des Einflusses, den die Carbamoylgruppe als mutmaßlicher sechster Ligand bei der Metallionenkomplexierung hat. Um sicherzustellen, daß die am C2-Atom der L-Gulose freigesetzte Hydroxygruppe die Vergleichsstudien nicht beeinträchtigt, wurde sie in den Methylether überführt. Das Analogon wurde durch diastereoselektive O-Glycosidierung von **61** mit dem Glycosyldiphenylphosphat der 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-O-methyl- β -L-gulopyranose **70** hergestellt, gefolgt von der Anpassung oder Abspaltung der Schutzgruppen und der sukzessiven Kuppelung mit Tetrapeptid S und N^α-Boc-Pyrimidoblastsäure (Schema 12). Die Glycosidierung gelang unter außergewöhnlich milden Bedingungen (–15 °C, 30 min) in ausgezeichneter Ausbeute (65–72 %) unter Inversion der Konfiguration am glycosidischen C1-Atom (α : β ≥ 20:1) und lieferte **71**. Zur glatten Bildung von **71** tragen sowohl die niedrige Reaktivität des Glycosylacceptors **61** als auch die mechanistischen Eigenschaften des Glycosylphosphatdonors bei, die die Inversion der Konfiguration am Reaktionszentrum begünstigen.

3.1.2. α -D-Mannopyranosyldeglycobleomycin A₂^[97]

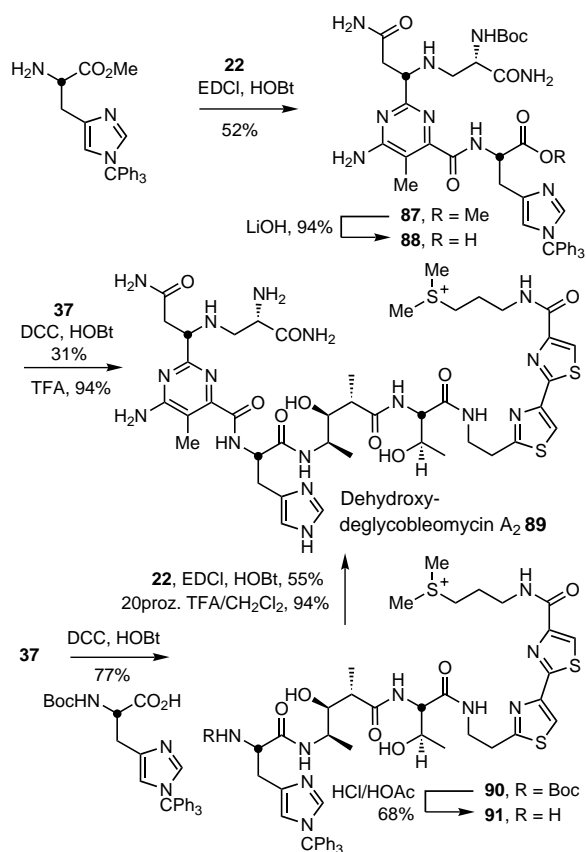
Das Analogon **86** enthält eine Monosaccharid-Einheit, bei der die Konfiguration am C5-Stereozentrum des α -L-Gulopyranosids invertiert wurde, so daß ein α -D-Mannopyranosid entsteht. Bei der Glycosidierung von **61** mit dem Glycosyldiphenylphosphat von 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-L- α -D-mannopyranose entstand **80**, ohne daß sich Nebenprodukte nachweisen ließen (Schema 12); die vollständige Retention der Konfiguration am glycosidischen C1-Atom ist auf eine Nachbargruppenbeteiligung der C2-Acetatgruppe zurückzuführen. Anpassung oder Abspalten der Schutzgruppen und die sukzessive Verknüpfung mit **37** und **22** lieferte **86**.



Schema 12. Synthese von Demannosylbleomycin A₂ **77** und α -D-Mannosyldeglycobleomycin A₂ **86**.

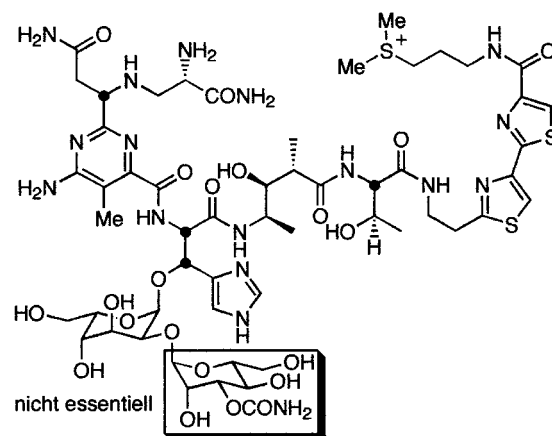
3.1.3. Dehydroxydeglycobleomycin A₂^[98]

Der Unterschied zwischen Bleomycin A₂ und Deglycobleomycin A₂ könnte statt auf die Abspaltung des Disaccharids auf die Freisetzung der Alkoholfunktion der β -Hydroxy-L-histidin-Einheit zurückzuführen sein. Um das zu klären, wurde Dehydroxydeglycobleomycin A₂ **89**, dem diese Alkoholfunktion fehlt, für Vergleichsuntersuchungen hergestellt (Schema 13). Beim ersten von zwei Ansätzen wurde **88** mit Tetrapeptid S unter partieller Racemisierung verknüpft. Die einfache Umkehr der Kupplungsreihenfolge, d. h. die Aktivierung der L-His-Carboxylatgruppe über eine N-Carbamoyl anstelle einer N-Acylgruppe, ermöglichte eine effizientere Herstellung von **89**.

Schema 13. Synthese von Dehydroxydeglycobleomycin A₂ 89.

Die DNA-Spaltungseffizienzen und -selektivitäten sowie das Verhältnis von ds-DNA- zu ss-DNA-Spaltung von Demannosylbleomycin A₂ 77 und Bleomycin A₂ 1 erwiesen sich als ähnlich oder nicht unterscheidbar; das legt nahe, daß das endständige 2-O-(3-O-Carbamoyl)- α -D-mannopyranosid einschließlich der Carbamoylgruppe nur einen geringen Einfluß auf die DNA-Spaltungseigenschaften ausübt (Abbildung 4). Im Unterschied dazu zeigen die geringere DNA-Spaltungseffizienz und das geringere Verhältnis von ds-DNA- zu ss-DNA-Spaltung von 86, das sich sogar als noch weniger wirksam als Deglycobleomycin A₂ 41 erwies, daß die erste Kohlenhydrat-Einheit des Disaccharids die Eigenschaften stark beeinflusst. Ähnlich war Dehydroxydeglycobleomycin A₂ 89 in seiner Wirkung nicht oder nur geringfügig weniger wirksam als Deglycobleomycin A₂ 41, was darauf hindeutet, daß das Fehlen der Disaccharid-Einheit und nicht die Freisetzung der β -Hydroxygruppe am L-Histidin die Verschlechterung der DNA-Spaltungseigenschaften bewirkt. Ein weiterer wichtiger Befund aus diesen Untersuchungen ist, daß das α -L-Gulopyranosid und nicht das α -D-Mannopyranosid einschließlich seiner Carbamoylgruppe diejenige Disaccharidkomponente ist, die für die vollständige Ausprägung der DNA-Spaltungseffizienz von Bleomycin A₂ erforderlich ist.

Bestätigt werden unsere Befunde von aktuellen Strukturuntersuchungen, die von der Arbeitsgruppe von Stubbe nach unseren Arbeiten beendet wurden: Die Co^{III}-OOH-Komplexe von Bleomycin A₂ 1 und Deglycobleomycin A₂ 41 binden



Verbindung	Effizienz	ds:ss	Selektivität
Bleomycin A ₂ 1	2 – 5	1 : 6	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
Demannosylbleomycin A ₂ 77	2 – 4	1 : 7	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
α -D-Mannosyldeglycobleomycin A ₂ 86	0.6 – 1	1 : 20	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
Deglycobleomycin A ₂ 41	1	1 : 12	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
Dehydroxydeglycobleomycin A ₂ 89	0.75	1 : 12	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA

Abbildung 4. DNA-Spaltungseigenschaften von Bleomycin-A₂-Analoga mit modifizierter Disaccharid-Einheit. Der Vergleich von Bleomycin A₂ 1 und Deglycobleomycin A₂ 41 zeigt, daß das Vorhandensein der vollständigen Disaccharid-Einheit die Effizienz der DNA-Spaltung um das Zwei- bis Fünffache erhöht und das Verhältnis von ds-DNA- zu ss-DNA-Spaltung verdoppelt. Weitere Einzelheiten siehe Text.

in der gleichen Weise an eine Oligonucleotid-Spaltstelle, wobei der von 41 eine um den Faktor 30 geringere Affinität aufweist.^[52] Die Moleküle binden in der kleinen Furche und nehmen eine kompakte Konformation ein. Dabei intercaliert die Bithiazolgruppe partiell an dem Basenpaar, das sich auf der 3'-Seite der Spaltstelle befindet, und das metallgebundene Peroxid befindet sich in der Nähe des C4'-Wasserstoffatoms der Spaltstelle. Das Disaccharid liegt an der Außenseite der kleinen Furche und schirmt den Komplex gegen das Lösungsmittel ab (Abbildung 5); die primäre Aminogruppe der β -Aminoalaninamid-Seitenkette der Pyrimidoblastamsäure, nicht die C3-Carbamoylgruppe der Mannose, ist der axiale Ligand. Diese und ähnliche Untersuchungen lassen vermuten, daß die C3-Carbamoylgruppe der Mannose wahrscheinlich keinen Beitrag zur Metallionenkomplexierung leistet, daß das Disaccharid eine produktive DNA-gebundene Konformation schützend stabilisiert und ihre Einnahme möglicherweise erleichtert und daß Deglycobleomycin A₂ als vereinfachtes Modell dienen kann, das relevante Informationen über die Wechselwirkung von Bleomycin A₂ und DNA liefert.

Der Befund, daß der Co^{III}-OOH-Komplex von Bleomycin A₂ 30mal effektiver an eine Oligonucleotid-Spaltstelle bindet als der von Deglycobleomycin A₂, wurde schwachen, nichtselektiven Wechselwirkungen zwischen der terminalen Mannose mit der hydrophoben Kette des DNA-Rückgrats

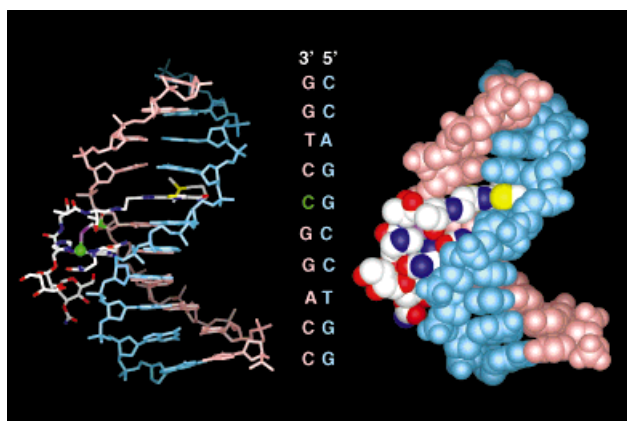


Abbildung 5. Durch NMR-Spektroskopie ermitteltes Strukturmodell von Oligonucleotid-gebundenem Co^{III} -OOH · Bleomycin A_2 .^[52]

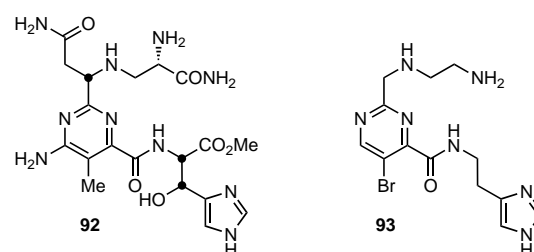
zugeschrieben. Die allgemeine Gültigkeit dieser Befunde, die den tatsächlichen Eigenschaften von **77** (dem dieser endständige Zucker fehlt) zu widersprechen scheinen, wird gegenwärtig geprüft.

3.2. Die Metallbindungsdomäne

Von zentraler Bedeutung für die Eigenschaften von Bleomycin A_2 ist die Chelatisierung von Metallionen und die anschließende O_2 -Aktivierung. Eine allgemein akzeptierte Beschreibung der Metallionen-chelatisierung wurde aus der Struktur von Cu^{II} · P-3A **2a** im Kristall abgeleitet: Die primären und sekundären Aminogruppen der β -Aminoalanin-amid-Seitenkette, das Atom N1 des Pyrimidins, das Atom N3 des Imidazols von L-Histidin und dessen deprotonierte Amidogruppe koordinieren das Metallion in einem planar-quadratischen Komplex, in dem die primäre Aminogruppe eine axiale Position einnimmt^[85] (siehe Abbildung 3). NMR-^[52–65] und verwandte spektroskopische Untersuchungen^[66–72] an einer Reihe von Bleomycin- A_2 -Metallkomplexen haben zur übereinstimmenden Auffassung beigetragen, daß das Pyrimidin, das Imidazol und die sekundäre Aminogruppe an das Metallion gebunden sind. Unsere Untersuchungen und die anderer Arbeitsgruppen lassen vermuten, daß die Carbamoylgruppe an C3 der Mannose nicht an der Metallionen-chelatisierung beteiligt ist und daß der axiale Ligand die primäre Aminogruppe des β -Aminoalanins ist. Die übrigen Liganden müssen noch eindeutig identifiziert werden. Auch die Grundlage der DNA-Spaltungsselektivität war zu Beginn unserer Untersuchungen ungeklärt, obwohl der Beitrag, den die Metallbindungsdomäne zur DNA-Bindungsaffinität und zur Polynucleotiderkennung leistet, eingehend untersucht worden ist.^[68, 72, 80] Sowohl der C-Terminus^[26, 80a] als auch die N-terminale Metallbindungsdomäne^[68, 72, 80b] sind jeweils als derjenige Molekülteil vorgeschlagen worden, der für die 5'-GC/5'-GT-Spaltungsselektivität bestimmend ist. Zur Untersuchung der Metallionen-chelatisierung und zur Aufklärung der Grundlage der DNA-Erkennung wurde eine Reihe von geeignet modifizierten Verbindungen herangezogen.

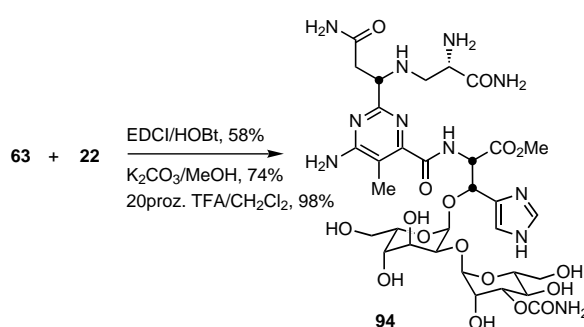
3.2.1. Die vollständige Metallbindungsdomäne^[100]

Schon in früheren Untersuchungen widmete man sich der wichtigen Frage nach den DNA-Spaltungseigenschaften der Metallbindungsdomäne selbst. Sowohl Hecht et al.^[72] als auch später Mascharak et al.^[68] machten zwar den Vorschlag, daß die Metallbindungsdomäne die DNA-Spaltungsselektivität steuert, eine strukturelle Basis für die Polynucleotiderkennung wurde aber nicht definiert. Darüber hinaus blieben Befunde von Hecht et al.^[5b] unerklärt, nach denen die Fe-Komplexe von **92** (der Metallbindungsdomäne ohne Disaccharid-Einheit) und von verwandten Verbindungen, die den N-Terminus enthalten, DNA nicht über das Ausmaß der schwachen unspezifischen Spaltung von DNA, die durch Fe-Ionen alleine verursacht wird (Hintergrundaktivität), hinaus spalten, während vereinfachte Modellverbindungen, die von Mascharak et al. beschrieben wurden (darunter **93**), ein Spaltungsmuster erzeugen, das dem von Bleomycin A_2 gebildeten ähnelt, aber nicht mit diesem identisch ist.^[99] Um



diese Ungereimtheiten aufzuklären und die Polynucleotiderkennungseigenschaften der Metallbindungsdomäne zu untersuchen, wurde die vollständig funktionalisierte, N-terminale Metallbindungsdomäne einschließlich des mit ihr verbundenen 2-O-(3-O-Carbamoyl- α -D-mannopyranosyl)- α -L-gulopyranosid-Disaccharids synthetisiert (**94**).^[100]

Die Synthese geht von **22** und **63** aus, die in neun (20–25 % Gesamtausbeute) bzw. sieben Stufen (16–19 % Gesamtausbeute) hergestellt wurden, und ist in Schema 14 skizziert. Die



Schema 14. Synthese der vollständigen Metallbindungsdomäne von Bleomycin A_2 (**94**).

Kupplung von N^{α} -Boc-Pyrimidoblamsäure **22** mit **63**, Methanolyse der sechs O-Acetatgruppen durch Umsetzung mit pulverisiertem K_2CO_3 in CH_3OH und säurekatalysiertes Abspalten der Schutzgruppen lieferte **94**. Zu Vergleichszwecken wurde **92** durch säurekatalysiertes Entschützen (20proz. $\text{TFA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 95 %) von **39** synthetisiert.

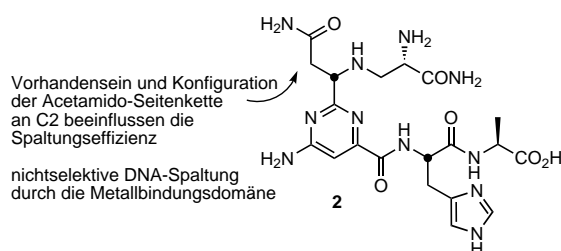
Im Unterschied zum Fe^{II} -Komplex von **92** spaltet der der vollständigen Metallbindungsdomäne **94** DNA deutlich über das Ausmaß der Hintergrundaktivität hinaus und nur 10mal weniger effizient als der von Deglycobleomycin **A₂ 41**; allerdings ist die Spaltung nicht sequenzspezifisch, und das Verhältnis von ds-DNA- zu ss-DNA-Spaltung ist deutlich kleiner (Abbildung 6).^[100] Obwohl sie also offenbar die DNA-Spaltungsselektivität stark beeinflusst, wenn sie Bestandteil des vollständigen Naturstoffmoleküls ist (siehe Abschnitt 3.2.8), weist die Metallbindungsdomäne allein nicht die sequenzselektive DNA-Spaltung auf, die für Bleomycin **A₂** charakteristisch ist.

Verbindung	Effizienz	ds:ss	Selektivität
Bleomycin A₂ 1	2 – 5	1 : 6	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
Deglycobleomycin A₂ 41	1	1 : 12	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
94	0.1	1 : 48	keine
92	<0.04	n.b.	keine
Fe^{III}	0.04	1 : 98	keine

Abbildung 6. Von der Metallbindungsdomäne vermittelte DNA-Spaltungseigenschaften. Die vollständige Metallbindungsdomäne weist allein keine Selektivität der DNA-Spaltung (ds:ss) auf. n.b. = nicht bestimmt.

3.2.2. (+)-P-3A, epi(-)-P-3A und (-)-Desacetamido-P-3A

Auch (+)-P-3A **2**, epi(-)-P-3A **14** und (-)-Desacetamido-P-3A **15** wurden als repräsentative Modelle für die Metallbindungsdomäne untersucht.^[18b, 84] (+)-P-3A **2** erwies sich als überraschend effizient bei der DNA-Spaltung – es ist sogar effizienter als **92** oder **94**. Die Fe^{II} -Komplexe aller drei Verbindungen führten zur Spaltung sowohl von ss- als auch von ds-DNA, allerdings mit einer verminderten Neigung zur ds-Spaltung und ohne meßbare Sequenzselektivität (Abbildung 7). Fe^{II} ·**2** war nur drei- bis fünfmal weniger effizient als



Verbindung	Effizienz	ds:ss	Selektivität
Bleomycin A₂ 1	2 – 5	1 : 6	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
Deglycobleomycin A₂ 41	1	1 : 12	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
(+)-P-3A 2	0.3 – 0.2	1 : 30	keine
epi(-)-P-3A 14	0.07	1 : 38	keine
(-)-Desacetamido-P-3A 15	0.07	1 : 40	keine

Abbildung 7. DNA-Spaltungseigenschaften von (+)-P-3A **2** und verwandten Verbindungen.

Deglycobleomycin **A₂** und drei- bis fünfmal effizienter als Fe^{II} ·**14** und Fe^{II} ·**15**. Die Ergebnisse bewiesen nicht nur, daß mit der Metallbindungsdomäne allein keine sequenzselektive DNA-Spaltung zu erzielen ist, sondern zeigten auch erstmals,

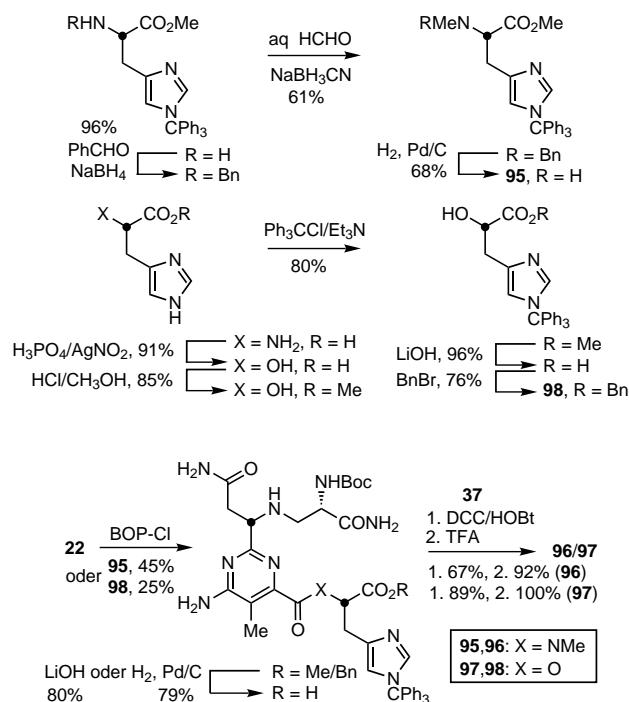
daß die C2-Acetamido-Seitenkette die Spaltungseffizienz deutlich beeinflusst, obwohl sie nicht an der Metallionenchelatisierung beteiligt ist.

3.2.3. Modifizierung der L-Histidin-Amidgruppe^[98]

Nach Ergebnissen von Umezawa et al., die potentiometrische Titrations des Bleomycin-Kupfer-Komplexes durchführten, besetzt im pH-Bereich zwischen 4 und 9 eine deprotonierte funktionelle Gruppe eine Koordinationsstelle am Metallzentrum.^[85] Die Amidbindung zwischen der Pyrimidoblamsäure- und der Histidin-Einheit (Histidin als Amin-Komponente) befindet sich in einer günstigen Position, um als Ligand zu fungieren; der deprotonierte Amidstickstoff wurde daher als eine Koordinationsstelle angenommen, ungeachtet der relativen pK_a -Werte von Imidazol (14.4) und eines Amids (17) in Abwesenheit eines Metalls.^[85] Diese Annahme wird durch die Kristallstrukturen von Cu^{II} ·P-3A **2a** und einfachen Modellkomplexen gestützt, die die N^{π} -Komplexierung des L-Histidin-Imidazols und N^{σ} -Komplexierung des deprotonierten Amid-Stickstoffatoms belegen.^[68] Manche Untersuchungen scheinen dies zu bestätigen,^[69b,c] während verwandte spektroskopische Studien an einer Reihe von Metallkomplexen vermuten lassen, daß das Amid-Stickstoffatom nicht immer beteiligt ist, und Zweifel an der Position des deprotonierten Liganden wecken.^[61a,b] Die Bedeutung der L-Histidin-Amidgruppe sollte über das Testen von zwei Amid-Analoga geklärt werden. Das Analogon **96** enthält eine N-Methylsubstituierte Amidgruppe. Das N-Methylamid kann nur eine Amid- N^{π} -Komplexierung eingehen; eine Deprotonierung und Metallionenkomplexierung über eine N^{σ} -Koordinationsstelle ist unmöglich. Beim Analogon **97** verhindert der Ersatz der Amid- durch eine Esterfunktion die Metallionenkoordinierung über das deprotonierte Amid. Für die Synthese des N-Methylamidderivates **96** wurde der geeignet geschützte N-Methyl-L-histidinmethylester **95** aus L-His(CPh₃)-OMe durch reduktive Benzilylierung, Methylierung und Hydrogenolyse des Benzylamins hergestellt (Schema 15). Über die Verknüpfung von **95** mit N^{α} -Boc-Pyrimidoblamsäure **22** wurde das N-substituierte Amid aufgebaut. Die Hydrolyse der Methyl-esterfunktion, Verknüpfung mit Tetrapeptid **S 37** und säurekatalysiertes Abspalten der Schutzgruppen lieferten **96**.

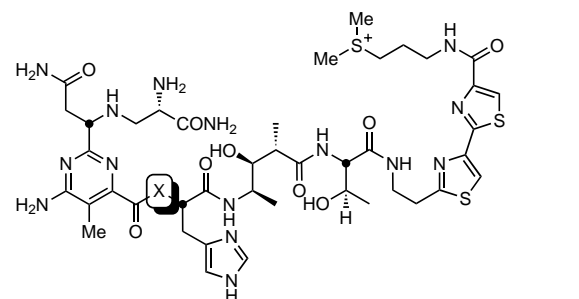
Als Vorstufe für die Synthese von **97** wurde der selektiv geschützte Alkohol **98** ausgewählt, der sich nach der Kuppelung mit **22** entschützen läßt, ohne daß es dabei zur Epimerisierung oder zu einer konkurrierenden Hydrolyse der neugebildeten Esterfunktion kommt. Der Benzylester **98** wurde ausgehend von L-Histidin hergestellt (Schema 15) und mit N^{α} -Boc-Pyrimidoblamsäure **22** zu einem Ester verknüpft, der ungewöhnlich hydrolyseempfindlich war. Das Entfernen der Benzylester-Schutzgruppe, Verknüpfen der resultierenden Carbonsäure mit Tetrapeptid **S 37** und säurekatalysiertes Abspalten der Schutzgruppen lieferte **97**.

Die Bleomycin-Analoga **96** und **97**, bei denen die Amidgruppe von L-Histidin gegen eine N-Methylamid- bzw. eine Estergruppe ausgetauscht wurde, spalten zwar DNA, aber ohne Sequenzselektivität und mit einer Effizienz sowie einem Verhältnis von ds-DNA- zu ss-DNA-Spaltung, die nur leicht über denen von freiem Fe^{III} liegen (Abbildung 8). Diese



Schema 15. Synthese von Bleomycin-A₂-Derivaten, bei denen NH der L-Histidin-Amid-Gruppe gegen NMe oder O ausgetauscht wurde. BOP-Cl = 1-Benzotriazolyl-oxyl-tris(dimethylamino)phosphoniumchlorid.

Beobachtungen stimmen mit dem Vorschlag überein, daß die deprotonierte Amidgruppe der L-Histidin-Einheit für die funktionelle Metallionenchelatisierung sowie für die Aktivität erforderlich ist.



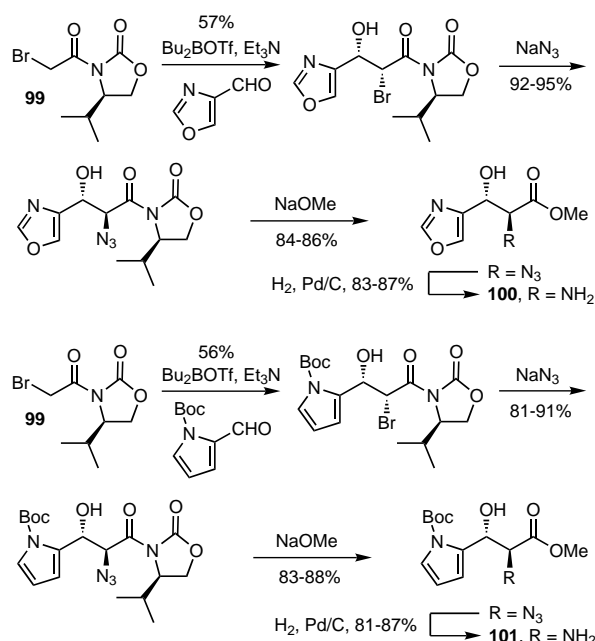
Verbindung	Effizienz	ds:ss	Selektivität
Bleomycin A ₂ 1	2–5	1 : 6	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
Deglycobleomycin A ₂ 41	1	1 : 12	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
89 , X = NH	0.75	1 : 12	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
96 , X = NMe	0.08	1 : 61	keine
97 , X = O	0.13	1 : 49	keine
Fe ^{III}	0.04	1 : 98	keine

Abbildung 8. DNA-Spaltungseigenschaften von Bleomycin-Analoga mit modifizierter L-Histidin-Amidgruppe. Die Ergebnisse zeigen, daß eine unsubstituierte Amidgruppe essentiell ist.

3.2.4. Oxazol-, Pyrrol- und Desimidazol-Deglycobleomycin A₂^[101]

Das N3-Atom der Imidazolgruppe der *erythro*-β-Hydroxy-L-histidin-Einheit fungiert als Schlüsselligand bei der Metallionenkomplexierung, und man nimmt an, daß es auch bei der

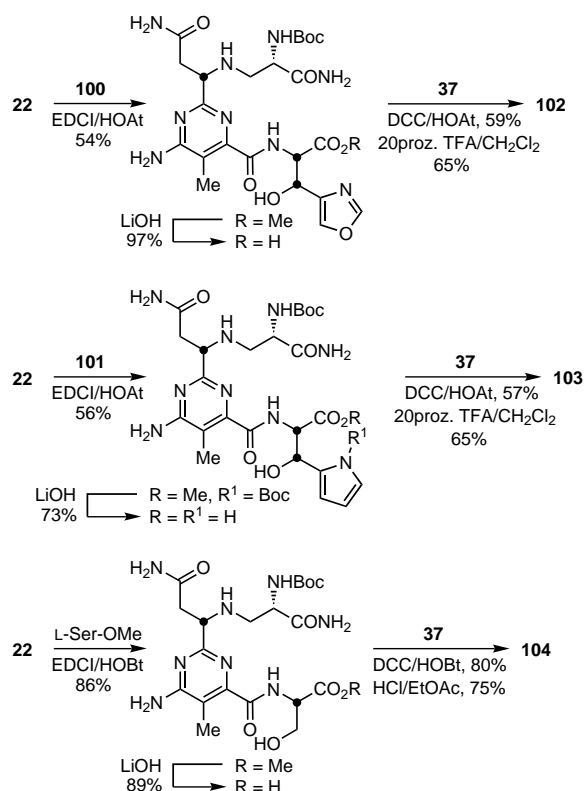
Sauerstoffaktivierung eine entscheidende Rolle spielt. Im Zuge unserer Untersuchungen zur Funktion der Amidgruppe der β-Hydroxy-L-histidin-Einheit versuchten wir die Frage zu klären, ob die Metallionenkomplexierung durch das N3-Atom des Imidazolrings über eine N^α- oder eine N^π-Bindung erfolgt, indem wir die Verbindungen **102**–**104** synthetisierten und ihre Eigenschaften untersuchten. Das Oxazol-Analogon **102** kann nur eine N^π-Metallionenkomplexierung eingehen; dabei liegt es in einer Form vor, die mit dem N¹-H-Imidazol-Tautomer von Bleomycin A₂ verwandt ist, während das Pyrrol-Analogon **103** die N^α-Metallionenkomplexierungseigenschaften des N³-H-Imidazol-Tautomers aufweist. Dem Analogon **104**, das L-Serin anstelle der L-Histidin-Einheit enthält, fehlt die Imidazolgruppe ganz. Für die Synthese von **102** und **103** wurden die geschützten *erythro*-β-Hydroxy-L-histidin-Analoga **100** und **101** verwendet. Beide Verbindungen wurden nach der gleichen Methode hergestellt, die auch für die Synthese der authentischen Einheit verwendet wurde, d.h. durch diastereoselektive *syn*-Aldoladdition des optisch aktiven α-Bromacetyloxazolidinons **99** (Schema 16).



Schema 16. Herstellung von Analoga der L-Histidin-Einheit.

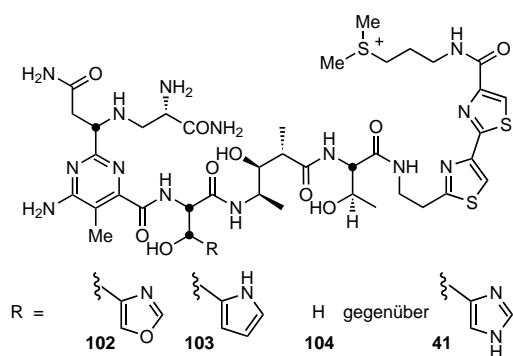
Das Kuppeln von **100** mit N^α-Boc-Pyrimidoblämsäure **22**, anschließende Hydrolyse der Methylestergruppe, Verknüpfen der resultierenden Carbonsäure mit Tetrapeptid **37** und säurekatalysiertes Abspalten der Schutzgruppen lieferte **102**. Der Einbau von **101** und von L-Ser-OCH₃ in die Analoga **103** bzw. **104** wurde auf ähnliche Weise vorgenommen (Schema 17).

Das Oxazol-Analogon **102**, das keine N^α-Metallionenkomplexierung eingehen kann, weist ähnliche DNA-Spaltungseigenschaften auf wie Deglycobleomycin A₂ **41** und ist dabei nur geringfügig weniger effizient. Die Auftreten sequenzselektiver Spaltung bestätigt, daß die Imidazol-N^π-Metallionenkomplexierung für die funktionelle Reaktivität ausreicht



Schema 17. Synthese von Bleomycin-Derivaten, bei denen die Imidazolgruppe der L-Histidin-Einheit durch Analoga ersetzt ist.

(Abbildung 9). Durch den Austausch des N1-Atoms des Imidazols gegen das O1-Atom des Oxazols wurde gezeigt, daß diese Gruppe für die Metallionenkomplexierung, die Sauerstoffaktivierung oder die nachfolgenden Oxidationsreaktionen nicht deprotoniert werden muß, daß das funktionelle Bleomycin-A₂-Tautomer das N¹-H-Tautomer ist und



Verbindung	Effizienz	ds:ss	Selektivität
Bleomycin A ₂ 1	2–5	1 : 6	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
Deglycobleomycin A ₂ 41	1	1 : 12	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
102, R = Oxazol	0.5	1 : 26	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
103, R = Pyrrol	0.15	1 : 44	keine
104, R = H	0.08	1 : 57	keine
Fe ^{III}	0.06	1 : 98	keine

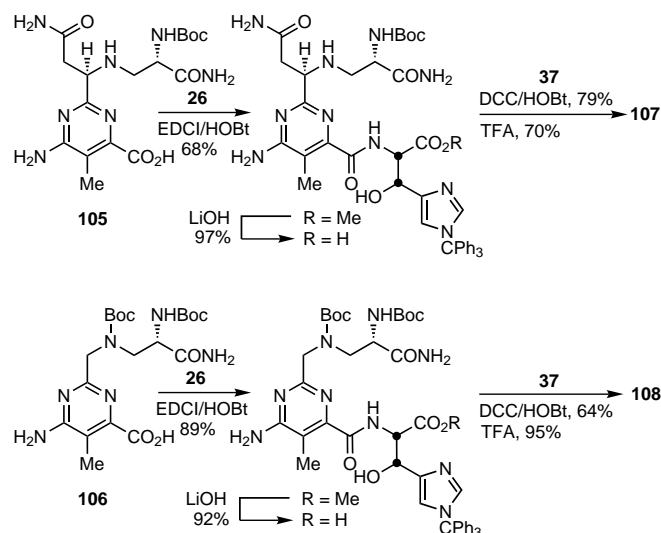
Abbildung 9. DNA-Spaltungseigenschaften von Bleomycin-Derivaten, die Imidazol-Analoga der Histidin-Einheit enthalten. Weitere Erläuterungen siehe Text.

daß das N¹-H-Atom nicht über Wasserstoffbrückenbindungen zum Phosphatrückgrat oder zu Nucleobasen an der Polynucleotiderkennung beteiligt ist. Das Pyrrol-Analogon **103** dagegen, das keine N^π-Metallionenkoordination eingehen und als N^σ-Donor fungieren kann, spaltet DNA nicht sequenzselektiv und mit deutlich geringerer Effizienz sowie kleinerem Verhältnis von ds- zu ss-DNA-Spaltung, wobei beide Werte nur wenig größer sind als die der Hintergrundaktivität von Fe^{III}. Ganz ähnlich erwies sich **104** als ineffizienter Wirkstoff, was die Unerläßlichkeit der Imidazolgruppe bestätigt. Die DNA-Spaltung durch **103** und **104** resultiert möglicherweise aus der Bildung diffusionsfähiger Oxidationsmittel, z. B. von Hydroxylradikalen, ähnlich wie bei vom Fenton-Reagens (H₂O₂ und Fe(II)-Salze) vermittelten Reaktionen. Diese Beobachtungen stützen die Annahme, daß eine N^π- und nicht eine N^σ-Koordinierung durch das N¹-H-Imidazol-Tautomer für die funktionelle Aktivität von Bleomycin A₂ von Bedeutung ist. Auch die neueren Strukturuntersuchungen von Stubbe et al. am Co^{III}-OOH-Komplex von Bleomycin A₂ zeigen und bestätigen die N^π-Komplexierung über die Histidin-Imidazolgruppe sowie die Komplexierung über die deprotonierte Amidgruppe.^[52]

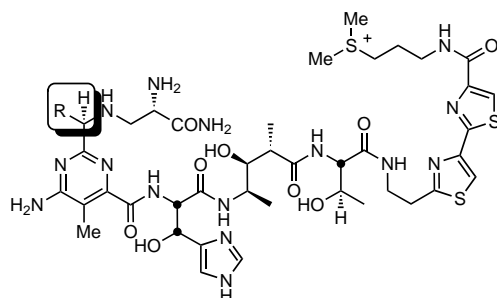
3.2.5. *epi*-Deglycobleomycin A₂ und Desacetamidodeglycobleomycin A₂^[18d,e, 102]

Die C2-Acetamido-Seitenkette ist nicht eng am Schlüsselprozeß der Metallionenchelatisierung und der anschließenden Sauerstoffaktivierung beteiligt; sie scheint dennoch ein wichtiger Bestandteil des Naturstoffs zu sein, denn die biologische Aktivität von *epi*-Bleomycin A₂^[47] ist deutlich verringert und seine DNA-Spaltungsselektivität verschieden.^[96] Untersuchungen von (+)-P-3A und verwandten Wirkstoffen ergaben auch einen deutlichen Einfluß der C2-Acetamido-Seitenkette auf die Effizienz der DNA-Spaltung.^[84b, 102] Darüber hinaus kann die β -Eliminierung des β -Aminoalaninamids, aktiviert durch die C2-Acetamido-Seitenkette, zur inhärenten Instabilität von Bleomycin A₂ beitragen. Man kann also erwarten, daß das Entfernen der C2-Acetamido-Seitenkette diesen Abbauweg blockiert und die Stabilität des Wirkstoffs erhöht.^[48, 49] Um die Rolle der C2-Acetamido-Seitenkette zu klären, wurden *epi*-Deglycobleomycin A₂ **107** und Desacetamidodeglycobleomycin A₂ **108** synthetisiert. Durch Kuppeln von **105**, bei dem die Konfiguration an dem Atom, das die Acetamido-Seitenkette trägt, epimer zu der in natürlicher Pyrimidoblamsäure ist, und **106**, dem die Seitenkette ganz fehlt, mit **26**, gefolgt von der Hydrolyse der Methylestergruppe, Verknüpfen mit Tetrapeptid S **37** und Abspalten der Schutzgruppen wurden *epi*-Deglycobleomycin A₂ **107** bzw. Desacetamidodeglycobleomycin A₂ **108** erhalten (Schema 18).

Fe^{II}·**107** und Fe^{II}·**108** erwiesen sich in ihren DNA-Spaltungseigenschaften als ununterscheidbar, und beide wiesen eine erheblich verringerte DNA-Spaltungseffizienz sowie ein geringeres Verhältnis von ds-DNA- zu ss-DNA-Spaltung im Vergleich zu Deglycobleomycin A₂ auf (Abbildung 10). Die Selektivität der DNA-Spaltung wurde durch das Entfernen oder Epimerisieren der C2-Acetamido-Seitenkette nicht beeinflusst. Da die Verbindungen **107** und **108** ein identisches



Schema 18. Synthese von Bleomycin-Analoga mit modifizierter C2-Acetamido-Seitenkette.



Verbindung	Effizienz	ds:ss	Selektivität
Bleomycin A ₂ 1	2–5	1 : 6	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
Deglycobleomycin A ₂ 41	1	1 : 12	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
107 , R = CH ₂ CONH ₂ (<i>epi</i>)	0.25	1 : 29	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
108 , R = H	0.25	1 : 29	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA

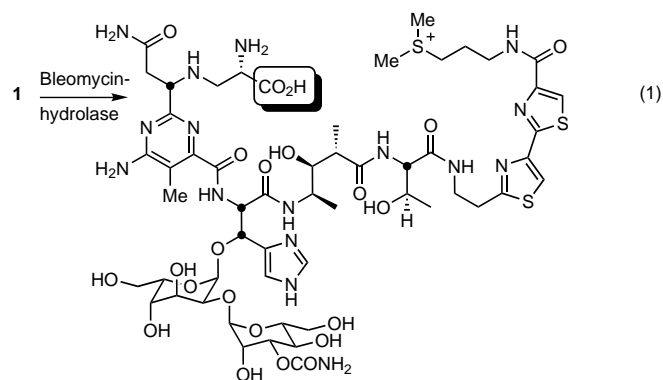
Abbildung 10. DNA-Spaltungseigenschaften von Bleomycin-Derivaten mit modifizierter C2-Acetamido-Seitenkette. Das Vorhandensein der Acetamido-Seitenkette verstärkt die DNA-Spaltungseffizienz vierfach, wie anhand der Vergleiche der Werte von **41** mit denen von **107** und **108**, der von **2** mit denen von **14** und **15** (Abbildung 7), der von **116/117** mit denen von **118/119** (Abbildung 14) sowie der von **131** mit denen von **132** (Abbildung 16) deutlich wird. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Verhalten aufweisen, kann die verringerte Spaltungseffizienz nicht auf die nicht dem Naturstoff entsprechende Konfiguration von **107** zurückgeführt werden. Die Ergebnisse deuten eher auf eine produktive Rolle der natürlichen C2-Acetamido-Seitenkette hin, die die DNA-Spaltungseffizienz erhöht und das Verhältnis von ds-DNA- zu ss-DNA-Spaltung deutlich vergrößert, ohne die Spaltungsselektivität zu beeinträchtigen. Obgleich es einige vielversprechende Erklärungen für diese Befunde gibt, sind die Tendenzen die gleichen wie bei (+)-P-3A **2**, *epi*-(-)-P-3A **14** und (-)-Desacetamido-P-3A **15** – Wirkstoffen, die DNA ohne Sequenzselektivität spalten. Demnach ist die Funktion der C2-Acetamido-Seitenkette nicht das Ergebnis einer spezifischen Wechselwirkung mit der DNA an einer bestimmten Spaltstelle. Die Befunde sprechen eher dafür, daß die Seitenkette die DNA-Spaltung begünstigt, indem sie entweder den aktivierten Metallkomplex stabili-

siert, wodurch seine katalysierte Umsetzung gesteigert wird, oder indem sie seine Zersetzung erschwert, möglicherweise durch den Schutz des aktivierten Metallkomplexes vor dem Lösungsmittel. Die Strukturuntersuchungen von Stubbe et al. am Co^{III}-OOH-Komplex von Deglycobleomycin A₂ lassen jedoch eine weitere, provokative Erklärung zu.^[52] Bei diesem Modell gibt es ein hochgeordnetes Netz von Wasserstoffbrückenbindungen, an dem die NH-, Carbonyl- und Hydroxygruppe der Threonin-Einheit sowie das metallgebundene Hydroperoxid und die Metallbindungsdomäne beteiligt sind. Sowohl die Carbonylgruppe der C2-Acetamido-Seitenkette als auch die an das Metall koordinierte β -Aminogruppe der Pyrimidoblamsäure-Seitenkette sind über H-Brücken mit der Hydroxygruppe des Threonins verbunden und tragen so zur Stabilität einer kompakten DNA-gebundenen Konformation bei. Dies könnte die Spaltungseffizienz erhöhen, entweder durch Stabilisierung des aktivierten Metallkomplexes oder durch bevorzugte Einnahme einer Konformation, die für die DNA-Spaltung günstig ist (siehe Abbildungen 13 und 19). Außerdem ist die Bildung einer H-Brücke zwischen der Carboxamid-NH₂-Gruppe der C2-Acetamido-Seitenkette und der C2-Carbonylgruppe von Cytosin möglich, das mit dem Guanin der Spaltstelle eine Basenpaarung eingeht. Im Prinzip entsteht dadurch eine dritte Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Metallbindungsdomäne und dem GC-Basenpaar an der Spaltstelle. Das Fehlen dieser H-Brücke könnte ebenfalls die verringerte Spaltungseffizienz erklären, aber nach unseren Untersuchungsergebnissen ist sie nicht unmittelbar für die Erkennung des GC-Basenpaares erforderlich (siehe Abschnitt 3.2.8).

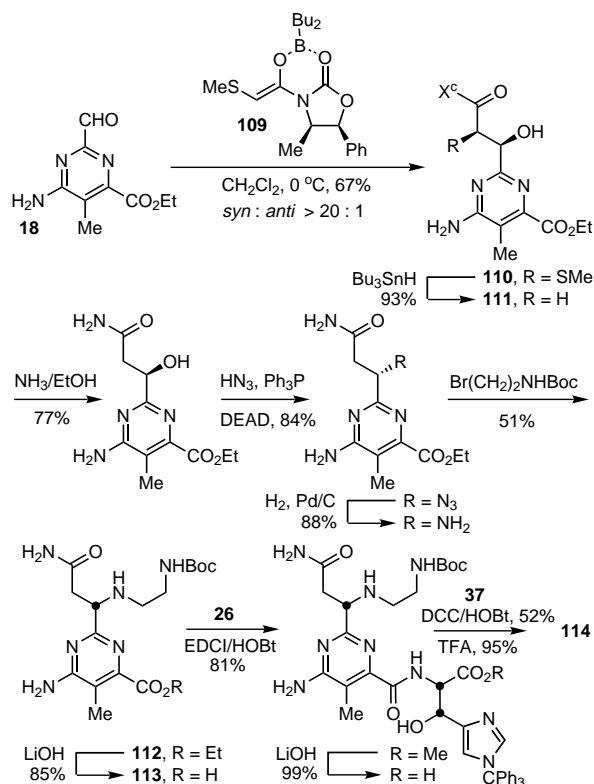
3.2.6. Decarboxamidodeglycobleomycin A₂^[18e]

Lange Zeit ging man davon aus, daß die terminale α -Carboxamidgruppe in der Pyrimidoblamsäure-Seitenkette nicht an der Metallionenchelatisierung beteiligt ist; auch bei der Sauerstoffaktivierung und für die DNA-Spaltungsreaktion spielt sie keine offensichtliche Rolle. In vivo findet allerdings eine rasche Hydrolyse statt, die von Bleomycinhydrolase katalysiert wird [Gl. (1)].^[48, 103, 104] Die Carboxylat-



gruppe der resultierenden Carbonsäure ersetzt die metallgebundene primäre Aminogruppe als fest gebundenen Liganden im inaktivierten Metallkomplex. Um festzustellen, ob der metabolisch labilen Carboxamidgruppe eine unerwartete Funktion zukommt, wurde **114** synthetisiert und untersucht.

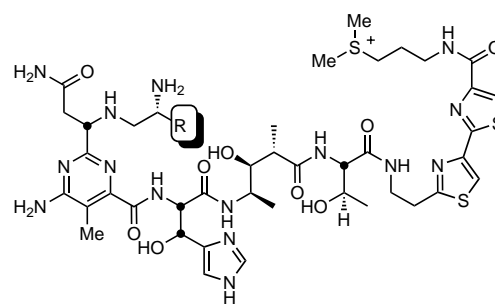
Das Pyrimidoblamsäure-Analogon **113**, dem die Carboxamidgruppe fehlt, wurde nach einer modifizierten Methode synthetisiert. Die Umsetzung von **18** mit dem Di-*n*-butylboronyl-(*Z*)-enolat **109** lieferte (2*R*,3*S*)-*syn*-**110** als einziges nachweisbares Produkt (67 %, *syn:anti* > 20:1; Schema 19). Die reduktive Entschwefelung mit Bu₃SnH (93 %), Aminolyse (77 %), Mitsunobu-Aktivierung der Alkoholfunktion und



Schema 19. Synthese von Decarboxamidodeglycobleomycin A₂ **114**. DEAD = Diethylazodicarboxylat, X^c = Oxazolidinonyl.

der Azidaustausch unter vollständiger Inversion der Konfiguration am Reaktionszentrum (84 %) verliefen in ausgezeichneten Ausbeuten. Die Umsetzungen ließen sich auch in umgekehrter Reihenfolge gut durchführen – Mitsunobu-Aktivierung und Azidsubstitution der Alkoholfunktion gefolgt von der Aminolyse des *N*-Acyloxazolidinons – lieferten aber geringere Ausbeuten (51 bzw. 40 %). Die Reduktion des Azids, Alkylierung mit *N*-Boc-2-Bromethylamin und Hydrolyse lieferten **113**. Durch Verknüpfen von **113** mit **26**, Hydrolyse der Methylesterfunktion, Kuppeln mit Tetrapeptid **37** und Abspalten der Schutzgruppen wurde **114** erhalten.

Der Vergleich von **114** mit Deglycobleomycin A₂ **41** erwies sich als interessant. Das Analogon war bei der DNA-Spaltung nur 1.6mal weniger effizient, spaltete ds-DNA nur unwesentlich schlechter als ss-DNA, und bei der Spaltungsselektivität wurden keine Unterschiede festgestellt (Abbildung 11). Diese geringen Unterschiede lassen vermuten, daß sich Analoga, denen die Carboxamidgruppe fehlt, wegen ihrer größeren Stabilität gegenüber der Inaktivierung durch Bleomycinhydrolase als stärkere, effizientere oder länger wirksame Wirkstoffe erweisen.

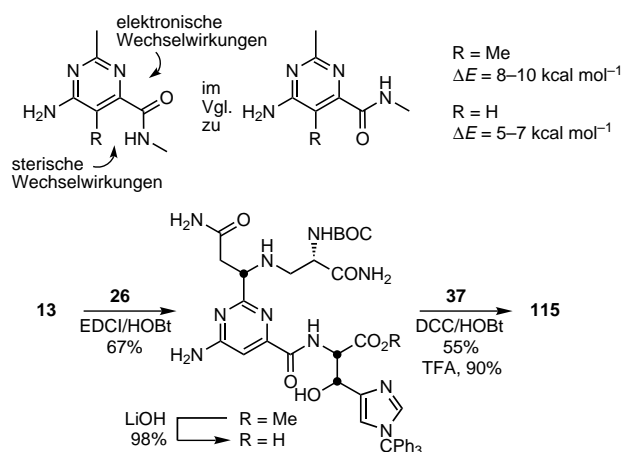


Verbindung	Effizienz	ds:ss	Selektivität
Bleomycin A ₂ 1	2 – 5	1 : 6	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
Deglycobleomycin A ₂ 41	1	1 : 12	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
114 , R = H	0.6	1 : 18	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA

Abbildung 11. DNA-Spaltungseigenschaften von Decarboxamidodeglycobleomycin A₂ **114**. Weitere Einzelheiten siehe Text.

3.2.7. C5-Demethyldeglycobleomycin A₂ ^[18e]

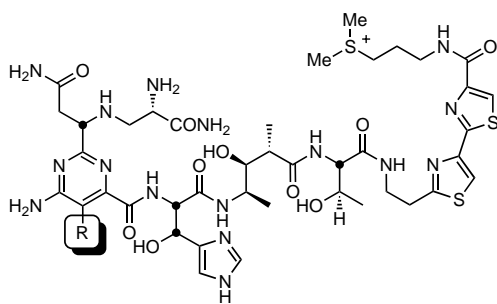
Um die Rolle des Methylsubstituenten am Pyrimidinring zu beurteilen, wurde C5-Demethyldeglycobleomycin A₂ **115** synthetisiert. Eine sterische Wechselwirkung der Methylgruppe mit der *ortho*-ständigen Carboxamidgruppe könnte eine Konformation begünstigen, die die Metallionenkoordination, Sauerstoffaktivierung und DNA-Spaltung verstärkt. Zwei inhärente Einflüsse sollten sicherstellen, daß **115** die *anti*-Konformation einnimmt: Zum einen wird die *syn*-Konformation durch die Abstoßung zwischen freien Elektronenpaaren elektronisch destabilisiert, zum anderen durch Wechselwirkungen zwischen der NHR-Gruppe und dem H-Atom sterisch destabilisiert ($\Delta E = 5.4 - 7.2 \text{ kcal mol}^{-1}$; Schema 20).



Schema 20. Synthese von C5-Demethyldeglycobleomycin A₂ **115**.

Daher ist zu erwarten, daß der Methylsubstituent an C5 unnötig ist. Das Verknüpfen von **13**, das über unsere Synthese von P-3A zugänglich ist, mit **26**, Hydrolyse der Methylesterfunktion, Kuppeln mit Tetrapeptid **37** und säurekatalysiertes Abspalten der Schutzgruppen lieferte **115**.

Der Vergleich von **115** mit **41** verlief genau wie erwartet (Abbildung 12). Die beiden Wirkstoffe wiesen dieselbe DNA-Spaltungseffizienz, nahezu das gleiche Verhältnis von ds-DNA- zu ss-DNA-Spaltung sowie die gleiche Spaltungsselektivität auf.



Verbindung	Effizienz	ds:ss	Selektivität
Bleomycin A ₂ 1	2 – 5	1 : 6	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
Deglycobleomycin A ₂ 41	1	1 : 12	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
115 , R = H	1	1 : 18	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA

Abbildung 12. DNA-Spaltungseigenschaften von C5-Demethyldeglycobleomycin A₂ **115**. Weitere Einzelheiten siehe Text.

tivität auf, was beweist, daß der Methylsubstituent an C5 tatsächlich keinen produktiven Beitrag zu den Eigenschaften von Bleomycin A₂ leistet.

3.2.8. Dimethylamino- und Desaminodeglycobleomycin A₂: Bestätigung der Basis für die sequenzselektive DNA-Spaltung^[105]

Klarheit über die Rolle der C4-Aminogruppe des Pyrimidinrings sollte die Synthese und die Untersuchung von **116** und **117** sowie von deren Epimeren **118** und **119** ermöglichen, bei denen die Aminofunktion durch eine *N,N*-Dimethylaminogruppe ersetzt bzw. ganz entfernt wurde. Neben dem Einfluß, den dies auf die Metallionenchelatisierung und die Sauerstoffaktivierung durch die Verbindungen haben könnte, ermöglicht deren Untersuchung die Bewertung einer potentiell entscheidenden Wasserstoffbrückenbindung zwischen der primären C4-Aminogruppe und dem Guanin-N3-Atom, die bei Strukturuntersuchungen von Stubbe et al. gefunden wurde.^[52] Diese Untersuchungen ergaben das Vorhandensein von zwei zuvor nicht erkannten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Pyrimidinring der Metallbindungsdomäne von Bleomycin A₂ und dem Guanin der 5'-GC/5'-GT-Spaltstellen: Das N3-Atom der Pyrimidoblamsäure ist mit dem nicht an den H-Brücken zwischen dem Basenpaar beteiligten H-Atom der C2-Aminogruppe von Guanin und eines der Wasserstoffatome ihrer C4-Aminogruppe mit dem N3-Atom von Guanin jeweils über eine H-Brücke verbunden. Insgesamt erfolgt die Erkennung also über eine dreifache Wechselwirkung in der kleinen Furche (Abbildung 13). Diese Wechselwirkung ist möglicherweise die Grundlage für die sequenzselektive Spaltung von DNA und erklärt den Befund, daß die C2-Aminogruppe von Guanin für die 5'-GC/5'-GT-Spaltung absolut erforderlich ist.^[26b, 44c, 76c, 76d, 106]

Nachdem Versuche zur Herstellung von **123** durch reduktive Methylierung oder Alkylierung von *N*⁶-Boc-Pyrimidoblamsäureethylester nicht erfolgreich verlaufen waren, wandten wir uns der Synthese von **116** aus einem geeignet substituierten Pyrimidin zu. Der Austausch des 4-Chlorsubstituenten von **120** gegen eine Dimethylaminogruppe lieferte glatt das entsprechende 4-Dimethylaminopyrimidin, die an-

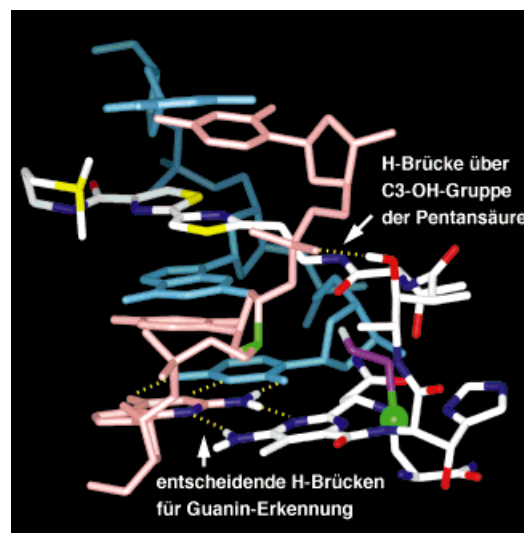
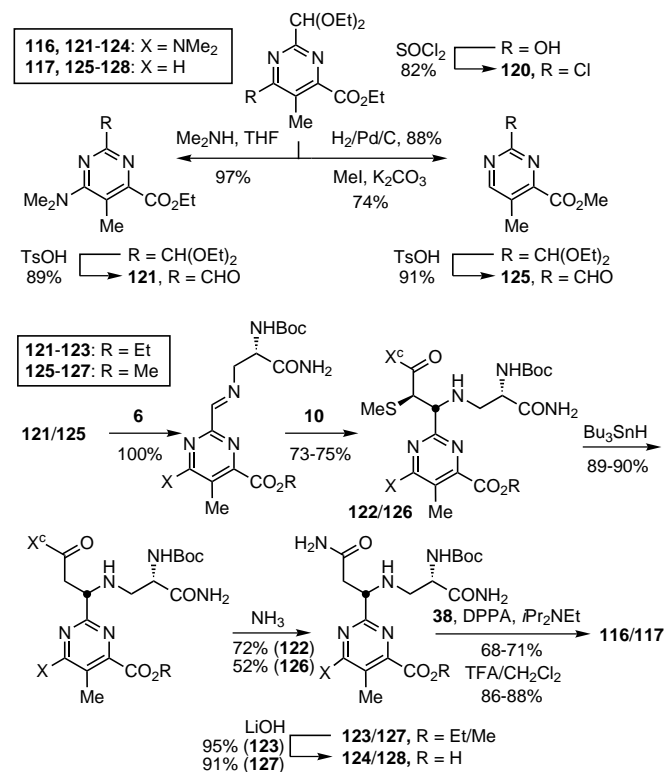


Abbildung 13. Ausschnittsvergrößerung der NMR-spektroskopisch bestimmten Komplexstruktur (siehe Abbildung 5), die die beiden H-Brücken zwischen Pyrimidoblamsäure (C4-Aminogruppe und N3-Atom) und dem Guanin der Spaltstelle zeigt. Außerdem sind die H-Brücke von der C3-OH-Gruppe der Pentansäure-Einheit zur DNA, die C4'-H-Abstraktionsstelle (grün), die Co^{III}-OOH-Einheit (grüne Kugel bzw. violettes Stabmodell) und die starre, kompakte Konformation der Linkerdomäne hervorgehoben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist die Disaccharid-Einheit nicht dargestellt.

schließende Acetalhydrolyse den Aldehyd **121** als Schlüsselintermediat zur diastereoselektiven Einführung der Seitenkette (Schema 21). Die Kondensation mit **6** und die Addition des Zinn-(Z)-enolats **10** lieferte **122** (Diastereoselektivität

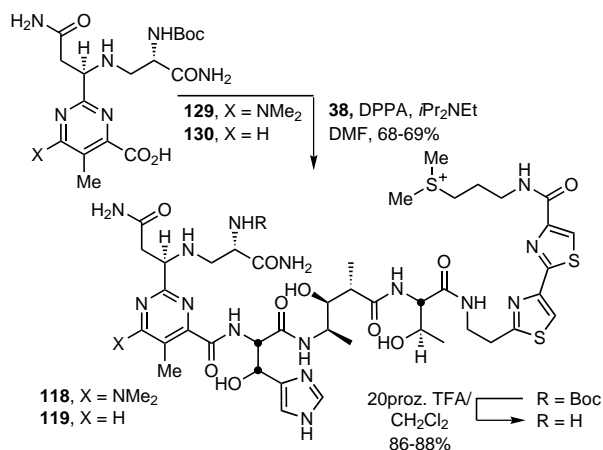


Schema 21. Synthese von Dimethylaminodeglycobleomycin A₂ **116** und Desaminodeglycobleomycin A₂ **117**. X^c = Oxazolidinonyl.

87:13). Reduktives Abspalten der Methylthiolgruppe, Aminolyse des *N*-Acyloxazolidinons und Esterhydrolyse führten zu **124**. Kuppeln von **124** mit Pentapeptid S **38** und säurekatalysiertes Abspalten der *N*-Boc-Schutzgruppe lieferten **116**.

Die Synthese von **128** und dessen Einbau in **117** folgten auf erfolglose Versuche zur reduktiven Desaminierung einer Pyrimidoblamsäure-Vorstufe (Schema 21). Unter den Bedingungen der reduktiven Dechlorierung von **120** wurde die Ethylestergruppe hydrolysiert; nach erneuter Veresterung und Acetalhydrolyse entstand die wichtige Aldehydzwischenstufe **125**. Deren Kondensation mit **6** und Addition des Zinn-(*Z*)-enolats **10** lieferten **126** (Diastereoselektivität 89:11). Nach reduktiver Entschwefelung, Aminolyse und Esterhydrolyse wurde **128** erhalten, das nach dem Kuppeln mit Pentapeptid S **38** und säurekatalysiertem Abspalten der Schutzgruppen **117** lieferte.

Die Nebendiastereomere aus den Imin-Additionen, deren Konfiguration an der C2-Acetamido-Seitenkette nicht der des Naturstoffs entsprechen, wurden in die Verbindungen **129** und **130** überführt und in die epimeren Analoga **118** und **119** eingebaut (Schema 22).



Schema 22. Synthese der epimeren Analoga **118** und **119**.

Im Rahmen früherer Bemühungen, die Eigenschaften der Wirkstoffe zu charakterisieren, wurde untersucht, in welchem Ausmaß ihre Fe^{III}-Komplexe die Oxidation von Styrol vermitteln können.^[72b, 107] Obwohl die C4-Aminogruppe des Pyrimidinrings von Bleomycin A₂ nicht direkt an der Metallionenchelatisierung beteiligt ist, wurde ein elektronischer Einfluß der C4-Substituenten auf die O₂-Aktivierungseigenschaften nachgewiesen.^[6, 68h, 73] Die Produktverteilung war für die Analoga **116** und **117** sowie ihre Epimere und für Deglycobleomycin A₂ identisch, was beweist, daß alle reaktive Eisen-Oxo-Intermediate bilden (Tabelle 2). Bezüglich der relativen Effizienz waren die beiden Dimethylaminanaloga **116** und **118** von **41** selbst kaum zu unterscheiden, während die Werte der Desaminoanaloga **117** und **118** etwas kleiner waren. Wie erwartet verstärkt ein elektronenliefernder Substituent am C4-Atom des Pyrimidinrings die O₂-Aktivierungseigenschaften der Metallkomplexe. Alle erwiesen sich jedoch als effektiv, wobei jeder Fe^{III}-Komplex 4–6 Oxidationen vermittelte.

Tabelle 2. Oxidation von Styrol durch Fe^{III}-Komplexe von Bleomycin-A₂-Analoga.^[a]

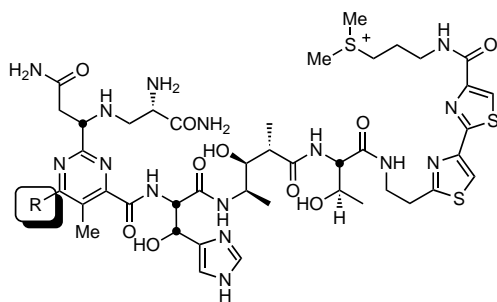
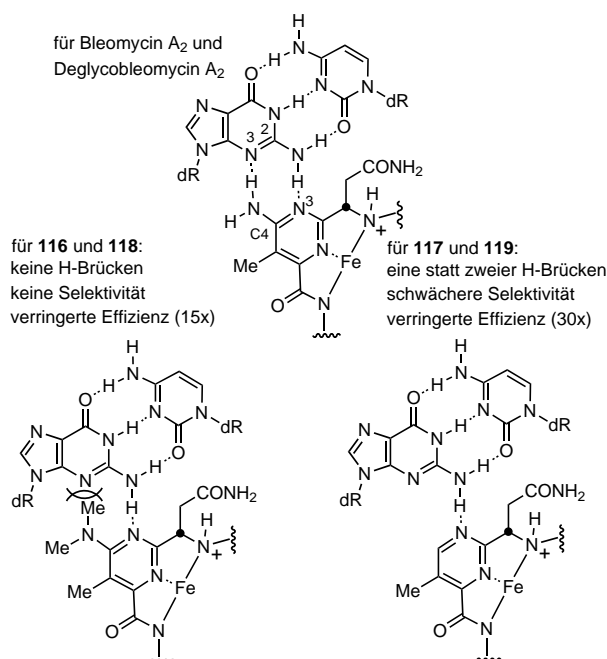
Verb.	c(Styrol-oxid) [mM]	c(Phenylacet-aldehyd) [mM]	Verhältnis	c(alle Produkte) [mM]	relative Effizienz
Fe ^{III} · 41	1.80	1.32	1.36	3.12	1.0
Fe ^{III} · 116	1.67	1.21	1.38	2.88	0.92
Fe ^{III} · 117	1.11	0.88	1.26	1.99	0.64
Fe ^{III} · 118	1.55	1.00	1.55	2.55	0.82
Fe ^{III} · 119	1.07	0.79	1.35	1.86	0.59
Fe ^{III} [b]	0	0	–	0	0
Fe ^{III} · 41 [c]	0	0	–	0	0

[a] Reaktionsbedingungen: 500 µM Fe^{III}-Komplex, 50 mM Styrol, 30 mM H₂O₂, 0 °C, 1.5 h, 80proz. CH₃OH in H₂O. [b] 500 µM Fe^{III} unter den gleichen Bedingungen wie bei [a] und in Anwesenheit von H₂O₂. [c] Wie bei [a], aber ohne H₂O₂.

Die DNA-Spaltungseigenschaften der Verbindungen waren besonders aussagekräftig. Das Analogon **116** und sein Epimer **118**, die beide einen Dimethylamino-Substituenten tragen, weisen eine erheblich verringerte DNA-Spaltungseffizienz (10–15 ×), ein vermindertes Verhältnis von ds-DNA- zu ss-DNA-Spaltung sowie einen vollständigen Verlust der Spaltungsselektivität auf (Abbildung 14). Diese Befunde belegen, daß die Einführung der Dimethylaminogruppe an C4 nicht nur die Bildung einer H-Brücke zwischen der C4-Aminogruppe und dem Guanin-N3-Atom ausschließt, sondern auch die Bildung der H-Brücke zwischen der C2-Aminogruppe des Guanins und dem Pyrimidin-N3-Atom aus sterischen Gründen verhindert; dadurch wird sowohl die Spaltungseffizienz als auch die Spaltungsselektivität der Verbindung aufgehoben.

Die DNA-Spaltungseffizienz der Analoga **117** und **119** ist sogar noch kleiner (30 ×), und ihre Sequenzselektivität ist verändert oder auch gar nicht vorhanden. Selbst in den Fällen, wo die Selektivität nicht erheblich verändert war, erforderte ihr Nachweis Versuchstemperaturen von 4 °C gegenüber sonst 25–37 °C. Des weiteren war praktisch keine Spaltung an den 5'-AT-Stellen nachzuweisen. Dies läßt auf eine schwächere Wechselwirkung bei der Bindung schließen und ist im Einklang mit einer Beteiligung der C4-Aminogruppe des Pyrimidinrings an der Bildung von einer oder zwei entscheidenden Wasserstoffbrückenbindungen, die für den Triplex-ähnlichen Erkennungsprozeß in der kleinen Furche der DNA erforderlich sind.

Beide Befunde sprechen für eine Beteiligung der C4-Aminogruppe an einer von zwei Wasserstoffbrücken der Triplex-ähnlichen Erkennung des Guanins an der Spaltstelle und liefern einen direkten Hinweis auf ihre ausschlaggebende Rolle bei der Polynucleotiderkennung. Darüber hinaus geben diese Ergebnisse weitere Hinweise auf die inhärente DNA-Spaltungsselektivität von Bleomycin A₂ selbst. Bleomycin A₂ spaltet nicht nur alle 5'-GT- und 5'-GC-Stellen von DNA, sondern auch 5'-AT- und 5'-AC-Stellen, wenn auch weniger effektiv (25–40 % gegenüber 100 %) und mit geringerer Wirksamkeit (Abbildung 15). Die Spaltungen an den statistisch selteneren Stellen, die in Abbildung 15 aufgeführt sind, könnten aus einer Spaltung von ds-DNA resultieren, die ihren Ursprung an primären Stellen des komplementären Strangs hat. Die allgemeine Bevorzugung von 5'-GPy gegenüber 5'-APy-Stellen (Py = Pyrimidinbase) spricht dagegen eher für



Verbindung	Effizienz	ds:ss	Selektivität
Bleomycin A ₂ 1	2–5	1 : 6	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
Deglycobleomycin A ₂ 41	1	1 : 12	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
116 , R = NMe ₂	0.08	1 : 53	keine
117 , R = H	0.06	1 : 45	schwach 5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
118 , R = NMe ₂ (epi)	0.04	1 : 61	keine
119 , R = H (epi)	0.03	1 : 48	schwach 5'-GC, 5'-GT > 5'-GA

Abbildung 14. DNA-Spaltungseigenschaften von Bleomycin-A₂-Analoga mit modifizierter Pyrimidin-C4-Aminogruppe. Die Ergebnisse zeigen, daß diese Gruppe für die Selektivität der DNA-Spaltung von entscheidender Bedeutung ist.

eine entsprechend verringerte Bindungsaffinität zu den 5'-APy-Stellen, weil nur eine statt zweier H-Brücken zum Adenin gebildet werden (Abbildung 15). Die Eigenschaften von **117** mögen zwar vor dem Hintergrund des Drei-H-Brücken-Modells unerwartet sein, sie liefern jedoch Hinweise auf den Ursprung der inhärenten Bevorzugung der Spaltung an 5'-GPy- gegenüber 5'-APy-Stellen durch Bleomycin A₂. Diese Ergebnisse ergänzen Untersuchungen, bei denen die Arbeitsgruppe von Waring zeigte, daß die Spaltung durch den Austausch von Guanin gegen Inosin zwar verringert, aber nicht verhindert wird, und daß die Spaltung an 5'-APy-Stellen stark zunimmt, wenn Adenin durch 2-Amino-Adenin ersetzt wird.^[76] Beide Modifikationen bestätigen auch den Ursprung der H-Brücken-Spezifität.

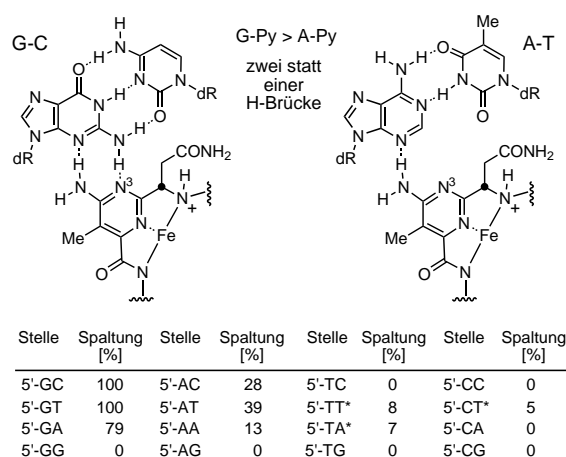


Abbildung 15. Weitere Befunde zur DNA-Spaltungsselektivität von Bleomycin A₂. Angegeben ist die Häufigkeit der Spaltung an Dinucleotid-Erkennungsstellen. Die mit einem Stern markierten Erkennungsstellen sind sekundäre ds-DNA-Spaltstellen (weitere Einzelheiten siehe Text).

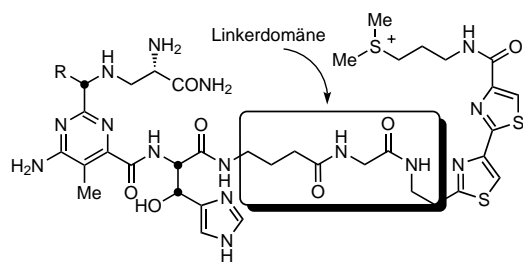
3.3. Die Linkerdomäne

Zu Beginn unserer Arbeiten war die Rolle der Linkerre-gion, die die C-terminale Bithiazol-Einheit mit der N-terminalen Pyrimidoblastamsäure-Einheit verbindet, nur unzureichend verstanden. Untersuchungen von einer Reihe ausgewählter Bleomycin-A₂-Analoga, die die Arbeitsgruppen von Umezawa und Ohno im Rahmen ihrer Forschungen durchführten, wiesen erstmals darauf hin, wie wichtig das Vorhandensein und die absolute Konfiguration der C4-Methylgruppe^[6, 73] für die DNA-Spaltungseffizienz sind. Hecht und Mitarbeitern gelang der Nachweis, daß die L-Threonin-Einheit und ihre Rückgratsubstituenten für die Spaltungsselektivität ohne Bedeutung sind, obwohl sie die Spaltungseffizienz zu beeinflussen scheinen.^[24d, 42b] Gleichzeitig mit unserer Synthese von Deglycobleomycin A₂ wurden die Verbindungen **131** und **132** hergestellt, denen alle Substituenten der Linkerdomäne fehlen.^[18e, 108] Ihre Untersuchung ergab, daß die Substituenten weder die Affinität der Bindung an Kälberthymus-DNA ($K_B = 2.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ gegenüber $1 - 1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ für **1** und **41**) noch die Spaltungsselektivität nachteilig beeinflussen, allerdings werden die Spaltungseffizienz (ca. $10 - 100 \times$) und das Verhältnis von ds-DNA- zu ss-DNA-Spaltung erheblich verringert (Abbildung 16).^[18e] Diese Befunde sind im Einklang mit unserem Vorschlag, daß die Substituenten der verbindenden Kette die Einnahme einer kompakten Konformation bei der DNA-Bindung erleichtern, die mindestens einen Knick enthält (an der Verbindungsstelle zu Tripeptid S/Tetrapeptid S). Um die Beiträge einzelner Substituenten der Linkerdomäne bewerten und die Effekte genau definieren zu können, wurde eine umfangreiche Serie von Verbindungen mit Analoga der Linkerdomäne untersucht.

3.3.1. Die Valeriansäure-Einheit

3.3.1.1. Einfluß der Linkerlänge^[109]

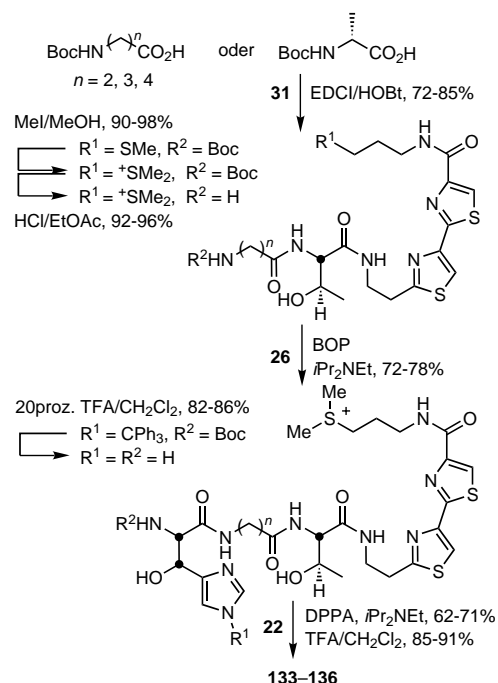
Die Analoga **133–136**, die Linker mit 2–5 Kohlenstoffatomen anstelle der Valeriansäure-Einheit enthalten, wurden



Verbindung	Effizienz	ds:ss	Selektivität
Bleomycin A ₂ 1	2 – 5	1 : 6	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
Deglycobleomycin A ₂ 41	1	1 : 12	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
131 , R = CH ₂ CONH ₂	0.1	1 : 33	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
132 , R = H	0.03	1 : 35	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA

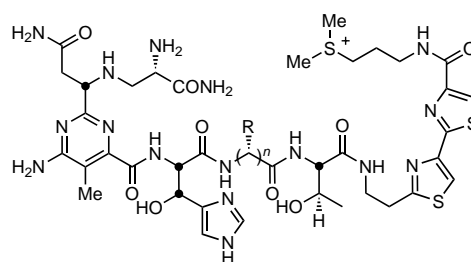
Abbildung 16. Kumulativer Effekt der Substituenten in der Linkerdomäne. Diese tragen zur Effizienz der DNA-Spaltung bei.

wie in Schema 23 gezeigt synthetisiert. Ihre Untersuchung ermöglichte es, festzustellen, welchen Einfluß die Länge der Valeriansäure-Einheit ausübt.



Schema 23. Synthese von Bleomycin-A₂-Analoga mit variabler Linkerlänge.

Bei DNA-Spaltungsexperimenten wurden mit dem Analogon mit der Linkerlänge, die der des natürlichen Valeriansäurelinkers entsprach, die besten Ergebnisse erhalten; insgesamt ergab sich folgende Abfolge: C4 > C5, C3 > C2 (Abbildung 17). Das spricht dafür, daß die Verbindungen eine wohldefinierte Konformation bei der DNA-Bindung einnehmen. Für Verbindungen mit einer Valeriansäuresubstitution von weniger als vier Kohlenstoffatomen ist es zunehmend schwieriger, Konformationen einzunehmen, die die Linkerregion umspannen. Im Unterschied dazu haben solche mit mehr als vier Kohlenstoffatomen eine größere Flexibilität, und die Einnahme einer produktiven Konformation, die für eine selektive Spaltung notwendig ist, wird erschwert.

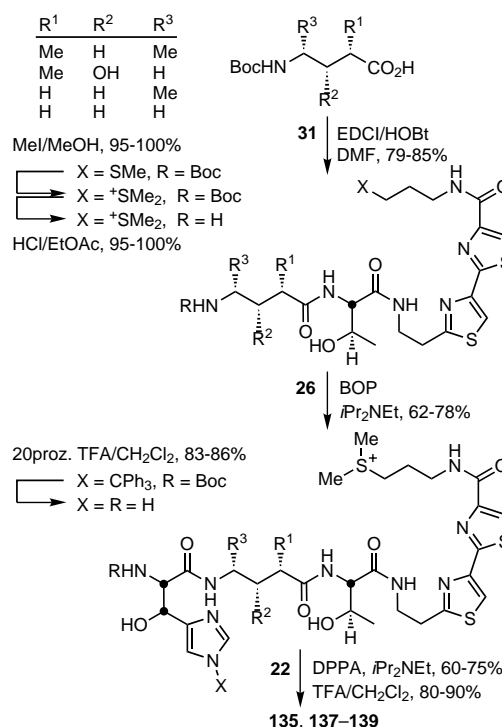


Verbindung	Effizienz	ds:ss	Selektivität
Bleomycin A ₂ 1	2 – 5	1 : 6	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
Deglycobleomycin A ₂ 41	1	1 : 12	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
133 , n = 1, R = Me	0.07	-	nicht bestimmt
134 , n = 2, R = H	0.08	1 : 43	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
135 , n = 3, R = H	0.13	1 : 31	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
136 , n = 4, R = H	0.08	1 : 38	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA

Abbildung 17. DNA-Spaltungseigenschaften von Bleomycin-A₂-Analoga mit veränderter Länge der Valeriansäure-Einheit. Weitere Einzelheiten siehe Text.

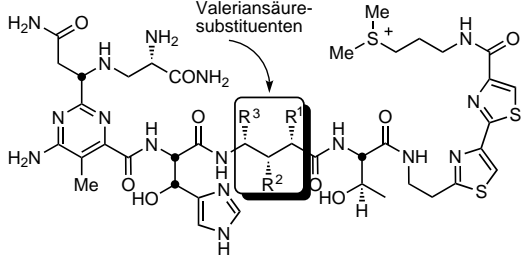
3.3.1.2. Substituenteneffekte^[109]

Die Untersuchung von **137** – **139** sowie **135** ermöglichte eine eindeutige Bestimmung der Substituenteneffekte. So ließen sich anhand der Eigenschaften von **137** Aussagen über die Rolle der C3-Hydroxygruppe der Valeriansäure treffen. Die Untersuchung von **138** – **139** sollte die Rolle der Methylsubstituenten an C2 und C4 klären, die sich bei unseren früheren Untersuchungen als wichtig erwiesen hatten.^[109] Die Analoga wurden durch das Kuppeln der Pentapeptid-S-Analoga, die die modifizierten Valeriansäure-Einheiten enthielten, und N^α-Boc-Pyrimidoblamsäure hergestellt (Schema 24).

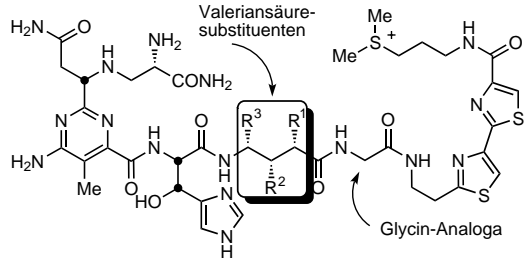


Schema 24. Synthese von Bleomycin-A₂-Analoga, die unterschiedliche Substituenten in der Valeriansäure-Einheit enthalten.

Die DNA-Spaltungseigenschaften der Valeriansäuresubstituenten-Analoga sind in Abbildung 18 zusammengefaßt. Das Analogon **137** war bei der DNA-Spaltung nur geringfügig weniger effektiv ($0.8 \times$) als Deglycobleomycin A_2 , während



Verbindung	Effizienz	ds:ss	Selektivität
Bleomycin A_2 1	2 – 5	1 : 6	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
Deglycobleomycin A_2 41	1	1 : 12	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
137 , Me H Me	0.8	1 : 14	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
138 , Me OH H	0.4	1 : 15	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
139 , H H Me	0.2	1 : 25	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
135 , H H H	0.13	1 : 31	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA



Verbindung	Effizienz	ds:ss	Selektivität
144 , Me OH Me	0.2	1 : 29	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
140 , Me OH H	0.15	1 : 30	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
131 , H H H	0.1	1 : 33	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA

Abbildung 18. DNA-Spaltungseigenschaften von Bleomycin- A_2 -Analoga mit modifizierter Valeriansäure-Einheit. Die Valeriansäuresubstituenten tragen zur Effizienz der DNA-Spaltung bei. Weitere Einzelheiten siehe Text.

138 deutlich weniger wirksam war ($0.4 \times$). Dementsprechend hat das Entfernen der Methylgruppe an C4 einen deutlicheren Einfluß als das der Hydroxygruppe an C3 (R^2 in Abbildung 18). Das Entfernen der C2-Methylgruppe sowie der C3-Hydroxygruppe von **139** führte zu einer noch größeren, fünffachen Verringerung, was beweist, daß die Methylgruppe an C4 allein nicht für die durch die Substituenten hervorgerufene Spaltungseffizienz ausschlaggebend sein kann. Wird auch noch der C4-Methylsubstituent entfernt (\rightarrow **135**), so nimmt die Spaltungseffizienz noch stärker ab ($0.13 \times$). Analoge Vergleiche wurden zwischen einer Gruppe von Glycin-Analoga und den entsprechenden Threoninverbindungen angestellt; dabei wurden – neben dem bedeutenden Einfluß der Threoninseitenkette, der im folgenden Abschnitt beschrieben wird – die gleichen Tendenzen für die Valeriansäuresubstituenten beobachtet (Abbildung 18).

Die kumulativen Substituenteneffekte sind erheblich und spielen eine unerwartete Rolle bei der Präorganisation von Bleomycin A_2 zur Einnahme einer starren, kompakten Konformation, die für die DNA-Spaltung günstig ist. Die Valeriansäure-Einheit von freiem und von DNA-gebundenem Co^{III} -OOH-Bleomycin- A_2 und -Deglycobleomycin- A_2 nimmt die gleiche wohldefinierte und starre Konformation ein (Abbildung 19). Wichtige Charakteristika dieser Konformation sind zwei Knicke, einer am C2-Zentrum und einer am C4-Zentrum. Einen NMR-spektroskopischen Hinweis auf diese Konformation liefern die kleine Kopplungskonstante für C2-H/C3-H ($J = 1.8 \pm 1.2$ Hz) und die große Kopplungskonstante für C3-H/C4-H ($J = 9.5 \pm 1.2$ Hz).^[52]

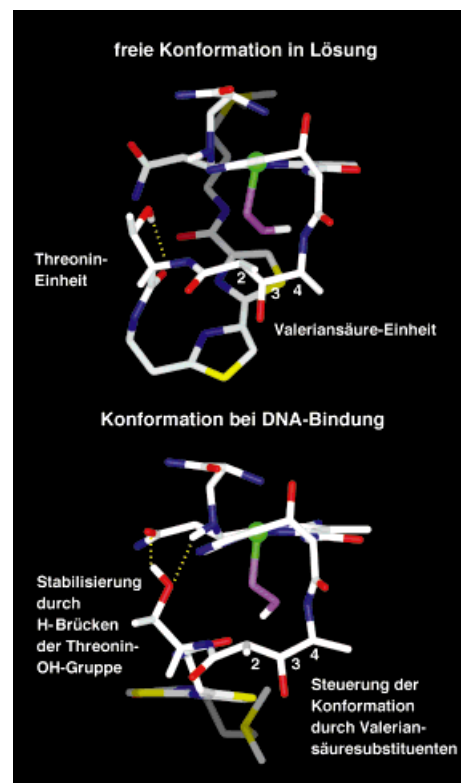
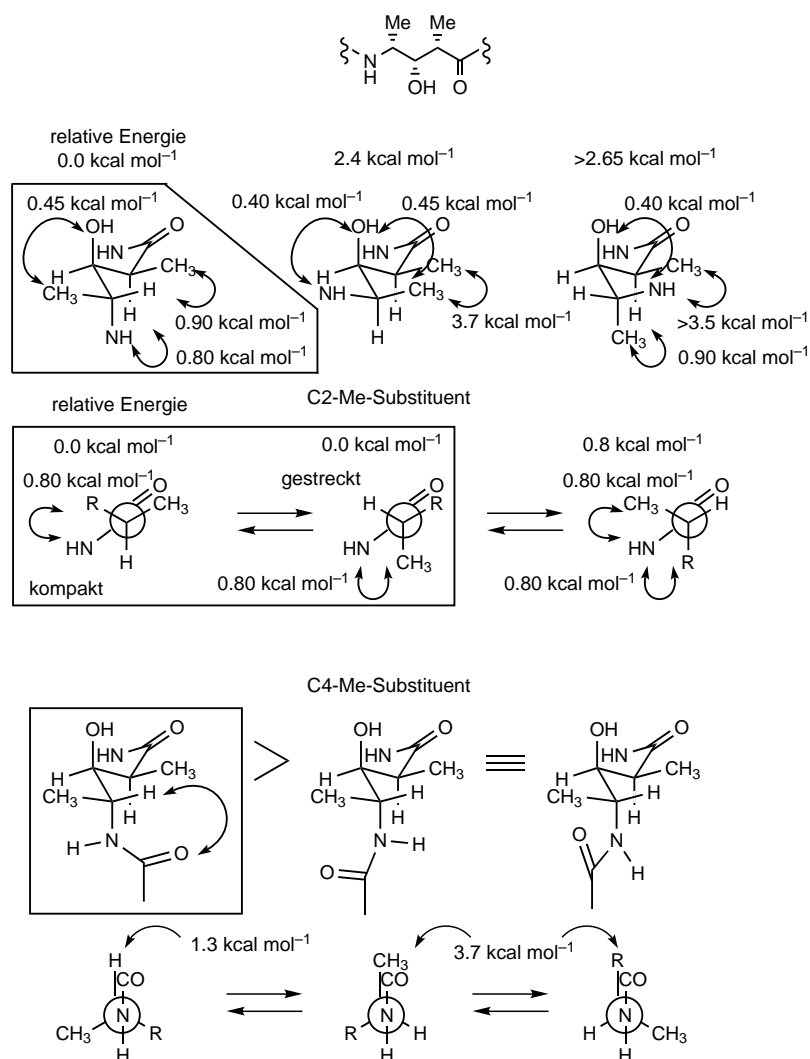


Abbildung 19. NMR-spektroskopisch bestimmte Strukturmodelle der Linkerdomäne für freies und DNA-gebundenes Co^{III} -OOH-Bleomycin- A_2 .^[52]

Die Valeriansäure-Einheit kann zwei Konformationen einnehmen, die sich an C2 unterscheiden (Abbildung 20). Die Konformation, bei der die Carbonyl- und die C2-Methylgruppe ekliptisch angeordnet sind, ist begünstigt, vermutlich durch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der NH-Gruppe der Valeriansäure und dem metallgebundenen Hydroperoxid (1.8 \AA , 155° bzw. 1.9 \AA , 152°). Bei den DNA-gebundenen Verbindungen wird dieser Effekt durch eine H-Brücke von der C3-Hydroxygruppe zum DNA-Phosphatrückgrat zusätzlich verstärkt (siehe Abbildung 13).^[52] Alternative Konformationen durch Drehung um Bindungen am C3- (≥ 2.65 – $3.35 \text{ kcal mol}^{-1}$) oder C4-Zentrum (> 2.4 – $2.65 \text{ kcal mol}^{-1}$) sind weit weniger stabil und tragen nicht zur DNA-Bindung bei. Der C4-Methylsubstituent muß sich in Gegenwart der C2-Methylgruppe am weitesten von dieser



entfernen, wodurch ein zweiter Knick in der Valeriansäure-Einheit an der Amidbindung induziert wird, über die die Histidin-Einheit angeknüpft ist (≥ 2.4 – 2.65 kcal mol⁻¹). Ebenso wichtig wie diese Orientierung der Amidgruppe ist, daß die Konformation ihrer Carbonylgruppe, bei der diese in ekliptischer Stellung zum H-Atom steht, um ca. 2.4 kcal mol⁻¹ bevorzugt ist. Dies sorgt für eine definierte Orientierung der Histidin-Einheit und der gesamten Metallbindungsdomäne. Insgesamt führt das zu einem starren Grundgerüst, an das die DNA-Bindungsdomäne und die Metallionenchelatisierungsdomäne geknüpft sind.

Die C3-Hydroxygruppe ist an einer Wasserstoffbrückenbindung zu einer Phosphatgruppe des DNA-Rückgrats beteiligt, die die Intercalationsstelle überspannt, was zur Affinität und Ausrichtung des DNA-gebundenen Wirkstoffmoleküls beitragen könnte. Ihr Entfernen hat nur wenig Einfluß auf die Konformation des C3-Zentrums ($\Delta E_{\text{alternativ}} = 2.25$ – 2.45 kcal mol⁻¹) oder des C4-Zentrums ($\Delta E_{\text{alternativ}} = 2.0$ – 2.7 kcal mol⁻¹); die mäßige Abnahme der Spaltungseffizienz bei **137** ($0.8 \times$) könnte auf das Fehlen der intermolekularen H-Brücke zu einem nichtverbrückenden Sauerstoffatom des Phosphatrückgrats zurückzuführen sein. Mit Ausnahme dieses Effektes korrelieren die übrigen Ergebnisse bemerkens-

wert gut mit der Fähigkeit der Verbindungen, die kompakte Konformation einzunehmen, die bei den Strukturuntersuchungen von Stubbe et al. ermittelt wurde (Tabelle 3). Der kumulative Effekt ist erheblich und läßt vermuten, daß eine wichtige Funktion der Valeriansäuresubstituenten darin besteht, Bleomycin A₂ in eine starre, kompakte, für die DNA-Spaltung günstige Konformation zu bringen.

3.3.2. Die Threonin-Einheit

3.3.2.1. Substituenteneffekte^[109, 110]

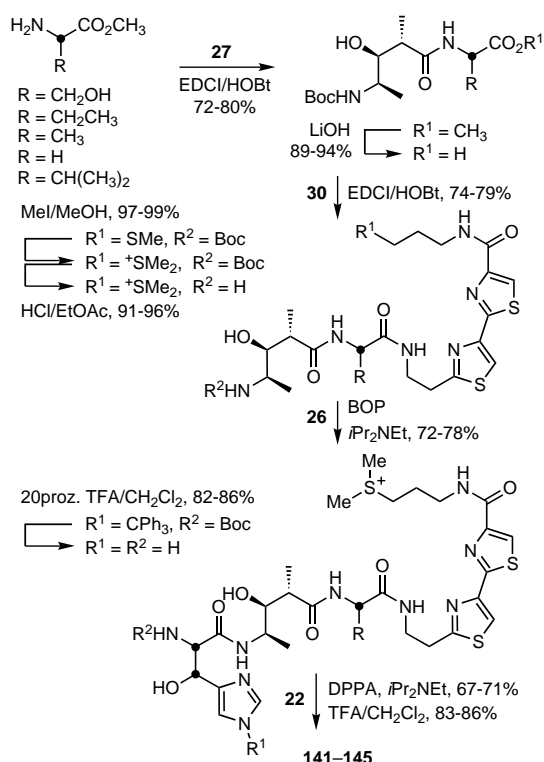
Im Rahmen unserer Bemühungen, die Rolle der Linkerdomäne zu verstehen, und im Anschluß an frühere Untersuchungen, nach denen die L-Threoninseitenkette erheblich zur Spaltungseffizienz beiträgt, wurde eine vollständige Reihe von Seitenkettenanaloga (**141**–**145**) untersucht, um die subtilen Beiträge dieses Molekülteils systematisch aufzuklären. Zum Teil sind dafür vermutlich Konformationseffekte ausschlaggebend, die durch die Seitenkette ausgeübt werden und einen Knick an der Verknüpfungsstelle zwischen Threonin- und Valeriansäure-Einheit induzieren und so die Einnahme einer kompakten Konformation erleichtern. Im Unterschied zum freien Komplex nimmt der DNA-gebundene Bleomycin-Co^{III}-OOH-Komplex eine Konformation ein, die eine H-Brücke zwischen der Threonin-Carbonylgruppe und dem terminalen Sauerstoffatom des Hydroperoxidliganden im von Stubbe et al. aufgestellten Strukturmodell ermöglicht, was zusätzliche Funktionen der L-Threonin-Einheit vermuten

Tabelle 3. Effekte der Valeriansäuresubstituenten.

Verb.	R ¹	R ²	R ³	$\Delta E_{\text{rel.}}$ [kcal mol ⁻¹] ^[a]	Z ^[b]
41	Me	OH	Me	0.0	1.0
137	Me	H	Me	0.0 ^[c]	0.8 ^[c]
138	Me	OH	H	0.4 ^[d]	0.4 ^[d]
139	H	H	Me	0.8	0.2
135	H	H	H	1.6	0.13

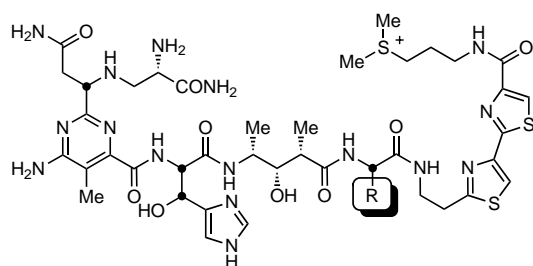
[a] $\Delta E_{\text{rel.}} = E(\text{Konformation geringer Energie}) - E(\text{DNA-gebundene Konformation von Co}^{\text{III}}\text{-OOH-BLM-A}_2\text{})$. [b] Z ist die relative DNA-Spaltungseffizienz. [c] Kann keine intermolekulare H-Brücke zwischen C3-OH und DNA-Phosphatgruppe bilden (siehe Text). [d] Kann statt einer zwei äquivalente Konformationen der Amidgruppe der L-Histidin-Einheit einnehmen, bei denen das H-Atom in einer ekliptischen Position ist, was zusätzlich zu einer Verringerung der Spaltungseffizienz beiträgt (siehe Text).

läßt. In ähnlicher Weise leistet die Einbindung der Hydroxygruppe des Threonins in ein Netz von Wasserstoffbrückenbindungen mit der Metallbindungsdomäne einen weiteren Beitrag zur Stabilisierung der kompakten Konformation. Zur Herstellung von **141**–**145** wurden fünf Pentapeptid-S-Analoga mit veränderten Seitenketten synthetisiert und abschließend mit N^α-Boc-Pyrimidoblamsäure gekuppelt (Schema 25).



Schema 25. Herstellung von Bleomycin-A₂-Analoga mit modifizierter Threonin-Einheit.

DNA-Spaltungsexperimente ergaben, daß Variationen der Substituenten in der L-Threonin-Einheit keinen Einfluß auf die Spaltungsselektivität ausüben, aber starke Auswirkungen auf die Spaltungseffizienz zeigen (Abbildung 21). Dies paßt zu unseren früheren Befunden, nach denen der Austausch von Threonin gegen Glycin einen sowohl erheblichen als auch allgemeinen Effekt bewirkt (siehe Abbildungen 16 und 18). Darüber hinaus wurde gezeigt, daß das Glycin-Analogon **144** Styrol nahezu genauso effektiv oxidiert wie Deglycobleomycin-



Verbindung	Effizienz	ds:ss	Selektivität
Bleomycin A ₂ 1	2–5	1 : 6	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
Deglycobleomycin A ₂ 41	1	1 : 12	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
141 , R = CH ₂ OH	1	1 : 17	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
142 , R = CH ₂ CH ₃	0.5	1 : 21	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
143 , R = CH ₃	0.4	1 : 24	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
144 , R = H	0.2	1 : 31	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
145 , R = CH(CH ₃) ₂	0.17	1 : 25	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA

Abbildung 21. DNA-Spaltungseigenschaften von Bleomycin-A₂-Analoga mit modifizierter Threonin-Einheit. Weitere Einzelheiten siehe Text.

cin A₂ (0.5 ×); die Anfangsgeschwindigkeiten sind nicht unterscheidbar, die Umsatzzahlen bei der katalytischen Reaktion des Analogons sind allerdings um den Faktor Zwei geringer.

Die Untersuchungen wiesen eine deutliche Verstärkungswirkung der L-Threonin-Hydroxygruppe nach, zeigten, wie wichtig die Anwesenheit eines Substituenten an der L-Threonin-Einheit ist (R ≠ H) und legten die Vermutung nahe, daß der Effekt ungewöhnlich stark von der Größe des Substituenten abhängt (R = CH₃ ≅ Et > iPr). Eine bemerkenswert gute Korrelation wurde zum einen zwischen den Spaltungseffizienzen und den berechneten Boltzmann-Wahrscheinlichkeiten^[111] beobachtet, mit denen die L-Threonin-Einheit die lokale Konformation einnimmt, die bei freiem Co^{III}-OOH-Bleomycin-A₂ gefunden wird; zum anderen zwischen den Spaltungseffizienzen und – mit Ausnahme von Valin – der Gesamtverteilung innerhalb der freien und der DNA-gebundenen Konformationen von Co^{III}-OOH-Bleomycin-A₂ (Tabelle 4). Demnach erleichtert die L-Threoninseitenkette die Präorganisation von Bleomycin A₂ zur Einnahme

Tabelle 4. Effekte der Substitution der Threonin-Einheit.

Verbindung	Z ^[a]	P _B ^[b] (Ψ = 20 bis 130°)	P _B ^[b] (Ψ = 130 bis 140°)	P _B ^[b] (insgesamt)
Thr, R = CH(OH)CH ₃	1.0	0.798	0.153	0.951
Ser, R = CH ₂ OH	0.9–1.0	0.776	0.087	0.863
Abu, R = Et	0.50	0.605	0.191	0.796
Ala, R = CH ₃	0.45	0.589	0.138	0.727
Gly, R = H	0.20	0.425	0.049	0.474
Val, R = iPr	0.17	0.390	0.335	0.725

[a] Z ist die relative DNA-Spaltungseffizienz. [b] P_B = Boltzmann-Wahrscheinlichkeit für die Einnahme des Peptidbindungswinkels Ψ (die Werte wurden aus Lit. [111] entnommen und gelten für AcN-X-NHMe). Vergleichswerte: freies Co^{III}-OOH-Bleomycin-A₂: Φ = –121.5°, Ψ = 120.4°; DNA-gebundenes Co^{III}-OOH-Bleomycin-A₂: Φ = –145.5°, Ψ = 173.9°.

einer kompakten Konformation, die für die DNA-Spaltung günstig ist (siehe Abbildung 19). Die andere wichtige Rolle der Hydroxygruppe kann entweder intramolekulare H-Brücken zur Threonin-Carbonylgruppe zugeschrieben werden oder – provokativer – zur Carbonylgruppe der distalen C2-Acetamido-Seitenkette der Pyrimidoblamsäure-Einheit, wodurch eine vorgebildete, für die DNA-Spaltung günstige Konformation von aktiviertem Bleomycin stabilisiert wird (siehe Abbildung 19). Dies erklärt auch – teilweise – die verstärkende Wirkung der Acetamido-Seitenkette (ca. 4 ×, siehe Abbildung 10). Wir können jedoch die Bildung einer intermolekularen H-Brücke mit der DNA selbst nicht ausschließen, obwohl Strukturmodelle bis jetzt keinen Hinweis auf eine solche Wechselwirkung geliefert haben.

Die Wirkung eines Substituenten läßt sich einfacher mit seiner wichtigen Rolle erklären, die Zahl der Konformationen zu begrenzen, die das Wirkstoffmolekül einnehmen kann (Abbildung 22). In Anwesenheit eines Substituenten (R ≠ H) induziert ein dominanter Effekt, der der Amidgruppe zwischen der Valeriansäure- und der Threonin-Einheit nur eine einzige Orientierung ermöglicht (Φ = –120°), einen Knick in der Linkerdomäne. Nach Entfernen dieses Substituenten

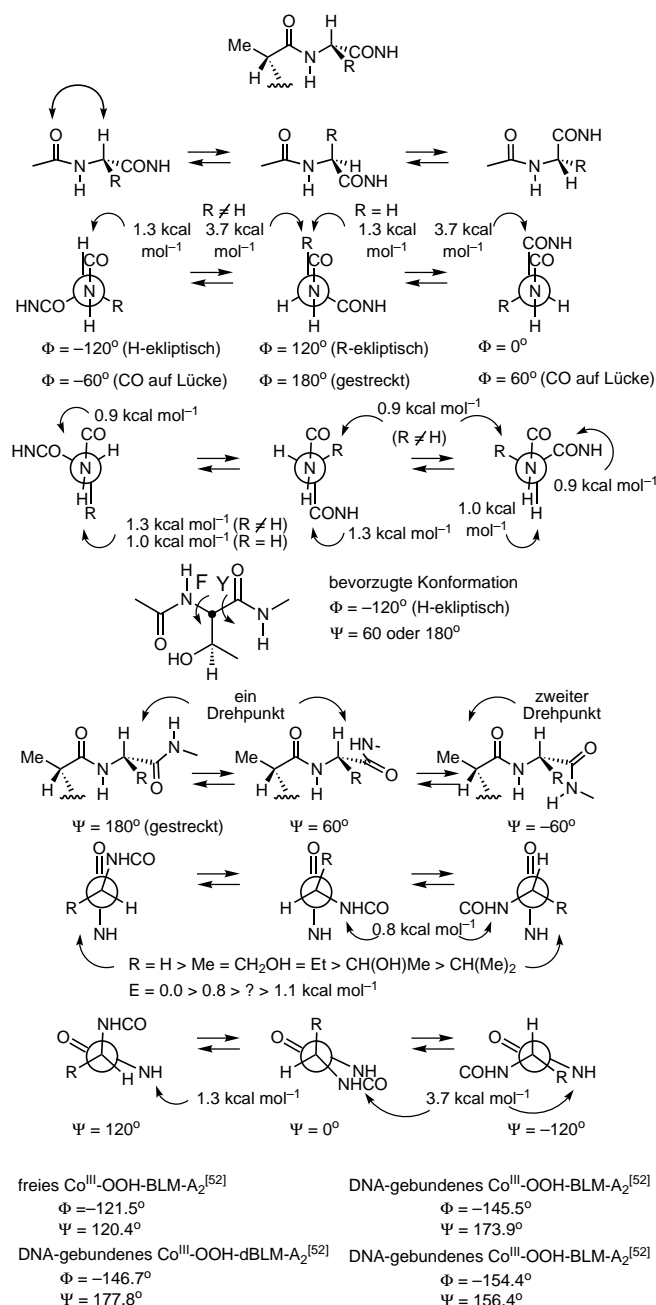


Abbildung 22. Konformative Effekte der Threonin-Einheit.

(R=H) sind fünf Konformationen möglich, von denen mindestens drei nicht produktiv für die DNA-Spaltung sind. Des weiteren werden die Konformationen, die für die DNA-Spaltung nicht produktiv sind, mit zunehmender Größe des Substituenten immer stärker begünstigt, so daß die Spaltungseffizienz abnimmt ($R = Me \cong Et > iPr$).

3.3.2.2. Austausch der Threonin-Amidgruppe^[112]

NMR-Untersuchungen der $Co^{III}\text{-OOH}$ -Komplexe von freiem sowie DNA-gebundenem Bleomycin ergaben, daß eine H-Brücke zwischen der NH-Gruppe des Threonins und dem benachbarten Sauerstoffatom des metallgebundenen Hydro-

peroxids günstig ist (Abbildung 23).^[52] Diese H-Brücke könnte die produktive, gebundene Konformation des aktivierten Wirkstoffes stabilisieren, das Fe-Oxo-Intermediat in der Position für die Abspaltung des C4'-Wasserstoffatoms fixieren, das metallgebundene Hydroperoxid stabilisieren oder

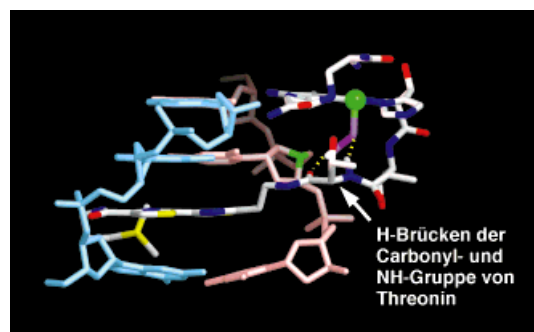
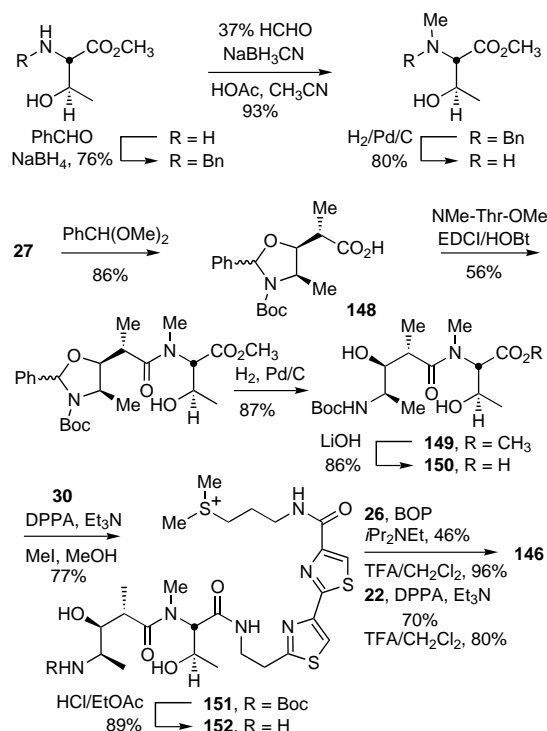


Abbildung 23. Auf der NMR-spektroskopisch bestimmten Struktur basierendes Modell, das die H-Brücken der NH- und -Carbonyl-Gruppe der Threonin-Einheit zum metallgebundenen Hydroperoxid im $Co^{III}\text{-OOH}$ -Bleomycin- A_2 -Komplex zeigt.^[52]

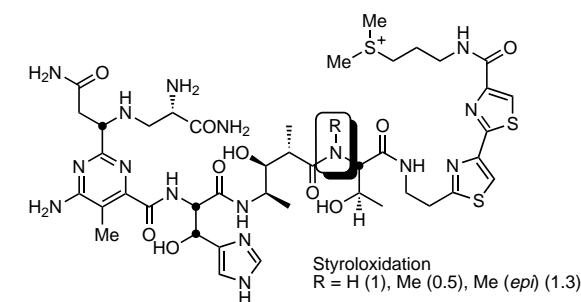
zur Katalyse der Reaktion beitragen, indem sie die homolytische Spaltung der Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung unterstützt. Im Hinblick auf diese Wechselwirkung der Threonin-NH-Gruppe untersuchten wir **146** und sein Epimer **147**, bei denen die Amidgruppe der Threonin-Einheit gegen eine N-Methylamidgruppe ausgetauscht wurde. Die Synthese von **146** gelang über die Herstellung des Tetrapeptids **152**, das die N-Methyl-L-threonin-Einheit enthält (Schema 26). NMe-Thr-OMe wurde ausgehend von L-Thr-OMe durch sukzessive reduktive Benzylierung, Methylierung und reduktive Deben-



Schema 26. Synthese von Bleomycin- A_2 -Analoga mit N-Methyl-substituierter Threonin-Amidgruppe.

zylierung synthetisiert. Seine Kupplung mit **27** eröffnete jedoch keinen brauchbaren Zugang zu **149**, und **27** cyclisierte bevorzugt zum entsprechenden fünfgliedrigen *N*-Boc-Lactam. Erfolgreich war dagegen die Verknüpfung mit dem cyclischen *N*,*O*-Acetal **148**, das durch Umsetzen von **27** mit Benzaldehyddimethylacetal erhalten wurde. Das Kuppeln von **148** mit *N*Me-Thr-OMe, gefolgt von der Spaltung des *N*,*O*-Acetals lieferte das Schlüsselintermediat **149**. Nach der Hydrolyse der Methylestergruppe und der anschließenden Verknüpfung mit **30** wurden **151** und kleine Mengen eines abtrennbaren Diastereomers erhalten. Nach Bildung des Sulfoniumsalzes wurde das Analogon **146** durch sukzessives Verknüpfen mit *erythro*- β -Hydroxy-L-histidin- und Pyrimidoblastsäure-Einheiten aufgebaut. Wird die gleiche Reaktionsfolge mit dem Nebendiastereomer von **152** durchgeführt, erhält man **147** in vergleichbaren Ausbeuten.

DNA-Spaltungsexperimente ergaben, daß durch die *N*-Methylierung der Threonin-Amidgruppe die DNA-Spaltungseffizienz dramatisch verringert ($10\text{--}15\times$) und die inhärente DNA-Spaltungsselektivität geschwächt oder nahezu aufgehoben wird, die inhärenten Oxidationseigenschaften der aktivierten Fe^{III} -Komplexe werden aber nur wenig beeinflusst (Abbildung 24). Zusammen mit den Ergebnissen, die im



Verbindung	Effizienz	ds:ss	Selektivität
Bleomycin A ₂ 1	2 – 5	1 : 6	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
Deglycobleomycin A ₂ 41	1	1 : 12	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
146 , R = Me	0.08	1 : 58	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA schwach
147 , R = Me (<i>epi</i>)	0.08	1 : 53	keine
Fe^{III}	0.04	1 : 98	keine

Abbildung 24. DNA-Spaltungseigenschaften von Bleomycin-A₂-Analoga mit modifizierter L-Threonin-Amidgruppe. Weitere Einzelheiten siehe Text.

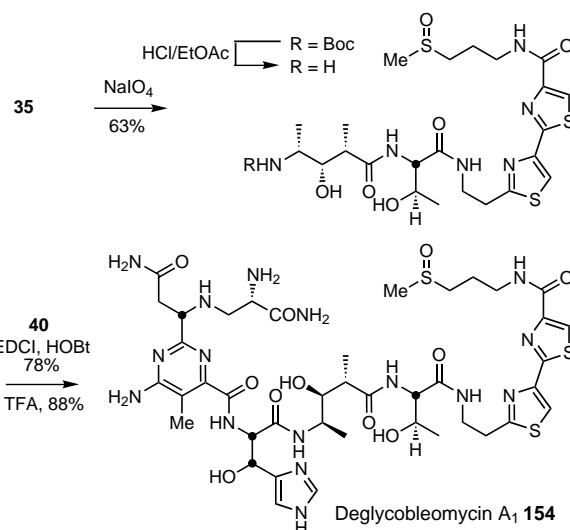
vorangegangenen Abschnitt beschrieben wurden, lassen diese Befunde nicht nur vermuten, daß die nichtsubstituierte Amidgruppe essentiell ist, sondern auch, daß diese eher mit konformativen Effekten oder stabilisierenden Einflüssen der Threonin-NH-Wasserstoffbrückenbindung erklärt werden können als mit einer Funktion bei der Katalyse der Oxidation. Dies ist im Einklang mit einem zuvor nicht erkannten Einfluß der Threonin-NH-Gruppe und läßt eine potentielle Bedeutung der H-Brücke im Fe^{III} -OOH-Komplex von Bleomycin oder einem nachfolgenden Fe -Oxo-Intermediat, das aus den Strukturmodellen von Stubbe et al. abgeleitet wird,^[52] vermuten.

3.4. Die C-terminale DNA-Bindungsdomäne

Wie wichtig die C-terminale kationische Gruppe und ihr elektrostatischer Beitrag zur DNA-Bindung ist, ist aus Untersuchungen an *S*-Demethyldglycobleomycin A₂^[24d, 72a] **153** und Bleomycinsäure wohl bekannt,^[96] denen beiden die terminale Sulfoniumgruppe fehlt. Mit der Synthese und Untersuchung von Deglycobleomycin A₁ **154**, dem Aglycon eines natürlichen Bleomycins, sollte der relative Einfluß bewertet werden, den die Substitution der Sulfonium- gegen eine Sulfoxidgruppe ausübt. Trotz der Bedeutung dieses Vergleiches im Hinblick auf die beschriebene veränderte DNA-Spaltungsselektivität der Bleomycinsäure ist zuvor weder synthetisches noch aus natürlichen Vorstufen erhaltenes Deglycobleomycin A₁ beschrieben worden.

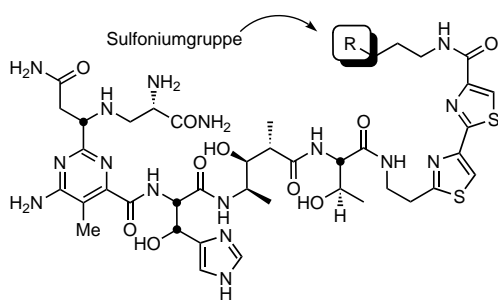
3.4.1. Deglycobleomycin A₁^[18e]

Die behutsame Oxidation der Tetrapeptid-S-Vorstufe **35** verlief glatt unter Bildung des Sulfoxids (Schema 27). Säurekatalysiertes Abspalten der Schutzgruppe, Verknüpfen mit **40** und säurekatalysiertes Entschützen lieferte Deglycobleomycin A₁ **154**.



Schema 27. Totalsynthese von Deglycobleomycin A₁ **154**.

Die DNA-Spaltungsexperimente zeigten, daß die terminale Sulfoxid- oder Sulfoniumgruppe eine wichtige, produktive Rolle spielen (Abbildung 25). Das Entfernen der positiven Ladung führte zu einer 10fach geringeren DNA-Spaltungseffizienz, obwohl die Sequenzselektivität nicht verändert wurde. Durch die Einführung der Sulfoxidgruppe wurde die Spaltungseffizienz zwar verbessert, sie erreichte aber nicht ihren ursprünglichen Wert. Im Strukturmodell von Stubbe et al. fädelt die kationische Gruppe durch die Basenpaare hindurch in die große Furche ein, unter senkrechter Intercalation der Bithiazolgruppe, und geht elektrostatische Wechselwirkungen mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der DNA ein.



Verbindung	Effizienz	ds:ss	Selektivität
Bleomycin A ₂ 1	2–5	1 : 6	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
Deglycobleomycin A ₂ 41	1	1 : 12	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
153 , R = SMe	0.1	n. b.	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
154 , R = S(O)Me	0.3	1 : 28	5'-GC, 5'-GT > 5'-GA
Fe ^{III}	0.04	1 : 98	keine

Abbildung 25. DNA-Spaltungseigenschaften von Bleomycin-A₂-Analoga mit modifizierter Sulfoniumgruppe. Weitere Einzelheiten siehe Text.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Bei unseren Untersuchungen haben wir versucht, die funktionellen Rollen der einzelnen Bleomycin-Einheiten aufzuklären. Dazu wurden wichtige Analoga des Wirkstoffs hergestellt und getestet. Diese Untersuchungen bewiesen, wie außerordentlich wichtig das Amid-Stickstoffatom der β -Hydroxy-L-histidin-Einheit und das Imidazol-N³-Stickstoffatom für die Metallionenchelatisierung sind, und daß die DNA-Bindungsaffinität ihren Ursprung größtenteils im Tripeptid S und in der C-terminalen kationischen Sulfoniumgruppe hat. Außerdem konnten die bislang nicht erkannten, subtilen konformativen und Substituenten-Effekte der Linkerdomäne bei der Präorganisation und Stabilisierung einer kompakten Konformation, die bei der DNA-Spaltung eingenommen wird, nachgewiesen werden. Die eingehende Untersuchung der Substituenten und Seitenketten der Pyrimidoblastsäure-Einheit ergaben einen geringen oder gar keinen Einfluß der C5-Methylgruppe und der terminalen α -Carboxamidgruppe. Die C2-Acetamido-Seitenkette übt dagegen eine wichtige, subtile Wirkung aus – möglicherweise durch die Bildung einer H-Brücke zwischen der Carboxamid-NH₂-Gruppe und der C2-Carbonylgruppe des Cytosins, das mit dem Guanin an der Spaltstelle eine Basenpaarung eingeht, und einer H-Brücke zwischen der Carbonylgruppe und der Hydroxygruppe des Threonins. Erstere trägt zur Stabilität der Bindung an eine Spaltstelle bei, während letztere die Einnahme einer kompakten, für die DNA-Spaltung günstigen Konformation fördert. Von größter Bedeutung war der Nachweis, daß die C4-Aminogruppe des Pyrimidinrings an H-Brücken sowie an der DNA-Erkennung beteiligt und Grundlage der DNA-Spaltungsselektivität ist. Auf der Basis dieser Untersuchungen suchen wir in unseren Labors nach neuen, starren Analoga von Bleomycin A₂, die möglicherweise die Präorganisation der produktiven, DNA-gebundenen Konformation, die Sequenzselektivität der DNA-Spaltung oder das Verhältnis der Spaltung von Doppelstrang- gegenüber Einzelstrang-DNA beeinflussen. Die

Rolle der Disaccharid-Einheit ist noch nicht bis in alle Einzelheiten verstanden, und systematische Untersuchungen der intercalierenden Bithiazolgruppe wurden bisher nicht durchgeführt. Spezifisch markierte (z.B. ¹⁵N) Verbindungen werden synthetisiert, um die Metallionenchelatisierung eindeutig aufzuklären. Schließlich könnten Informationen über Einzelheiten des zweiten Spaltungsschritts bei der Spaltung von Doppelstrang-DNA und die Kenntnis von Details der katalytischen Aktivierung und des Abbaus von Bleomycin das Design effektiverer Wirkstoffe erleichtern.

Die hier beschriebenen Arbeiten wurden von einer kleinen aber engagierten Gruppe von Studenten durchgeführt: Dr. S. L. Colletti, Dr. T. Honda, S. Teramoto, Hui Cai, Dr. Tim Ramsey und Royce Menezes. Die neueren Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. J. Stubbe (MIT) und ihrer Arbeitsgruppe durchgeführt. Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (CA42056) und vom Skaggs Institute for Chemical Biology gefördert.

Eingegangen am 29. Dezember 1997,

veränderte Fassung am 14. April 1998 [A267]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 448–476

Übersetzt von Dr. Silke Gräf, Leverkusen

- [1] H. Umezawa, K. Maeda, T. Takeuchi, Y. Okami, *J. Antibiot.* **1966**, 19, 200–209.
- [2] *Bleomycin: Current Status and New Developments* (Hrsg.: S. K. Carter, S. T. Crooke, H. Umezawa), Academic Press, New York, **1978**.
- [3] *Bleomycin: Chemical, Biochemical and Biological Aspects* (Hrsg.: S. M. Hecht), Springer, New York, **1979**.
- [4] *Bleomycin Chemotherapy* (Hrsg.: B. I. Sikic, M. Rozenzweig, S. K. Carter), Academic Press, Orlando, **1985**.
- [5] a) A. Natrajan, S. M. Hecht in *Molecular Aspects of Anticancer Drug-DNA Interactions*, Vol. 2 (Hrsg.: S. Neidle, M. J. Waring), CRC Press, Boca Raton, **1994**, S. 197–242; b) S. A. Kane, S. M. Hecht, *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **1994**, 49, 313–352.
- [6] M. Ohno, M. Otsuka in *Recent Progress in the Chemical Synthesis of Antibiotics* (Hrsg.: G. Lukacs, M. Ohno), Springer, New York, **1990**, S. 387–414.
- [7] L. F. Povirk in *Molecular Aspects of Anti-Cancer Drug Action* (Hrsg.: S. Neidle, M. J. Waring), MacMillan, London, **1983**, S. 157–181.
- [8] J. S. Lazo, B. A. Chabner in *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*, 2. Aufl. (Hrsg.: B. A. Chabner, D. L. Longo), Lippincott-Raven, Philadelphia, **1996**, S. 379–393.
- [9] J. C. Dabrowiak, *Adv. Inorg. Chem.* **1982**, 4, 69–113.
- [10] a) J. Stubbe, J. W. Kozarich, *Chem. Rev.* **1987**, 87, 1107–1136; b) J. Stubbe, J. W. Kozarich, W. Wu, D. E. Vanderwall, *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 322–330.
- [11] S. M. Hecht, *Acc. Chem. Res.* **1986**, 19, 383–391.
- [12] P. C. Dedon, I. H. Goldberg, *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, 5, 311–332.
- [13] D. H. Petering, R. W. Byrnes, W. E. Antholine, *Chem. Biol. Interact.* **1990**, 73, 133–182.
- [14] Y. Sugiura, T. Takita, H. Umezawa, *Met. Ions Biol. Syst.* **1985**, 19, 81–108.
- [15] P. R. Twentyman, *Pharmacol. Ther.* **1984**, 23, 417–441.
- [16] a) H. Umezawa, *Pure Appl. Chem.* **1971**, 28, 665–680; b) T. Takita, Y. Muraoka, T. Yoshioka, A. Fujii, K. Maeda, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1972**, 25, 755–758; b) Y. Muraoka, A. Fujii, T. Yoshioka, T. Takita, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1977**, 30, 178–181.
- [17] a) T. Takita, Y. Muraoka, T. Nakatani, A. Fujii, Y. Umezawa, H. Naganawa, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1978**, 31, 801–804; b) T. Fukuoka, Y. Muraoka, A. Fujii, H. Naganawa, T. Kakita, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1980**, 33, 114–117.

- [18] a) D. L. Boger, R. F. Menezes, T. Honda, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 310–311; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 273–275; b) D. L. Boger, T. Honda, R. F. Menezes, S. L. Colletti, Q. Dang, W. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 82–92; c) D. L. Boger, S. L. Colletti, T. Honda, R. F. Menezes, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5607–5618; d) D. L. Boger, T. Honda, Q. Dang, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5619–5630; e) D. L. Boger, T. Honda, R. F. Menezes; S. L. Colletti, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5631–5646; f) D. L. Boger, T. Honda, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5647–5656.
- [19] R. Ishida, T. Takahashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *66*, 1432–1438.
- [20] a) E. A. Sausville, J. Peisach, S. B. Horwitz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, *73*, 814–822; b) E. A. Sausville, R. W. Stein, J. Peisach, S. B. Horwitz, *Biochemistry* **1978**, *17*, 2740–2746; c) R. M. Burger, J. Peisach, S. B. Horwitz, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 11633–11644; d) R. M. Burger, T. A. Kent, S. B. Horwitz, E. Munck, J. Peisach, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 1559–1564.
- [21] R. M. Burger, G. Tian, K. Drlica, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1167–1168.
- [22] A. D. D'Andrea, W. A. Haseltine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 3608–3612.
- [23] M. Takeshita, A. P. Grollman, E. Ohtsubo, H. Ohtsubo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 5983–5987.
- [24] a) G. M. Ehrenfeld, J. B. Shipley, D. C. Heimbrook, H. Sugiyama, E. C. Long, J. H. van Boom, G. A. van der Marcel, N. J. Oppenheimer, S. M. Hecht, *Biochemistry* **1987**, *26*, 931–942; b) A. Natrajan, S. M. Hecht, G. A. van der Marcel, J. H. van Boom, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3997–4002; c) E. C. Long, S. M. Hecht, G. A. van der Marcel, J. H. van Boom, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5272–5276; d) B. J. Carter, K. S. Reddy, S. M. Hecht, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2463–2474.
- [25] L. F. Povirk, *Biochemistry* **1979**, *18*, 3989–3995.
- [26] a) Y. Sugiura, T. Suzuki, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 10544–10546; b) J. Kuwahara, Y. Sugiura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 2459–2463.
- [27] J. W. Sam, X.-J. Tang, J. Peisach, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5250–5256.
- [28] T. E. Westre, K. E. Loeb, J. M. Zaleski, B. Hedman, K. O. Hodgson, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1309–1313.
- [29] a) H. Sugiyama, T. Tashiro, Y. Dannoue, T. Miwa, T. Matsuura, I. Saito, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 7213–7216; b) H. Sugiyama, H. Kawabata, T. Fujiwara, Y. Dannoue, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5252–5257; c) H. Sugiyama, T. Sera, Y. Dannoue, R. Marumoto, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2290–2295; d) H. Sugiyama, K. Ohmori, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10326–10327.
- [30] a) J. C. Wu, J. W. Kozarich, J. Stubbe, *Biochemistry* **1985**, *24*, 7562–7568; b) J. C. Wu, J. Stubbe, J. W. Kozarich, *Biochemistry* **1985**, *24*, 7569–7573; c) J. W. Kozarich, L. Worth, Jr., B. L. Frank, D. F. Christner, D. E. Vanderwall, J. Stubbe, *Science* **1989**, *245*, 1396–1399; d) L. E. Rabow, J. Stubbe, J. W. Kozarich, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3196–3203; e) L. E. Rabow, G. H. McGall, J. Stubbe, J. W. Kozarich, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3203–3208; f) G. H. McGall, L. E. Rabow, G. W. Ashley, S. H. Wu, J. W. Kozarich, J. Stubbe, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4958–4967; g) L. Worth, Jr., B. L. Frank, D. F. Christner, M. J. Absalon, J. Stubbe, J. W. Kozarich, *Biochemistry* **1993**, *32*, 2601–2609.
- [31] a) H. Sugiyama, R. E. Kikusie, L.-H. Chang, L.-T. Ma, S. M. Hecht, G. A. van der Marcel, J. H. van Boom, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3852–3854; b) H. Sugiyama, C. Xu, N. Murugesan, S. M. Hecht, *Biochemistry* **1988**, *27*, 58–67; c) J. R. Barr, R. B. Van Atta, A. Natrajan, S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4058–4060.
- [32] R. M. Burger, K. Drlica, B. Birdsall, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 25978–25985.
- [33] a) L. F. Povirk, W. Wubker, W. Kohnlein, F. Hutchinson, *Nucleic Acids Res.* **1977**, *4*, 3575–3580; b) L. F. Povirk, C. W. Houlgrave, *Biochemistry* **1988**, *27*, 3850–3857; c) L. F. Povirk, Y.-H. Han, R. J. Steighner, *Biochemistry* **1989**, *28*, 5808–5814; d) R. J. Steighner, L. F. Povirk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 8350–8354; e) L. F. Povirk, M. J. F. Austin, *Mutat. Res.* **1991**, *257*, 127–143; f) R. A. Bennett, P. S. Swerdlow, L. F. Povirk, *Biochemistry* **1993**, *32*, 3188–3195.
- [34] a) R. S. Lloyd, C. W. Haidle, R. R. Hewitt, *Cancer Res.* **1978**, *38*, 3191–3196; b) R. S. Lloyd, C. W. Haidle, D. L. Robberson, *Biochemistry* **1978**, *17*, 1890–1896.
- [35] M. O. Bradley, K. W. Kohn, *Nucleic Acids Res.* **1979**, *7*, 793–804.
- [36] a) C. K. Mirabelli, C.-H. Huang, S. T. Crooke, *Cancer Res.* **1980**, *40*, 4173–4177; b) C. K. Mirabelli, C.-H. Huang, R. G. Fenwick, S. T. Crooke, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *27*, 460–467.
- [37] T. Lindahl, *Mutat. Res.* **1990**, *238*, 305–311.
- [38] B. Dimple, L. Harrison, *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, *63*, 915–948.
- [39] a) M. J. Absalon, J. W. Kozarich, J. Stubbe, *Biochemistry* **1995**, *34*, 2065–2075; b) M. J. Absalon, W. Wu, J. W. Kozarich, J. Stubbe, *Biochemistry* **1995**, *34*, 2076–2086.
- [40] G. Brazilay, I. D. Hickson, *Bioessays* **1995**, *17*, 713–719.
- [41] a) J. A. Tainer, M. M. Thayer, R. P. Cunningham, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 20–26; b) T. P. Hilbert, R. J. Boorstein, H. C. Kung, P. H. Bolton, D. Xing, R. P. Cunningham, G. Teebor, *Biochemistry* **1996**, *35*, 2505–2511.
- [42] a) B. J. Carter, E. de Vroom, E. C. Long, G. A. van der Marcel, J. H. van Boom, S. M. Hecht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 9373–9377; b) C. E. Holmes, B. J. Carter, S. M. Hecht, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4293–4307; c) C. E. Holmes, B. J. Carter, S. M. Hecht, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4293–4307; d) S. M. Hecht, *Bioconjug. Chem.* **1994**, *5*, 513–526; e) C. H. Holmes, A. T. Abraham, S. M. Hecht, C. Florentz, R. Giege, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3399–3406.
- [43] R. S. Magliozzo, J. Peisach, M. R. Ciolo, *Mol. Pharmacol.* **1989**, *35*, 428–432.
- [44] a) M. J. Absalon, C. R. Krishnamoorthy, G. McGall, J. W. Kozarich, J. Stubbe, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 4179–4185; b) M. Bansal, J. S. Lee, J. Stubbe, J. W. Kozarich, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 1836–1845; c) M. Bansal, J. Stubbe, J. W. Kozarich, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 1846–1853.
- [45] Deglycobleomycin A₂: a) N. J. Oppenheimer, C. Chang, L.-H. Chang, G. Ehrenfeld, L. O. Rodriguez, S. M. Hecht, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 1606–1609; b) Y. Sugiura, T. Suzuki, M. Otsuka, S. Kobayashi, M. Ohno, T. Takita, H. Umezawa, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 1328–1336; c) Y. Sugiura, J. Kuwahara, T. Suzuki, *FEBS Lett.* **1985**, *182*, 39–42. d) A. Kenani, G. Lamblin, J.-P. Henichart, *Carbohydr. Res.* **1988**, *177*, 81–89; e) D. L. Boger, R. F. Menezes, W. Yang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 959–962.
- [46] iso-Bleomycin A₂: Y. Nakayama, M. Kunishima, S. Omoto, T. Takita, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1973**, *26*, 400–402.
- [47] epi-Bleomycin A₂: Y. Muraoka, H. Kobayashi, A. Fujii, M. Kunishima, T. Fujii, Y. Nakayama, T. Takita, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 853–856.
- [48] Desamidobleomycin A₂: H. Umezawa, S. Hori, T. Sawa, T. Yoshioka, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1974**, *27*, 419–424.
- [49] Desamidobleomycin A₂ und Depyruvamidobleomycin A₂: Y. Sugiura, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5208–5215.
- [50] Decarbamoylbleomycin A₂: H. Sugiyama, G. M. Ehrenfeld, J. B. Shipley, R. E. Kikusie, L.-H. Chang, S. M. Hecht, *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 869–877.
- [51] PEMH und iso-Bithiazolbleomycin A₂: a) T. Morii, T. Matsuura, I. Saito, T. Suzuki, J. Kuwahara, Y. Sugiura, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7089–7094; b) T. Morii, I. Saito, T. Matsuura, J. Kuwahara, Y. Sugiura, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 938–939.
- [52] a) W. Wu, D. E. Vanderwall, S. M. Lui, X.-J. Tang, C. J. Turner, J. W. Kozarich, J. Stubbe, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1268–1280; b) W. Wu, D. E. Vanderwall, C. J. Turner, J. W. Kozarich, J. Stubbe, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1281–1294; c) W. Wu, D. E. Vanderwall, J. Stubbe, J. W. Kozarich, C. J. Turner, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10843–10844; d) D. E. Vanderwall, S. M. Lui, W. Wu, C. J. Turner, J. W. Kozarich, J. Stubbe, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 373–387; e) S. M. Lui, D. E. Vanderwall, W. Wu, X.-J. Tang, C. J. Turner, J. W. Kozarich, J. Stubbe, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9603–9613; f) W. Wu, D. E. Vanderwall, S. Teramoto, S. M. Lui, S. Hoehn, X.-J. Tang, C. J. Turner, D. L. Boger, J. W. Kozarich, J. Stubbe, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2239–2250.
- [53] a) R. A. Manderville, J. F. Ellena, S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10851–10852; b) R. A. Manderville, J. F. Ellena, S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7891–7903.
- [54] a) R. X. Xu, W. E. Antholine, D. H. Petering, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 944–949; b) Q. Mao, P. Fulmer, W. Li, E. F. DeRose, D. H.

- Petering, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 6185–6191; c) J. D. Otvos, W. E. Antholine, S. Wehrli, D. H. Petering, *Biochemistry* **1996**, 35, 1458–1465; d) P. Fulmer, C. Zhao, W. Li, E. DeRose, W. E. Antholine, D. H. Petering, *Biochemistry* **1997**, 36, 4367–4374; e) R. X. Xu, D. Nettesheim, J. D. Otvos, D. H. Petering, *Biochemistry* **1994**, 33, 907–916.
- [55] A. M. Calafat, H. Won, L. G. Marzilli, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 3656–3664.
- [56] T. E. Lehmann, L.-J. Ming, M. E. Rosen, L. Que, Jr., *Biochemistry* **1997**, 36, 2807–2816.
- [57] a) J. Caceres-Cortes, H. Sugiyama, K. Ikudome, I. Saito, A. H.-J. Wang, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 244, 818–828; b) J. Caceres-Cortes, H. Sugiyama, K. Ikudome, I. Saito, A. H.-J. Wang, *Biochemistry* **1997**, 36, 9995–10005.
- [58] Y. Yang, L. Huang, R. T. Pon, S.-F. Cheng, D.-K. Chang, J. W. Lown, *Bioconjug. Chem.* **1996**, 7, 670–679.
- [59] a) J. D. Glickson, R. P. Pillai, T. T. Sakai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 2967–2971; b) M. P. Gamcsik, J. D. Glickson, G. Zon, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1990**, 7, 1117–1133.
- [60] a) M. A. J. Akkerman, C. A. G. Haansnoot, C. W. Hilbers, *Eur. J. Biochem.* **1988**, 173, 211–225; b) M. A. J. Akkerman, E. W. J. F. Neijman, S. S. Wijmenga, C. W. Hilbers, W. Bermel, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 7462–7474.
- [61] a) N. J. Oppenheimer, L. O. Rodriguez, S. M. Hecht, *Biochemistry* **1979**, 18, 3439–3445; b) N. J. Oppenheimer, L. O. Rodriguez, S. M. Hecht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, 76, 5616–5620; c) G. M. Ehrenfeld, L. O. Rodriguez, S. M. Hecht, C. Chang, V. J. Basus, N. J. Oppenheimer, *Biochemistry* **1985**, 24, 81–92.
- [62] D. M. Chen, T. T. Sakai, J. D. Glickson, D. J. Patel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, 92, 197–205.
- [63] H. Kurosaki, K. Hayashi, Y. Ishikawa, M. Goto, *Chem. Lett.* **1995**, 691–692.
- [64] H. Urata, Y. Ueda, Y. Usami, M. Akagi, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7135–7138.
- [65] H. Hiroaki, T. Nakayama, M. Ikehara, S. Uesugi, *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, 39, 2780–2786.
- [66] M. Chien, A. P. Grollman, S. B. Horwitz, *Biochemistry* **1977**, 16, 3641–3647.
- [67] a) N. J. Oppenheimer, L. O. Rodriguez, S. M. Hecht, *Biochemistry* **1980**, 19, 4096–4103; b) N. J. Oppenheimer, C. Chang, L. O. Rodriguez, S. M. Hecht, *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 1514–1517; c) J. Kross, W. D. Henner, W. A. Haseltine, L. Rodriguez, M. D. Levin, S. M. Hecht, *Biochemistry* **1982**, 21, 3711–3721.
- [68] a) S. J. Brown, S. E. Hudson, P. K. Mascharak, M. M. Olmstead, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 6446–6448; b) S. J. Brown, M. M. Olmstead, P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.* **1990**, 29, 3229–3234; c) J. D. Tan, S. E. Hudson, S. J. Brown, M. M. Olmstead, P. K. Mascharak, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3841–3853; d) E. Farinas, J. D. Tan, N. Baidya, P. K. Mascharak, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 2996–2997; e) R. J. Guajardo, S. E. Hudson, S. J. Brown, P. K. Mascharak, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7971–7977; f) R. J. Guajardo, J. D. Tan, P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.* **1994**, 33, 2838–2840; g) R. J. Guajardo, F. Chavez, E. T. Farinas, P. K. Mascharak, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3883–3884; h) K. E. Loeb, J. M. Zaleski, T. W. Westre, R. J. Guajardo, P. K. Mascharak, B. Hedman, K. O. Hodgson, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 4545–4561; i) E. T. Farinas, J. D. Tan, P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 2637–2643.
- [69] a) R. X. Xu, W. E. Antholine, D. H. Petering, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 950–955; b) W. E. Antholine, J. S. Hyde, R. C. Sealy, D. H. Petering, *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 4437–4440; c) J. C. Dabrowiak, M. Tsukayama, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 7543–7550.
- [70] S. Takahashi, J. W. Sam, J. Peisach, D. L. Rousseau, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 4408–4413.
- [71] A. Veselov, H. Sun, A. Sienkiewicz, H. Taylor, R. M. Burger, C. P. Scholes, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 7508–7512.
- [72] a) B. C. Carter, V. S. Murty, K. S. Reddy, S.-N. Wang, S. M. Hecht, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 4193–4196; b) N. Hamamichi, A. Natrajan, S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 6278–6291; c) S. Kane, A. Natrajan, S. M. Hecht, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 10899–10904.
- [73] a) A. Kittaka, Y. Sugano, M. Otsuka, M. Ohno, *Tetrahedron* **1988**, 44, 2811–2820; b) M. Otsuka, T. Masuda, A. Haupt, M. Ohno, T. Shiraki, Y. Sugiura, K. Maeda, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 838–845; c) T. Owa, T. Sugiyama, M. Otsuka, M. Ohno, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 6063–6066; d) T. Owa, A. Haupt, M. Otsuka, S. Kobayashi, N. Tomioka, A. Itai, M. Ohno, T. Shiraki, M. Uesugi, Y. Sugiura, *Tetrahedron* **1992**, 48, 1193–1208; e) T. Sugiyama, M. Ohno, M. Shibasaki, M. Otsuka, Y. Sugiura, S. Kobayashi, K. Maeda, *Heterocycles* **1994**, 37, 275–282; f) A. Kittaka, Y. Sugano, M. Otsuka, M. Ohno, *Tetrahedron* **1988**, 44, 2821–2833.
- [74] a) K. Shinozuka, H. Morishita, T. Yamazaki, Y. Sugiura, H. Sawai, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 6869–6872; b) J. Kohda, K. Shinozuka, H. Sawai, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 5575–5578; c) T. Arai, K. Shinozuka, H. Sawai, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 15–18.
- [75] a) L. Huang, J. C. Quada, Jr., J. W. Lown, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 5323–5326; b) L. Huang, J. W. Lown, *Heterocycles* **1995**, 41, 1181–1185.
- [76] a) M. J. McLean, A. Dar, M. J. Waring, *J. Mol. Recognit.* **1989**, 1, 184–192; b) K. Toshima, K. Ohta, A. Ohashi, T. Nakamura, M. Nakata, K. Tatsuta, S. Matsumura, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 4822–4831; c) C. Bailly, M. J. Waring, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 7311–7316; d) C. Bailly, A. Kenani, M. J. Waring, *FEBS Lett.* **1995**, 372, 144–147; e) S. Jennwein, M. J. Waring, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 1502–1509; f) C. Bailly, A. Kenani, M. J. Waring, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 1516–1522.
- [77] a) L. F. Povirk, M. Hogan, N. Dattagupta, *Biochemistry* **1979**, 18, 96–101; b) L. F. Povirk, M. Hogan, N. Dattagupta, M. Buechner, *Biochemistry* **1981**, 20, 655–671; c) T. Suzuki, J. Kuwahara, M. Goto, Y. Sugiura, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 824, 330–335; d) D. Suh, L. F. Povirk, *Biochemistry* **1997**, 36, 4248–4257.
- [78] a) A. Kenani, C. Bailly, N. Helbecque, J.-P. Cateau, R. Houssin, J.-L. Bernier, J.-P. Henichart, *Biochem. J.* **1988**, 253, 497–504; b) A. Kenani, C. Bailly, R. Houssin, J. P. Henichart, *Anticancer Drugs* **1994**, 5, 199–201.
- [79] M. Ohno, M. Otsuka, A. Kittaka, Y. Sugano, Y. Sugiura, T. Suzuki, J. Kuwahara, K. Umezawa, H. Umezawa, *Int. J. Exp. Clin. Chemother.* **1988**, 1, 12.
- [80] a) R. E. Dickerson in *Mechanisms of DNA Damage and Repair: Implications for Carcinogenesis and Risk Assessment in Basic Life Sciences* (Hrsg.: M. G. Sini, L. Grossman), Plenum, New York, **1986**, S. 245–255; b) R. Kuroda, H. Satoh, M. Shinomiya, T. Watanabe, M. Otsuka, *Nucleic Acids Res.* **1995**, 23, 1524–1530.
- [81] J.-P. Henichart, J.-L. Bernier, N. Helbecque, R. Houssin, *Nucleic Acids Res.* **1985**, 13, 6703–6717.
- [82] a) T. Takita, Y. Umezawa, S. Saito, H. Morishima, H. Naganawa, H. Umezawa, T. Tsuchiya, T. Miyake, S. Kageyama, S. Umezawa, Y. Muraoka, M. Suzuki, M. Otsuka, M. Narita, S. Kobayashi, M. Ohno, *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 521–524; b) T. Takita, Y. Umezawa, S. Saito, H. Morishima, H. Umezawa, Y. Muraoka, Y. Suzuki, M. Otsuka, S. Kobayashi, M. Ohno, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 671–674; c) S. Saito, Y. Umezawa, H. Morishima, T. Takita, H. Umezawa, M. Narita, M. Otsuka, S. Kobayashi, M. Ohno, *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 529–532; d) T. Tsuchiya, T. Miyake, S. Kageyama, S. Umezawa, H. Umezawa, T. Takita, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1413–1416; e) S. Saito, Y. Umezawa, T. Yoshioka, Y. Muraoka, T. Takita, H. Umezawa, *Pept. Chem.* **1983**, 20, 133–138; f) S. Saito, Y. Umezawa, T. Yoshioka, T. Takita, H. Umezawa, Y. Muraoka, *J. Antibiot.* **1983**, 36, 92–95; g) M. Otsuka, M. Narita, M. Yoshida, S. Kobayashi, M. Ohno, Y. Umezawa, H. Morishima, S. Saito, T. Takita, H. Umezawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, 33, 520–526; h) T. Miyake, T. Tsuchiya, S. Umezawa, S. Saito, H. Umezawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1986**, 59, 1387–1395.
- [83] a) Y. Aoyagi, K. Katano, H. Suguna, J. Primeau, L.-H. Chang, S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 5537–5538; b) Y. Aoyagi, H. Suguna, N. Murugesan, G. M. Ehrenfeld, L.-H. Chang, T. Ohgi, M. S. Shekhani, M. P. Kirkup, S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 5237–5239; c) V. Pozsgay, T. Ohgi, S. M. Hecht, *J. Org. Chem.* **1981**, 46, 3761–3763; d) K. Katano, P.-I. Chang, A. Millar, V. Pozsgay, D. K. Minster, T. Ohgi, S. M. Hecht, *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 5807–5815.
- [84] a) D. L. Boger, Q. Dang, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 1631–1633; b) D. L. Boger, W. Yang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, 2, 1649–1654.
- [85] a) Y. Iitaka, H. Nakamura, T. Nakatani, Y. Muraoka, A. Fujii, T. Takita, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1978**, 31, 1070–1072; b) T. Takita,

- Y. Muraoka, T. Nakatani, A. Fujii, Y. Iitaka, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1978**, *31*, 1073–1077.
- [86] a) *Hetero Diels-Alder Methodology in Organic Synthesis* (Hrsg.: D. L. Boger, S. M. Weinreb), Academic Press, San Diego, **1987**; b) D. L. Boger, *Tetrahedron* **1983**, *39*, 2869–2939; c) D. L. Boger, *Chem. Rev.* **1986**, *86*, 781–793; d) D. L. Boger, M. Patel, *Prog. Heterocycl. Chem.* **1989**, *1*, 30–64; e) D. L. Boger, *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1990**, *99*, 599–615; f) D. L. Boger, *Chemtracts: Org. Chem.* **1996**, *9*, 149–189.
- [87] a) D. L. Boger, Q. Dang *Tetrahedron* **1988**, *44*, 3379; b) D. L. Boger, M. J. Kochanny, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4950–4955.
- [88] D. L. Boger, T. Honda, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1567–1570.
- [89] D. L. Boger, R. F. Menezes, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4331–4333.
- [90] T. Owa, M. Otsuka, M. Ohno, *Chem. Lett.* **1988**, 1873–1874.
- [91] D. A. Evans, A. E. Weber, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6757–6761.
- [92] T. T. Sakai, J. M. Riordan, T. E. Booth, J. D. Glickson, *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 279–285.
- [93] H. Kasai, H. Naganawa, T. Takita, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1978**, *31*, 1316–1320.
- [94] S. N. Roy, G. A. Orr, F. Brewer, S. B. Horwitz, *Cancer. Res.* **1981**, *41*, 4471–4477.
- [95] P. Sieber, B. Riniker, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 6031–6034.
- [96] J. B. Shipley, S. M. Hecht, *Chem. Res. Toxicol.* **1988**, *1*, 25–27.
- [97] D. L. Boger, S. Teramoto, J. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7344–7356.
- [98] D. L. Boger, S. Teramoto, H. Cai, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 179–193.
- [99] Rückblickend sind die zuletzt genannten Beobachtungen von Mascharak besonders interessant, wenn auch bei oberflächlicher Betrachtung seltsam. Sie beziehen die C4-Aminogruppe, die sich bei den Strukturuntersuchungen von Stubbe et al. als entscheidend erwiesen hat und in Abschnitt 3.2.8 detailliert erörtert wurde, nicht mit ein. Das Pyrimidin-N3-Atom des Bleomycins bleibt aber H-Brücken-Acceptor für die C2-Aminogruppe des Guanins an der Spaltstelle. Es ist denkbar, daß eine verringerte Guaninspaltungsselektivität resultiert, wenn statt zweier nur eine H-Brücken gebildet werden.
- [100] D. L. Boger, S. Teramoto, T. Honda, J. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 7338–7343.
- [101] D. L. Boger, T. M. Ramsey, H. Cai, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 195–207.
- [102] D. L. Boger, R. F. Menezes, Q. Dang, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4333–4336.
- [103] a) C. Nishimura, N. Tanaka, H. Suzuki, N. Tanaka, *Biochemistry* **1987**, *26*, 1547; b) C. Nishimura, H. Suzuki, N. Tanaka, H. Yamaguchi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *163*, 788–796.
- [104] a) S. M. Sebt, J. C. Deleon, J. S. Lazo, *Biochemistry* **1987**, *26*, 4213–4219; b) S. M. Sebt, J. E. Mignano, J. P. Jani, S. Srimatkandada, J. S. Lazo, *Biochemistry* **1989**, *28*, 6544–6548.
- [105] D. L. Boger, T. M. Ramsey, H. Cai, S. T. Hoehn, J. W. Kozarich, J. Stubbe, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 53–65.
- [106] K. P. Nightingale, K. R. Fox, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 2549–2555.
- [107] a) R. E. Kilkuskie, H. Suguna, B. Yellin, N. Murugesan, S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 260–261; b) D. C. Heimbrook, R. L. Mulholland, Jr., S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7839–7840.
- [108] D. L. Boger, R. F. Menezes, Q. Dang, W. Yang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 261–266.
- [109] a) D. L. Boger, T. M. Ramsey, H. Cai, S. T. Hoehn, J. Stubbe, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9149–9158; b) D. L. Boger, S. L. Colletti, S. Teramoto, T. M. Ramsey, J. Zhou, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1281–1295.
- [110] D. L. Boger, T. M. Ramsey, H. Cai, S. T. Hoehn, J. Stubbe, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9139–9148.
- [111] a) M. Vasquez, G. Nemethy, H. Scheraga, *Macromolecules* **1983**, *16*, 1043–1049; b) S. S. Zimmerman, M. S. Pottle, G. Nemethy, H. Scheraga, *Macromolecules* **1977**, *10*, 1–9.
- [112] D. L. Boger, S. Teramoto, H. Cai, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1577–1589.