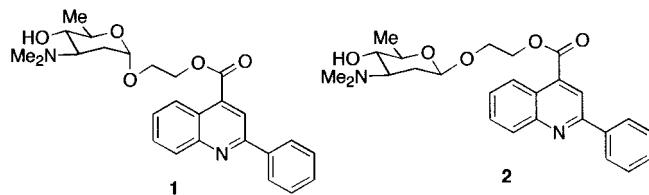


## 2-Phenylchinolin-Kohlenhydrat-Hybride: Moleküldesign, Synthese und Prüfung einer neuen Klasse von photoaktivierbaren DNA-spaltenden Substanzen\*\*

Kazunobu Toshima,\* Ryusuke Takano, Yutaka Maeda, Masataka Suzuki, Akira Asai und Shuichi Matsumura

Die Entwicklung von photoaktivierbaren Substanzen, die DNA selektiv durch Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge unter milden Bedingungen und ohne Zusatz von Metallen oder Reduktionsmitteln spalten, ist sowohl vom chemischen wie auch vom biologischen Standpunkt aus sehr interessant und birgt ein beachtliches Potential für die Medizin.<sup>[1]</sup> Hier diskutieren wir das Moleküldesign, die chemische Synthese, die photoinduzierte DNA-Spaltung und die Cytotoxizität von zwei neuen und durch Kunstlicht aktivierbaren DNA-spaltenden Agentien, den 2-Phenylchinolin-Kohlenhydrat-Hybridverbindungen **1** und **2**.

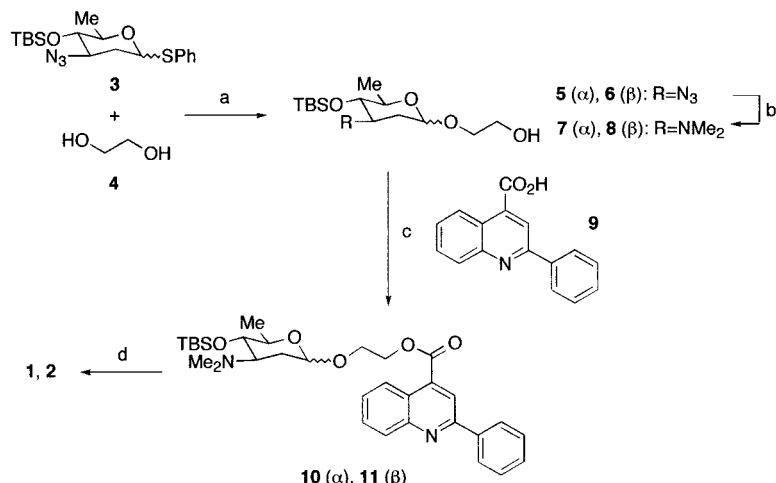


Bei unserem Ansatz zur Synthese neuer DNA-spaltender Verbindungen entwarfen wir künstliche Intercalator-Kohlenhydrat-Hybridverbindungen,<sup>[2-4]</sup> weil viele klinisch nutzbare Antitumorantibiotika, z.B. die Anthracycline<sup>[5]</sup> und Aureolsäuren,<sup>[6]</sup> die mit DNA interagieren, normalerweise sowohl aromatische Domänen als auch Kohlenhydrat-Domänen enthalten. Denny et al.<sup>[7]</sup> demonstrierten die Wirksamkeit von tricyclischen aromatischen Systemen wie Phenylchinolinen als „minimale Intercalatoren“; daher wählten wir 2-Phenylchinolin<sup>[8, 9]</sup> als DNA-Intercalator. Von der konjugierten C=N-Bindung in der 2-Phenylchinolin-Einheit wurde außerdem angenommen, daß sie durch Lichtbestrahlung in den  $^3(n \rightarrow \pi^*)$ -Zustand übergeht, der möglicherweise radikalischen Charakter aufweist und zur DNA-Spaltung geeignet sein könnte.

Für den Kohlenhydratteil schien bestimmt 2,6-Didesoxyaminozucker geeignet zu sein, da sie

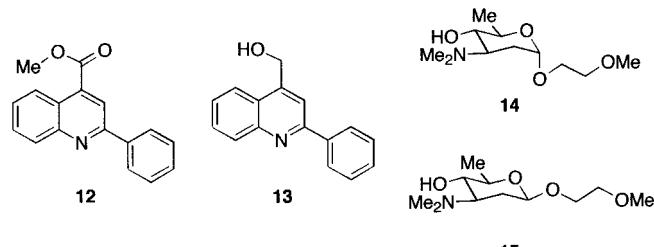
als Bestandteile einiger DNA-bindender Antitumorantibiotika<sup>[10]</sup> sowie unserer zuvor vorgestellten künstlichen DNA-wechselwirkenden Intercalator-Kohlenhydrat-Moleküle an die DNA-Furchen binden.<sup>[4]</sup> Daher entwarfen wir neue, künstliche Intercalator-Kohlenhydrat-Hybride mit einer 2-Phenylchinolin- und einer 2,6-Didesoxyaminozucker-Einheit, die über einen Ethylenglycol-Linker verbunden sind.

Die 2-Phenylchinolin-Kohlenhydrat-Hybride **1** und **2** wurden durch eine kurze Reaktionssequenz synthetisiert (Schema 1): Die Glycosylierung des Phenylthiozuckers **3**<sup>[11]</sup> (1.0 Äquiv.) mit Ethylenglycol **4** (5.0 Äquiv) unter Verwendung von *N*-Bromsuccinimid (NBS)<sup>[12]</sup> in MeCN lieferte mit 79% Ausbeute eine Mischung der  $\alpha$ -Glycoside **5** und der  $\beta$ -Glycoside **6** im Verhältnis von 1.4:1. Die Azidgruppen von **5** und **6** wurden durch Behandlung mit 35proz. HCHO und einer katalytischen Menge an Pd/C in MeOH unter Wasserstoff in *N,N*-Dimethylaminogruppen überführt, wodurch **7** und **8** mit 81% Ausbeute erhalten wurden. Nach säulenchromatographischer Trennung wurden **7** (1.0 Äquiv.) und **8** (1.0 Äquiv.) mit 2-Phenylchinolin-4-carbonsäure **9** (1.5 Äquiv.) unter Einwirkung von *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 4-Dimethylaminopyridin (4-DMAP) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  verestert, wobei die Hybridverbindungen **10** und **11** in 93 bzw. 90% erhalten wurden. Schließlich lieferte die Entfernung der Silylschutzgruppen von **10** und **11** mit HF/Pyridin (Py) die gewünschten 2-Phenylchinolin-Kohlenhydrat-Hybride **1** bzw. **2** in hohen Ausbeuten.



Schema 1. Synthese von **1** und **2**. a) NBS (1.5 Äquiv. bezogen auf **3**), 4-Å-Molekularsieb, MeCN, 0°C, 1 h, 79%, **5:6** = 1.4:1; b)  $\text{H}_2$ , kat. Pd/C, 35proz. HCHO, MeOH, 25°C, 18 h, 81%; c) **9**, DCC (1.0 Äquiv.), kat. 4-DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0°C, 4.5 h, 93% (**10**) und 90% (**11**); d) HF/Py, 25°C, 15 h, 99% (**1**) und 94% (**2**). TBS = *tert*-Butyldimethylsilyl.

Die lichtinduzierte DNA-Spaltung der Hybridverbindungen **1** und **2** sowie die der Verbindungen **12**–**15**,<sup>[11]</sup> die



[\*] Prof. Dr. K. Toshima, R. Takano, Y. Maeda, M. Suzuki, Prof. Dr. S. Matsumura  
Department of Applied Chemistry, Faculty of Science and Technology  
Keio University  
3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama 223-8522 (Japan)  
Fax: (+81) 45-563-0446  
E-mail: toshima@applc.keio.ac.jp  
Dr. A. Asai  
Tokyo Research Laboratories, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.  
3-6-6 Asahi-machi, Machida-shi, Tokyo 194-8533 (Japan)

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch Fördermittel für junge Wissenschaftler des japanischen Ministeriums für Bildung, Wissenschaft, Sport und Kultur gefördert.

Substrukturen von **1** und **2** entsprechen, wurde mit superspiralierter  $\Phi$ X174-DNA untersucht. Wie aus Abbildung 1 ersichtlich ist, wurde mit **1** und **2** (jeweils  $500\text{ }\mu\text{M}$ ) eine signifikante DNA-Spaltung erreicht, und bei Bestrahlung mit



Abbildung 1. Photospaltung von superspiralierter  $\Phi$ X174-DNA.  $\Phi$ X174-DNA ( $50\text{ }\mu\text{M}$  pro Basenpaar) wurde mit der jeweiligen Verbindung in 20proz. Acetonitril in Tris-HCl-Puffer (Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan, pH 7.5,  $50\text{ }\mu\text{M}$ ) bei  $25^\circ\text{C}$  1 h unter UV-Bestrahlung (365 nm, 15 W) inkubiert und durch Gelelektrophorese (0.9% Agarosegel, Ethisdiumbromid-Färbung) untersucht. Bahn 1: DNA allein; Bahn 2: DNA, Bestrahlung; Bahn 3-8: **1**, **2**, **12**, **13**, **14** bzw. **15** (jeweils  $500\text{ }\mu\text{M}$ ). Form I = kovalent geschlossene, superspiralisierte DNA. Form II = offene, ringförmige DNA. Form III = lineare DNA.

langwelligem UV-Licht (365 nm) entstanden kleine Fragmente; **12-15** zeigten unter denselben Bedingungen keine DNA-Spaltung. Diese Ergebnisse belegen, wie wichtig die Hybridanordnung für die DNA-Spaltung ist. Auch lassen sie vermuten, daß der 2,6-Didesoxyaminozucker für die Bindung an die DNA-Furche verantwortlich ist und die Intercalationsfähigkeit des 2-Phenylchinolinylrestes deutlich erhöht. Bei Abwesenheit von Licht wurde keine DNA-Spaltung durch **1** und **2** beobachtet. Weiterhin wurde festgestellt, daß die DNA-Spaltungsaktivität des  $\beta$ -anomeren **2** stärker war als die des  $\alpha$ -anomeren **1** (Abbildung 2). Dieses Ergebnis verdeutlicht, daß

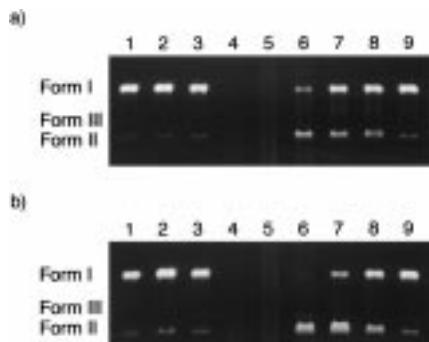


Abbildung 2. Photospaltung von superspiralierter  $\Phi$ X174-DNA.  $\Phi$ X174-DNA ( $50\text{ }\mu\text{M}$  pro Basenpaar) wurde mit dem Hybrid in 20proz. Acetonitril in Tris-HCl-Puffer (pH 7.5,  $50\text{ }\mu\text{M}$ ) bei  $25^\circ\text{C}$  1 h unter UV-Bestrahlung (365 nm, 15 W) inkubiert und durch Gelelektrophorese (0.9% Agarosegel, Ethisdiumbromid-Färbung) untersucht. a) Bahn 1: DNA allein; Bahn 2: DNA, Bestrahlung; Bahn 3: DNA + **1** ohne Bestrahlung; Bahn 4-9 in den Konzentrationen 1000, 500, 300, 100, 30 und  $10\text{ }\mu\text{M}$ . b) Bahn 1: DNA allein; Bahn 2: DNA, Bestrahlung; Bahn 3: DNA + **2** ohne Bestrahlung; Bahn 4-9 in den Konzentrationen 1000, 500, 300, 100, 30 und  $10\text{ }\mu\text{M}$ .

die DNA-Spaltungsaktivität von der Konfiguration der Zuckerkereinheit im Hybrid abhängt. Da die DNA-Spaltung durch **1** und **2** in Anwesenheit des Radikalfängers Dimethylsulfoxid stark abnahm, muß die DNA-Spaltung vom lichtangeregten 2-Phenylchinolin-Radikal ausgehen. Die Ortsspezifität der DNA-Spaltung von **1** und **2** wurde nach Sangers Methode

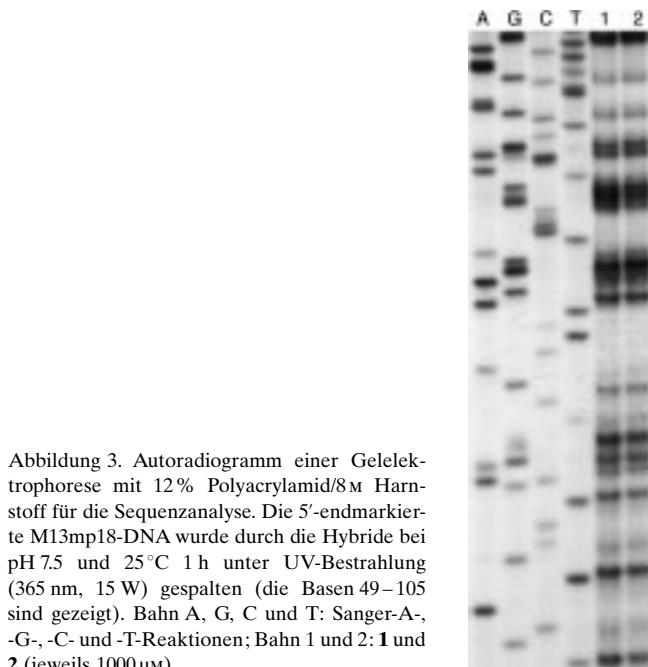


Abbildung 3. Autoradiogramm einer Gelelektrophorese mit 12% Polyacrylamid/8 M Harnstoff für die Sequenzanalyse. Die 5'-endmarkierte M13mp18-DNA wurde durch die Hybride bei pH 7.5 und  $25^\circ\text{C}$  1 h unter UV-Bestrahlung (365 nm, 15 W) gespalten (die Basen 49-105 sind gezeigt). Bahn A, G, C und T: Sanger-A-, -G-, -C- und -T-Reaktionen; Bahn 1 und 2: **1** und **2** (jeweils  $1000\text{ }\mu\text{M}$ ).

untersucht.<sup>[13]</sup> Die Ergebnisse in Abbildung 3 lassen die gleich hohe Guanin-Selektivität erkennen.

Als nächstes wurde die Cytotoxizität der DNA-spaltenden Hybride **1** und **2** mit HeLa-S3-Zellen untersucht, die den Verbindungen 72 h ausgesetzt wurden – mit oder ohne Belichtung für 1 h.<sup>[14]</sup> Die  $IC_{50}$ -Werte von **1** und **2** betrugen 12 bzw.  $18\text{ }\mu\text{M}$ , wenn nicht bestrahlt wurde, und 0.44 bzw.  $0.25\text{ }\mu\text{M}$ , wenn bestrahlt wurde. Die Cytotoxizitäten von **1** und **2** waren also nach Belichtung viel höher; dies korreliert mit ihrer DNA-Spaltungsaktivität. Wenn HeLa-S3-Zellen **1** oder **2** (jeweils  $1\text{ }\mu\text{M}$ ) ohne Belichtung ausgesetzt wurden, überlebten die meisten Zellen, doch starben alle ab, wenn unter diesen Bedingungen zusätzlich belichtet wurde. Dies zeigt deutlich, daß die lichtinduzierte DNA-Spaltung die Cytotoxizität der Hybride stark beeinflußt und daß das Überleben der Krebszellen durch Behandlung mit einer entsprechenden Menge des 2-Phenylchinolin-Kohlenhydrat-Hybrids mit oder ohne Belichtung kontrolliert werden kann.

Eingegangen am 10. Mai,  
veränderte Fassung am 24. Juni 1999 [Z13401]  
International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3733-3735

**Stichwörter:** Cytostatika • DNA-Spaltung • Kohlenhydrate

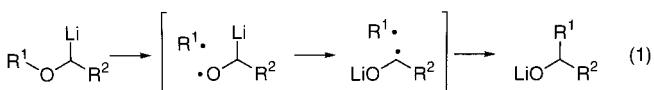
- [1] B. Armitage, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1171-1200.
- [2] a) D. J. Mincher, G. Shaw, E. D. Clercq, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1983**, 613-618; b) D. J. Mincher, G. Shaw, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1984**, 1279-1282.
- [3] a) D. B. Berkowitz, S. J. Danishefsky, G. K. Schulte, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4518-4529; b) C. J. Roche, D. Berkowitz, G. A. Sulikowski, S. J. Danishefsky, D. M. Crothers, *Biochemistry* **1994**, *33*, 936-942; c) K. M. Depew, S. M. Zeman, S. H. Boyer, D. J. Denhart, N. Ikemoto, S. J. Danishefsky, D. M. Crothers, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2972-2975; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2797-2801.
- [4] K. Toshima, H. Ouchi, Y. Okazaki, T. Kano, M. Moriguchi, A. Asai, S. Matsumura, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2864-2866; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2748-2750.

- [5] a) F. Arcamone in *Doxorubicin Anticancer Antibiotics. Medicinal Chemistry Series of Monographs, Vol. 17* (Hrsg.: G. Stevens), Academic Press, New York, **1981**; b) *Anthracycline and Anthracenedione Based Anticancer Agents* (Hrsg.: J. W. Lown), Elsevier, Amsterdam, **1988**; c) *Anthracycline Antibiotics* (Hrsg.: W. Priebe), ACS Symposium Ser. No. 574, American Chemical Society, Washington DC, **1995**.
- [6] J. D. Skarbek, M. K. Speedie in *Antitumor Compounds of Natural Origin: Chemistry and Biochemistry* (Hrsg.: A. Aszalos), CRC Press, Boca Raton, FL, **1981**, S. 191–235.
- [7] a) G. J. Atwell, C. D. Bos, B. C. Baguley, W. A. Denny, *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 1048–1052; b) G. J. Atwell, B. C. Baguley, W. A. Denny, *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 396–401; c) W. A. Denny, G. W. Rewcastle, B. C. Baguley, *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 814–819.
- [8] Y. Mikata, M. Yokoyama, S. Ogura, I. Okura, M. Kawasaki, M. Maeda, S. Yano, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 1243–1248.
- [9] U. Henriksen, C. Larsen, G. Karup, C. Jeppesen, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *Photochem. Photobiol.* **1991**, 53, 299–305.
- [10] P. Jytten, R. Greven in *Polysaccharide in Medicinal Applications* (Hrsg.: S. Dumitriu), Marcel Dekker, New York, **1996**, S. 339–410.
- [11] Die Synthese der Verbindung wird an anderer Stelle beschrieben werden.
- [12] K. C. Nicolaou, S. P. Seitz, D. P. Papahatjis, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 2430–2434.
- [13] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1977**, 74, 5463–5467. Da die Sequenzierung nach Sanger mit dem Einbau einer Base einhergeht, entspricht die Spaltung am Nucleotid *N* der Stelle, die durch das Agens oder die Maxam-Gilbert-Reaktion an *N*+1 gespalten wird. Siehe auch: D. L. Boger, S. A. Munk, H. Zarrinmayeh, T. Ishizaki, J. Haught, M. Bina, *Tetrahedron* **1991**, 47, 2661–2682.
- [14] D. A. Scudiero, R. H. Shoemaker, K. D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T. H. Nofziger, M. J. Currens, D. Seniff, M. R. Boyd, *Cancer Res.* **1988**, 48, 4827–4833.

## Enantioselektive [1,2]-Wittig-Umlagerung mit einem externen chiralen Liganden\*\*

Katsuhiko Tomooka,\* Kyoko Yamamoto und Takeshi Nakai\*

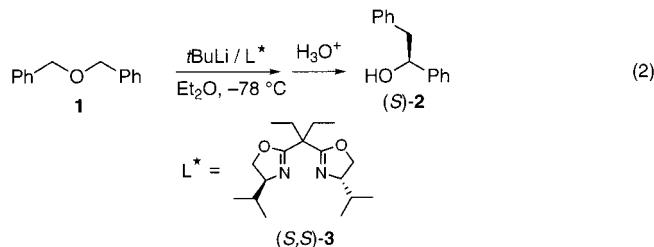
Seit ihrer Entdeckung durch Wittig und Löhmann im Jahre 1942<sup>[1]</sup> hat die Reaktion von  $\alpha$ -lithiierten Ethern, heute als [1,2]-Wittig-Umlagerung bekannt, großes Interesse sowohl vom mechanistischen als auch synthetischen Blickpunkt auf sich gezogen.<sup>[2]</sup> Man nimmt von dieser Carbanionen-Umlagerung an, daß sie im Sinne eines Radikal-Dissoziations-Rekombinations-Mechanismus verläuft [Gl. (1)].<sup>[2,3]</sup>



[\*] Prof. Dr. K. Tomooka, K. Yamamoto, Prof. Dr. T. Nakai  
Department of Applied Chemistry  
Graduate School of Science and Engineering  
Tokyo Institute of Technology  
Meguro-ku, Tokyo 152-8552 (Japan)  
Fax: (+81) 3-5734-3931  
E-mail: ktomooka@o.cc.titech.ac.jp  
takeshi@o.cc.titech.ac.jp

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom japanischen Ministerium für Bildung, Wissenschaft und Kultur und von der Japan Society of the Promotion of Science (Research for the Future Program) gefördert.

Trotz der langen Geschichte wurden bisher keine enantioselektiven Varianten der Wittig-Umlagerung entwickelt. Der radikalische Charakter stellt hierbei eine große Herausforderung dar. Wir berichten hier über die erste enantioselektive Wittig-Umlagerung, die auf einer asymmetrischen Lithiierung basiert<sup>[4]</sup> und bei der (*S,S*)-Bis(dihydrooxazol) **3** als externer chiraler Ligand dient<sup>[5,6]</sup> [Gl. (2)]. Das herausstechendste Merkmal ist, daß die Umlagerung grundsätzlich auch mit der gleichen Enantioselektivität verläuft, wenn der chirale Ligand **3** nur in katalytischer Menge eingesetzt wird.



Die Umlagerung von Dibenzylether **1**, einem klassischen Wittig-Substrat,<sup>[1]</sup> lieferte nach Zugabe des vorgemischten Komplexes *tBuLi/3* (jeweils 1.0 Äquiv.) bei  $-78^{\circ}\text{C}$  in Diethylether den Alkohol **(S)-2** in 55 % Ausbeute und mit 60 % *ee*; **1** wird zu 43 % zurückgehalten.<sup>[7,8]</sup> Dies ist das erste Beispiel einer enantioselektiven Wittig-Umlagerung, wenngleich die Enantioselektivität nur mäßig ist.<sup>[9]</sup> Wenn entweder ein weiteres Äquivalent *tBuLi* nach der Reaktion zugegeben wurde oder der Komplex *tBuLi/3* (2.0/1.0) eingesetzt wurde, stiegen die Ausbeuten von **2** bemerkenswerterweise auf 90–94 %, während die Enantioselektivitäten nahezu unverändert blieben (62 % *ee*). Das bedeutet, daß für eine vollständige Reaktion zwei Äquivalente *tBuLi* benötigt werden. Zu diesem Zeitpunkt machten wir zwei Annahmen: 1) Die erste Lithiierung wird fast ausschließlich durch den *tBuLi/3*-Komplex bewirkt und *tBuLi* selbst, von dem bekannt ist, daß es in Diethylether als Dimer vorliegt,<sup>[10]</sup> kann unter diesen Bedingungen nicht als effektives Lithiierungsagens wirken.<sup>[11]</sup> 2) Das *tBuLi*-Dimer ist an der Komplexierung mit dem entstehenden **3**-gebundenen Lithiumalkoxid beteiligt, wobei es zur Hälfte zur Bildung eines *tBuLi*/Alkoxid-Komplexes<sup>[12,13]</sup> verbraucht und so der Reaktion entzogen wird, während der aktive Komplex *tBuLi/3* regeneriert würde. Somit ließe sich auch erklären, daß die enantioselektive Variante auch mit lediglich katalytischen Mengen des chiralen Liganden **3** abläuft.

Die Umlagerung von **1** wurde deshalb mit 10 Mol-% **3** und zwei Äquivalenten *tBuLi* unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Wie erwartet wurde der Alkohol **(S)-2** mit gleich hoher Enantioselektivität und in der gleichen chemischen Ausbeute erhalten (60 % *ee*, 86 %). Die gleiche Reaktion mit 5 Mol-% **3** führte zu 54 % *ee* und 81 % chemischer Ausbeute. In Schema 1 ist ein plausibler Katalysezyklus wiedergegeben, bei dem die Enantioselektivität durch den Radikal-Rekombinationsschritt bestimmt werden könnte, an dem das an den chiralen Liganden gebundene Radikal anion beteiligt ist. In der Tat ergab eine ähnliche Umlagerung von  $[\text{D}_3]\mathbf{1}$  (Racemat)  $(S)$ - $[\text{D}_3]\mathbf{2}$  ( $>90\%$  D-Gehalt) in 87 % Ausbeute und im wesentlichen mit dem gleichen Enantiomeren-