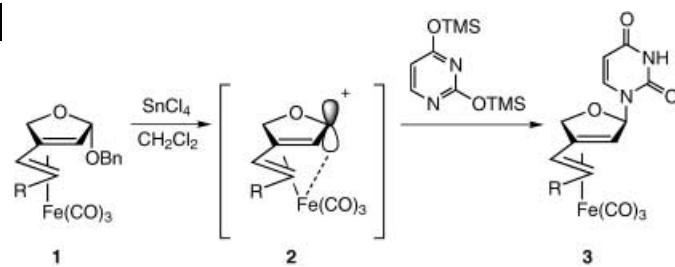


Eisenhaltige Nucleosidanaloge mit
apoptoseinduzierender Wirksamkeit**

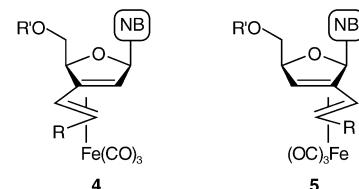
Daniel Schlawe, André Majdalani, Juraj Velicky,
Erik Heßler, Thomas Wieder,* Aram Prokop* und
Hans-Günther Schmalz*

In einer früheren Arbeit zeigten wir, dass sich η^4 -Butadien-Fe(CO)₃-Komplexe des Typs **1** hochselektiv am Acetalzentrum substituieren lassen. Dabei werden Fe(CO)₃-stabilisierte kationische Zwischenstufen vom Typ **2** durchlaufen.^[1] Beispielsweise liefert die SnCl₄-katalysierte Reaktion des Komplexes **1** (R = H) mit einem silylierten Uracilderivat^[2] fast quantitativ das Nucleosidanalogon **3** mit einer Diastereoselektivität von $\geq 95\%$ (Schema 1).

Diese hohe Effizienz der Reaktion und die wachsende Bedeutung der biometallorganischen Chemie^[3] veranlassten uns dazu, die Methode auf die Synthese eisenhaltiger Nucleosidanalogon des Typs **4** und **5** zu übertragen, die zusätzlich einen 5'-CH₂OR'-Substituenten haben. Solche Verbindungen könnten interessante biologische Eigenschaften aufweisen, da Nucleosidanalogon oft pharmakologisches Potenzial haben, vor allem als antivirale Wirkstoffe oder Tumortherapeutika.^[4] Außerdem bieten Übergangsmetall-



Schema 1. Diastereoselektive Bildung eines Nucleosids über eine eisenstabilisierte kationische Zwischenstufe.



Carbonyl-Komplexe noch weitgehend unerforschte Möglichkeiten für die Medikamentenentwicklung.^[5]

Wir beschreiben hier erste Ergebnisse unserer Untersuchung und die Entdeckung eisenhaltiger Nucleosidanalogon mit stark apoptoseinduzierender Wirkung.^[6] Die Synthese der Komplexe **10** und **12** (Schema 2) als Vorstufen für Nucleosid-

[*] Dr. D. Schlawe, A. Majdalani, Dr. J. Velicky, E. Heßler,
Prof. Dr. H.-G. Schmalz

Institut für Organische Chemie

Universität zu Köln

Greinstrasse 4, 50939 Köln (Deutschland)

Fax: (+49) 221-470-3064

E-mail: schmalz@uni-koeln.de

Dr. Dr. A. Prokop

Klinik für Pädiatrie, Schwerpunkt Onkologie/Hämatologie
Charité Campus Virchow-Klinikum

13353 Berlin (Deutschland)

Fax: (+49) 30-450-559999

E-mail: aram.prokop@charite.de

Priv.-Doz. Dr. T. Wieder

Institut für Physiologie I

Eberhard Karls Universität Tübingen

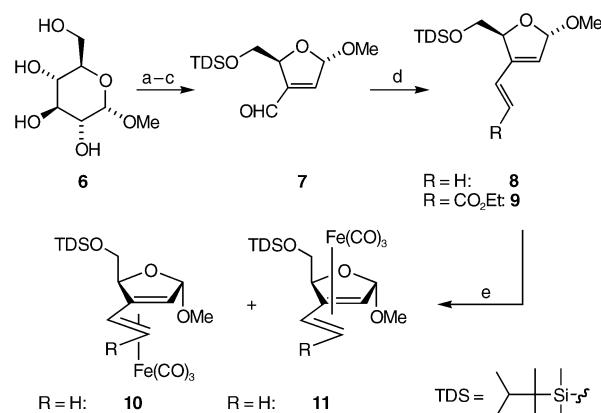
72076 Tübingen (Deutschland)

Fax: (+49) 7071-293-073

E-mail: thomas.wieder@uni-tuebingen.de

[**] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Schm 875/1 H.G.S.), die Deutsche José Carreras Leukämie-Stiftung e.V. (DJCLS-R01/02; T.W. und A.P.), den Verein zur Förderung der Tagesklinik e.V. (A.P. und T.W.), die Berliner Krebsgesellschaft e.V. (T.W.) und den Fonds der Chemischen Industrie (H.G.S.) gefördert. Die Autoren danken Dr. P. T. Daniel für die freundliche Bereitstellung von BJAB-Zellen und von Laborausrüstung sowie Dr. J. Lex, Dr. H. Schmickler und Dr. M. Schäfer für röntgenkristallographische, NMR-spektroskopische und massenspektrometrische Messungen. A. Richter danken wir für die Unterstützung bei der Durchführung der Zell-Assays.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

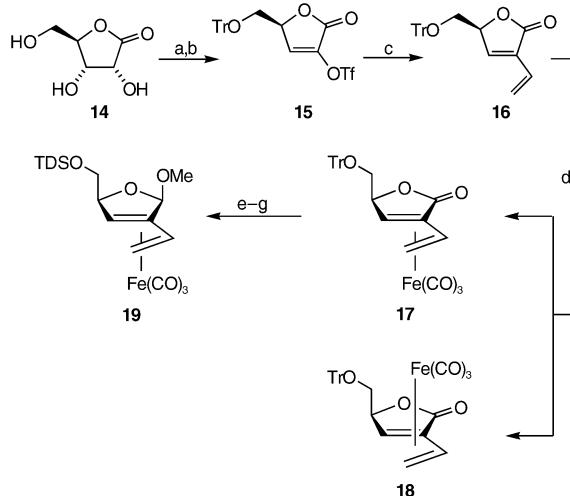


Schema 2. a) TDSO-Cl, Pyridin, RT, 16 h, 98%; b) DEAD, PPh₃, Benzol, 80°C, 4 h, 81%; c) LiBr, Tetramethylharnstoff, Toluol, Rückfluss, 2.5 h, 68%; d) H₂C=PPh₃, THF, -78°C bis RT, 86%; oder Ph₃P=C(H)CO₂Et, THF, Rückfluss, 1 h, 95%; e) [Fe₂(CO)₉], Et₂O, Rückfluss, 18 h, für R = H 72%, **10:11** = 3.3:1; oder 3 h, für R = CO₂Et 77%, **12:13** = 4.3:1. DEAD = Diethylazodicarboxylat.

analoga des Typs **4** geht von käuflichem α -Methylglucopyranosid (**6**) aus. Durch Silylierung der primären OH-Gruppe mit Thexyldimethylsilylchlorid, Mitsunobu-Epoxidierung und LiBr-induzierte Umlagerung/Ringverengung entsteht der Aldehyd **7**.^[7] Die Komplexierung der aus **7** durch Wittig-Olefinition gewonnenen Diene **8** und **9** mit [Fe₂(CO)₉] in siedendem Et₂O ergibt mit signifikanter Diastereoselektivität^[8] bevorzugt die *endo*-Komplexe **10** und **12**.

bzw. **12**. Die Produktgemische (**10/11** oder **12/13**) lassen sich zwar durch präparative HPLC trennen, es ist jedoch einfacher, die durch TBAF-induzierte Desilylierung erhaltenen Alkohole flashchromatographisch zu trennen und anschließend zu resilylieren.^[9]

Für die Synthese von Nucleosidanalogen des Typs **5** wird zunächst der Komplex **19** ausgehend von Ribonolacton **14** hergestellt (Schema 3). Nach selektiver Tritylierung der



Schema 3. a) TrCl , Pyridin, 55°C , 16 h, 67%; b) $\text{ Tf}_2\text{O}$, Pyridin, CH_2Cl_2 , -78 bis -15°C , 2 h, 85%; c) $\text{Bu}_3\text{SnCH}=\text{CH}_2$, 3.5 Mol-% Ph_3As , 0.5 Mol-% $[\text{Pd}_2(\text{dba})_3]$, LiCl , THF, RT, 2 h, 87%; d) $[\text{Fe}_2(\text{CO})_9]$, EtOAc , RT bis Rückfluss, 4 h, 69%; **17:18** = 1.4:1; dann Chromatographie; e) DIBAH, Toluol, -78°C , 2 h, 92%; f) $\text{HC}(\text{OMe})_3$, kat. TsOH , MeOH , RT, 5 h, 99%; g) TDSCl, Imidazol, CH_2Cl_2 , RT, 16 h, 96%. TrCl = Tritylchlorid, DIBAH = Diisobutylaluminiumhydrid, TsOH = *p*-Toluolsulfosäure.

primären OH-Gruppe und Bildung des Enoltriflats **15** liefert die nachfolgende Stille-Kupplung mit Tributylvinylstannan das Dien **16** in 50% Gesamtausbeute.^[10] Die Komplexierung von **16** ist wesentlich schwieriger als die der Diene **8** und **9**. Langsames Erwärmen von **16** mit 4 Äquiv. $[\text{Fe}_2(\text{CO})_9]$ in Essigester von Raumtemperatur bis zum Sieden liefert die besten Ergebnisse. Die entstehende Mischung der Komplexe **17** und **18** (1.4:1) lässt sich flashchromatographisch leicht trennen.^[9] Die Umwandlung von **17** in **19** erfolgt über DIBAH-Reduktion, saure Methanolysen und Silylierung.

Zur Synthese der Nucleosidanaloge vom Typ **4** und **5** (analog der Reaktion aus Schema 1) werden die Komplexe **10**, **12** und **19** mit silylierten Nucleobasen (Abbildung 1) unter Vorbrüggen-artigen Bedingungen umgesetzt (Tabelle 1).^[2,11] Zur Einführung von Uracil (U), 5-Bromuracil (BrU) und Thymin (T) wird ein Überschuss an SnCl_4 als Lewis-Säure verwendet, wobei die gewünschten N^1 -substituierten Produkte entstehen. Im Falle von Cytosin (C) muss jedoch TMSOTf eingesetzt werden, um die Bildung der regiosomeren N^4 -substituierten Produkte zu unterdrücken.^[12] Ausgehend von **10** und **12** entstehen bevorzugt die natürlich konfigurierten Nucleosidanaloge des Typs **4** neben unterschiedlich hohen Anteilen der jeweiligen Epimere (*epi*-**4**).^[13] **19** reagiert unter den gleichen Bedingungen diastereoselektiv

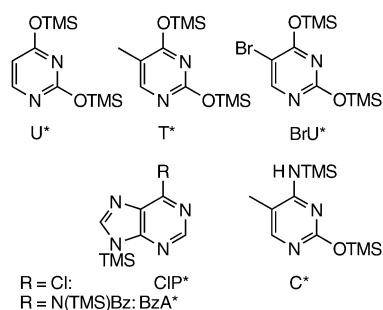


Abbildung 1. Silylierte Nucleobasen (NB^*) für die Synthese der eisenhaltigen Nucleosidanaloge (Abbildung 2 und Tabelle 1).

Tabelle 1: Synthese eisenhaltiger Nucleosidanaloge und einige Cytotoxizitätsdaten.

Edukt	NB^*	Bedingungen ^[a]	Produkt	Ausb. ^[b]	d.r. ^[c]	LD_{90} [μM] ^[d]
10	U*	A	4a	79 %	5.6:1	n.d.
10	T*	A	4b	82 %	1.6:1	n.d.
10	C*	B	4c	96 %	2.3:1	30
12	U*	A	4d	84 %	6.6:1	n.d.
12	T*	A	4e	81 %	2.4:1	> 100
12	BrU*	A	4f	72 %	4.5:1	> 100
12	C*	B	4g	83 %	3.6:1	20
19	U*	B	5a	76 %	> 50:1	> 100
19	T*	B	5b	75 %	> 50:1	≈ 100
19	BrU*	B	5c	60 %	> 50:1	≈ 100
19	C*	B	5d	84 %	> 50:1	≈ 30
19	CIP*	B	5e	79 %	> 50:1	n.d.
19	BzA*	B	5f	23 %	> 50:1	n.d.
5e	—	C	5g	56 %	—	n.d.
5f	—	D	5g	78 %	—	n.d.
4g	—	E	4h	37 %	—	> 100
4g	—	F	20	74 %	—	> 100

[a] Reaktionsbedingungen: A) 3.0–5.0 Äquiv. NB^* (Abbildung 2) in CH_2Cl_2 , Rückfluss, Zugabe von 3.0–5.5 Äquiv. SnCl_4 als 1 M Lösung in Heptan innerhalb von 2 h mittels Dosierpumpe, dann H_2O ; B) 4 Äquiv. NB^* , 6 Äquiv. TMSOTf, CH_2Cl_2 , RT, 2–8 h, dann H_2O ; C) 1 atm. NH_3 , DMAP, Dioxan/MeOH (20:1), RT, 3 Wochen; D) 7 M NH_3 in MeOH, RT, 20 h; E) 1.5 Äquiv. TBAF, H_2O , THF, RT, 3 h; F) 6 Äquiv. TMANO, Toluol, RT, 1.5 h. [b] Ausbeuten an isolierten getrennten Epimeren. [c] Diastereomererverhältnis (**4/epi-4** oder **5/epi-5**). [d] Cytotoxizität der Verbindungen, bestimmt durch LDH-Freisetzung von kultivierten BJAB-mock-Zellen nach einer Einwirkzeit von 48 h. Wegen des steilen Anstiegs der biologischen Aktivität oberhalb einer bestimmten Schwellenkonzentration wurden LD_{90} anstelle von LD_{50} -Werten angegeben.

in hohen Ausbeuten zu den Nucleosidanalogen vom Typ **5** (Abbildung 2). Die Einführung von Adenin gelingt ausgehend von **19** in zwei Stufen mithilfe der silylierten Reagenzien CIP* oder BzA* (Abbildung 1). Aus den Produkten **5e** und **5f** wird das Adenosinderivat **5g** durch Ammonolyse in guten Ausbeuten erhalten (Tabelle 1).

Für Vergleichszwecke in den biologischen Assays wurden aus **4g** das eisenfreie Nucleosid **20** (durch oxidative Dekomplexierung mit Trimethylamin-N-oxid) und das desilylierte Cytosinderivat **4h** (durch Umsetzung mit TBAF) hergestellt (Schema 4).

Nachdem Tests auf eine antivirale Wirkung gegen HIV enttäuschend verlaufen waren,^[14] stellten wir fest, dass einige eisenhaltigen Nucleosidanaloge eine ausgeprägte Cyto-

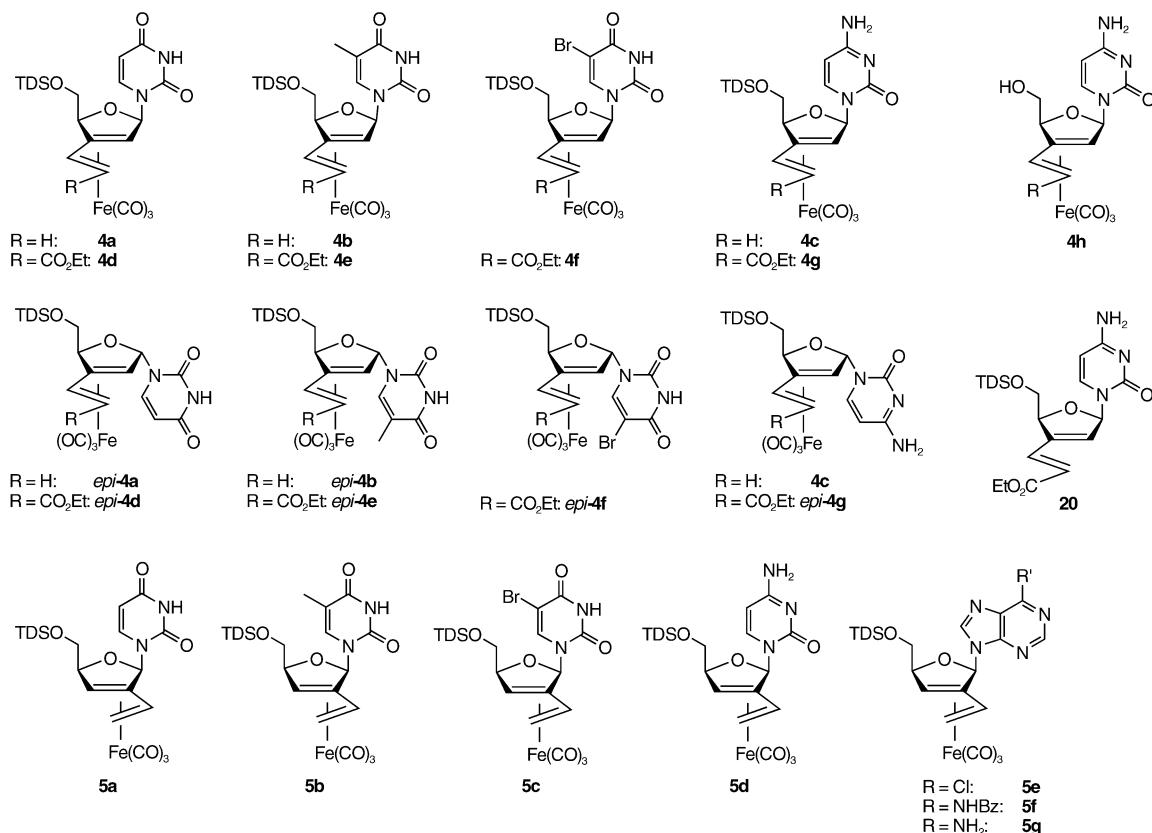
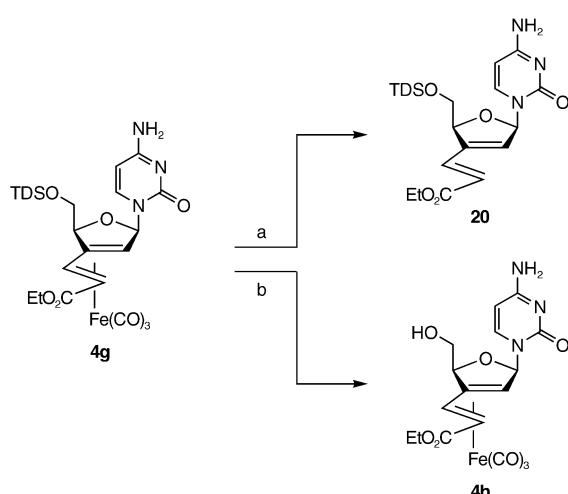


Abbildung 2. Verschiedene synthetisierte eisenhaltige Nucleosidanaloge (Tabelle 1).



Schema 4. a) TMANO, Toluol, 0°C bis RT, 74%; b) TBAF, H₂O, THF, RT, 3 h, 37%. TMANO = Trimethylamin-N-oxid, TBAF = Tetrabutylammoniumfluorid.

toxizität gegen Tumorzellen aufweisen. Wie die in Tabelle 1 zusammengestellten Daten zeigen, sind Substanzen beider regiosomaler Reihen (**4** und **5**) aktiv. Die Wahl der Nucleobase hat dabei einen signifikanten Einfluss auf die Wirksamkeit. Die Cytosinderivate **4c**, **4g** und **5d** (Abbildung 2) sind hier am wirksamsten. Die dekomplexierte Verbindung **20** ist erheblich weniger aktiv als der Komplex **4g**, was die große

Bedeutung des Metallcarbonylfragments für die biologische Wirksamkeit belegt. Eine unspezifische Aktivität der Dien-Fe(CO)₃-Einheit kann jedoch ausgeschlossen werden, da z. B. die strukturell mit **4g** eng verwandten Verbindungen **4e**, **4f** und **5a** oder die eisenhaltigen Vorstufen vom Typ **10** und **12** keine Wirkung zeigen. Auch das aus **4g** hergestellte dekalierte **4h** ist inaktiv.

In weiteren Experimenten konnten wir zeigen, dass der cytotoxische Effekt der aktiven Verbindungen auf Apoptoseinduktion beruht. Apoptose, der programmierte Zelltod, zählt zu den grundlegenden Prozessen der Zellbiologie,^[15] und Apoptoseinduktion ist ein Schlüsselkonzept der modernen Krebstherapie.^[16] Einen direkten Hinweis auf die Apoptoseinduzierende Wirkung der eisenhaltigen Nucleoside erhielten wir durch die typischen morphologischen Veränderungen^[15] („blebbing“) kultivierter Tumorzellen (BJAB-Zellen) nach der Behandlung^[17] mit **4g** (Abbildung 3).

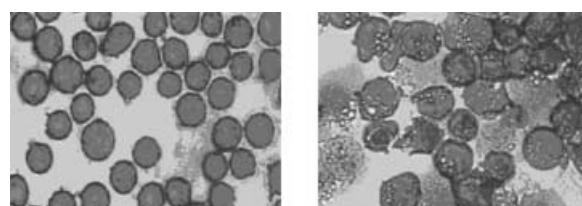


Abbildung 3. Behandlung von kultivierten BJAB-Tumorzellen (links) mit **4g** (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) führt zur Apoptoseinduktion. Daraus resultieren typische morphologische Veränderungen (blebbing) (rechts; nach 24 h).

Viele Cytostatika schädigen (unerwünscht) konzentrationsabhängig die Membran, was zum Zelltod durch Nekrose führt. Durch Bestimmung der ins Kulturmedium freigesetzten Lactatdehydrogenase (LDH) konnten wir zeigen, dass **4g** bei Konzentrationen $\leq 100 \mu\text{M}$ die Lebensfähigkeit von BJAB-Zellen nach 4 h nicht signifikant beeinträchtigt (Abbildung 4a). Dies belegt, dass nekroseartige, lytische Mecha-

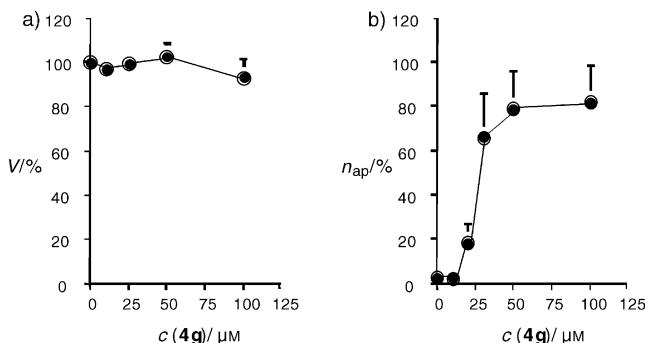


Abbildung 4. Einfluss von **4g** auf a) die Lebensfähigkeit V (Viability) nach 4 h und b) die Apoptose n_{ap} von BJAB-Zellen nach 48 h. Die Lebensfähigkeit wurde durch LDH-Freisetzung bestimmt und prozentual zum Messwert eines Kontrollversuchs $\pm \text{SD}$ ($n=3$) angegeben.^[18] Die Apoptose wurde durchflusszytometrisch gemessen und prozentual zum Wert von Zellen mit hypodiploider DNA $\pm \text{SD}$ ($n=3$) angegeben.^[19] Experimentelle Details siehe Hintergrundinformationen.

nismen nicht zur Cytotoxizität von **4g** beitragen. Bei fast 80% der Zellen induziert **4g** nach 48 h eine für Apoptose typische DNA-Fragmentierung. Die Apoptoseinduktion ist von der Konzentration von **4g** abhängig ($\text{EC}_{50} = 30 \mu\text{M}$; Abbildung 4b).

Um das antileukämische Potenzial der Nucleoside zu testen, wurde ein Ex-vivo-DNA-Fragmentierungs-Assay durchgeführt. Dabei wurden primäre leukämische Lymphoblasten von Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) eingesetzt. **4g** erwies sich auch hier als ein sehr effizienter apoptoseinduzierender Wirkstoff.^[20]

Wir haben gezeigt, dass eisenhaltige Nucleosidanaloge vom Typ **4** und **5** eine neue Klasse von cytostatischen, apoptoseinduzierenden Wirkstoffen sind. Damit wurde ein neues Kapitel der biometallorganischen Chemie aufgeschlagen. Zurzeit erforschen wir die Wirkungsmechanismen und dabei die Funktion der $\text{Fe}(\text{CO})_3$ -Gruppe. Des Weiteren entwickeln wir Verbindungen mit besseren pharmakologischen Eigenschaften.

Eingegangen am 22. Oktober 2003 [Z53132]

Stichwörter: Carbonylkomplexe · Eisen · Nucleoside · Syntheseplanung · Tumortherapeutika

[1] a) E. Heßler, H.-G. Schmalz, G. Dürner, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 4547; b) E. Heßler, Dissertation, Universität Frankfurt am Main, **1993**; Übersichten zu Dien- $\text{Fe}(\text{CO})_3$ -Komplexen in der Synthese: c) R. Gree, *Synthesis* **1989**, 341; eine theoretische Studie $\text{Fe}(\text{CO})_3$ -stabilisierter reaktiver Zwischenstufen: d) A.

Pfletschinger, H.-G. Schmalz, W. Koch, *Eur. J. Inorg. Chem.* **1999**, 1869.

- [2] U. Niedballa, H. Vorbrüggen, *J. Org. Chem.* **1974**, 39, 3654.
- [3] Übersichten: a) W. Beck, K. Severin, *Chem. Unserer Zeit* **2002**, 36, 356; b) „The Bio Side of Organometallics“: R. Dagani, *Chem. Eng. News* **2002**, 80(37), 23; c) R. H. Fish, G. Jaouen, *Organometallics* **2003**, 22, 2166.
- [4] a) D. M. Huryn, M. Okabe, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1745; b) *Nucleosides and Nucleotides as Antitumor and Antiviral Agents* (Hrsg.: C. K. Chu, D. C. Baker), Plenum, New York, **1993**; c) R. J. Young, R. Challand, *Antiviral Chemotherapy*, Pergamon, Oxford, **1996**.
- [5] Siehe z. B.: a) K. Schmidt, M. Jung, R. Keilitz, B. Schnurr, R. Gust, *Inorg. Chim. Acta* **2000**, 306, 6; b) G. Jaouen, S. Top, A. Vessieres, P. Pigeon, G. Leclercq, I. Laios, *Chem. Commun.* **2001**, 383; ein aktueller Überblick: c) T. R. Johnson, B. E. Mann, J. E. Clark, R. Foresti, C. J. Green, R. Motterlini, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 3850; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 3722.
- [6] H.-G. Schmalz, A. Prokop, T. Wieder, P. Daniel, PCT Int. Appl. WO 02/80923A1, **2002** [*Chem. Abstr.* **2002**, 137, 295194; AN 2002:793423]
- [7] a) G. Magnusson, N. Rehnberg, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 5467; b) G. Magnusson, *Chem. Scr.* **1987**, 27, 571.
- [8] a) H.-G. Schmalz, E. Heßler, J. W. Bats, G. Dürner, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 4543; Übersicht über diastereoselektive Komplexiereungen: b) R. S. Paley, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 1493.
- [9] Die Konfiguration der Komplexiereungsprodukte wurde durch NMR- und CD-Korrelationen sowie durch Röntgenbeugungsexperimente mit **18** und dem aus **13** erhaltenen Desilylierungsprodukt bestätigt.
- [10] Die Methode basiert auf: a) I. Kalwinsh, K.-H. Metten, R. Brückner, *Heterocycles* **1995**, 40, 939; b) F. C. Görth, A. Umland, R. Brückner, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1055.
- [11] a) H. Vorbrüggen, K. Krolkiewicz, B. Bennua, *Chem. Ber.* **1981**, 114, 1234; b) H. Vorbrüggen, G. Höfle, *Chem. Ber.* **1981**, 114, 1256; c) T. L. Su, B. Bennua, H. Vorbrüggen, H. J. Lindner, *Chem. Ber.* **1981**, 114, 1269; d) H. Vorbrüggen, B. Bennua, *Chem. Ber.* **1981**, 114, 1279.
- [12] Der Ort der Substitution (N^1 - oder N^4 -Substitution am Heterocyclus) wurde NMR-spektroskopisch zugeordnet (NOEs und Fernkopplungen).
- [13] Die Konfiguration wurde NMR-spektroskopisch zugeordnet (Kopplungen und NOEs zwischen den Wasserstoffatomen an den substituierten Positionen des Dihydrofurans).
- [14] Wir danken Dr. J. Balzarini, Rega Institute, Leuven, für die Durchführung der Tests auf antivirale Wirkung.
- [15] Monographie: M. D. Jacobson, N. McCarthy, *Apoptosis*, Oxford University Press, Oxford, **2002**, Überblicke: S. Grimm, *Chem. Unserer Zeit* **2003**, 37, 172; F. Höffeler, *Biol. Unserer Zeit* **2004**, 34, 16.
- [16] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2000**, 100, 57.
- [17] BJAB: „Burkitt-like lymphoma cell line“, Charakterisierung: T. Wieder, F. Essmann, A. Prokop, K. Schmalz, K. Schulze-Osthoff, R. Beyaert, B. Dörken, P. T. Daniel, *Blood* **2001**, 97, 1378.
- [18] T. Wieder, C. E. Orfanos, C. C. Geilen, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 11025.
- [19] T. Wieder, A. Prokop, B. Bagci, F. Essmann, D. Bernicke, K. Schulze-Osthoff, B. Dörken, H.-G. Schmalz, P. T. Daniel, G. Henze, *Leukemia* **2001**, 15, 1735.
- [20] Die Apoptoseinduktion durch **4g** in BJAB-Zellen wurde zusätzlich durch Western-Blot-Analyse der Caspase-3-Prozessierung belegt. Die Prozessierung wurde nach einer Inkubationszeit von 18 h ($20 \mu\text{M}$) gemessen. Details der Methode: A. Prokop, T. Wieder, I. Sturm, F. Essmann, K. Seeger, C. Wuchter, W.-D. Ludwig, G. Henze, B. Dörken, P. T. Daniel, *Leukemia* **2000**, 14, 1606.