

Röntgenstrukturanalyse dieser Form (**6**) bei Zimmertemperatur zeigt im Vergleich mit der protonierten Form **4** bei gleicher Temperatur eine Zunahme des O1-N101-Abstands von 2.620(3) auf 2.641(2) Å<sup>[8]</sup>. Zugleich wächst der O4-N102-Abstand von 2.593(2) Å auf 2.623(2) Å. Dies ist vergleichbar mit der Zunahme des O-O-Abstands bei der Deuterierung der freien Quadratsäure<sup>[12]</sup> und deutet auf das Vorliegen eines Doppelminimum-potentials hin<sup>[13]</sup>. Wird die deuterierte Form **6** erhitzt, so ist bis zur Zersetzungstemperatur von ca. 225 °C keine Farbänderung zu beobachten.

Ein solch starker Isotopeneffekt (Erhöhung der Phasenumwandlungstemperatur) wurde auch bei der freien Quadratsäure gefunden<sup>[14]</sup>. Dies gibt Grund zu der Annahme, daß auch in unserem Fall die rote Hochtemperaturmodifikation durch Protonentransfer aus der gelben Zimmertemperaturmodifikation gebildet wird. Dadurch werden die Elektronen-Donor-Acceptor-Eigenschaften der beteiligten Ionen beeinflußt.

Erste Versuche weisen darauf hin, daß **4** auch unter hydrostatischem Druck einen reversiblen Phasenübergang durchläuft. So ähneln das Festkörper-UV-VIS-Spektrum und das Pulverdiffraktogramm einer für 60 s auf 11 kbar gepreßten Pulverprobe von **4** nach dem Entspannen denen der ehemals erhitzten Form.

Ein eingegangen am 1. Juli,  
veränderte Fassung am 23. August 1993 [Z 6183]

- [1] T. Mitani, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1989**, *171*, 343.
- [2] T. Inabe, K. Okinawa, H. Okamoto, T. Mitani, Y. Murayama, S. Takeda, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1992**, *216*, 229.
- [3] K. Nakasuiji, K. Sugiura, T. Kitagawa, J. Toyada, H. Okamoto, K. Okinawa, T. Mitani, H. Yamamoto, I. Murata, A. Kawamoto, J. Tanaka, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1862.
- [4] S. R. Byrn, D. Y. Curtin, J. C. Paul, *Acc. Chem. Res.* **1973**, *7*, 217; Q. C. Yang, M. F. Richardson, J. D. Dunitz, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5535; *Acta Crystallogr. Sect. B* **1989**, *45*, 312.
- [5] H. Bock, W. Seitz, Z. Havlas, J. W. Bats, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 410; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 411.
- [6] Reaktion von äquimolaren Mengen **1** und **2** in heißem Wasser liefert nach dem Abkühlen nahezu quantitativ einen leicht gelbbrauen Niederschlag von **3**. Durch Umkristallisieren aus Wasser lassen sich für die Röntgenstrukturanalyse geeignete Einkristalle von **4** und **5** erhalten. Elementaranalyse ( $C_{14}H_{10}N_2O_4$ ): berechnet: C 62.21 %, H 3.74 %, N 10.37%; gefunden: C 61.95 %, H 3.81 %, N 10.31 %. Schmp. ca. 225 °C (Zers.).
- [7] Übersicht über Polymorphe von organischen Festkörpern: J. Bernstein in *Organic Solid State Chemistry* (Hrsg.: D. R. Desiraju), Elsevier, Amsterdam, **1987**, S. 471.
- [8] Kristallstrukturuntersuchungen ( $Cu_K\alpha$ -Strahlung): **4** (183 K), monoklin,  $P2_1/n$ ,  $a = 3.758(1)$ ,  $b = 11.196(1)$ ,  $c = 27.351(2)$  Å;  $\beta = 92.95(1)^\circ$ ,  $Z = 4$ ,  $\rho_{\text{ber.}} = 1.562 \text{ g cm}^{-3}$ ;  $R = 0.052$  ( $R_w = 0.057$ ) für 1701 unabhängige Reflexe. **5** (173 K), triklin,  $P1$ ,  $a = 9.619(1)$ ,  $b = 10.679(2)$ ,  $c = 12.726(4)$  Å,  $\alpha = 70.17(3)$ ,  $\beta = 85.83(2)$ ,  $\gamma = 70.08(1)^\circ$ ,  $Z = 4$ ,  $\rho_{\text{ber.}} = 1.55 \text{ g cm}^{-3}$ ;  $R = 0.049$  ( $R_w = 0.053$ ) für 2859 unabhängige Reflexe. **4** (293 K), monoklin,  $P2_1/n$ ,  $a = 3.800(1)$ ,  $b = 11.208(1)$ ,  $c = 27.447(2)$  Å,  $\beta = 92.22(1)^\circ$ ,  $Z = 4$ ,  $\rho_{\text{ber.}} = 1.537 \text{ g cm}^{-3}$ ;  $R = 0.061$  ( $R_w = 0.041$ ) für 1734 unabhängige Reflexe. **6** (293 K), monoklin,  $P2_1/n$ ,  $a = 3.793(1)$ ,  $b = 11.175(1)$ ,  $c = 27.581(4)$  Å,  $\beta = 91.99(1)^\circ$ ,  $Z = 4$ ,  $\rho_{\text{ber.}} = 1.536 \text{ g cm}^{-3}$ ;  $R = 0.036$  ( $R_w = 0.036$ ) für 1445 unabhängige Reflexe. Weitere Einzelheiten zu den Kristallstrukturuntersuchungen können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen, unter der Angabe der Hinterlegungsnummer CSD-57835 angefordert werden.
- [9] E. Patton, R. West, *J. Phys. Chem.* **1970**, *74*, 2512; L. A. Ashton, J. I. Bullock, P. N. G. Simpson, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* **1982**, 343; J. Ulstrup, *Acta Chem. Scand.* **1971**, *25*, 3397.
- [10] H. Endres, M. Schendzielorz, *Acta Crystallogr. Sect. C* **1984**, *40*, 453.
- [11] H. B. Bürgi, J. D. Dunitz, *Acc. Chem. Res.* **1983**, *16*, 153.
- [12] D. Semmingsen, *Acta Chem. Scand. Ser. A* **1975**, *29*, 470.
- [13] T. R. Singh, J. L. Wood, *J. Phys. Chem.* **1969**, *50*, 3572.
- [14] F. J. Hollander, D. Semmingsen, F. F. Koetzle, *J. Chem. Phys.* **1977**, *67*, 4825.

## Calicheamicin $\theta_1^1$ : durch Moleküldesign zu einer Verbindung, die DNA selektiv und effizient spaltet und Zelltod auslöst\*\*

K. C. Nicolaou\*, T. Li, M. Nakada, C. W. Hummel, A. Hiatt und W. Wrasidlo

Calicheamicin  $\theta_1^1$  **1** (Abb. 1 A), ein biologisch aktives und selektiv wirksames Endiin<sup>[1]</sup>, wurde, in Kenntnis der Wirkungsweise des natürlich vorkommenden Calicheamicins  $\gamma_1^1$  **2**<sup>[2]</sup>, designed. Dieses neue Endiin wurde so konstruiert, daß es – anders als sein natürliches Analogon – unter mild basischen Bedingungen<sup>[3]</sup> von Hydroxid-Ionen (Abb. 1 B) aktiviert wird. Hierbei entstehen 1,4-Phenyl-Diradikale<sup>[4]</sup>, die Doppelstrang-DNA spalten können. Durch Totalsynthese hergestelltes Calicheamicin  $\theta_1^1$  **1** spaltet DNA wirksam (Konzentrationen  $< 10^{-9} \text{ M}$  genügen) und selektiv (an TCCT-, TTTT- und CTCT-Sequenzen) bei pH 7.5 und 37 °C. Es löst den programmierten Zelltod (Apoptose)<sup>[5]</sup> in einer Konzentration  $< 10^{-10} \text{ M}$  aus und tötet Zellen in noch geringerer Konzentration ( $< 10^{-12} \text{ M}$ ); die Wirksamkeit übertrifft in einigen Fällen die von Calicheamicin  $\gamma_1^1$  **2**, MRA-CN (= 3-Cyan-4-morpholinyllderivat des Anthracyclins Doxorubicin)<sup>[6]</sup> und Ricin<sup>[7]</sup>, Substanzen, die zu den toxischsten Verbindungen überhaupt gehören.

Die Wirkungsweise von Calicheamicin  $\gamma_1^1$  **2**<sup>[8]</sup> (Abb. 1 B), bei dem ein starkes Nucleophil, z.B. ein Thiolat-Ion, eine Kette von Reaktionen auslöst, die zur DNA-Schädigung führen<sup>[9, 10]</sup>, und unsere Absicht, ein Molekül zu konstruieren, das auf andere Weise aktiviert wird, führten uns zu Calicheamicin  $\theta_1^1$  **1**, das anstelle der Trisulfidfunktion eine Thioacetylgruppe als reaktives Zentrum enthält. **1** sollte von sauerstoffhaltigen Nucleophilen, z.B. Hydroxid-Ionen, oder schwefel- oder stickstoffhaltigen Nucleophilen aktiviert werden; **2** wird normalerweise von Thiolen aktiviert. Calicheamicin  $\theta_1^1$  **1** sollte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Vorteile bieten, da es besonders einfach zu aktivieren ist. Nicht nur die Art und Weise der Aktivierung unterscheidet **1** von **2**; trotz der strukturellen Ähnlichkeit zwischen den Verbindungen kann **1** nicht aus dem Naturstoff **2** hergestellt werden. Die hierfür benötigten chemischen Reaktionen würden **1** zugleich aktivieren und damit zerstören. Unsere Befunde sind deshalb unter den Aspekten Moleküldesign<sup>[11]</sup>, chemische Synthese und biologische Eigenschaften von Bedeutung.

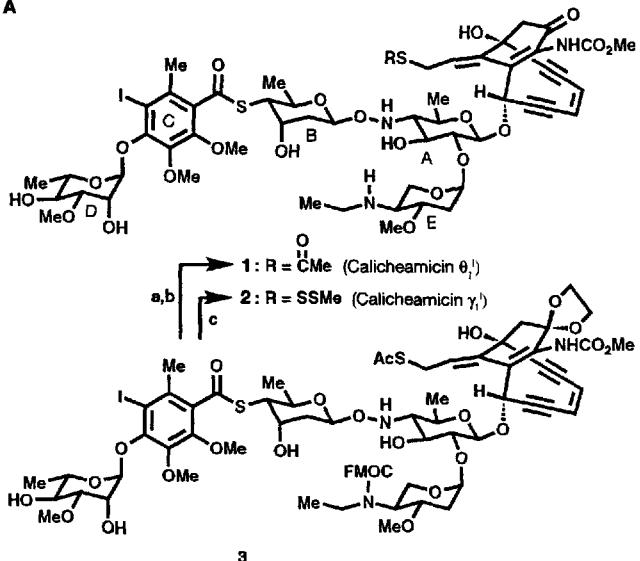
Calicheamicin  $\theta_1^1$  **1** wurde durch eine Totalsynthese erhalten, für die ein vor kurzem beschriebener Syntheseweg<sup>[12–15]</sup> für Calicheamicin  $\gamma_1^1$  **2** variiert wurde. Danach wurde das früher synthetisierte Zwischenprodukt **3**<sup>[12–15]</sup> bei Raumtemperatur 48 h mit *para*-Toluolsulfonsäure in wäßrigem Tetrahydrofuran behandelt. Zugabe von wasserhaltigem Diethylamin führte dann in 75% Ausbeute zu **1**, dessen physikalische Eigenschaften in der Legende zu Abbildung 1 zusammengefaßt sind.

Die superspiralisierte DNA des Phagen  $\Phi X$  174 wurde bei 37 °C in Pufferlösungen verschiedener pH-Werte mit **1** und **2** inkubiert und die Spaltung mit Agarose-Gelektrophorese verfolgt (Abb. 2). Das synthetische Calicheamicin  $\theta_1^1$  **1** schneidet schon in sehr niedrigen Konzentrationen Doppel- und Einzel-

[\*] K. C. Nicolaou, T. Li, M. Nakada, C. W. Hummel, A. Hiatt, W. Wrasidlo  
Department of Chemistry, The Scripps Research Institute  
10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)  
und  
Department of Chemistry, University of California  
San Diego, 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093 (USA).

[\*\*] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (USA) und vom Scripps Research Institute gefördert. Wir danken Dr. Darryl Rideout und Z. Zeng für Diskussionen, E. N. Pitsinos, Dr. H. Saito, Dr. K. Shishibayama, Dr. Y. Mizuno und Dr. K.-U. Baldenius für ihre Unterstützung bei Synthesen sowie Robert Merlock und Gail Hum für Hilfe bei den biologischen Tests.

A



B

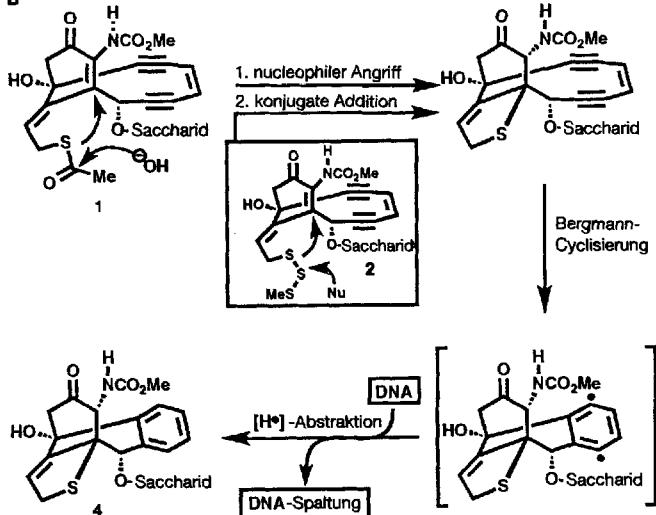


Abb. 1. A) Strukturformeln des konstruierten und des natürlich vorkommenden Calicheamincins  $\theta_1$  bzw.  $\gamma_1$  2 sowie ihre Synthese aus der Vorläuferverbindung 3. a)  $TsOH \cdot H_2O$ ,  $THF/H_2O$  (50:1),  $25^\circ C$ , 48 h, 100% (auf 57 % Umsatz bezogen); b)  $Et_2NH/THF/H_2O$  (5:25:1),  $25^\circ C$ , 2 h, 75%; c) siehe Lit. [10–13]. FMOC = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl, Ar = Aryl, eq = äquatorial, ax = axial. Physikalische Eigenschaften von 1:  $R_f$  = 0.13 (Dichlormethan/Ethylacetat/Methanol = 5.5:4:0.5);  $[\alpha]^{25}_D$  =  $-147.6$  ( $c = 0.59$ ,  $CHCl_3$ ); IR (KBr):  $\nu_{max}$  = 3443, 2932, 1683, 1456, 1390, 1325, 1243, 1074, 959, 913  $cm^{-1}$ ;  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 6.21 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H,  $CH-C\equiv C$ ), 6.14 (dd,  $J = 9.8$ , 5.1 Hz, 1H,  $C=CH-CH_2$ ), 5.87 (d,  $J = 9.5$  Hz, 1H,  $CH=CH$ ), 5.81 (dd,  $J = 9.4$ , 1.6 Hz, 1H,  $CH=CH$ ), 5.72 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H, D-1), 5.70 (d,  $J = 3.2$  Hz, 1H, E-1), 5.02 (dd,  $J = 10.2$ , 1.8 Hz, 1H, B-1), 4.70 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, A-1), 4.47 (dd,  $J = 3.2$ , 1.7 Hz, D-2), 4.31 (m, 1H, B-3), 4.18 (dq,  $J = 9.6$ , 6.1 Hz, 1H, D-5), 4.06 (dq,  $J = 10.9$ , 6.2 Hz, 1H, B-5), 4.03 (dd,  $J = 9.7$ , 9.7 Hz, 1H, A-3), 3.91–3.56 (m, 8H), 3.88 (s, 3H,  $ArOCH_3$ ), 3.82 (s, 3H,  $ArOCH_3$ ), 3.76 (dd,  $J = 10.9$ , 2.5 Hz, 1H, B-4), 3.69 (bs, 3H,  $NHCO_2CH_3$ ), 3.63 (dd,  $J = 9.5$ , 9.5 Hz, 1H, D-4), 3.56 (s, 3H,  $CH_3O-D$ -Ring), 3.42 (s, 3H,  $CH_3O-E$ -Ring), 2.85 (AB- $q$ ,  $J = 16.7$  Hz,  $\Delta\nu = 259$  Hz, 2H,  $CH_2$ ), 2.74 (bm, 1H,  $CH_2N$ ), 2.65 (m, 1H, E-4), 2.54 (bm, 1H,  $CH_2N$ ), 2.38 (H, E-2eq), 2.36 (dd,  $J = 9.6$ , 9.6 Hz, 1H, A-4), 2.35 (s, 3H,  $ArCH_3$ ), 2.29 (s, 3H,  $CH_3CO$ ), 2.02 (m, 1H, B-2eq), 1.76 (m, 1H, B-2ax), 1.50 (m, 1H, E-2ax), 1.40 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, B-6), 1.36 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, A-6), 1.29 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, D-6), 1.16 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $CH_3CH_2N$ );  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 195.3, 192.6, 192.0, 151.5, 150.6, 143.0, 133.4, 130.2, 124.4, 123.5, 102.6, 100.9, 99.6, 99.5, 97.2, 93.5, 88.0, 82.9, 80.8, 75.7, 71.9, 71.8, 71.1, 70.4, 69.8, 69.1, 68.4, 68.3, 67.0, 61.7, 61.2, 60.9, 57.2, 56.1, 52.8, 51.6, 42.4, 36.8, 34.1, 30.5, 30.3, 29.7, 25.3, 18.9, 17.6 (2), 14.4; hochauflöste Fast-Atom-Bombardment(FAB)-Massenspektrum: ber. für  $C_{56}H_{74}In_3O_{22}S_2Cs$  ( $M + Cs$ ): 1464.2035, gef. 1464.2211. – B) Mechanismus der Aktivierung von 1 (und 2).

stränge in neutralem oder basischem Medium und ohne Zugabe von irgendwelchen Additiven; es übertrifft hierin Calicheamicin  $\gamma_1$  2, das unter vergleichbaren Bedingungen nahezu inaktiv ist. Sind allerdings Thiole zugegen, so ist 2 die aktiver Verbindung (die entsprechenden Daten sind hier nicht aufgeführt). Diese Beobachtung ist in Einklang mit den vorgeschlagenen Aktivierungsmechanismen der beiden Verbindungen. Ein weiterer interessanter Befund ist, daß die Fähigkeit von 1, DNA in neutralem oder basischem Medium zu spalten, durch Zugabe von Thiolen noch gesteigert wird. Dies war zu erwarten, da Schwefel-Nucleophile wesentlich nucleophiler sind als Sauerstoff-Nucleophile.

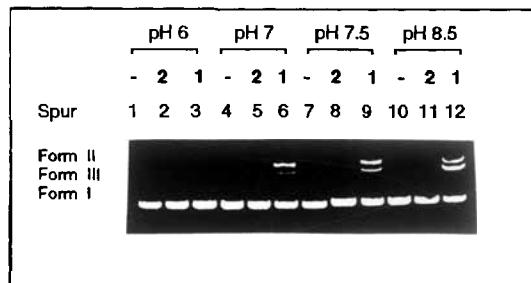


Abb. 2. Wechselwirkung von Calicheamicin  $\theta_1$  mit Doppelstrang-DNA. Agarose-Gelelektrophorese von superspiralierter  $\phi X$  174-DNA nach Spaltung mit 1 und 2. Das konstruierte Calicheamicin  $\theta_1$  1 spaltet unter schwach basischen Bedingungen Doppelstrang-DNA wirksamer als das natürlich vorkommende Calicheamicin  $\gamma_1$  2. Methoden: Superspiralisierte, ringförmig geschlossene DNA (Form I) des Phagen  $\phi X$  174 (200 ng) wurde in Pufferlösungen mit einem Gesamtvolumen von 10  $\mu L$  [Dimethylsulfoxid (DMSO)/tris-Puffer (4 mM) (1:99), 4 mM Ethylenediamintetraessigsäure (EDTA)] und verschiedenen pH-Werten bei  $37^\circ C$  12 h mit 10 nM 1 oder 2 inkubiert. Zur Elektrophorese wurde einprozentige Agarose mit einem Zusatz von Ethidiumbromid verwendet. Spuren 1, 4, 7 und 10: Kontrolle. Form I: superspiralierte DNA; Form II: entspannt-ringförmige DNA (nicked DNA); Form III: lineare DNA.

Wie der Naturstoff 2<sup>[9, 10, 16]</sup> sollte Calicheamicin  $\theta_1$  1 TCCT-, CTCT- und TTTT-Sequenzen auf der DNA-Helix erkennen und spalten. Der Oligosaccharidteil dieser Moleküle ist für die molekulare Erkennung verantwortlich; er bindet fest und selektiv<sup>[17, 18]</sup> an die genannten Sequenzen in der kleinen Furche der Doppelstrang-DNA (Abb. 3). Die Erwartung wurde in der Tat

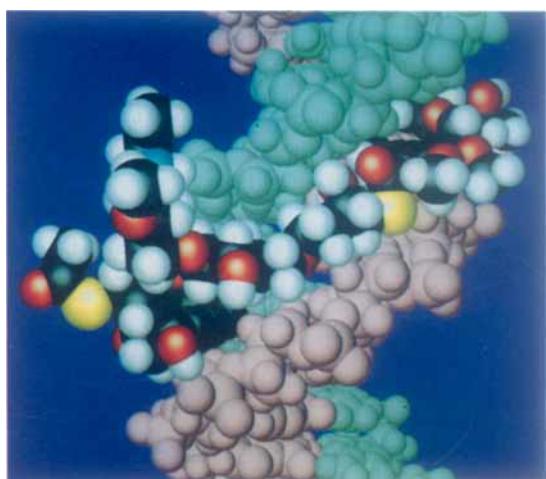


Abb. 3. Computererzeugtes Kalottenmodell von Calicheamicin  $\theta_1$  1, das in der kleinen Furche einer DNA-Doppelhelix an eine TCCT-Sequenz bindet (Sybyl-Molecular-Modelling-Programm; Modellierung und Photographie von Manos Pitsinos, University of California, San Diego, und The Scripps Research Institute).

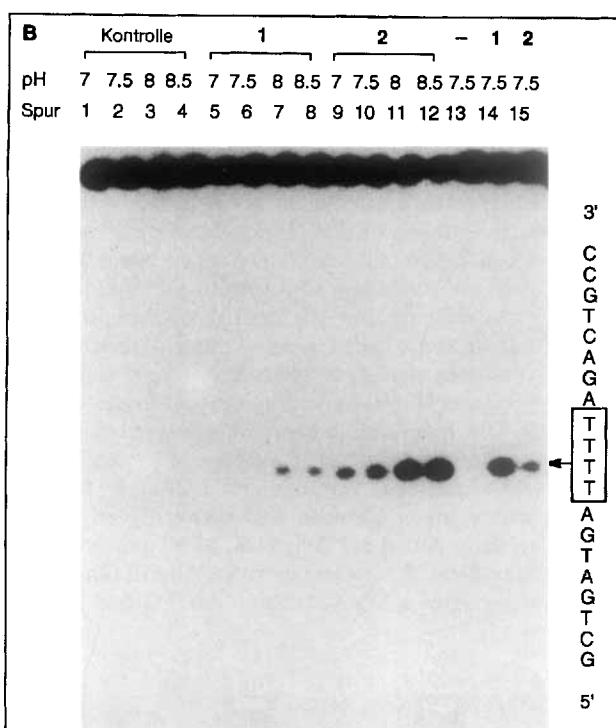
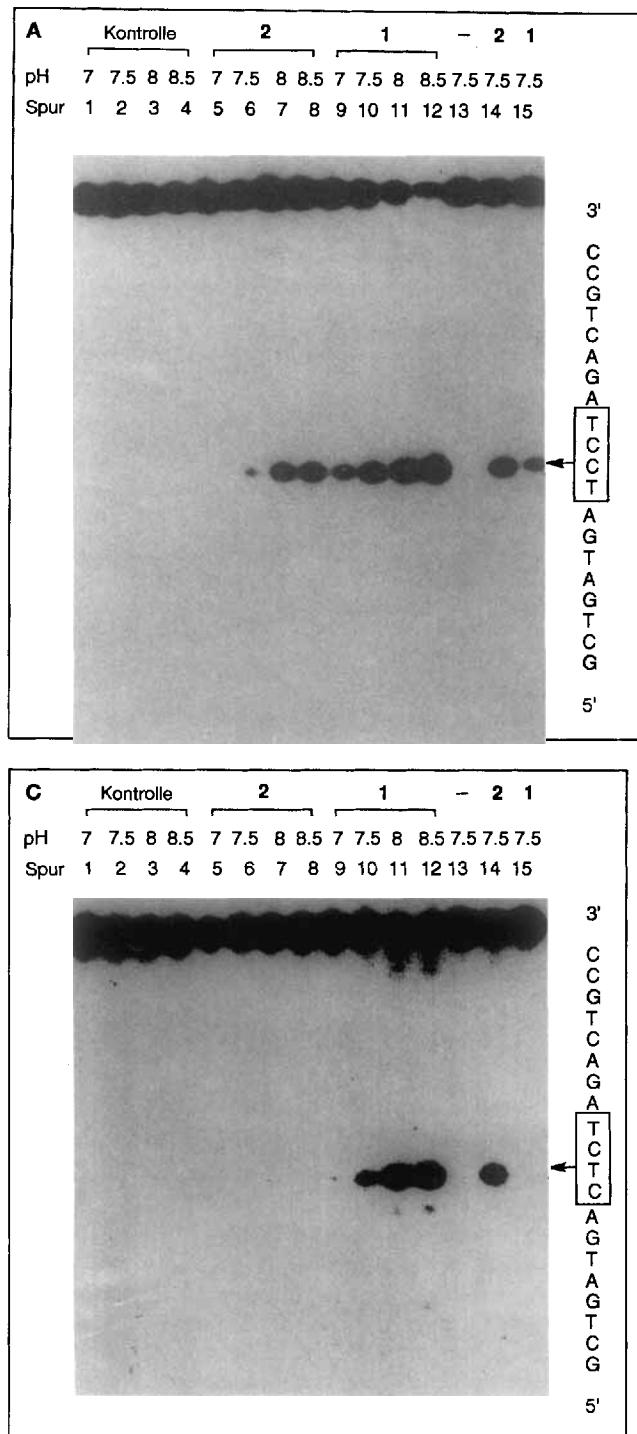


Abb. 4. Autoradiogramme denaturierender Gele. Gezeigt wird die selektive Spaltung doppelsträngiger, am 5'-Ende markierter Ikosanucleotid-DNA (20mer), die A) eine TCCT/AGGA-, B) eine TTTT/AAAA- und C) eine CTCT/GAGA-Sequenz enthält. Die DNA wird selektiv an der gekennzeichneten Tetranucleotid-Sequenz gespalten. Methoden: Die synthetische Doppelstrang-DNA (100 pm, Operon Technologies) wurde in Lösung bei verschiedenen pH-Werten inkubiert: mit 400  $\mu$ M 2 oder 1 (Spuren 5–8 bzw. Spuren 9–12) 4 h und mit 1  $\mu$ M 2 oder 1 (Spuren 14 bzw. 15) erst 20 min, dann wurde  $\beta$ -Mercaptoethanol (5 mM) zugegeben und weitere 15 min inkubiert. Spuren 1–4 und 13 sind Kontrollen. Alle Inkubationen fanden bei 37 °C in 50 mM Tris · HCl-Puffer/DMSO (97:3)-Lösungen statt, und die DNA jeder dieser Reaktionsmischungen wurde durch Elektrophorese aufgetrennt und durch Autoradiographie nachgewiesen.

Tabelle 1. Die Cytotoxizität [a] der Calicheamicine  $\theta_1^1$  und  $\gamma_1^1$ , 1 bzw. 2, für diverse nichttransformierte und Krebszelllinien.

Zelltype	Zelllinie	IC <sub>50</sub> [M]	1	2
<i>Krebszelllinien</i>				
Brustkrebs	BT-549	<10 <sup>-12</sup>	1.0 × 10 <sup>-9</sup>	
Pankreascarcinom	CAPAN 1	<10 <sup>-12</sup>	1.3 × 10 <sup>-9</sup>	
Lungenkrebs	H322	1.0 × 10 <sup>-9</sup>	1.7 × 10 <sup>-8</sup>	
B-Zell-Leukämie	HL-60	<10 <sup>-12</sup>	<10 <sup>-12</sup>	
T-Zell-Leukämie	MOLT-4	<10 <sup>-12</sup>	<10 <sup>-12</sup>	
Coloncarcinom	HT-29	<10 <sup>-12</sup>	7.0 × 10 <sup>-9</sup>	
Brustkrebs	MCF-7	1.2 × 10 <sup>-11</sup>	4.1 × 10 <sup>-8</sup>	
Ovarcarcinom	OVCAR-3	<10 <sup>-12</sup>	2.2 × 10 <sup>-9</sup>	
Lungenkrebs	UCLA-P-3	<10 <sup>-12</sup>	1.7 × 10 <sup>-9</sup>	
Prostatacarcinom	PC-3	<10 <sup>-12</sup>	4.4 × 10 <sup>-9</sup>	
Weichteilcarzinom	SIHA	<10 <sup>-12</sup>	6.7 × 10 <sup>-10</sup>	
Melanom	SK-MEL 28	<10 <sup>-12</sup>	1.6 × 10 <sup>-9</sup>	
metastasierendes Melanom	M24 MET	<10 <sup>-12</sup>	1.0 × 10 <sup>-9</sup>	
ZNS-Carcinom	U251	9.9 × 10 <sup>-9</sup>	1.1 × 10 <sup>-9</sup>	
Nebennierenrindencarcinom	786-0	<10 <sup>-12</sup>	1.0 × 10 <sup>-8</sup>	
<i>nichttransformierte Zelllinien</i>				
Ovar des chinesischen Hamsters	CHO	4.3 × 10 <sup>-9</sup>	1.2 × 10 <sup>-9</sup>	
menschliches Brustepithel	HMEC	<10 <sup>-12</sup>	1.0 × 10 <sup>-9</sup>	
menschliche Hautfibroblasten	NHDF	<10 <sup>-12</sup>	1.0 × 10 <sup>-9</sup>	
periphere Blutzymphoblasten	RPMI 7666	<10 <sup>-12</sup>	1.6 × 10 <sup>-9</sup>	

[a] Die Cytotoxizität wurde mit dem Sulforhodamin-B-Test ermittelt (siehe Lit. [20]). Der IC<sub>50</sub>-Wert ist die Molarität, bei der 50 % der Zellen unter standardisierten Gewebekulturbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt der Luft) noch 72 h noch beweglich sind.

bestätigt: Die Verbindungen **1** und **2** wurden mit synthetischen Ikosanucleotiden (20meren), die TCCT-, TTTT- oder CTCT-Sequenzen enthielten, inkubiert (Abb. 4A–C); auch hier ist bemerkenswert, daß **1** in Abwesenheit von Additiven wirksamer ist als der Naturstoff **2**. Die Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol drehte diese Reihenfolge wie erwartet um.

Die Wirksamkeit von Calicheamicin  $\theta_1^1$  wurde anhand einer Vielzahl von Zelllinien erprobt. Die Auswahl reichte von der relativ unempfindlichen Melanomzelllinie SK-MEL 28 bis hin zu der hochempfindlichen Leukämiezelllinie MOLT-4 und enthielt auch einige nichttransformierte Zelllinien (Tabelle 1). In einigen Fällen ist die synthetische Verbindung **1** wirksamer als

das natürlich vorkommende Calicheamicin  $\gamma_1^1$  2. Vergleichende Experimente mit anderen hoch cytotoxischen Substanzen, z.B. MRA-CN<sup>[6]</sup> und Ricin<sup>[7]</sup> (die Ergebnisse werden hier nicht im Detail beschrieben), ergaben eine gleichartige oder höhere Wirksamkeit der Verbindung 2. Besonders bedeutsam ist die starke Wirkung dieser Verbindung auf Brust-, Colon-, Prostata- und SK-MEL-28-Melanomzelllinien.

Um weiteren Einblick in den Wirkmechanismus von 1 zu erhalten, wurden Zellen mit den Verbindungen 1 und 2 behandelt und danach auf Anzeichen von Apoptose<sup>[5, 19]</sup> untersucht. An MOLT-4-Leukämiezellen, die geringen Konzentrationen von 1 und 2 ausgesetzt worden waren, konnten tatsächlich die typischen Anzeichen der Apoptose (verdichtetes Chromatin und DNA-Abbau zu Nucleosomenfragmenten) festgestellt werden (Abb. 5). Die apoptotische Morphologie war bei Verwendung des Calicheamicins 1 stärker ausgeprägt als bei der der natürlich vorkommenden Verbindung 2 (Abb. 5F und D). Obendrein wurde, unter gleichen Bedingungen, von Verbindung 1 ein größerer Anteil der Zellen (ca. 66 %) angegriffen als von Verbindung 2 (ca. 28 %). Der verstärkte Angriff führte auch zu einem ausgeprägteren DNA-Abbau (Abb. 5G und E).

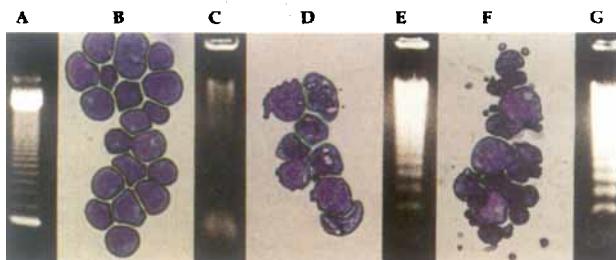


Abb. 5. Veränderung der Zell-Morphologie durch Apoptose und Abbau der Kern-DNA, beides verursacht durch Calicheamicin  $\theta_1^1$  und  $\gamma_1^1$ , 1 bzw. 2. A) Molekulargewichtsmarker, bestehend aus Multiplen eines 123-Basenpaarfragments der Firma Gibco BRL. B) Unbehandelte MOLT-4-Leukämiezellen. C) Aus unbehandelten MOLT-4-Leukämiezellen extrahierte DNA. D) MOLT-4-Zellen, die mit  $10^{-10}$  M 2 behandelt wurden. E) DNA, die aus mit  $10^{-8}$  M 2 behandelten MOLT-4-Zellen extrahiert wurde. F) MOLT-4-Zellen, die mit  $10^{-10}$  M 1 behandelt wurden. G) DNA, die aus mit  $10^{-8}$  M 1 behandelten MOLT-4-Zellen extrahiert wurde. Methoden: Lösungen von Calicheamicin 1 oder 2 in DMSO ( $10^{-3}$  M) wurden mit Kulturmedium zu den entsprechenden Konzentrationen verdünnt und zu den Zellkulturen gegeben. MOLT-4-Zellen ( $10^5$ ) wurden mit 1 und 2 in Konzentrationen von  $10^{-10}$  M zur Untersuchung der Apoptose und von  $10^{-8}$  M zur Untersuchung des DNA-Abbaus inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 4 h bei  $37^\circ\text{C}$  wurden die Zellen geerntet und, wie in Lit. [18] beschrieben, weiterverarbeitet, um die durch Apoptose veränderte Zell-Morphologie und den DNA-Abbau bildlich darzustellen.

Die hier beschriebenen chemischen und biologischen Befunde demonstrieren die Leistungsfähigkeit der Organischen Chemie; heute lassen sich komplizierte Moleküle mit einer spezifischen biologischen Wirkung planen und synthetisieren. Die Totalsynthese von Calicheamicin  $\theta_1^1$  1 und die Erforschung seiner Eigenschaften – 1 spaltet hochwirksam und selektiv DNA, löst Apoptose aus und ist cytotoxisch – tragen zu unserer Kenntnis der DNA-Spaltung und des Zelltodes bei. Anwendung könnte die Verbindung 1 beim spezifischen Schneiden von DNA und in der Apoptoseforschung finden. Als hochwirksame cytotoxische und möglicherweise cancerostatische Substanz verdienen 1 und andere neue Calicheamicin-Derivate weitere Untersuchung.

Eingegangen am 26. August 1993 [Z 6319]

- [1] K. C. Nicolaou, W.-M. Dai, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1453–1481; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1387–1416.
- [2] M. D. Lee, G. A. Ellestad, D. B. Borders, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 235–243.
- [3] J. H. Haseltine, S. J. Danishefsky, G. Schulte, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*,

7638–7640; J. Aiyar, S. J. Danishefsky, D. M. Crothers, *ibid.* **1992**, *114*, 7552–7554.

- [4] R. G. Bergman, *Acc. Chem. Res.* **1973**, *6*, 25–31.
- [5] R. E. Ellis, J. Yuan, H. R. Horvitz, *Annu. Rev. Cell. Biol.* **1991**, *7*, 663–698.
- [6] E. M. Acton, G. L. Tong, C. W. Mosher, R. L. Wolgemuth, *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 638–645.
- [7] V. Raso, J. Ritz, M. Basala, S. F. Schlossman, *Cancer Res.* **1982**, *42*, 457–464.
- [8] M. D. Lee, T. S. Dunne, M. M. Siegel, C. C. Chang, G. O. Morton, D. B. Borders, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3464–3466; M. D. Lee, T. S. Dunne, C. C. Chang, G. A. Ellestad, M. M. Siegel, G. O. Morton, W. J. McGahren, D. B. Borders, *ibid.* **1987**, *109*, 3466–3468.
- [9] N. Zein, A. M. Sinha, W. J. McGahren, G. A. Ellestad, *Science* **1988**, *240*, 1198–1201.
- [10] N. Zein, M. Porcini, R. Nilakantan, G. A. Ellestad, *Science* **1989**, *244*, 697–699.
- [11] K. C. Nicolaou, W.-M. Dai, S.-C. Tsay, V. A. Estevez, W. Wrasidlo, *Science* **1992**, *256*, 1172–1178.
- [12] K. C. Nicolaou, C. W. Hummel, E. N. Pitsios, M. Nakada, A. L. Smith, K. Shibayama, H. Saimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10082–10084; siehe auch: K. C. Nicolaou, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1462–1471; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1377–1385.
- [13] R. D. Groneberg, T. Miyazaki, N. A. Stylianides, T. J. Schulze, W. Stahl, E. P. Schreiner, T. Suzuki, Y. Iwabuchi, A. L. Smith, K. C. Nicolaou, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7593–7611.
- [14] A. L. Smith, E. Pitsios, C.-K. Hwang, Y. Mizuno, H. Saimoto, G. R. Scarlato, T. Suzuki, K. C. Nicolaou, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7612–7624.
- [15] K. C. Nicolaou, C. W. Hummel, M. Nakada, K. Shibayama, E. N. Pitsios, H. Saimoto, Y. Mizuno, K.-U. Baldenius, A. L. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7625–7635.
- [16] S. Walker, R. Landovitz, W. D. Ding, G. A. Ellestad, D. Kahne, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **1992**, *89*, 4608–4612.
- [17] R. C. Hawley, L. L. Kiessling, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **1989**, *86*, 1105–1109.
- [18] K. C. Nicolaou, S.-C. Tsay, T. Suzuki, G. F. Joyce, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7555–7557.
- [19] K. C. Nicolaou, P. Stabila, B. Esmaeli-Azad, W. Wrasidlo, A. Hiatt, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **1993**, *90*, 3142–3146.
- [20] P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, M. R. Boyd, *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107–1112.

## Struktur eines tumorhemmenden Bipyridyl-Kronenether-Platinkomplexes \*\*

Andreas Gund und Bernhard K. Keppler \*

*cis*-Diammin dichloroplatin(II) 1 (Schema 1) hat unter dem Namen Cisplatin in der Krebstherapie schon lange große Bedeutung. Auch einige Derivate dieses Stammkomplexes wie Iproplatin und Carboplatin<sup>[1]</sup> wurden schon klinisch angewendet. Neuerdings versucht man unter anderem, durch Kopplung mit Carriermolekülen Cisplatin und andere pharmakologisch wichtige Verbindungen bestimmten Geweben im Körper besser zugänglich zu machen, um so eine bessere Wirkung zu erreichen („drug targeting“). So konnten z.B. durch Bindung von Cisplatin an Phosphonsäuren, die eine hohe Affinität zur anorganischen Knochenmatrix Hydroxyapatit aufweisen, dort eine höhere Anreicherung und somit eine bessere therapeutische Wirksamkeit an Knochentumoren erzielt werden.

Das Ziel verminderter Nebenwirkungen bei gleicher Wirkksamkeit soll auch durch eine verbesserte Löslichkeit der Kom-

\* Priv.-Doz. Dr. Dr. B. K. Keppler, Dipl.-Chem. A. Gund  
Anorganisch-chemisches Institut der Universität  
Im Neuenheimer Feld 270, D-69120 Heidelberg  
Telefax: Int. + 6221/56-4955

\*\* Diese Arbeit wurde von der Deutschen Krebshilfe, Dr.-Mildred-Scheel-Stiftung für Krebsforschung, Bonn, und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Herrn Dr. Nuber danken wir für die Durchführung der röntgenografischen Messungen.