

Ein wasserlösliches Prodrug von Taxol mit der Fähigkeit zur Selbstorganisation**

Kyriacos Costa Nicolaou*, Rodney Kiplin Guy, Emmanuel Nicolaou Pitsinos und Wolfgang Wrasidlo

Taxol **1** (Abb. 1a) ist ein neues Antitumormittel, das ursprünglich aus der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*)^[11] isoliert wurde. Er hat infolge seiner erheblichen biologischen Aktivität in vivo^[12] intensive Forschungsbemühungen von Chemikern^[3–7], Biologen^[2, 6] und Medizinern^[2] ausgelöst. Trotz seines klinischen Einsatzes bei der Behandlung von Patientinnen mit Eierstockkrebs und ungeachtet der Tatsache, daß es als größerer Fortschritt in der Krebs-Chemotherapie gefeiert wird, ist ein großer Nachteil von Taxol seine extrem geringe Wasserlöslichkeit ($< 5 \times 10^{-6}$ M). Sie ist der Grund dafür, daß es in einer Mischung mit Cremaphor (einem polyoxyethylierten Rizinusöl) und Ethanol verabreicht wird. Diese Darreichungsform löst häufig signifikante Nebenwirkungen aus, zu denen starke Überempfindlichkeitsreaktionen gehören^[8]. Obwohl einige dieser klinischen Probleme durch medikamentöse Vorbehandlung und langsame Infusion des Medikaments über längere Zeitabstände umgangen werden können^[9], ist es eher mühsam, das vollständige Behandlungsprotokoll zu erstellen; eine umfassende Überwachung der Prozeduren und der Patienten ist erforderlich^[10]. Die klinische Anwendung des Medikaments wurde wegen seiner beeindruckenden Wirksamkeit trotz dieser Mängel vorangetrieben. Mit einer wasserlöslichen Form von Taxol könnten diese Schwierigkeiten völlig vermieden werden und sowohl seine Anwendungsmöglichkeiten erweitert als auch sein pharmakologisches Profil drastisch verbessert werden.

Es sind zahlreiche Versuche unternommen worden, die Löslichkeit und die pharmakologischen Eigenschaften des Taxols zu verbessern^[11–17]. Zu den bemerkenswertesten Taxolderivaten, die bisher synthetisiert wurden, gehören jene, bei denen die C-2'- und die C-7-Hydroxygruppe des Moleküls funktionalisiert sind und die bei In-vivo-Aktivierung unter Freisetzung von Taxol zerfallen. Verbindungen dieser Art, also solche, bei denen der Wirkstoff erst im Körper freigesetzt wird, werden als Prodrugs bezeichnet. Infolge fortdauernder Schwierigkeiten mit der Löslichkeit und der Bioverfügbarkeit konnte sich keines dieser Prodrugs in der klinischen Anwendung durchsetzen. Um diese Verbindungen mit Erfolg einsetzen zu können, müssen ihre Eigenschaften gleichsam auf Messers Schneide stehen: Einerseits müssen sie für die Verabreichung hydrophil sein, andererseits müssen sie für therapeutische Zwecke lipophil sein. Darüber hinaus müssen sie sich schnell von der hydrophilen in die lipophile Form umwandeln, um eine Ausscheidung über die Nieren zu vermeiden.

Im Rahmen eines Arbeitsprogramms, dessen Ziel der Entwurf und die chemische Synthese neuer C-2'- und C-7-Derivate des Taxols ist, stellten wir Taxol-2'-methylpyridiniumacetat, Taxol-

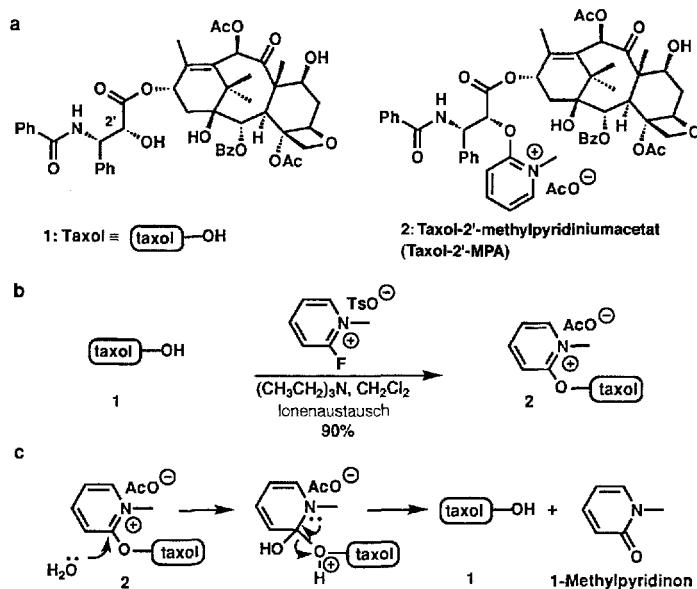


Abb. 1. a) Formeln von Taxol **1** und Taxol-2'-MPA **2**; b) Synthese von Taxol-2'-MPA **2**; und c) möglicher Mechanismus der Freisetzung von Taxol **1** aus Taxol-2'-MPA **2**. Methode: Taxol (10.2 mg, 0.012 mmol) wurde in Dichlormethan (0.4 mL) gelöst und bei Raumtemperatur unter trockenem Argon nacheinander mit frisch destilliertem Triethylamin (5 μ L, 0.036 mmol, 3 Äquiv.) und 2-Fluor-1-methylpyridiniumtosylat (10.0 mg, 0.035 mmol, 2.9 Äquiv.) versetzt. Die klare, farblose Lösung nahm schnell eine schwach gelbe Färbung an. Nach 30 min Rühren bei Raumtemperatur war die Reaktion vollständig (kein Taxol mehr vorhanden). Die anschließende HPLC-Analyse (Vydak 22.5 mm \times 250 mm C18-Säule, Gradient aus 10 mM NH₄OAc-Puffer (pH 6.0)/Methanol, 9 mL min⁻¹, UV, R_f : Taxol-2'-MPA, 26.2 min; Taxol, 28.2 min) zeigte nur eine Verbindung. Das Rohprodukt wurde mit HPLC gereinigt und ergab nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum Produkt **2** (11 mg) in 90% Ausbeute. ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1.07 (s, 3H, C16-H), 1.11 (s, 3H, C17-H), 1.62 (s, 3H, C19-H), 1.76 (s, 3H, C18-H), 1.85 (m, 1H, C6- β -H), 2.00 (s, 3H, C10-OAc), 2.1–2.2 (bm, 2H, C14-H), 2.2 (s, 3H, C4-OAc), 2.53 (s und m überlagert, 4H, C6-H, Gegenion OAc), 3.67 (d, 1H, J = 7.0 Hz, C3-H), 4.05 (s, 3H, N-CH₃), 4.10 (d, 1H, J = 8.5 Hz, C20-H, A von AB), 4.22 (d, 1H, J = 8.5, C20-H, B von AB), 4.31 (dd, 1H, J = 8.7, 10.7 Hz, C7-H), 4.87 (dd, 1H, J = 1.0, 7.7, C5-H), 5.50 (d, 1H, C2-H, J = 7.0), 5.70 (bt, 1H, J = 8.0, C2'-H), 5.95 (dd, 1H, J = 1.0, 8.0, C13-H), 6.20 (s, 1H, C10-H), 6.46 (bd, 1H, J = 10.0, C3'-H), 7.08 (t, 1H, N-H, J = 7.5), 7.33–7.45 (m, 7H, Ar-H), 7.57 (t, 2H, J = 8, Ar-H), 7.69 (d, 2H, J = 9.0, Hz, Ar-H), 7.79 (d, 1H, J = 9.0 Ar-H), 8.01 (dd, 2H, J = 1.0, 8.0, Ar-H), 8.14 (d, 1H, J = 8.0, Ar-H), 8.29 (d, 2H, J = 7.0, Ar-H), 8.41 (t, 1H, J = 7.0, Py-H), 10.48 (d, 1H, J = 7.0, Py-H). IR (in Substanz, KCl-Preßling) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3640–3120 (bm), 3030–2870 (bm), 2320 (m), 1720 (s), 1630 (m), 1560 (m), 1500 (m), 1360 (s), 1160 (m), 1070 (m), 700 (m). UV/VIS (CHCl₃): $\lambda_{\text{max}}^{[n]m}$ = 254, 280. FAB-HRMS: ber. für M^+ C₅₃H₅₇O₁₄N₂: 945.3810; gef. 945.3810.

2'-MPA **2**, her (Abb. 1a), eine Verbindung, die ziemlich reaktiv gegenüber einem nucleophilen Austausch sein sollte^[18]. Die Synthese dieser Verbindung gelang nach der Methode von Mukaiyama et al. aus Taxol **1** und 1-Fluor-1-methylpyridiniumtosylat (1.2 Äquiv.) in Dichlormethan (25 °C, 0.5 h)^[19]. Reinigung über Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) und nachfolgendes Lyophilisieren unter Austausch des Gegenions (Tosylat gegen Acetat) ergab reines Taxol-2'-MPA **2** als weißen, amorphen Feststoff in einer Ausbeute von 90% (Abb. 1b). Spektroskopische und analytische Daten stimmen mit Struktur **2** überein. Erste Untersuchungen, die nachstehend beschrieben werden, zeigten, daß diese Verbindung eine Reihe von wichtigen Eigenschaften hat: Hydrolysestabilität, hohe Wasserlöslichkeit, die Fähigkeit, in menschlichem Plasma schnell Taxol freizusetzen, Cytotoxizität und Antitumoreigenschaften ähnlich denen des Taxols sowie die Fähigkeit zur Selbstorganisation.

Taxol-2'-MPA **2** ist sowohl in festem Zustand als auch in wässrigen Lösungen sehr stabil. Bei allen Untersuchungen wurden als

* Prof. Dr. K. C. Nicolaou, R. K. Guy, E. N. Pitsinos, 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)
Telefax: Int. + 619/534-6738

** Wir danken Dr. R. Milligan und Dr. X. Chan für die TEM-Untersuchungen, S. Mauch für die In-vivo-Tierversuche, R. Merlock für die Entwicklung und Durchführung der HPLC- und Tubuli-Experimente, Gary Siuzdak für die Hilfe bei der Massenspektrometrie und D.-H. Huang für seine Unterstützung bei den NMR-Studien. Diese Arbeit wurde gefördert von den National Institutes of Health (USA), einem Graduiertenstipendium des Office of Naval Research (USA), für R. K. G. und dem Scripps Research Institute.

alleinige Zersetzungsprodukte Taxol **1** und das Pyridinon, das bei der Hydrolyse des Pyridiniumsalzes entsteht (Abb. 1c), nachgewiesen. Infolge der unterschiedlichen Retentionszeiten unter den angewendeten HPLC-Bedingungen und der unterschiedlichen UV-Absorptionsmaxima ($\lambda_{280}/\lambda_{254} = 1.6$ für **2** und 0.3 für **1**), konnte die Stabilität von **2** leicht mit HPLC unter UV-Detektion geprüft werden. Taxol-2'-MPA **2** ist in festem Zustand bei Raumtemperatur mindestens 30 Tage völlig stabil. In Wasser, 5proz. Dextrose- oder 0.9proz. Salzlösung ist **2** bei Raumtemperatur einige Tage stabil (Abb. 2), eine langsame Zersetzung setzt nach 4 Tagen ein. In Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS)

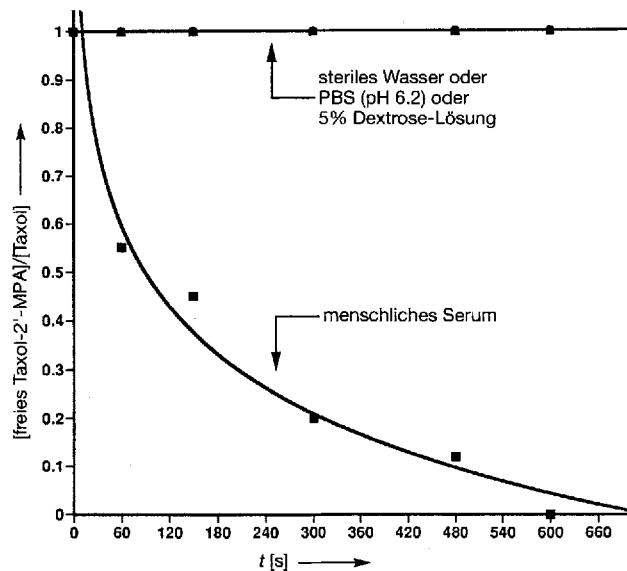


Abb. 2. Geschwindigkeit der Freisetzung von Taxol aus Taxol-2'-MPA **2** in wässrigen Lösungen bei 25 °C. In Wasser und wässrigen Pufferlösungen (horizontale Linie) ist **2** stabil. Dagegen beweist die Dichlormethan-Extraktion von Plasma, das mit **2** behandelt worden war, daß **2** in diesem Medium innerhalb von 10 min vollständig in Taxol **1** umgewandelt wird (Kurve, 20% der Gesamtmenge wurde bei dieser Extraktion zurückgewonnen). Methode: Taxol-2'-MPA **2** wurde mit einer fünfminütigen Ultraschallbehandlung im wässrigen System gelöst. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen, in Dichlormethan gegeben (um die Reaktion abzubrechen) und mit einem Waters-Maxima-HPLC-Gerät analysiert, das mit einem Autoinjektor bestückt war [3.9 × 300 mm 18-C-Säule mit einer Vorsäule bestückt; Fließgeschwindigkeit 1.5 mL min⁻¹; Elutionsmittelgradient A-B über 30 min, wobei A 80% 80 mM Ammoniumacetat (pH 6.0) und B 100% Methanol; UV-Dioden-Array-Detektor]. Das Verhältnis von **2** ($R_f = 16.2$ min) zu Taxol (**1**, $R_f = 16.8$ min) wurde aus den relativen Flächen der Signale bestimmt (nach Normierung mit zuvor bestimmten Eichkurven). Die Stabilitätsuntersuchungen in wässrigen Lösungen wurden über einen Zeitraum von über zwei Wochen fortgesetzt. Dabei trat in den gepufferten Lösungen geringfügig Zersetzung auf.

oder Ammoniumacetat-Puffern mit pH 6.0 bis 7.3 ist **2** bei Raumtemperatur mindestens 21 Tage stabil. In 5proz. HCl (pH 1.1), Kochsalzlösung (ca. 6 M wässrige NaCl-Lösung), ebenso wie in wässrigen ethanolischen Lösungen ist Taxol-2'-MPA **2** in unterschiedlichem Maße begrenzt stabil. Am wichtigsten ist jedoch, daß **2** sich schnell in Taxol **1** umwandelt, wenn es bei 37 °C mit menschlichem Plasma behandelt wird (<10 Minuten, Abb. 2). Auch mit reinem Albumin wird schnell Taxol **1** freigesetzt. Darüber hinaus wurden nach Verabreichung von tritiertem **2** an Mäuse nur 5% der Verbindung als Taxol über die Nieren ausgeschieden, ein Ergebnis, das in völliger Übereinstimmung mit dem Verhalten von Taxol selbst steht^[20]. Diese Ergebnisse weisen nachdrücklich darauf hin, daß **2** in vivo als ein Prodrug von Taxol fungiert. Es ist zu beachten, daß die ausgezeichnete Bioverfügbarkeit von **2** im Gegensatz zu einer Reihe bekannter Protaxole^[16] steht, die schnell über die Nieren ausgeschieden werden^[21]. Die Freisetzung von Taxol aus **2** ist

vermutlich das Ergebnis eines nucleophilen Angriffs von Wasser oder einem anderen Nucleophil auf die 2-Position der Pyridiniumeinheit, wie er in Abbildung 1c gezeigt ist. Unklar ist noch, ob diese schnelle Reaktion in menschlichem Plasma Enzym-unterstützt verläuft.

Die Löslichkeiten und Verteilungskoeffizienten von Taxol-2'-MPA **2** und Taxol **1** wurden mit HPLC bestimmt. In 100 mM Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) betrug die Löslichkeit von **2** 1.5 mM, und der Verteilungskoeffizient (Octanol/Wasser) betrug 50 (Taxol: <0.0015 mM bzw. 10 000). Die Löslichkeit von Taxol liegt an der Nachweisgrenze des verwendeten HPLC-Geräts und bildet somit einen oberen Grenzwert. Die Löslichkeit von **2** dagegen repräsentiert einen unteren Grenzwert, weil eine Konzentration gewählt wurde, bei der die Lösung klar und nicht kolloidal war. Verbindung **2** zeigt in mehreren Puffersystemen im pH-Bereich von 6.2 bis 7.4 ähnliche Löslichkeiten. In reinem Wasser scheint die Löslichkeit nur durch die Bildung klarer, farbloser Gele bei hohen Konzentrationen (> 20 mM) begrenzt zu sein. Diese Daten zeigen deutlich, daß **2** in Wasser um Größenordnungen besser löslich ist als die Stammverbindung Taxol **1**. Die Löslichkeiten von **2** in einer Reihe von wässrigen Systemen sind beträchtlich höher als die klinisch relevanten Dosen (3–30 µM) von Taxol.

Mikrotubuli-Polymerisation/Depolymerisations-Experimente^[22] mit Taxol-2'-MPA **2** zeigten Effekte, die denen sehr ähneln, die mit Guanosin-5'-triphosphat(GTP)-Kochsalzlösungen in Kontrollversuchen beobachtet wurden. Sie unterscheiden sich aber drastisch von den Effekten, die von Taxol hervorgerufen werden. So stabilisierte **2** die Mikrotubuli bei Zugabe von CaCl₂ nicht, was die fehlende intrinsische Aktivität der Verbindung und ihre chemische Stabilität im Versuchsmittel widerspiegelt. Dieser Befund stimmt mit dem Verhalten anderer 2'-substituierter Derivate überein^[23–25]. Taxol **1**, das aus menschlichem Plasma zurückgewonnen wurde, zu dem Verbindung **2** zugegeben worden war, zeigte die erwartete Stabilisierung der Mikrotubuli, was beweist, daß **2** als Prodrug für Taxol fungiert.

Taxol-2'-MPA **2** wurde auf seine Cytotoxizität gegenüber einer Auswahl von Zelllinien geprüft, zu denen Leukämie-, Eierstock-, Lungen- und Brustcarcinome und Melanomzellen gehörten (Abb. 3). Die Cytotoxizitätsprofile von **2** wurden mit denen von Taxol verglichen. Sie sind recht ähnlich, obgleich einige Unterschiede zu erkennen sind. Beide Verbindungen zeigten IC₅₀-Werte im Bereich von 10⁻⁵ bis 10⁻¹² M und Mittelwerte nahe 1 nM. Extrem hohe Cytotoxizität wurde für menschliche Leukämie, metastasierende Melanome und cervicale Carcinome verzeichnet. Insgesamt – und wie für ein Taxol-Prodrug zu erwarten – zeigt **2** die gleiche bemerkenswerte Tumorzellenselektivität und Zelllinienspezifität wie Taxol.

Die vielversprechenden In-vitro-Ergebnisse und das Löslichkeitsprofil von Taxol-2'-MPA **2** veranlaßten uns, sein In-vivo-Verhalten zu untersuchen und es mit dem von Taxol zu vergleichen. Dazu wurden nackte Mäuse mit menschlichen Prostatacarcinom-Xenotransplantaten verwendet (Abb. 4). Im Gegensatz zu Taxol **1** wurde Verbindung **2** ohne Cremaphor in steriler 5proz. wässriger Dextroselösung verabreicht. Damit wurde bewiesen, daß die Verbindung einfach in Form einer Pille verabreicht werden kann und somit ein erster Vorteil gegenüber der Stammverbindung aufgezeigt. Mehrere Experimente mit Mäusen belegen, daß Taxol-2'-MPA die gleiche wachstumshemmende Wirkung auf Tumore hat wie Taxol bei gleicher molarer Konzentration; dabei haben beide Verbindungen deutliche Antitumor-Eigenschaften, wie der Vergleich mit Kontrollversuchen zeigt (Abb. 4). Am beeindruckendsten ist ein Befund aus Untersuchungen mit äquimolaren Dosierungen bei der maximal tolerierten Dosis (MTD) Taxol: Während die Taxolgruppe deutlich

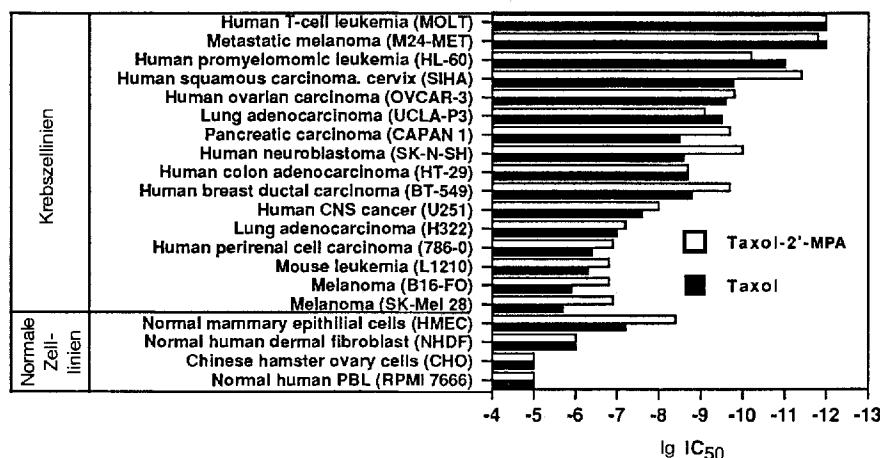


Abb. 3. Cytotoxizitäten von Taxol-2'-MPA 2 und Taxol 1 gegenüber einer Reihe von Zelllinien. Methode: Die Zellen wurden auf Gewebekulturplatten (96 Vertiefungen) mit den folgenden Kontrollen aufgebracht: keine Zellen und toxische Kontrolle (1×10^{-3} M Natrium-dodecylsulfat/SDS). Der Wirkstoff wurde in die erste Reihe der Vertiefungen gegeben und nach Standardverdünnungsmethode ausgehend von diesen Vertiefungen verdünnt. Die Träger wurden 72 h bei 37°C, unter 5% Kohlendioxid in steriler Luft, in einem feuchtgehaltenen Brutschrank belassen. Anschließend wurde in jede Vertiefung eine Lösung (50 μ L) von 2,3-Bis(methoxy-4-nitro-5-sulfonylphenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazoliumhydroxid XTT, 1 mg mL^{-1} in PBS (100 mM) gegeben. In Anwesenheit von lebensfähigen Zellen wird diese farblose klare Lösung enzymatisch umgewandelt, was zu einer Rosafärbung führt. Die Gewebekulturplatten wurden bei 450 nm mit einem Mikroplattenlese (Molecular Devices Thermomax) gelesen.

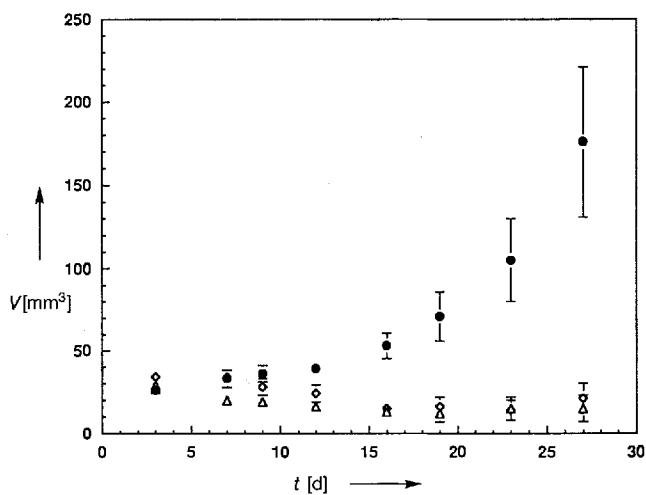


Abb. 4. In-vivo-Wirksamkeit von Taxol-2'-MPA 2 im Modell mit nackten Mäusen mit Prostata-tumor-Xenotransplantaten: 5% Dextrose (●), Taxol (Δ) und Taxol-2'-MPA (○). Methode: Das Tumormodell wurde aus einer ATTC-PC-3-Prostata-tumorzelllinie erzeugt, die unter Standard-Zellvermehrungsbedingungen gehalten wurde (37°C, 5% Kohlendioxid in steriler Luft). Jede Gruppe bestand aus acht zufällig ausgewählten weiblichen nackten Mäusen, so daß sich eine Gesamtpopulation von 24 ergibt. Mit einem Hämocytometer gezählte Zellen, die in Hanks Medium (Gibco, Grand Island, NY) suspendiert wurden, wurden subkutan implantiert (10^6 Zellen in 0.4 mL je Maus). Das Wachstum der festen Tumore wurde jeden dritten Tag kontrolliert und das Volumen gemäß der Gleichung (Länge \times Breite) 2 (0.5) bestimmt. Äquimolare Mengen der Testverbindungen (1.0 μ M) wurden an den Tagen 1, 3, 5, 7, 9 und 11 intraperitoneal injiziert, wobei folgende Medien benutzt wurden: Kontrolle, 5% Dextrose in Wasser (D5W); Taxol, suspendiert in Cramaphor/D5W (5/95, 18.0 mg kg^{-1} Körpergewicht des Tieres); Taxol-2'-MPA, gelöst in D5W (23.9 mg/kg Körpergewicht des Tieres). Die Verfahren zur Aufrechterhaltung von Tumoren und experimentelle Einzelheiten entsprachen den Protokollen, die vom Developmental Therapeutics Program des National Cancer Institute (NCI) veröffentlicht werden. Folgerungen über die Wirksamkeit wurden mit ANOVA (Varianzanalyse) gezogen, gefolgt vom t-Test (statistisches Verfahren). Zum Beispiel: Tag 9 (schlimmster Fall): Nachdem ANOVA auf 0.06-Niveau eine signifikante Varianz zeigt, ergibt der t-Test, daß Taxol und Taxol-2'-MPA sich auf 0.04-Niveau deutlich von den Kontrollen unterscheiden. Nach Tag 9 ist jeder Datensatz bei einer Vertrauengrenze von über 0.05 deutlich verschieden von den anderen. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt.

toxisch war (vier von acht Tieren am Ende der Studie tot), zeigte Taxol-2'-MPA keine sichtbare Toxizität (vier von acht Tieren dieser Gruppe waren am Ende dieser Studie zusätzlich tumorfrei).

Die ungewöhnliche Struktur von Taxol-2'-MPA und seine hohe Löslichkeit in wässrigen Medien veranlaßte uns, zu untersuchen, ob diese Verbindung die Fähigkeit zur Selbstorganisation hat. Molekulare Selbstorganisation ist ein Phänomen von beträchtlichem aktuellen Interesse. Ein erheblicher Reiz röhrt von der Möglichkeit her, mit diesem Prozeß Nanostrukturen mit potentiellen Anwendungen in der Materialforschung und in der Medizin aufzubauen^[26–28]. Inmitten dieser Untersuchungen stehen die Beiträge der Chemie, die den Entwurf und die Synthese selbstorganisierender Moleküle beinhaltet, zu denen auf Lipiden basierende^[29] und H-verbrückte Strukturen gehören^[30]. Auch lebende Systeme bedienen sich zum Aufbau von Nanostrukturen in weitreichendem Ausmaß der Selbstorganisation. Ein bekanntes Beispiel sind die Mikrotubuli, das Ziel von Taxol in der Zelle^[31].

Taxol-2'-MPA 2 organisiert sich – abhängig von der Natur des Mediums – zu mehreren Arten von Molekülverbänden, darunter reguläre Helices und Micellen. Dieser eher zufällige Befund überrascht nicht, denn die molekulare Struktur von 2 ist ideal zur Selbstorganisation geeignet^[32–34]. Sie verbindet ein stark hydrophobes Segment (Taxolgerüst) mit einem polaren Teil (Pyridiniumeinheit), eine charakteristische Eigenschaft mehrerer selbstaggregierender Moleküle. Dieses Verhalten kennt man von planaren Amphiphilen wie dem antiasthmatisch wirkenden Dinitruckromoglycat; bei kugelförmigen Molekülen wie dem hier diskutierten ist es unseres Wissens nach unbekannt. Darüber hinaus induziert die Chiralität der Struktur allem Anschein nach eine Helicität in den langen Nanostrukturen, die aus diesem Bauelement aufgebaut werden^[35–38]. Während wässrige Lösungen von 2 bei allen untersuchten Konzentrationen ($< 1 \times 10^{-3}$ M) optisch klar waren, zeigten gepufferte Lösungen mit Konzentrationen über 1×10^{-3} M mit dem bloßen Auge betrachtet einen blauen Schimmer und eine diffuse Streuung monochromatischen Lichts, beides charakteristische Eigenschaften von Kolloiden. Bei höheren Konzentrationen bilden sich kolloidale Gele. UV-Absorptionsmessungen bei 340 nm, einer Wellenlänge, bei der 2 nicht absorbiert, zeigten einen exponentiellen Anstieg der optischen Dichte (OD) über 4×10^{-4} M. Auch dieser Befund ist charakteristisch für die Bildung eines Kolloids.

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) bestätigte die Anwesenheit von supramolekularen Strukturen in diesen Lösungen. So zeigten 1 mM Lösungen von 2 in PBS bei TEM-Untersuchungen einheitliche Aggregate von fibrillärer Struktur (Abb. 5A) mit helicalen Konformationen. Diese Nanostrukturen waren unterschiedlich lang (bis zu 80 nm), wiesen aber einen konsistenten Durchmesser von ca. 8 nm mit einer helicalen Drehung von etwa sieben Einheiten pro Windung (Abb. 5, Einschub). Zusätzlich enthielten frisch beschallte wässrige Lösungen von 2 (1 mM) sphärische Strukturen (Abb. 5B) mit einem einheitlichen Durchmesser von etwa 5 nm, während hochkonzentrierte Lösungen (kolloidal, ca. 2×10^{-3} M) eine kompliziertere molekulare Architektur offenbarten. Die ursprünglichen

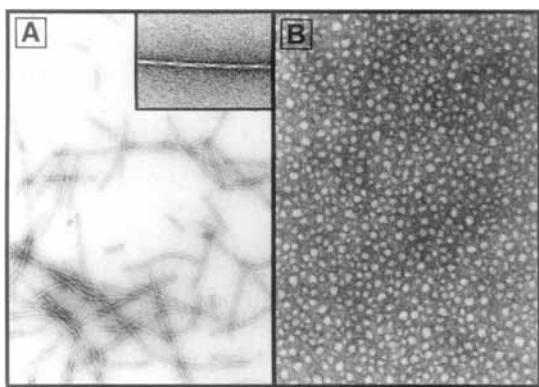


Abb. 5. A) Die TEM-Aufnahme von Taxol-2'-MPA **2** (1 mM in 100 mM PBS) bei 25000facher Vergrößerung (Negativfärbungen mit Phosphowolframat) zeigt die helicalen fibrillären Nanostrukturen, die in gepufferten Lösungen dieser Verbindung oberhalb der kritischen Aggregationskonzentration (CAC) vorliegen. B) Die TEM-Aufnahme von Taxol-2'-MPA **2** (1 mM in H₂O) bei 45000facher Vergrößerung (Negativfärbung mit Uranylacetat) zeigt die sphärischen Nanostrukturen, die in nicht-gepufferten Lösungen dieser Verbindung über der CAC vorliegen. Einschub: Die Vergrößerung einer der Fibrillen von Teilbild A zeigt die helicalen Verdrillungen.

Fäden hatten sich zu weiteren Überstrukturen zusammengelagert (Abb. 6).

Wir haben die neuen physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften von Taxol-2'-MPA **2** beschrieben, einer Verbindung, die in einem Schritt in hoher Ausbeute aus Taxol **1** zugänglich ist. Diese Verbindung **2** ist, sowohl in Bezug auf die Löslichkeit in wässrigen Medien als auch bezüglich des In-vivo-



Abb. 6. TEM-Aufnahme von Taxol-2'-MPA **2** (2 mM in 100 mM PBS) bei 10000facher Vergrößerung.

Verhaltens gegenüber Tumor-Xenotransplantaten, der Stammverbindung Taxol **1** als Antitumormittel überlegen. Die hier präsentierten Daten lassen vermuten, daß Taxol-2'-MPA **2** ein Hauptkandidat für die Entwicklung zum Antitumormittel ist. Andere Taxane, z.B. Taxotere^[39], könnten analog modifiziert werden, um zu effektiveren Wirkstoffen zu gelangen. Darüber hinaus könnten andere funktionelle Gruppen ähnlich der Pyridiniumeinheit an den 2', 7- oder anderen geeigneten Positionen

der Taxane eingeführt werden, um die neuen Einheiten mit solchen Eigenschaften auszustatten. Die beeindruckenden Eigenschaften dieses Wirkstoffs könnten seiner Fähigkeit zugeschrieben werden, sich in wässrigem Medium selbst zu Nanostrukturen zu organisieren. Momentan versuchen wir, den Zusammenhang zwischen Nanostruktur und Wirkstoffaktivität aufzuklären.

Ein eingegangen am 11. April 1994 [Z 6838]

- [1] M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wells, P. Coggan, A. T. McPhail, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325–2327.
- [2] E. K. Rowinsky, N. Onetto, R. M. Canetta, S. G. Arbuck, *Semin. Oncol.* **1992**, *19*, 646–662.
- [3] P. Potier, *Chem. Soc. Rev.* **1992**, *21*, 113–119.
- [4] D. G. I. Kingston, *Pharmacol. Ther.* **1991**, *52*, 1–34.
- [5] C. S. Swindell, *Org. Prep. Proced. Int.* **1991**, *23*, 465–543.
- [6] K. C. Nicolaou, W.-M. Dai, R. K. Guy, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 15–69; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 15–44.
- [7] K. C. Nicolaou, Z. Yang, J. J. Liu, H. Ueno, P. G. Nantermet, R. K. Guy, C. F. Claiborne, J. Renaud, E. A. Couladouros, K. Paulvannan, E. J. Sorensen, *Nature* **1994**, *367*, 630–634.
- [8] R. Weiss, R. C. Donehower, P. H. Wiernik, T. Ohnuma, R. S. Gralla, D. L. Trump, J. R. Daker, D. A. von Echo, D. D. von Hoff, B. Leyland-Jones, *J. Clin. Oncol.* **1990**, *8*, 1263–1268.
- [9] E. K. Rowinsky, E. E. Eisenhauer, V. Chaudhry, S. G. Arbuck, R. C. Donehower, *Semin. Oncol.* **1993**, *20* (4 Suppl. 3), 1–15.
- [10] B. G. Lubejko, S. E. Sartorius, *Semin. Oncol.* **1993**, *20* (4 Suppl. 3), 26–30.
- [11] H. M. Deutsch, J. A. Glinksi, M. Hernandez, R. D. Haugwitz, V. L. Narayanan, M. Sussman, L. H. Zalhow, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 788–792.
- [12] C. S. Swindell, N. E. Krauss, S. B. Horwitz, I. Ringel, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1176–1184.
- [13] Z. Zhao, D. G. I. Kingston, A. R. Crosswell, *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 1607–1611.
- [14] A. M. Mathew, R. Mejillano, J. P. Nath, R. H. Himes, V. J. Stella, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 145–151.
- [15] D. M. Vyas, H. Wong, A. R. Crosswell, A. M. Casazza, J. O. Knipe, S. W. Mamber, T. W. Doyle, *Biomed. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 1357–1360.
- [16] K. C. Nicolaou, C. Riemer, M. A. Kerr, D. Rideout, W. Wrasidlo, *Nature* **1993**, *364*, 464–466.
- [17] D. G. I. Kingston, Z. Y. Zhao, *Eur. Patent Appl.* EP 537905 A1 (21. April 1993).
- [18] T. Mukaiyama, *Angew. Chem.* **1979**, *91*, 798–812; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1979**, *18*, 707–721.
- [19] S. Kobayashi, M. Tsutsui, T. Mukaiyama, *Chem. Lett.* **1976**, 373–374.
- [20] E. K. Rowinsky, R. C. Donehower, *Semin. Oncol.* **1993**, *20* (4 Suppl. 3), 16–25.
- [21] W. Wrasidlo, K. C. Nicolaou, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [22] R. Merlock, W. Wrasidlo, *Anal. Biochem.*, im Druck.
- [23] J. Parness, D. G. I. Kingston, R. G. Powell, C. Harracksingh, S. B. Horwitz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1982**, *105*, 1082–1089.
- [24] W. Mellado, N. F. Magri, D. G. I. Kingston, R. Garcia-Arenas, G. A. Orr, S. B. Horwitz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *124*, 329–336.
- [25] H. Lasaste, H. Senilh, M. Wright, D. Guenard, P. Potier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 4090–4094.
- [26] H. Ringsdorf, B. Schlar, J. Venzmer, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 117–162; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 113–158.
- [27] Besonderes Kapitel: A. S. Rudolph, J. M. Calvert, P. E. Schoen, J. M. Schnur in *Biotechnological Applications of Lipid Microstructures* (Hrsg.: B. P. Gaber, J. M. Schnur, D. Chapman), Plenum, New York, **1988**, S. 320–325.
- [28] „Engineering a Small World“, *Science* **1991**, *254*, 1300–1335.
- [29] J. M. Schnur, *Science* **1993**, *262*, 1669–1676.
- [30] M. R. Ghadiri, J. R. Granja, R. A. Milligan, D. E. McRee, N. W. Khazanovich, *Nature* **1993**, *366*, 324–327.
- [31] S. B. Horwitz, J. Fant, P. B. Schiff, *Nature* **1979**, *277*, 665–667.
- [32] F. Vögtle, *Supramolecular Chemistry*, Wiley, New York, **1991**.
- [33] J. H. Fuhrhop, G. Penzlin, *Organic Synthesis Concepts, Methods and Starting Materials*, 2. Aufl., VCH, New York, **1993**, S. 350–356.
- [34] G. M. Whitesides, J. P. Mathias, C. T. Seto, *Science* **1993**, *254*, 1312–1319.
- [35] J. H. Fuhrhop, P. Schnieder, J. Rosenberg, E. Boekema, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3387–3390.
- [36] J. H. Fuhrhop, P. Schnieder, E. Boekema, W. Helfrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2861–2867.
- [37] J. H. Fuhrhop, S. Svenson, C. Boettcher, E. Rossler, H.-M. Vieth, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4307–4312.
- [38] J. H. Fuhrhop, C. Boettcher, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1768–1776.
- [39] R. Pazdur, R. A. Newman, B. M. Newman, A. Fuentes, J. Benvenuto, B. Bready, D. Moore, I. Jayiesimi, F. Vreeland, M. M. G. Bayssas, M. N. Rader, *J. Natl. Cancer Inst.* **1992**, *84*, 1781–1788.