

DOI: 10.1002/ange.200600935

Untersuchung der Reaktivität und Selektivität DNA-alkylierender Duocarmycin-Analoga mittels hochauflösender Massenspektrometrie**

Lutz F. Tietze,* Birgit Krewer, Holm Frauendorf,
Felix Major und Ingrid Schuberth

Professor Dieter Enders zum 60. Geburtstag gewidmet

Die Behandlung maligner Tumoren mit den derzeit zur Verfügung stehenden Chemotherapeutika ist im Allgemeinen aufgrund einer unzureichenden Differenzierung zwischen malignem und gesundem Gewebe mit starken Nebenwirkungen verbunden. Im Rahmen des ADEPT-Konzeptes (ADEPT = Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy)^[1,2] haben wir, wie in der vorhergehenden Arbeit beschrieben,^[3] auf der Grundlage der Duocarmycin-Antibiotika das neue Prodrug (+)-**2** entwickelt, das sich durch einen exzellenten QIC₅₀-Wert von 4800 [QIC₅₀ = IC₅₀^[***] (Prodrug)/IC₅₀(Prodrug in Gegenwart des Enzyms β-D-Galactosidase)] bei gleichzeitig hoher Zytotoxizität des zugrunde liegenden Zytostatikums (+)-**3** mit einem IC₅₀-Wert von 0.75 nM auszeichnet (Schema 1). Aus (+)-**2** entsteht durch enzymatische Umsetzung das seco-Drug (+)-**3**, aus dem sich in situ das alkylierend wirkende Drug (+)-**4** mit einer Spirocyclopropylcyclohexadienon-Struktureinheit bildet.

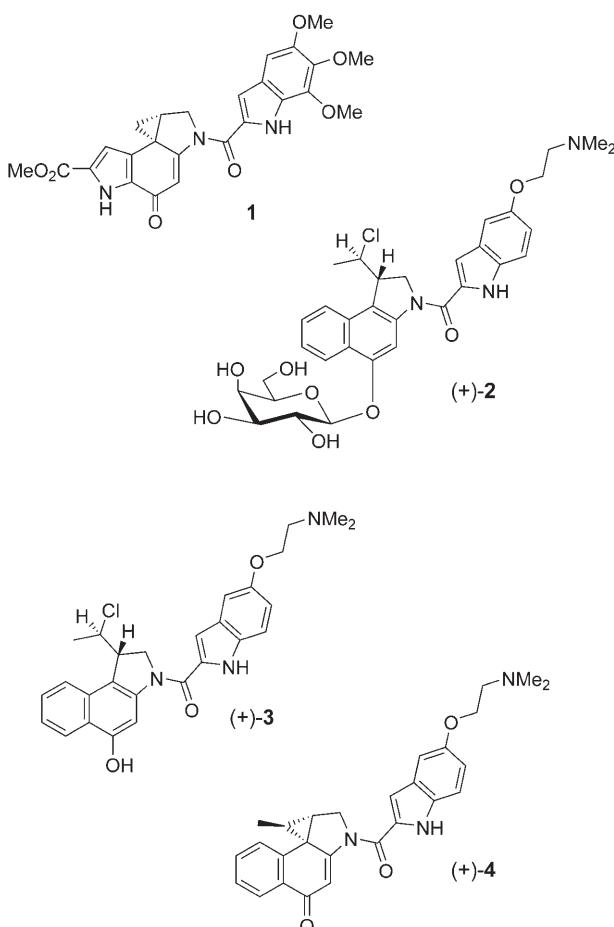
Hier beschreiben wir Untersuchungen zur DNA-Alkylierungseffizienz des neuen Zytostatikums (+)-**3** und vergleichen dessen Reaktivität mit derjenigen der weniger toxischen Verbindungen (+)-**2** und (–)-**3**. Die Alkylierung eines doppel- und eines einzelsträngigen Oligodesoxynukleotids wurde durch hochauflösende Elektrospray-Massenspektrometrie analysiert. Die ESI-FTICR-MS-Messungen (ESI-FTICR-MS = Electrospray-Ionisation-Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometrie) erfolgten hierbei direkt aus der mit Methanol verdünnten Reaktionslösung ohne die bei ähnlichen massenspektrometrischen Untersuchungen^[4] bisher notwendige chromatographische Reinigung

[*] Prof. Dr. L. F. Tietze, Dipl.-Chem. B. Krewer, Dr. H. Frauendorf, Dipl.-Chem. F. Major, Dr. I. Schuberth
Institut für Organische und Biomolekulare Chemie
Georg-August-Universität Göttingen
Tammannstraße 2, 37077 Göttingen (Deutschland)
Fax: (+49) 551-39-9476
E-Mail: ltietze@gwdg.de

[**] Die Untersuchungen wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 416) und dem Fonds der chemischen Industrie unterstützt. F.M. dankt der Studienstiftung des deutschen Volkes für ein Promotionsstipendium.

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

[***] IC₅₀: Toxinkonzentration, bei der das Zellwachstum um 50% gehemmt wird.



Schema 1. (+)-Duocarmycin SA (**1**), Prodrug **(+)-2**, seco-Drug **(+)-3** sowie Drug **(+)-4**.

und Anreicherung der alkylierten DNA. Der gleichzeitige Nachweis der Substrate, Intermediate und alkylierten Oligonucleotid-Produkte ist von großem Vorteil, da er direkte Aussagen über die Alkylierungseffizienz, die Selektivität der Bindungsknüpfung sowie die Art und Menge der in der Reaktionslösung vorhandenen Verbindungen ermöglicht. Des Weiteren konnte durch Variation der Messbedingungen eine Fragmentierung der Addukte im Bereich der Alkylierungsstelle induziert werden, die eine genaue Lokalisierung der Bindungsstelle ermöglichte.^[5]

Gegenüber anderen Methoden zur Strukturanalyse von DNA-Drug-Komplexen wie der NMR-Spektroskopie^[6] und der Röntgenstrukturanalyse^[7] hat die gewählte Vorgehensweise deutliche Vorteile, da sie eine direkte Messung ermöglicht, wesentlich schneller ist, nur niedrige Konzentrationen benötigt werden und keine kristallinen Addukte – wie für die Röntgenstrukturbestimmung erforderlich – vorliegen müssen. Weitere Verfahren zur Bestimmung der Sequenzselektivität wie PCR-Stop-Assay, DNaseI-Footprinting und PAGE nach thermisch induziertem Strangbruch sind wesentlich aufwändiger als die hier beschriebene Methode.^[8]

Die hohe Zytotoxizität von Duocarmycin SA (**1**) und verwandten Verbindungen beruht vermutlich auf einer Alkylierung von Adenin am N-3-Atom innerhalb AT-reicher

Bindungsstellen in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA.^[9] Für die Bindungsstudien mit **(+)-3**, **(-)-3** und **(+)-2** wurde die Duplex-DNA **5** mit 15 Basenpaaren (Abbildung 1)



Abbildung 1. Sequenz der ausgewählten Duplex-DNA **5**.

ausgewählt. Dieses doppelsträngige Oligonucleotid enthält eine Bindungsstelle hoher Affinität, kann eine kleine Furche bilden, und außer Adenin grenzen die Basen Cytosin, Guanin und Thymin an die AT-reiche Sequenz.

Eine Lösung von **5** in Wasser wurde mit einer Lösung der zu untersuchenden Verbindung in DMSO/Wasser in den molaren Wirkstoff/DNA-Verhältnissen von 1:1 und 5:1 versetzt. Unmittelbar nach Mischen der Komponenten sowie nach 24 h Inkubation bei 25 °C wurden jeweils ESI-FTICR-MS-Messungen im Negativ-Ionen-Modus der mit Methanol im Verhältnis 1:1 verdünnten Reaktionslösungen durchgeführt. Zum Zeitpunkt $t=0$ h (Abbildung 2) wurden für das

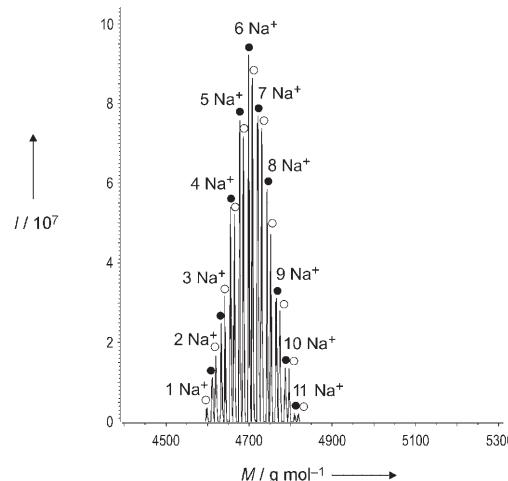


Abbildung 2. Dekonvoluiertes ESI(-)-HR-MS-Spektrum: **(+)-3/5 = 1:1**, $t=0$ h; Na⁺-Addukte von ON-1 (●) und ON-2 (○); I = Intensität.

1:1-Gemisch von **(+)-3** und **5** erwartungsgemäß nur die isotopenauflösten Signale der Natrium-Addukte der beiden einzelsträngigen DNA-Oligonucleotide (ON-1 und ON-2) sowie das seco-Drug **(+)-3** und das Drug **(+)-4** nachgewiesen; nach 24 h Inkubation (Abbildung 3) konnten dagegen hauptsächlich die Peaks des kovalent mit dem Drug verknüpften Einzelstranges ON-1 (ON-1*), des Einzelstranges ON-1 nach Abspaltung der Base Adenin (ON-1-A), des durch das Drug alkylierten Adenins (**6**) sowie des Einzelstranges ON-2 detektiert werden.^{[*][10]}

Die Bildung des mit **(+)-4** verknüpften Adenins (**6**) lässt sich durch eine Schwächung der *N*-glycosidischen Bindung zwischen der Nucleobase und der Desoxyribose in ON-1*

[*] Weitere Spektren siehe Hintergrundinformationen.

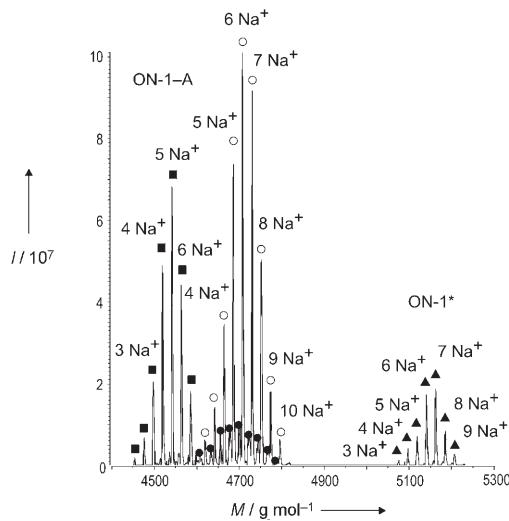


Abbildung 3. Dekonvolviertes ESI(-)-HR-MS-Spektrum: (+)-3/5=1:1, $t=24$ h; Na^+ -Addukte von ON-1 (●), ON-2 (○), ON-1* (▲) und ON-1-A (■); A=Adenin.

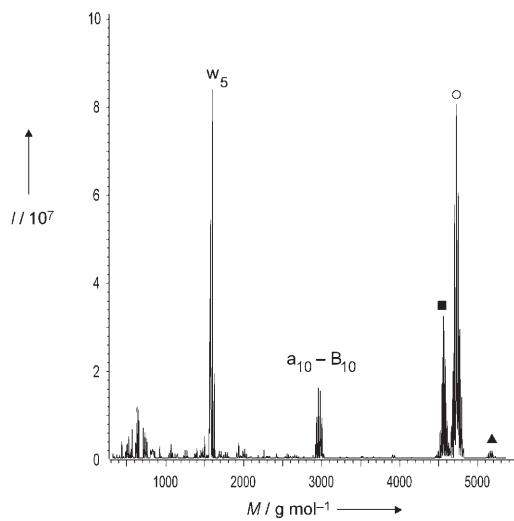
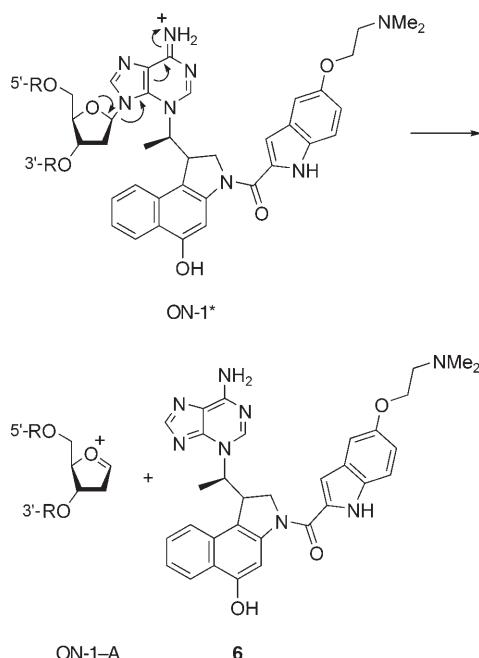


Abbildung 4. Dekonvolviertes ESI(-)-HR-MS-Spektrum: (+)-3/5=1:1, $t=24$ h; Na^+ -Addukte von ON-2 (○), ON-1* (▲), ON-1-A (■), w₅(ON-1) und a₁₀-B₁₀(ON-1).

erklären, wodurch eine thermische Spaltung zu **6** und dem Derivat ON-1-A möglich wird (Schema 2).^[5] Durch Änderung der CapExit-Spannung von -100 auf -150 V konnte mittels Capillary-Skimmer-Dissoziation zusätzlich die Fragmentierung von ON-1-A induziert und damit anhand der Fragmente w₅(ON-1) und a₁₀-B₁₀(ON-1) (Abbildung 4) die Alkylierungsposition im Einzelstrang ON-1 eindeutig bestimmt werden (Abbildung 5). Die Fragmentierung von ON-1-A in w₅ und a₁₀-B₁₀ konnte durch CID-MS/MS (Collision Induced Dissociation) bestätigt werden. Bei einem Mischungsverhältnis von (+)-3/Duplex-DNA **5**=1:1 wurde



Schema 2. Spaltung der glycosidischen Bindung in ON-1* unter Entstehung von ON-1-A und **6**.

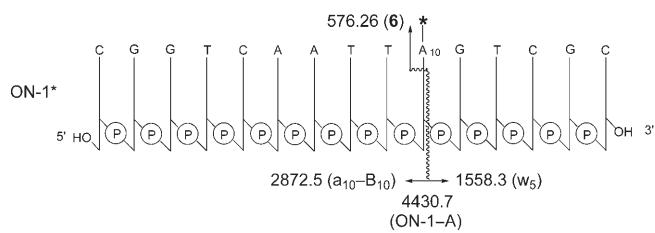


Abbildung 5. ON-1* und auftretende Fragmentierungen. *: Drug.

ausschließlich und nahezu quantitativ der Einzelstrang ON-1 am Adenin A-10 alkyliert. Bei Einsatz eines höheren (+)-3-Anteils konnte zusätzlich eine geringfügige Alkylierung an Guanin festgestellt werden. Dies entspricht den Befunden der Untersuchungen mit Duocarmycin SA (**1**).^[4,6,11]

Bei der Umsetzung des Prodrugs (+)-2 mit Duplex-DNA **5** in einem Verhältnis von (+)-2/5=1:1 wurde fast keine (Abbildung 6) und bei einem Verhältnis von 5:1 nur eine etwa 10-prozentige Alkylierung gefunden (siehe Hintergrundinformationen). Dieses Ergebnis korreliert sehr gut mit der an humanen Bronchialkarzinomzellen (A549) bestimmten Zytotoxizität des Prodrugs (+)-2, die wesentlich geringer ist als jene des seco-Drugs (+)-3.^[3] Die Alkylierung, die bei Reaktion von (+)-2 mit **5** an Adenin A-10 im Einzelstrang ON-1 und Adenin A-7 im Einzelstrang ON-2 beobachtet wird (Abbildung 7), weist zudem darauf hin, dass sich (+)-2 zwar analog zu dem aus (+)-3 in situ gebildeten (+)-4 in die DNA einlagert, dass aber wegen der höheren Flexibilität der alkylierenden Chlorethyl-Einheit des seco-Prodrugs (+)-2 beide Oligonucleotide als Nucleophile wirken können. Dies kann auch als eindeutiger Beleg dafür gewertet werden, dass die Alkylierung der DNA durch (+)-3 erst nach Umwandlung in (+)-4 erfolgt.

Untersuchungen mit dem enantiomeren seco-Drug (-)-3 ergaben, dass diese Verbindung eine weitaus geringere Alkylierungstendenz als (+)-3 aufweist (Abbildung 8); dieses

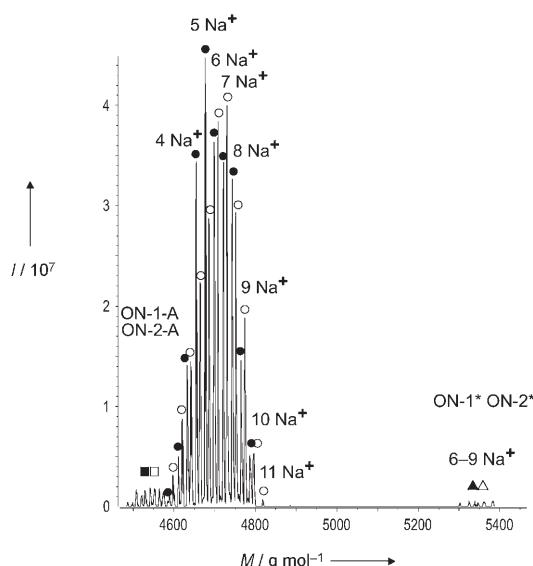


Abbildung 6. Dekonvolviertes ESI(-)-HR-MS-Spektrum: $(+)$ -**2**/**5** = 1:1, t = 24 h; Na^+ -Addukte von ON-1 (●), ON-2 (○), ON-1-A (■), ON-2-A (□), ON-1* (▲) und ON-2* (△); *: alkyliert durch $(+)$ -**2**.



Abbildung 7. Alkylierungspositionen des Prodrugs $(+)$ -**2**.

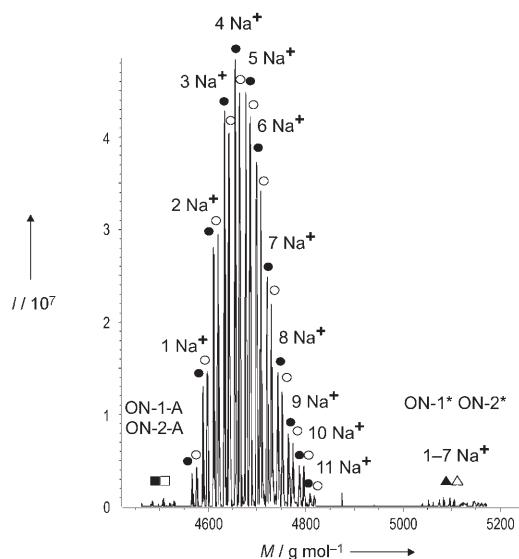


Abbildung 8. Dekonvolviertes ESI(-)-HR-MS-Spektrum: $(-)$ -**3**/**5** = 1:1, t = 24 h; Na^+ -Addukte von ON-1 (●), ON-2 (○), ON-1-A (■), ON-2-A (□), ON-1* (▲) und ON-2* (△); *: alkyliert durch $(-)$ -**4**.

Resultat ist wiederum konsistent mit den Ergebnissen aus den Zytotoxizitätstests.^[3]

In Ergänzung zu den Messungen an der doppelsträngigen DNA **5** wurden Untersuchungen der Reaktion von $(+)$ -**2**, $(+)$ -**3** und $(-)$ -**3** mit dem Einzelstrang ON-1 durchgeführt. Nach 24 h Inkubation konnte auch bei einem Wirkstoffüberschuss nur eine vergleichsweise schwache Alkylierung

festgestellt werden, und es wurden sowohl Guanin als auch Adenin alkyliert. Die Befunde zeigen eindeutig, dass Selektivität und Reaktivität beim Übergang vom Doppelstrang zum Einzelstrang stark abnehmen. Dies ist in Einklang mit dem Befund, dass Duocarmycin SA (**1**) und analoge Verbindungen eine ungewöhnlich geringe Reaktivität gegenüber konventionellen Nucleophilen aufweisen, aber sehr schnell mit doppelsträngiger DNA reagieren.^[11a, 12]

Die hier beschriebenen ESI(-)-HR-MS-Messungen ermöglichen direkte Aussagen über die Reaktivität und Selektivität DNA-alkylierender Duocarmycin-Analoga. So konnte gezeigt werden, dass das von uns entwickelte Zytostatikum $(+)$ -**3** eine hohe Alkylierungstendenz und Selektivität gegenüber doppelsträngiger DNA aufweist, aber nur schwach alkylierend gegenüber Oligonucleotid-Einzelsträngen wirkt. Hervorzuheben ist die vergleichsweise geringe Alkylierungstendenz des Prodrugs $(+)$ -**2** und des enantiomeren seco-Drugs $(-)$ -**3**, die sehr gut mit der geringeren Toxizität dieser Verbindungen in Zellkultur-Untersuchungen korreliert. Das am Beispiel der Duocarmycin-Analoga $(+)$ -**3**, $(+)$ -**2** und $(-)$ -**3** erläuterte Verfahren sollte auch dafür geeignet sein, die Reaktivität und Selektivität anderer DNA-alkylierender Wirkstoffe abzuschätzen.

Experimentelles und ausgewählte Massenspektren sind in den Hintergrundinformationen zu finden.

Eingegangen am 9. März 2006

Online veröffentlicht am 8. September 2006

Stichwörter: Alkylierungen · DNA · Duocarmycine · Massenspektrometrie

- [1] a) W. A. Denny, *Cancer Invest.* **2004**, *22*, 604–619; b) G. Xu, H. L. McLeod, *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 3314–3324; c) M. P. Napier, S. K. Sharma, C. J. Springer, K. D. Bagshawe, A. J. Green, J. Martin, S. M. Stribbling, N. Cushen, D. O’Malley, R. H. J. Begent, *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 765–772; d) K. D. Bagshawe, *Br. J. Cancer* **1987**, *56*, 531–532.
- [2] a) L. F. Tietze, T. Feuerstein, *Aust. J. Chem.* **2003**, *56*, 841–854; b) L. F. Tietze, T. Feuerstein, *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 2155–2175; c) L. F. Tietze, T. Feuerstein, A. Fecher, F. Haunert, O. Panknin, U. Borchers, I. Schuberth, F. Alves, *Angew. Chem. 2002*, *114*, 785–787; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 759–761; d) L. F. Tietze, M. Lieb, T. Herzig, F. Haunert, I. Schuberth, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1929–1939; e) L. F. Tietze, R. Hannemann, W. Buhr, M. Lögers, P. Menningen, M. Lieb, D. Starck, T. Grote, A. Döring, I. Schuberth, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2840–2842; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2674–2677.
- [3] L. F. Tietze, F. Major, I. Schuberth, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6724–6727; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6574–6577.
- [4] a) M. L. Colgrave, P. Iannitti-Tito, G. Wickham, M. M. Sheil, *Aust. J. Chem.* **2003**, *56*, 401–413; b) J. L. Beck, M. L. Colgrave, S. F. Ralph, M. M. Sheil, *Mass Spectrom. Rev.* **2001**, *20*, 61–87; c) P. Iannitti-Tito, A. Weimann, G. Wickham, M. M. Sheil, *Analyst* **2000**, *125*, 627–634; d) L. A. Marzilli, D. Wang, W. R. Kobertz, J. M. Essigmann, P. Vouros, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9*, 676–682; e) P. Iannitti, M. M. Sheil, G. Wickham, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1490–1491.
- [5] a) J. H. Banoub, R. P. Newton, E. Esmans, D. F. Ewing, G. Mackenzie, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1869–1915; b) E. Nordhoff, F. Kirpekar, P. Roepstorff, *Mass Spectrom. Rev.* **1996**, *15*, 67–138;

- c) S. A. McLuckey, S. Habibi-Goudarzi, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12085–12095.
- [6] a) J. A. Smith, G. Bifulco, D. A. Case, D. L. Boger, L. Gomez-Paloma, W. J. Chazin, *J. Mol. Biol.* **2000**, *300*, 1195–1204; b) P. S. Eis, J. A. Smith, J. M. Rydzewski, D. A. Case, D. L. Boger, W. J. Chazin, *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 237–252.
- [7] O. Kennard, W. N. Hunter, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1280–1304; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1254–1277.
- [8] a) T. Bando, A. Narita, S. Sasaki, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13890–13895; b) S. Kupchinsky, S. Centioni, T. Howard, J. Trzupek, S. Roller, V. Carnahan, H. Townes, B. Purnell, C. Price, H. Handl, K. Summerville, K. Johnson, J. Toth, S. Hudson, K. Kiakos, J. A. Hartley, M. Lee, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 6221–6236; c) D. L. Boger, H. W. Schmitt, B. E. Fink, M. P. Hedrick, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6654–6661; d) Z. Zhang, M. C. Poirier, *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 971–977; e) Y. Pommier, G. Kohlhagen, C. Bailly, M. Waring, A. Mazumder, K. W. Kohn, *Biochemistry* **1996**, *35*, 13303–13309.
- [9] a) D. L. Boger, B. Bollinger, D. L. Hertzog, D. S. Johnson, H. Cai, P. Mésini, R. M. Garbaccio, Q. Jin, P. A. Kitos, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4987–4998; b) D. L. Boger, D. S. Johnson, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1542–1580; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1438–1474; c) L. H. Hurley, D. R. Needham-VanDevanter, *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*, 230–237.
- [10] Zur Erleichterung der Auswertung wurden die Spektren dekonvolviert, d.h., es erfolgte eine computergestützte Umrechnung der Signale der mehrfach geladenen Ionen in Signale der entsprechenden neutralen Spezies. Bei allen in der Folge diskutierten Spektren handelt es sich um dekonvolvierte Spektren.
- [11] a) A. Asai, S. Nagamura, H. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4171–4177; b) H. Sugiyama, K. Ohmori, K. L. Chan, M. Hosoda, A. Asai, H. Saito, I. Saito, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2179–2182; c) K. Yamamoto, H. Sugiyama, S. Kawanishi, *Biochemistry* **1993**, *32*, 1059–1066.
- [12] a) K. N. Kirschner, M. Lee, R. C. Stanley, J. P. Bowen, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 329–335; b) D. L. Boger, R. M. Garbaccio, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 1043–1052.