

DOI: 10.1002/ange.200600936

Antitumor-Wirkstoffe: Entwicklung hochpotenter glycosidischer Duocarmycin-Analoga für eine selektive Krebstherapie***Lutz F. Tietze,* Felix Major und Ingrid Schuberth**Professor Gerhard Erker zum 60. Geburtstag gewidmet*

Die Chemotherapie maligner Tumoren ist eine der großen Herausforderungen der modernen Medizin. Sie ist im Allgemeinen mit starken Nebenwirkungen verbunden, da die Selektivität klassischer Zytostatika hauptsächlich auf dem Unterschied der Proliferationsraten maligner und normaler Zellen beruht. Dieser ist jedoch insbesondere im Vergleich mit Zellen des hämatopoetischen Systems, des Intestinaltraktes und der Haarfollikel nur gering. Das Ziel einer modernen Krebstherapie muss daher die gezielte Zerstörung der malignen Zellen ohne Beeinträchtigung der Normalzellpopulation sein. Die Grundlage des von uns verfolgten Ansatzes für eine selektive Krebsbehandlung ist die „Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy“ (ADEPT), bei der im therapeutischen Bereich untoxische Verbindungen (Prodrugs) gezielt im Krebsgewebe enzymatisch in hochtoxische Zytostatika überführt werden.^[1,2] Bei diesem binären Ansatz wird die Selektivität durch die Verwendung monoklonaler Antikörper erreicht, die an tumorassoziierte Antigene binden und die kovalent mit dem entsprechenden Enzym verknüpft sind. Andere Ansätze für eine selektive Krebstherapie beruhen unter anderem auf dem Einsatz von Immunkonjugaten,^[3] Angiogeneseinhibitoren,^[4] Antitumor-Vakzinen,^[5] Kinase-Inhibitoren^[6] sowie Konjugaten aus Neuropeptiden und einem Antitumorwirkstoff.^[7]

Für das ADEPT-Konzept definieren wir auf der Basis unserer bisherigen Arbeiten, die bis in das Jahr 1985 zurückreichen, als wesentliche Kriterien, dass das aus dem Prodrug gebildete Zytostatikum einen $IC_{50}^{[***]} < 10$ nM aufweisen muss und dass das Verhältnis der unterschiedlichen Toxizitäten von Prodrug und Drug, das wir als QIC_{50} definieren, den Wert 1000 übersteigen sollte ($QIC_{50} = IC_{50}(\text{Prodrug})/IC_{50}(\text{Prodrug} + \text{spaltendes Enzym})$).^[8]

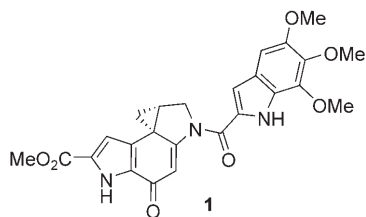
Hier beschreiben wir das neue Prodrug (+)-**2a** für eine selektive Krebstherapie, das auf der Basis der zytotoxischen

[*] Prof. Dr. L. F. Tietze, 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.

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

Duocarmycin-Antibiotika, z. B. Duocarmycin SA (**1**), entwickelt wurde und das nicht nur die aufgestellten Kriterien erfüllt, sondern wegen seines exzellenten QIC_{50} -Wertes, seiner

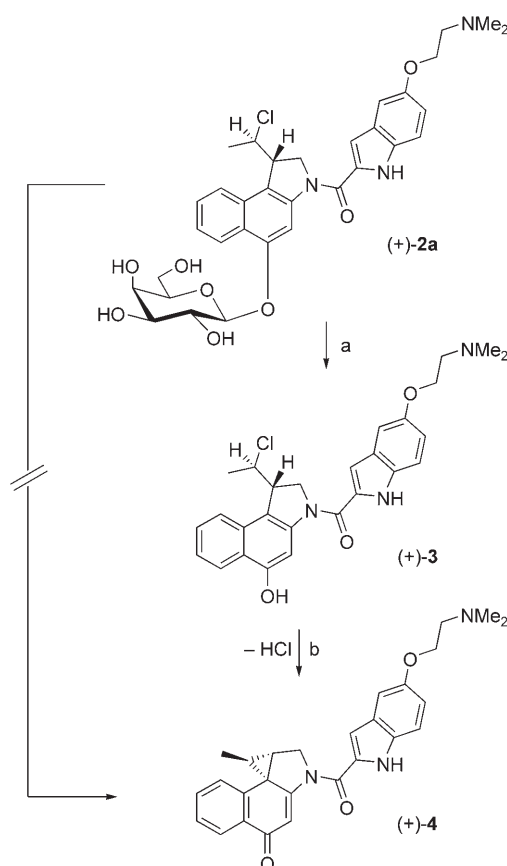


guten Wasserlöslichkeit und seiner einfachen Synthese alle bisher von uns^[1b,c,9] und anderen^[1,10] hergestellten Prodrugs übertrifft.

Duocarmycin SA wurde aus *Streptomyces* DO-113 isoliert und hat einen IC_{50} -Wert von 10 pM (Krebszelllinie L1210);^[11] das für die biologische Wirkung erforderliche Spirocyclopropylcyclohexadienon-System kann sich in situ aus der entsprechenden seco-Verbindung mit einer freien phenolischen Hydroxygruppe bilden.^[12] In dem von uns entwickelten Prodrug (+)-**2a** ist die phenolische Hydroxygruppe als Galactosid geschützt, sodass keine Spirocyclisierung erfolgen kann. Das Prodrug kann jedoch einfach durch enzymatische Umsetzung in die entsprechende seco-Verbindung (+)-**3** überführt werden, die dann zur zytotoxischen Verbindung (+)-**4** weiterreagiert (Schema 1). Die *N,N*-Dimethylaminoethoxyindolcarbonsäure-Komponente^[13] bewirkt nicht nur die Einlagerung der Verbindung in die kleine Furche der DNA, sondern erhöht auch die Wasserlöslichkeit aufgrund der Möglichkeit zur Salzbildung.

Als Ausgangsverbindung für die Synthese der Prodrugs **2** und der seco-Drugs **3** wurde der racemische Benzylether **5** verwendet, der nach literaturbekannten Methoden einfach zugänglich ist.^[9c,14] Für die Synthese diastereomerenreiner glycosidischer Prodrugs sowie enantiomerenreiner Toxine war es erforderlich, **5** in enantiomerenreiner Form zu erhalten. Die klassischen Methoden der Racematspaltung durch Salzbildung und Derivatisierung mit enantiomerenreinen Reagentien waren wegen der Empfindlichkeit des entsprechenden freien Amins von **5** nicht erfolgreich; dagegen gelang eine effiziente präparative HPLC-Trennung an einer Säule mit chiraler stationärer Phase (Chiralpak IA).^[15] Die absolute Konfiguration von (+)-**5** wurde nach Derivatisierung mit 3,5-Dibrombenzoesäure durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt.^[16]

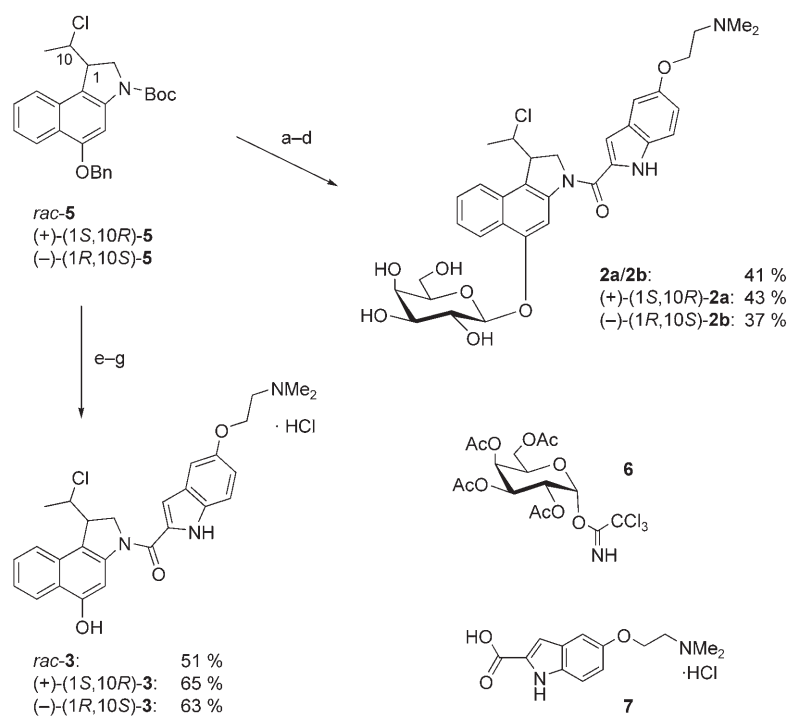
Die Herstellung der Galactoside **2** erfolgte ausgehend von **5** nach Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppe mit Palladium auf Aktivkohle und Ammoniumformiat als Wasserstoffquelle^[17] durch Glycosidierung mit **6** nach der von Schmidt entwickelten Trichloracetimidat-Methode;^[18] nachfolgende $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ -vermittelte *N*-tert-Butoxycarbonyl(Boc)-Entschützung, Kupplung des freien sekundären Amins mit dem Indolcarbonsäurehydrochlorid **7**^[13] und abschließende basenkatalysierte Solvolyse der Acetylgruppen lieferten die gewünschten Galactoside **2** in einer sehr guten Gesamtausbeute von 37–43% über vier Stufen (Schema 2). Die für In-vitro-



Schema 1. Enzymatische Toxifizierung des glycosidischen Prodrugs (+)-**2a**: a) Umwandlung zum seco-Drug (+)-**3** und b) In-situ-Winstein-Cyclisierung zum Drug (+)-**4** als Analogon des Antibiotikums (+)-Duocarmycin SA (**1**).

Untersuchungen zum Vergleich erforderlichen freien Toxins **3** wurden ausgehend von **5** durch *N*-Boc-Entschützung, nachfolgende Kupplung mit **7** sowie abschließende Debenzylierung in einer Gesamtausbeute von 51–65% erhalten. Eine direkte Glycosidierung von **3** nach der Trichloracetimidat-Methode war nicht erfolgreich.

Um die zytotoxische Wirkung der neu synthetisierten Substanzen auf humane Tumorzellen zu untersuchen, erfolgte ein Klonogenitätstest im Triplikat, der sich an den HTCFA-Test^[9d] (HTCFA = Human Tumor Colony Forming Ability Test) anlehnt und die Proliferationsfähigkeit von einzelnen Zellen widerspiegelt (Tabelle 1). Bei Untersuchungen an humanen Bronchialkarzinomzellen (A549) konnte für das Gemisch der diastereomeren Prodrugs **2a/2b** ein QIC_{50} von 6600 und für das diastereomerenreine Prodrug (+)-(1*S*,10*R*)-**2a** ein QIC_{50} von 4800 bei gleichzeitig hoher Zytotoxizität des zugrunde liegenden Toxins (+)-(1*S*,10*R*)-**3** mit einem IC_{50} -Wert von 0.75 nM erzielt werden. Der QIC_{50} -Wert des Prodrugs (–)-(1*R*,10*S*)-**2b** ließ sich wegen dessen geringer Zytotoxizität und der dadurch bedingten erforderlichen hohen Substanzmenge, die zu Löslichkeitsproblemen führte, nicht bestimmen. So zeigt das zugrunde liegende seco-Drug (–)-(1*R*,10*S*)-**3** mit einem IC_{50} -Wert von 560 nM schon eine gegenüber seinem Enantiomer (+)-(1*S*,10*R*)-**3** nahezu um den Faktor 1000 geringere Zytotoxizität. Die Ergebnisse der Zy-



Scheme 2. Synthese der Prodrugs **2** und der seco-Drugs **3**: a) Pd/C/NH₄HCO₂, THF, 40 °C, 15 min; b) **6**, BF₃·OEt₂, CH₂Cl₂, MS (4 Å), -10 °C, 3.5 h, dann BF₃·OEt₂, RT, 5 h; c) **7**, EDC·HCl, DMF, RT, 20 h; d) NaOMe/MeOH, RT, 2 h; e) 4 M HCl/EtOAc, RT, 2 h; f) **7**, EDC·HCl, DMF, RT, 19 h; g) 4 M HCl/EtOAc, RT, 2 h, dann Pd/C/NH₄HCO₂, THF, 40 °C, 2 h. Bn = Benzyl, EDC = *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimid.

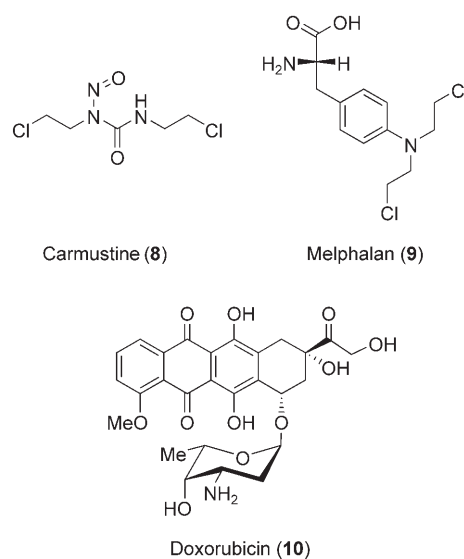
Tabelle 1: HTCFA-Test zur Untersuchung der In-vitro-Zytotoxizität von **2** und **3** gegen humane Bronchialkarzinomzellen (A549).^[a]

Verbindung	β-D-Gal. ^[b]	IC ₅₀ [nM]	QIC ₅₀
2a/2b	—	7.9 × 10 ³	6600
2a/2b	+	1.2	
(+)-(1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 2a	—	3.6 × 10 ³	4800
(+)-(1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 2a	+	0.75	
(-)-(1 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)- 2b	—	> 7.8 × 10 ⁴	> 140
(-)-(1 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)- 2b	+	5.5 × 10 ²	
<i>rac</i> - 3	—	1.5	
(+)-(1 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)- 3	—	0.75	
(-)-(1 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)- 3	—	5.6 × 10 ²	

[a] Die Zellen wurden mit den entsprechenden Verbindungen 24 h bei 37 °C inkubiert; nach 12-tägiger Kultivierung wurde die Klonbildungsrate im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt; β-D-Galactosidase: *Escherichia coli*, 4 U mL⁻¹. [b] Zugabe von β-D-Galactosidase.

toxizitätsbestimmungen stimmen gut mit den Daten der massenspektrometrischen Untersuchungen der Alkylierung von Duplex-DNA mit (+)-(1*S*,10*R*)-**2a**, (+)-(1*S*,10*R*)-**3** und (-)-(1*R*,10*S*)-**3** überein.^[19] Als weiterer wichtiger Befund dieser In-vitro-Zytotoxizitätsuntersuchungen ist hervorzuheben, dass die glycosidischen Prodrugs **2** bei Umsetzung mit β-D-Galactosidase eine nahezu identische Zytotoxizität aufweisen wie die jeweiligen seco-Drugs **3**. Dies bestätigt das Prinzip der reversiblen Detoxifizierung, die Stabilität der Prodrugs unter den Versuchsbedingungen sowie die Nicht-Beeinträchtigung der Enzymaktivität.

Zum direkten Vergleich der von uns entwickelten Verbindungen **2** und **3** mit anderen Zytostatika haben wir die zurzeit in der Tumorthherapie verwendeten Arzneimittel Carmustin (**8**), Melphalan (**9**) und Doxorubicin (**10**) mit dem HTCFA-Test an humanen Bronchialkarzinomzellen (A549) untersucht (Schema 3 und Abbildung 1). Hierbei bestätigte sich, dass das neue Prodrug (+)-(1*S*,10*R*)-**2a** in Gegenwart des Enzyms β-D-Galactosidase eine weit höhere biologische Wirksamkeit als die Verbindungen **8–10** zeigt und damit erhebliche Vorteile für eine Anwendung im Rahmen des ADEPT-Konzeptes aufweist.



Scheme 3. Die Tumortheraeutika Carmustin (**8**), Melphalan (**9**) und Doxorubicin (**10**).

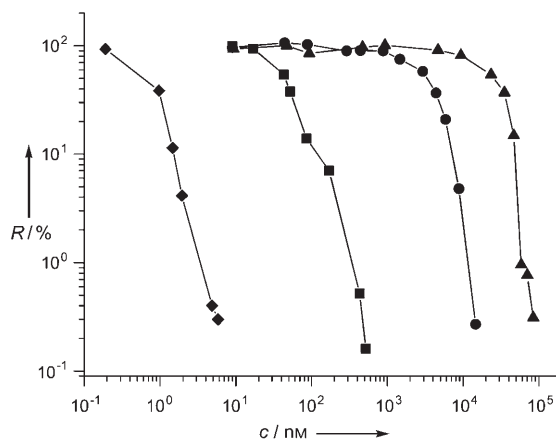


Abbildung 1. Vergleich der In-vitro-Zytotoxizität unterschiedlicher Tumortheraeutika gegen humane Bronchialkarzinomzellen (A549). (♦) (+)-(1*S*,10*R*)-**2a** in Gegenwart von β-D-Galactosidase (4 U mL⁻¹): IC₅₀ = 0.75 nM; (▲) Carmustin (**8**): IC₅₀ = 2.6 × 10⁴ nM; (●) Melphalan (**9**): IC₅₀ = 3.4 × 10³ nM und (■) Doxorubicin (**10**): IC₅₀ = 45 nM; R = relative Klonbildungsrate.

Eingegangen am 9. März 2006
Online veröffentlicht am 8. September 2006

Stichwörter: Duocarmycine · Glycoside · Prodrugs ·
Tumortheraeutika · Zytostatika

- [1] Übersichten: a) W. A. Denny, *Cancer Invest.* **2004**, *22*, 604–619; b) L. F. Tietze, T. Feuerstein, *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 2155–2175; c) L. F. Tietze, T. Feuerstein, *Aust. J. Chem.* **2003**, *56*, 841–854; d) W. A. Denny, *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 577–595; e) M. Jung, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2001**, *1*, 399–407; f) G. Xu, H. L. McLeod, *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 3314–3324; g) K. N. Syrigos, A. A. Epenetos, *Anticancer Res.* **1999**, *19*, 605–614; h) G. M. Dubowchik, M. A. Walker, *Pharmacol. Ther.* **1999**, *83*, 67–123; i) C. J. Springer, I. Niculescu-Duvaz, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *26*, 151–172; j) L. N. Jungheim, T. A. Shepherd, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 1553–1566.
- [2] K. D. Bagshawe, *Br. J. Cancer* **1987**, *56*, 531–532.
- [3] A. M. Wu, P. D. Senter, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1137–1146.
- [4] a) T. Arndt, U. Arndt, U. Reuning, H. Kessler in *Cancer Therapy: Molecular Targets in Tumor-Host Interactions* (Hrsg.: G. F. Weber), Horizon Bioscience, Norfolk, **2005**, S. 93–141; b) D. Ribatti, A. Vacca, F. Merchionne, M. Presta, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2005**, *5*, 313–317; c) K. A. El Sayed, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2005**, *5*, 971–993.
- [5] a) S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7798–7803; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7624–7630; b) S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7803–7808; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7630–7635.
- [6] a) M. E. M. Noble, J. A. Endicott, L. N. Johnson, *Science* **2004**, *303*, 1800–1805; b) C. Garcia-Echeverria, D. Fabbro, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2004**, *4*, 273–283.
- [7] a) M. Langer, F. Kratz, B. Rothen-Rutishauser, H. Wunderli-Allenspach, A. G. Beck-Sickinger, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1341–1348; b) M. Langer, A. G. Beck-Sickinger, *Curr. Med. Chem.: Anti-Cancer Agents* **2001**, *1*, 71–93.
- [8] L. F. Tietze, T. Herzig, T. Feuerstein, I. Schuberth, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1634–1645.
- [9] a) 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; b) L. F. Tietze, M. Lieb, T. Herzig, F. Haunert, I. Schuberth, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1929–1939; c) L. F. Tietze, T. Herzig, A. Fecher, F. Haunert, I. Schuberth, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 758–765; d) 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.
- [10] a) G. Wei, N. A. Loktionova, A. E. Pegg, R. C. Moschel, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 256–261; b) H. Cheng, X. Cao, M. Xian, L. Fang, T. B. Cai, J. J. Ji, J. B. Tunac, D. Sun, P. G. Wang, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 645–652; c) M. Y. Torgov, S. C. Alley, C. G. Cerveny, D. Farquhar, P. D. Senter, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 717–721; d) E. Bouvier, S. Thiro, F. Schmidt, C. Monneret, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 969–977; e) T. Kline, M. Y. Torgov, B. A. Mendelsohn, C. G. Cerveny, P. D. Senter, *Mol. Pharm.* **2004**, *1*, 9–22; f) E. Bouvier, S. Thiro, F. Schmidt, C. Monneret, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3343–3352; g) H. Townes, K. Summerville, B. Purnell, M. Hooker, E. Madsen, S. Hudson, M. Lee, *Med. Chem. Res.* **2002**, *12*, 248–253; h) N. Amishiro, S. Nagamura, C. Murakata, A. Okamoto, E. Kobayashi, M. Asada, K. Gomi, T. Tamaoki, M. Okabe, N. Yamaguchi, K. Yamaguchi, H. Saito, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 381–391.
- [11] a) M. Ichimura, T. Ogawa, K. Takahashi, E. Kobayashi, I. Kawamoto, T. Yasuzawa, I. Takahashi, H. Nakano, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1037–1038; b) M. Ichimura, T. Ogawa, S. Katsumata, K. Takahashi, I. Takahashi, H. Nakano, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 1045–1053; c) D. L. Boger, D. S. Johnson, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1542–1580; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1438–1474.
- [12] a) L. F. Tietze, F. Haunert, T. Feuerstein, T. Herzig, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 562–566; b) R. Baird, S. Winstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 567–578.
- [13] J. B. J. Milbank, M. Tercel, G. J. Atwell, W. R. Wilson, A. Hogg, W. A. Denny, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 649–658.
- [14] Das bei der Synthese von **5** früher verwendete toxische *n*Bu₃SnH wurde durch Tris(trimethylsilyl)silan ersetzt.
- [15] Präparative HPLC-Trennung: Säule Chiralpak IA (250 × 20 mm, Partikelgröße: 5 µm), mobile Phase: *n*-Heptan/Dichlormethan 4:1, Fluss: 18 mL min⁻¹, α = 2.05, (+)-**5**: 99.9% ee, (–)-**5**: 99.9% ee.
- [16] L. F. Tietze, F. Major, J. Magull, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [17] a) S. Ram, L. D. Spicer, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 515–516; b) T. Bieg, W. Szeja, *Synthesis* **1985**, 76–77.
- [18] a) R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 213–236; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 212–235; b) W. Dullenkopf, J. C. Castro-Palomino, L. Manzoni, R. R. Schmidt, *Carbohydr. Res.* **1996**, *296*, 135–147.
- [19] L. F. Tietze, B. Krewer, H. Frauendorf, F. Major, I. Schuberth, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6720–6724; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6570–6574.