

1 Einleitung

Die Erforschung neuer, biologisch aktiver Verbindungen aus natürlichen Quellen haben Naturwissenschaftler und Mediziner seit jeher interessiert, handelt es sich bei Naturstoffen doch häufig um Substanzen mit hoher biologischer Wirkung. Die Natur dient als Ideenlieferant bei der Suche nach neuen Wirkstoffen und Leitstrukturen für die pharmazeutische Anwendung. Es sind zahlreiche Naturstoffe als pharmazeutische Wirkstoffe für den Humanbereich im Handel. Sie gehören zu den umsatzstärksten Pharmaprodukten. Zu den neueren Naturstoffen, die aufgrund ihrer außergewöhnlichen Wirkung im Markt eingeführt wurden, gehören das Cyclosporin (Immunsuppressivum), der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Mevinolin (Cholesterinsenker) und das durch Semisynthese gewonnene Taxol (Cytostatikum).

Die Totalsynthese von Naturstoffen wird heute nur noch selten zur Strukturaufklärung herangezogen. Vielmehr ermöglicht eine erfolgreich durchgeführte Synthese eines Wirkstoffs, diesen bei begrenztem natürlichem Vorkommen in ausreichender Menge für die Forschung und gegebenenfalls zur medizinischen Versorgung zur Verfügung zu stellen. Zudem erlaubt eine flexible Synthesestrategie die Variation einzelner Strukturelemente. Man gelangt so zu Derivaten und analogen Verbindungen, deren Untersuchung Hinweise zu Struktur-Wirkungsbeziehungen geben. Die Aufklärung des zugrundeliegenden Wirkungsmechanismus eines Naturstoffs erlaubt es dann, diesen gezielt in seinen pharmakologischen Eigenschaften zu modifizieren. Ziel kann es sein, von komplexen Verbindungen zu einfachen Leitstrukturen zu gelangen, die Aktivität zu erhöhen, die Nebenwirkungen zu minimieren, das Wirkungsspektrum zu verbreitern oder die Applizierbarkeit zu verbessern.

Es werden immer wieder neue Naturstoffe mit interessanten biologischen Wirkungen entdeckt. Eine solche Klasse neuer natürlicher Verbindungen mit außergewöhnlicher pharmakologischer Wirkung stellen die Endiin-Cytostatika dar, deren Strukturen und Wirkungsmechanismen in den letzten Jahren aufgeklärt werden konnten. Diese DNA-spaltenden Verbindungen vereinigen einen außergewöhnlichen Molekülaufbau mit bemerkenswerten biologischen Aktivitäten und einem faszinierenden Wirkungsmechanismus. Die Totalsynthese und die Suche nach einfacheren synthetischen Endiinen mit gezielt modifizierten Eigenschaften sind aufgrund der vielversprechenden biologischen Wirkung von Interesse.

1.1 Die natürlichen Endiin-Cytostatika

Eine neue Klasse von Naturstoffen bakterieller Herkunft stellen die Endiin-Cytostatika dar¹. EDO *et al.* veröffentlichte 1985 die Struktur des Neokarzinostatin-Chromophors als erstes Endiin, das ein Bicyclo[7.3.0]dodecadiin-Gerüst aufweist². In den folgenden Jahren wurden weitere Naturstoffe isoliert und in der Struktur aufgeklärt, die zu der Familie der Endiin-Cytostatika zusammengefaßt wurden. Es sind dies die Calicheamicine³, die Esperamicine⁴, die Dynemicine⁵, das Kedarcidin⁶, der C-1027 Chromophor⁷ (s. Abb. 1) und als jüngstes Mitglied dieser Gruppe das Namenamicin⁸ (o. Abb.).

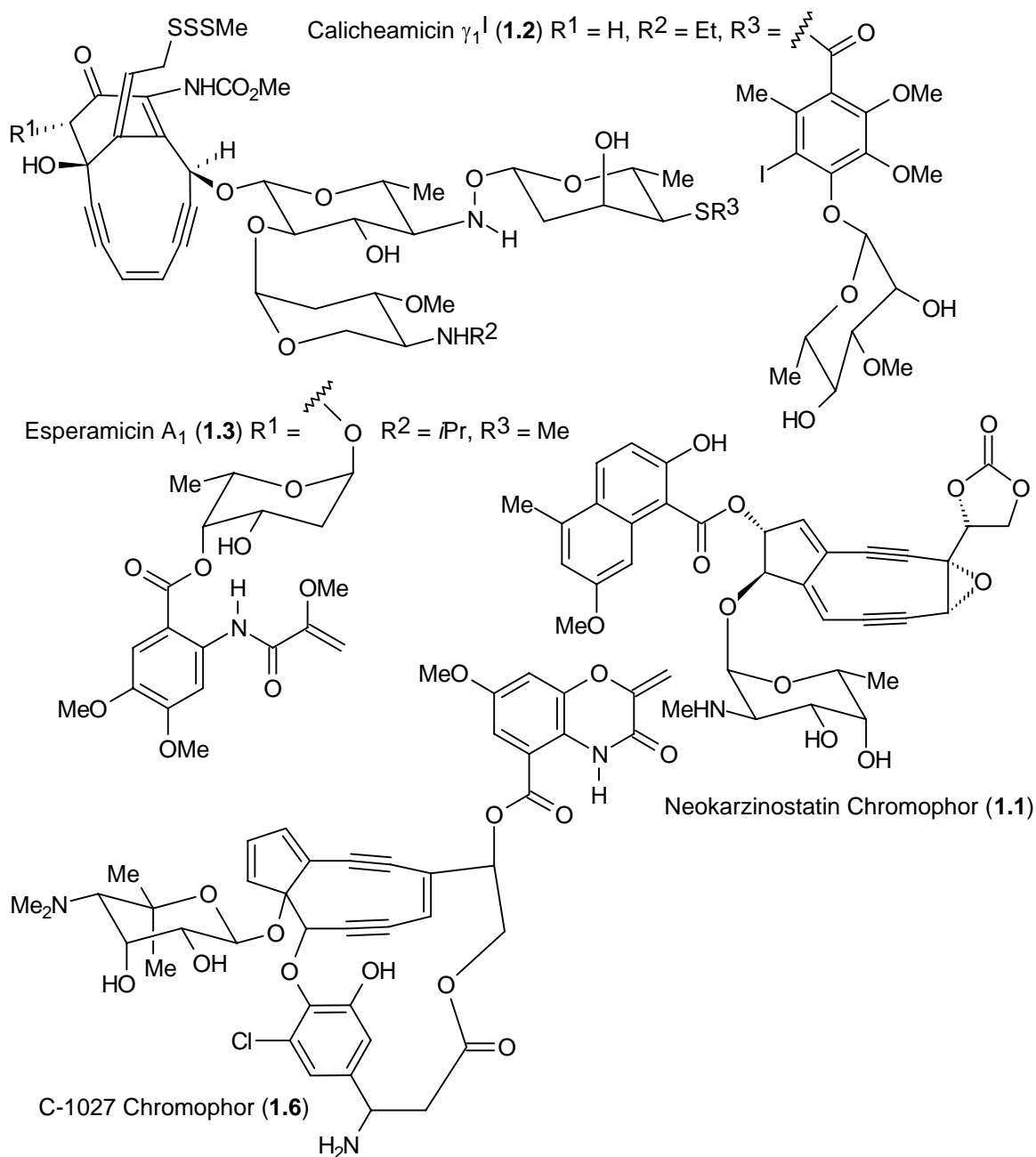


Abb. 1 Vertreter der natürlichen Endiin-Cytostatika/Antibiotika.

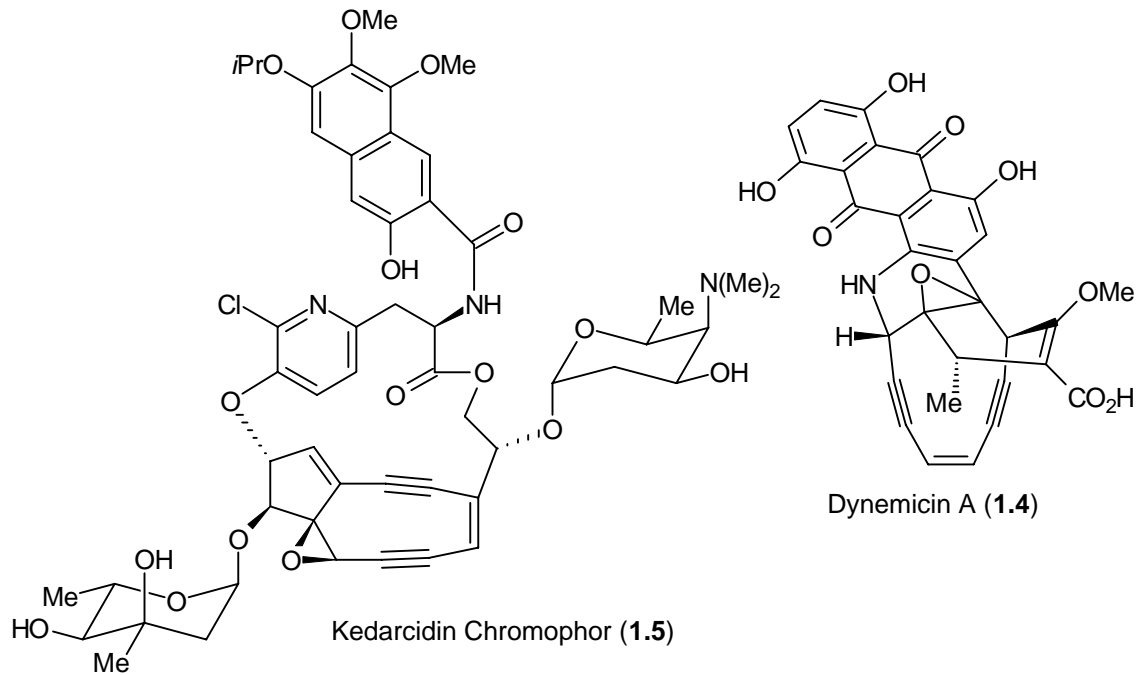


Abb. 1 Vertreter der natürlichen Endiin-Cytostatika/Antibiotika (Fortsetzung).

Trotz der offensichtlichen strukturellen Vielfalt der Moleküle ist ihnen gemeinsam, daß ihre cytotoxischen Eigenschaften auf der Fähigkeit beruhen, sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffradikale zu bilden, die zum Bruch von Doppelstrang-DNA führen und somit den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten. Als Vorläufer für die Diradikale dient das ungesättigte konjugierte System, das aber erst durch eine vorgelagerte chemische Reaktion aktiviert werden muß, wobei sich bei den Endiinen unterschiedliche Auslösevorrichtungen finden. Alle Moleküle enthalten mindestens drei funktionelle Untereinheiten: a) Ein Erkennungs- und Transportsystem, das das Endiin zur DNA leitet, b) eine Auslösevorrichtung (Trigger), die nach Aktivierung eine Reaktionskaskade startet und den "Sprengkopf" zündet, c) einen "Sprengkopf" mit konjugierten Mehrfachbindungen, der nach Aktivierung durch den Trigger sp^2 -Radikale bildet und nach H-Abstraktion aus der DNA die Zelle irreversibel schädigt.

Die Endiine stellen somit eine Klasse von natürlichen, cytotoxischen Prodrugs dar, die zu den mit am wirksamsten anti-Tumor-aktiven Substanzen zählen. Die IC_{50} -Werte für einige Tumorarten liegen in Größenordnungen von wenigen ng/ml.

Die hohe biologische Aktivität und die Notwendigkeit, die Endiine zunächst zu aktivieren, bevor sie ihre biologische Wirkung entfalten, machen diese Moleküle für neue Krebstherapien interessant. Ein neues Konzept in der Bekämpfung von Krebs stellt das *tumor-targeting* dar⁹. Das Prodrug wird zunächst an einen tumorspezifischen Antikörper gebunden und durch diesen selektiv zur Tumorzelle transportiert. Um in das Zellinnere zu

gelangen, muß sich das Prodrug dann zunächst vom Antikörper lösen, um durch die Zellmembran zu diffundieren und kann dann durch die Zelle selbst oder extern (z. B. Licht¹⁰) aktiviert werden.

Der *antibody directed enzyme-mediated prodrug therapy* (ADEPT) liegt ein anderes Konzept zugrunde¹¹. Hier wird das Prodrug durch ein Enzym aktiviert, das zuvor mit Hilfe eines tumorspezifischen Antikörpers an die Krebszelle gebracht wurde. Diese Strategie hat den Vorteil, daß das Prodrug nach Aktivierung ohne weiteres in die Tumorzelle diffundiert und daß ein Enzym-Antikörper-Konjugat eine große Zahl von Prodrugs aktivieren kann.

In den folgenden Kapiteln soll auf die einzelnen natürlichen Endiine bezüglich ihrer Herkunft, Struktur und Wirkungsmechanismen eingegangen werden.

1.1.1 Neokarzinostatin

Neokarzinostatin (**1.1**) wurde 1965 von ISHIDA et al. aus *Streptomyces carzinostaticus* Var. F-41 isoliert¹². Der antibiotische 1:1-Komplex besteht aus einer Proteinkomponente und dem NCS-Chromophor¹³. Die starke cytostatische und antibakterielle Wirkung, die auf der Fähigkeit DNA zu spalten beruht, ist im wesentlichen auf den Chromophor zurückzuführen. Das Protein spielt beim Transport des Wirkstoffs eine Rolle und stabilisiert den NCS-Chromophor, der in unkomplexierter Form instabil ist¹⁴. Ein erster Vorschlag zum Wirkungsmechanismus stammt von MYERS et al¹⁵ (s. Abb. 2).

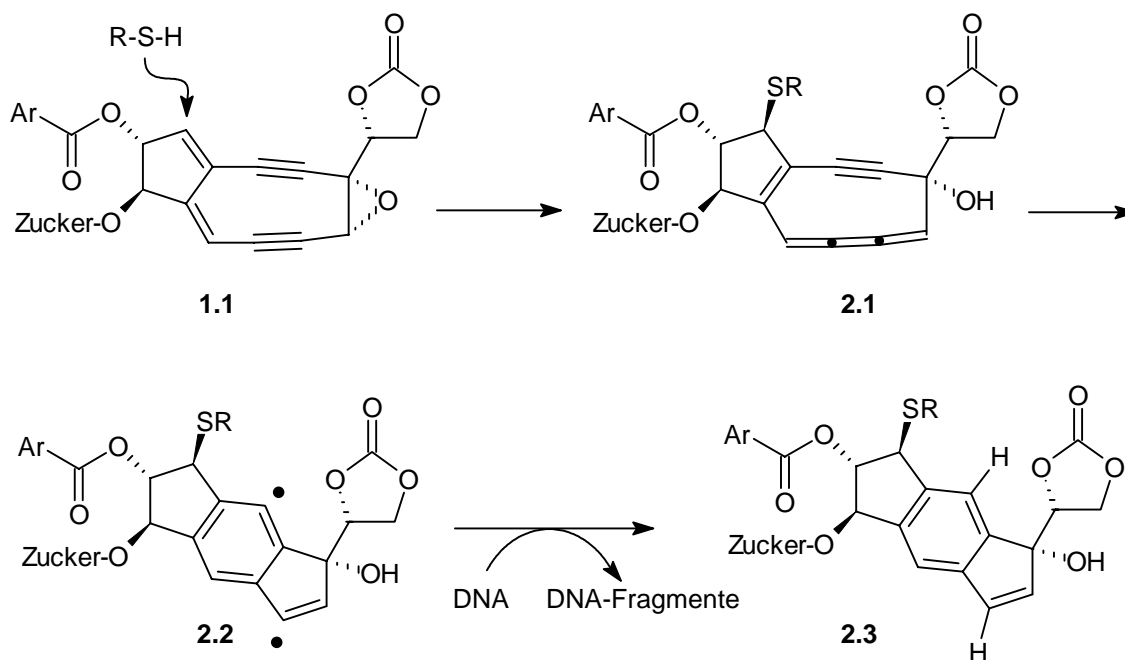


Abb. 2 Vorgeschlagener Wirkungsmechanismus des Neokarzinostatin Chromophors (**1.1**). Demnach wird eine Reaktionskaskade durch einen nucleophilen Angriff (z. B. durch ein Thiol) an die Doppelbindung des 5-Ringes ausgelöst. Dieser Angriff bewirkt eine

Umlagerung der Mehrfachbindungen und führt zur Öffnung des Epoxids unter Bildung des Cumulens **2.1**. Diese labile und stark gespannte Zwischenstufe stabilisiert sich nach Cycloaromatisierung zum Diradikal **2.2** und H-Abstraktion aus der DNA zur Verbindung **2.3**. Vorzugsweise handelt es sich um H-Atome an der 5'-Position von Adenin und Thymin¹⁶. Die Reaktionskaskade konnte *in vitro* mit S-Nucleophilen^{15b,c} und Natriumborhydrid¹⁷ nachgewiesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, daß sich die Naphthoatgruppe in die DNA einschleibt und den Rest des Moleküls in die kleine Furche plaziert¹⁸.

1.1.2 Calicheamicine

Die Familie der Calicheamicine wurden aus Kulturen von *Micromonospora echinospora* ssp *calichensis* isoliert^{3a,b}. Ihre Strukturen wurden von LEE et al. veröffentlicht^{3a,b} und 1989 korrigiert^{3c}. Der bekannteste Vertreter ist das Calicheamicin γ_1^I (**1.2**), das inzwischen auch synthetisch zugänglich ist¹⁹. Die Calicheamicine wirken antibakteriell sowohl gegen gram-positive als auch gegen gram-negative Bakterien. Zudem zeichnen sie sich durch eine hohe Wirksamkeit gegen Tumorzellen mit optimalen Dosen von 0.15-5 μg pro kg aus^{3,20}. *In vitro* spalten Calicheamicine DNA äußerst effektiv und sequenzspezifisch, so daß angenommen wird, daß die biologische Wirkung der Calicheamicine auf DNA-Schädigung zurückzuführen ist. Der Oligosaccharid-Teil wird für den Transport zur DNA und für die sequenzspezifische Bindung verantwortlich gemacht²¹. Der [7.3.1.]-Bicyclus ist vermutlich der Vorläufer der cytotoxischen Diradikale, der durch das Trisulfid als Auslösevorrichtung aktiviert wird. Der vorgeschlagene Wirkungsmechanismus ist in Abb. 3 dargestellt^{3a,b,4}. Nach Plazierung in die kleine Furche der DNA - sequenzspezifisch an ein 5'-TCCT-3'-Basenquartett - erfolgt ein nucleophiler Angriff an das Trisulfid, der ein Thiolatanion freisetzt. Das Anion wiederum greift intramolekular in einer Art Michael-Addition an das α,β -ungesättigte Keton an. Im resultierenden Tricyclus **3.1** ist die Aktivierungsenergie aufgrund des Fehlens der Doppelbindung am Brückenkopf (Bredt'sche Regel) soweit abgesenkt, daß die Bergman-Cyclisierung²² unter physiologischen Bedingungen spontan erfolgen kann. Das Diradikal **3.2** stabilisiert sich wiederum durch H-Abstraktion aus der DNA was zum Doppelstrangbruch und zur irreversiblen Schädigung des genetischen Materials führt.

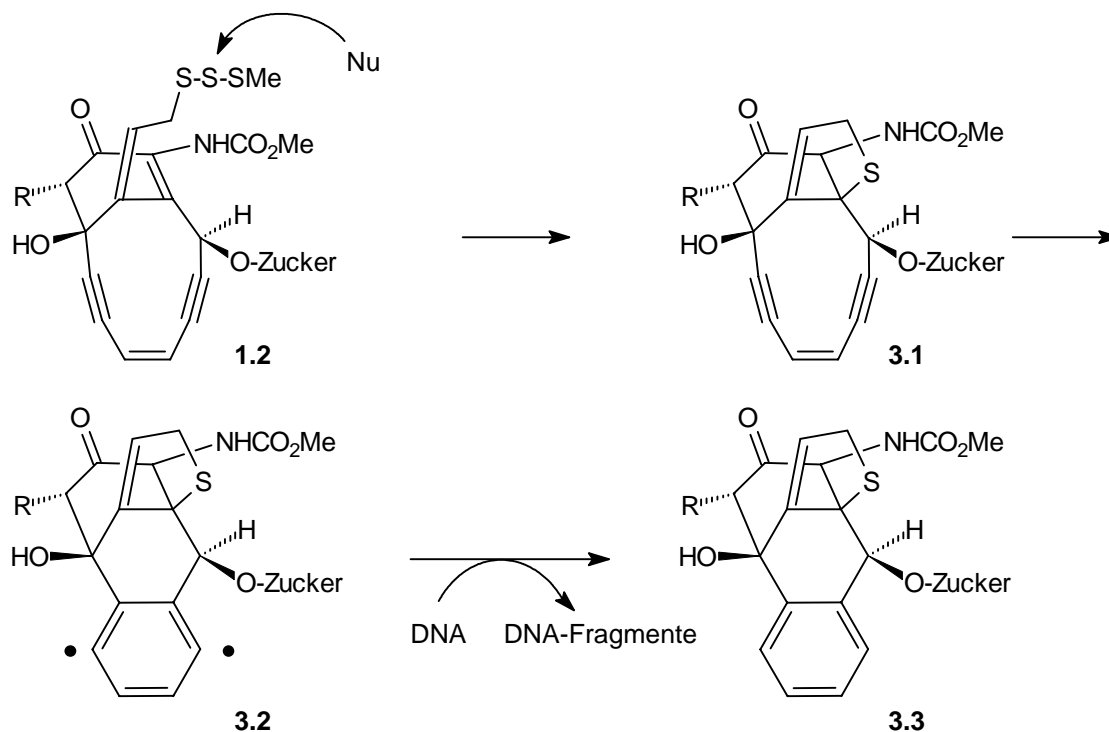


Abb. 3 Vorgeschlagener Wirkungsmechanismus der Calicheamicine und Esperamicine.

1.1.3 Esperamicine

Die Esperamicine wurden aus Kulturen von *Actinomadura verrucosospora* isoliert und in ihren Strukturen 1987 aufgeklärt^{4,23}. Die Verbindungen zeigen extrem starke Wirkung als Breitbandantibiotika und Cytostatika. Die auffallenden Ähnlichkeiten zwischen den Esperamicinen und den Calicheamicinen umfassen die Struktur, die biologische Wirkung und den Wirkungsmechanismus. Die Aktivität der Esperamicine gegenüber Maustumormodellen wie P 388, B 16 und M 5076 ist mit derjenigen der Calicheamicine vergleichbar⁴. Für die Wirkungsweise wurde ein Mechanismus analog dem der Calicheamicine vorgeschlagen^{3,4,24}. Allerdings ist die Sequenzspezifität bei der DNA-Spaltung deutlich kleiner.

1.1.4 Dynemicine

Dynemicin A (**1.4**) wurde 1989 aus der Fermentationsbrühe von *Micromonospora chersina* isoliert^{5a} und ist inzwischen auch synthetisch zugänglich^{19a,25}. Es bildet mit dem Desoxydynemicin A^{5b} mit ähnlichen biologischen Eigenschaften eine eigene Unterklasse von natürlichen Endiinen. Neben der hohen antibakteriellen Wirkung bei niedriger Toxizität weist es hohe Aktivität gegenüber verschiedenen Tumorzellarten auf und verlängert die Lebensdauer von Mäusen, die mit P 388-Leukämie- und B 16-Melanomzellen geimpft wurden²⁶. Die biologische Aktivität beruht ebenfalls auf der Fähigkeit, DNA zu spalten, wobei Einfach- als auch Doppelstrangbrüche beobachtet werden^{28a,b}.

Die Dynemicine enthalten wie die Calicheamicine und Esperamicine einen zehngliedrigen Ring mit einer 1,5-Diin-3-en-Einheit. Die Dynemicine unterscheiden sich jedoch von letzteren durch die Verknüpfung des Ringes mit einem Anthrachinonchromophor, wie man ihn auch bei den Anthracyclin-Antibiotika²⁷ findet. Es wurde ein mehrere Reaktionen umfassender Wirkungsmechanismus für Dynemicin A vorgeschlagen, der Merkmale der Wirkungsweisen von Endiin- und Anthracyclin-Antibiotika in sich vereint (s. Abb. 4)²⁸.

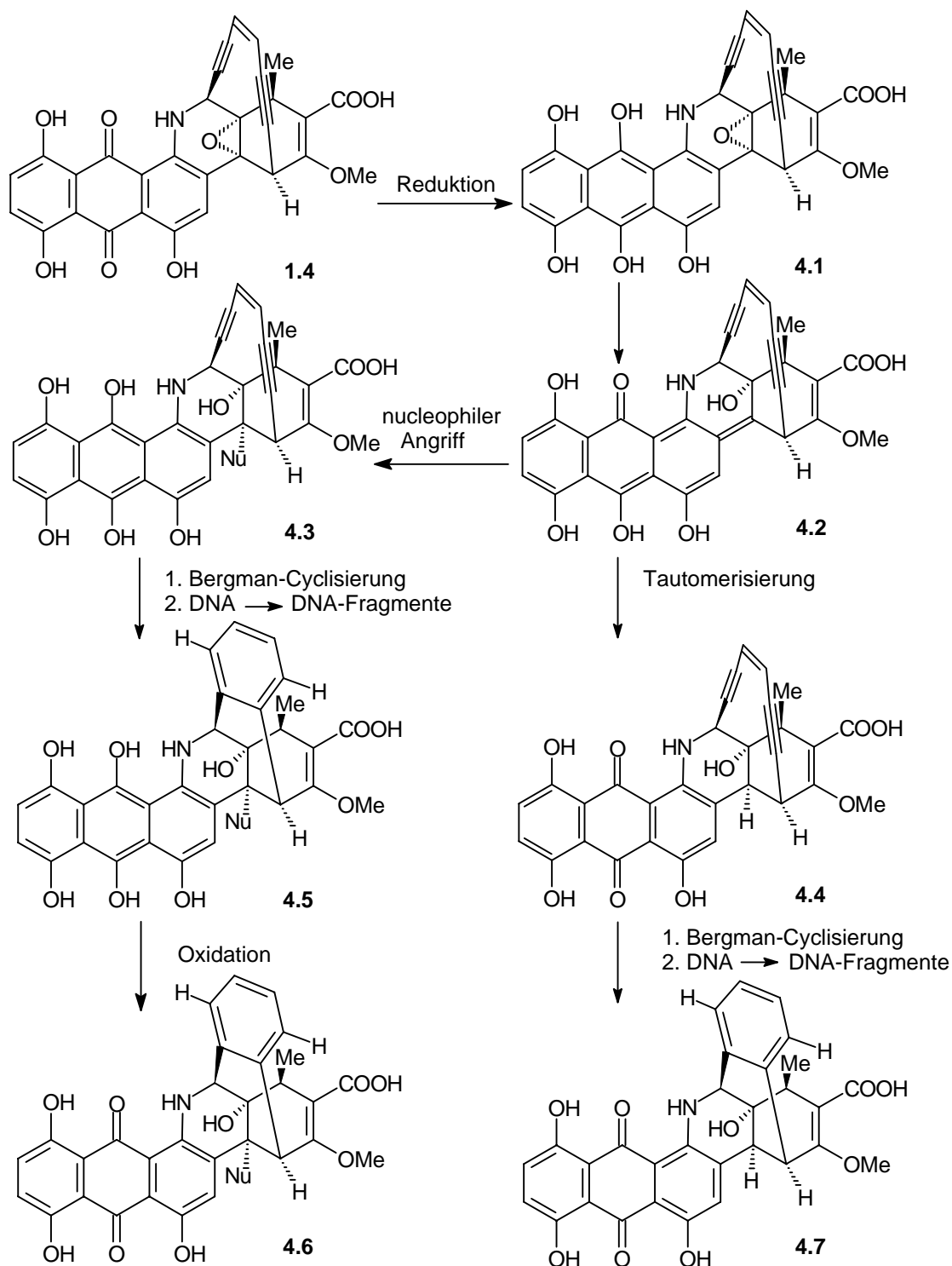


Abb. 4 Vorgeschlagener Wirkungsmechanismus von Dynemicin A (1.4).

Der Anthrachinonchromophor ist für die Bindung des Moleküls an die DNA durch Interkalation verantwortlich^{28a}. Aufgrund der orthogonalen Anordnung des Anthrachinon- und des Endiin-Ringes kommt das Endiin optimal in die kleine Furche der DNA zu liegen. Die bemerkenswerte Reaktionskaskade wird durch Bioreduktion des Chinon-Systems zum Hydrochinon eingeleitet. Das resultierende Anthrachinol **4.1** lagert unter Epoxidöffnung zum Chinonmethid **4.2** um, das zunächst nucleophil angegriffen wird (**4.3**) oder zu Verbindung **4.4** tautomerisiert. Die Aktivierungsenergie der Bergman-Cyclisierung²² ist in den Intermediaten **4.3** und **4.4** im Vergleich zum Dynemicin herabgesetzt, so daß spontane Cycloaromatisierung eintritt. Die resultierenden benzoiden Diradikale stabilisieren sich durch H-Abstraktion aus der DNA, was zu Einfach- und Doppelstrangbrüchen führt. Die Verbindungen **4.6** (mit Nu = OH, SCH₂CO₂Me, nach spontaner Oxidation) und **4.7** konnten als Endprodukte der Reaktionskaskade isoliert werden^{5c,28a,b}.

1.1.5 Kedarcidin

Das Kedarcidin (**1.5**) wurde 1991 aus einer Kultur von *Actinomycete* L585-6 isoliert^{6a}. Es besteht aus einem Protein mit 114 Aminosäuren und einem Chromophor, der nicht kovalent an das Protein gebunden ist. Der Chromophor enthält wie Neokarzinostatin ein neungliedriges cyclisches Endiin, welches in Lösung äußerst instabil ist²⁹.

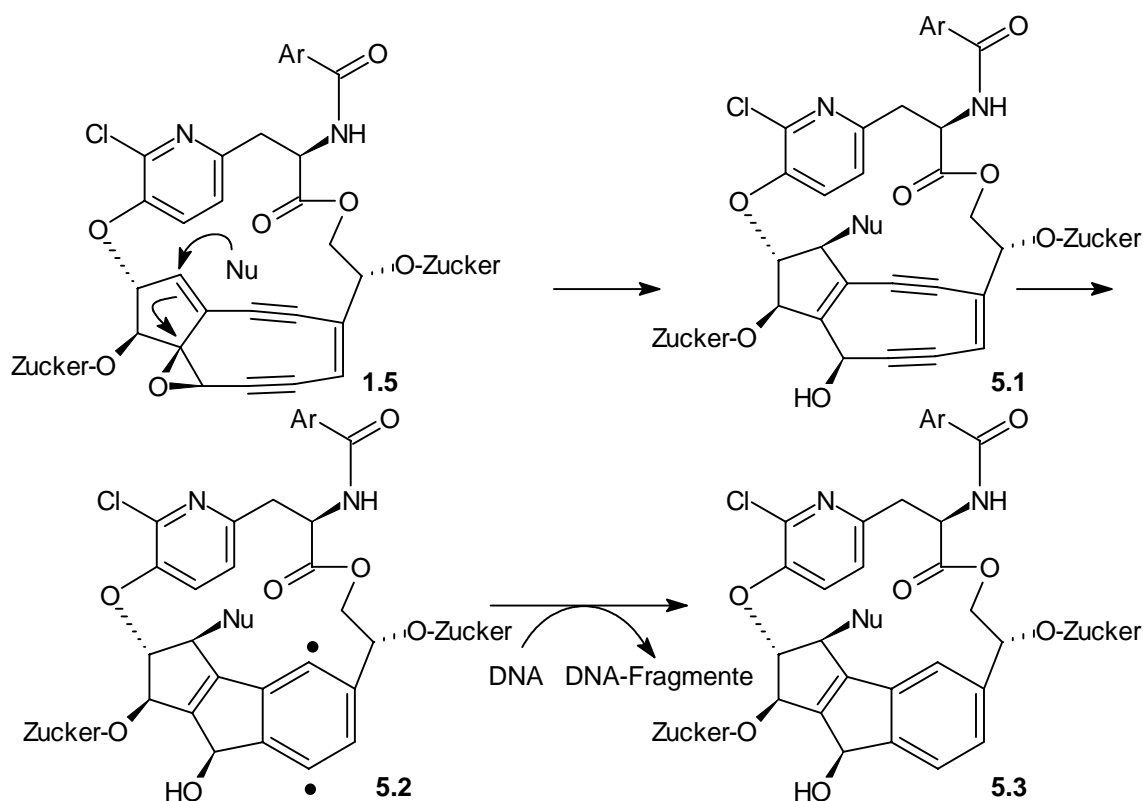


Abb. 5 Vorgeschlagener Wirkungsmechanismus des Kedarcidin Chromophors (**1.5**).

Das Kedarcidin zeigt starke Aktivität gegen P 338-Leukämie- und B 16-Melanomzellen, sowie gegen gram-positive Bakterien^{6a}. Der favorisierte Wirkungsmechanismus ist in Abb. 5 gezeigt^{6b}. Nach nucleophilem Angriff an die Doppelbindung und Öffnung des Epoxids wird ein reaktives Endiin erzeugt, das spontan cycloaromatisiert und das zellschädigenden Diradikal ausbildet. Die Verbindung **5.2** stabilisiert sich wiederum durch H-Abstraktion aus der DNA.

1.1.6 C-1027 Chromophor

Der C-1027 Chromophor (**1.6**) wurde von einer japanischen Arbeitsgruppe isoliert und zeichnet sich durch eine hohe Wirksamkeit gegen Tumorzellen aus⁷. Die Core-Struktur dieses jüngsten Vertreters der Endiin-Cytostatika weist große Ähnlichkeit mit der des Neokarzinostatins und des Kedarcidins auf. Die Endiineinheit ist Teil eines neungliedrigen Ringes, der am Brückenkopf eine weitere Doppelbindung aufweist, die das Endiin vermutlich zunächst stabilisiert. Angenommen wird, daß ein nucleophiler Angriff an die Doppelbindung die Reaktionskaskade startet und zur Bildung der zellschädigenden Diradikale führt.