



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 33 942 T2 2006.06.08

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 888 301 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 33 942.4

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US97/03641

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 908 059.5

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 97/032850

(86) PCT-Anmeldetag: 07.03.1997

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 12.09.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 07.01.1999

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 10.08.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 08.06.2006

(51) Int Cl.⁸: C07D 209/70 (2006.01)

C07D 403/06 (2006.01)

C07D 403/14 (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

13024 P 08.03.1996 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

The Scripps Research Institute, La Jolla, Calif., US

(72) Erfinder:

BOGER, L., Dale, La Jolla, US

(74) Vertreter:

Zenz, Helber, Hosbach & Partner GbR, 45128
Essen

(54) Bezeichnung: MCBI ANALOGUE VON CC-1065 UND DIE DUOCARMYCINE

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**Gebiet der Erfindung:**

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf gegen Tumore gerichtete Antibiotika. Spezieller gesagt, bezieht sich die Erfindung auf Analoga von CC-1065 und die Duocarmycine, die eine antitumorelle antibiotische Aktivität besitzen.

Hintergrund:

[0002] (+)-CC-1065 (1) und die Duocarmycine stellen die ersten Mitglieder einer Klasse von außergewöhnlich wirksamen, antitumorellen Antibiotika dar, die ihre biologischen Wirkungen aus der reversiblen, stereo-elektronisch regulierten, sequenzselektiven Alkylierung von DNA ableiten (Boger et al., J. Org. Chem. 1990, 55, 4499; Boger et al., J. Am. Chem. Soc., 1990, 112, 8961; Boger et al., J. Am. Chem. Soc., 1991, 113, 6645; Boger et al., J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 9872; Boger et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 1992, 2, 759). Nach ihrer ersten Offenlegung sind beträchtliche Anstrengungen unternommen worden, um ihre DNA-Alkylierungsselektivität und ihre strukturellen Herkunft nachzuweisen. Weitere Anstrengungen wurden unternommen, um die Verbindung zwischen der DNA-Alkylierung und den daraus folgenden biologischen Eigenschaften herzustellen, d.h. um die grundlegenden Prinzipien zu definieren, die den Beziehungen zwischen Struktur, chemischer Reaktivität und biologischen Eigenschaften zugrunde liegen ([Fig. 1](#); 1–3).

[0003] CBI (1,2,9,9a-Tetrahydrocyclopropa[c]benz[e]indol-4-on) ist als Alkylierungsuntereinheit identifiziert worden, die der Alkylierungsuntereinheit von CC-1065 und den Duocarmycinen entspricht. (Boger et al., J. Am. Chem. Soc., 1989, 111, 6461; Boger D. L.; Ishizaki et al. J. Org. Chem. 1990, 55, 5823). Mittel, zu denen die Analoga auf der Basis von CBI gehören, haben sich als besonders nützlich als DNA alkylierende Substanzen erwiesen. Dies war signifikant, da vorhergehende Untersuchungen diese einzigartigen Eigenschaften den natürlich vorkommenden Alkylierungsuntereinheiten zugeordnet hatten, so dass der Eindruck hinterlassen wurde, dass sogar kleine strukturelle Störungen, ganz zu schweigen von tief sitzenden strukturellen Änderungen, nachteilige Auswirkungen auf die Eigenschaften haben würden. (Hurley et al., Science 1984, 226, 843; Reynolds et al. Biochemistry 1985, 24, 6228; Hurley et al. Biochemistry 1988, 27, 3886; Hurley et al. J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 4633; Warpehoski et al., Biochemistry 1992, 31, 2502). Dies hat sich nicht nur als falsch erwiesen, sondern die natürlichen Enantiomere der Analoga von (+)-CC-1065 auf CBI-Basis haben sich als (4×) chemisch stabiler, biologisch wirksamer und synthetisch wesentlich besser zugänglich als die entsprechenden Mittel erwiesen, die die natürliche CPI-Alkylierungsuntereinheit von CC-1065 enthalten. (Boger et al., J. Org. Chem. 1990, 55, 5823; Boger et al., J. Org. Chem. 1992, 57, 2873; Boger et al., J. Org. Chem. 1995, 60, 1271). Weiters wiesen ausgewählte Mittel innerhalb der Reihe von CBI-Analoga nicht nur wirksame cytotoxische Aktivität auf, sondern auch wirksame und wirkungsvolle in vivo-Antitumoraktivität. (Boger et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 1991, 1, 115).

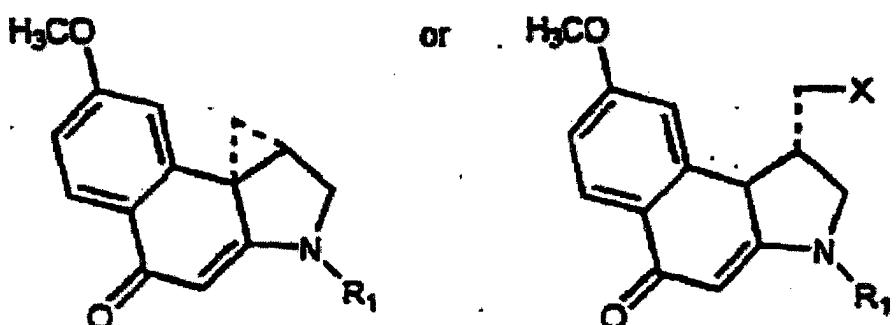
[0004] Es wurde gezeigt, dass die natürlichen Enantiomere der Analoga auf CBI-Basis, DNA mit einer unveränderten Sequenzselektivität bei einer erhöhten Rate und mit größerer Effizienz als das entsprechende CPI-Analogon alkylieren. (Boger et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 1991, 1, 115; Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 2779; Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 5487). Dies zeigt, dass die vereinfachte CBI-Alkylierungsuntereinheit wichtige Vorteile gegenüber der natürlichen Alkylierungsuntereinheit von CC-1065 besitzt. In kürzlich durchgeföhrten Untersuchungen wurden Modelle für die DNA-Alkylierungsreaktionen von CC-1065 und den Duocarmycinen entwickelt. (Boger et al., J. Org. Chem. 1990, 55, 4499; Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 8961; Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 6645; Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 9872; Boger et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 1992, 2, 759; Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 1635). Diese Modelle berücksichtigen die umgekehrte und versetzte AT-reiche Adenin-N₃-DNA-Alkylierungsselektivität der enantiomeren Agenzien und ihrer strukturellen Analoga. Es wurde festgestellt, dass die diastereomeren, aus nicht natürlichen Enantiomeren abgeleiteten Addukte eine bedeutende destabilisierende sterische Wechselwirkung zwischen dem CPI C7-Zentrum (CH₃) oder dem CBI C8-Zentrum und der Base direkt neben dem alkylierten Adenin erfahren, die bei den natürlichen enantiomeren Addukten nicht vorhanden ist. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen verringern sich oder verschwinden die Unterscheidungsmerkmale zwischen natürlichen und nicht natürlichen Enantiomeren, wenn die inhärente sterische Masse, die dieses Zentrum umgibt, verringert oder entfernt wird. (Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 7996). Wegen der Empfindlichkeit der nicht natürlichen Enantiomere gegenüber destabilisierenden sterischen Wechselwirkungen in der Umgebung des CPI C7- oder CBI C8-Zentrums sind die nicht natürlichen Enantiomere der Analoga auf CBI-Basis wirksamer als das entsprechende CPI-Analogon, da sie eine noch stärkere relative Rate und Effizienz der DNA-Alkylierung aufweisen.

[0005] Es gibt eine direkte Beziehung zwischen der funktionellen Stabilität und der cytotoxischen Wirksamkeit. (Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 6461; Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 11335; Mohamadi et al., J. Med. Chem. 1994, 37, 232; Boger et al., J. Org. Chem. 1994, 59, 4943; Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 6461; Boger et al., J. Org. Chem. 1990, 55, 5823). In einer laufenden Reihe von Untersuchungen, die mit Agenzien mit tiefliegenden Modifikationen in der Alkylierungsuntereinheit durchgeführt wurden, welche gegenwärtig die Verbindungen 4–9 (Fig. 2) einschließen, wurde festgestellt, dass die Agenzien mit der größten Solvolysestabilität die wirksamste cytotoxische Aktivität aufweisen. Weiters wurde diese direkte Beziehung zwischen funktioneller Stabilität und biologischer Wirksamkeit bei einfachen und höheren Analoga der natürlichen Produkte beobachtet. Eine nachfolgende Bestätigung dieser Beziehung wurde bei einer Reihe von einfachen N²-substituierten CBI-Derivaten beobachtet. (Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 5523). Es wurden vorhersagbare lineare Beziehungen zwischen der Solvolysestabilität ($-\log k$), cytotoxischen Wirksamkeit ($\log 1/IC_{50}$, L1210) und den Elektronen abziehenden Eigenschaften des N²-Substituenten (Hammettsche σ_p Konstante) beobachtet (Fig. 2; 4–9).

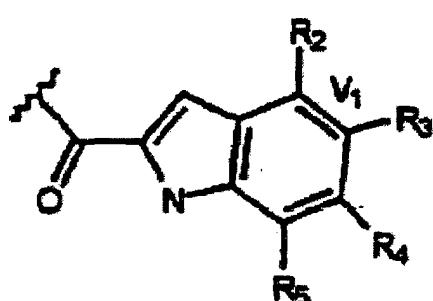
[0006] Es wird ein alternatives alkylierendes Mittel mit einer geänderten Reaktivität im Vergleich zu CBI benötigt, das in Analoga von CC-1065 und die Duocarmycine eingebaut werden kann.

Zusammenfassung der Erfindung:

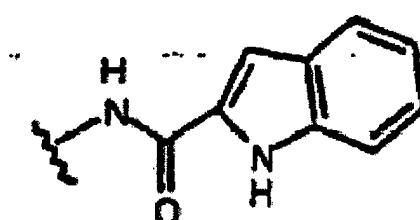
[0007] Eine Erscheinungsform der Erfindung richtet sich auf Alkylierungsmittel, die durch eine der folgenden Strukturen dargestellt sind:



[0008] In den obigen Strukturen wird X aus der Gruppe bestehend aus Chlor, Brom, Iod und OTOS ausgewählt, und R₁ wird aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, tert-Butoxycarbonyl und einem Radikal ausgewählt, das durch die folgende Struktur dargestellt ist:

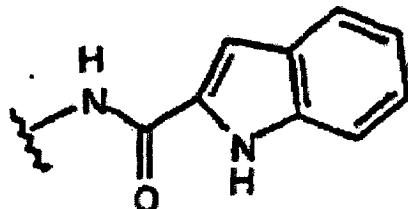


[0009] In dem obigen Radikal wird R₂ aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Hydroxyl und O-Alkyl(C1-C6) ausgewählt; R₃ wird aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Hydroxyl, O-Alkyl(C1-C6) und einem Radikal ausgewählt, das durch die folgende Struktur dargestellt ist:

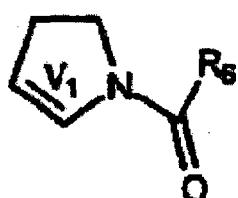


[0010] R_4 wird aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Hydroxyl und O-Alkyl(C1-C6) ausgewählt, und R_5 wird aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Hydroxyl und O-Alkyl(C1-C6) ausgewählt. V_1 stellt eine Vinylengruppe zwischen R_2 und R_3 dar. Es gelten jedoch die folgenden Bedingungen:

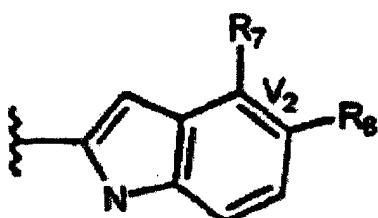
1. Wenn R_2 und R_3 an einem N-substituierten Pyrrolidinring (siehe unten) beteiligt sind, dann sind R_4 und R_5 Wasserstoff; und
2. Wenn R_2 Wasserstoff ist, dann sind R_4 und R_5 Wasserstoff und R_3 ist ein Radikal, das durch die folgende Struktur dargestellt ist:



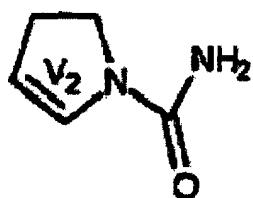
[0011] Alternativ gruppieren sich R_2 und R_3 und die dazwischenliegende Vinylengruppe zu einem N-substituierten Pyrrolidinring zusammen, der durch die folgende Struktur dargestellt ist:



wobei V_1 die Vinylengruppe zwischen R_2 und R_3 darstellt. In dem obigen Radikal wird R_6 aus der Gruppe bestehend aus $-NH_2$ und einem Radikal gewählt, das durch die folgende Struktur dargestellt ist:

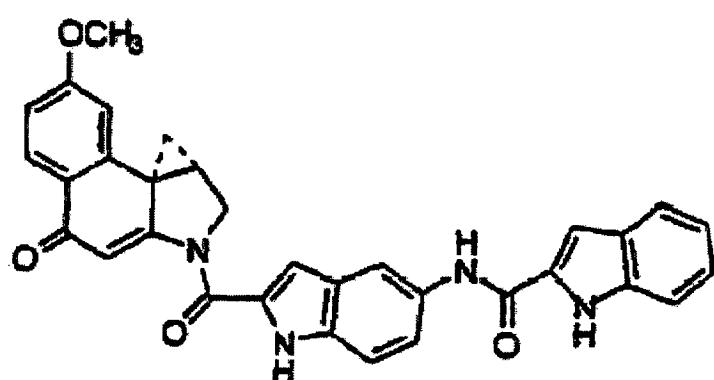
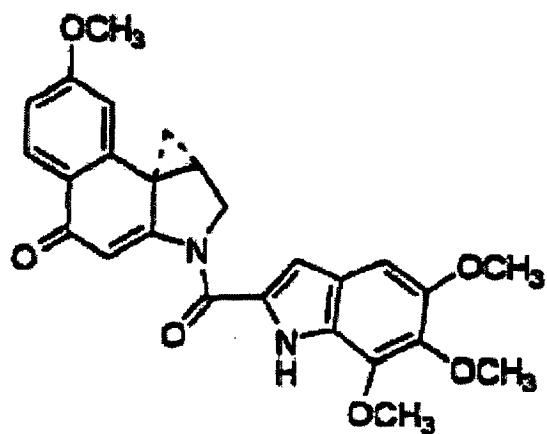


[0012] R_7 wird aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Hydroxyl und O-Alkyl(C1-C6) gewählt; R_8 wird aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Hydroxyl und O-Alkyl(C1-C6) gewählt, und V_2 stellt eine Vinylengruppe zwischen R_7 und R_8 dar. Alternativ können R_7 und R_8 und die dazwischenliegende Vinylengruppe zusammen einen N-substituierten Pyrrolidinring bilden, der durch folgende Struktur dargestellt ist:

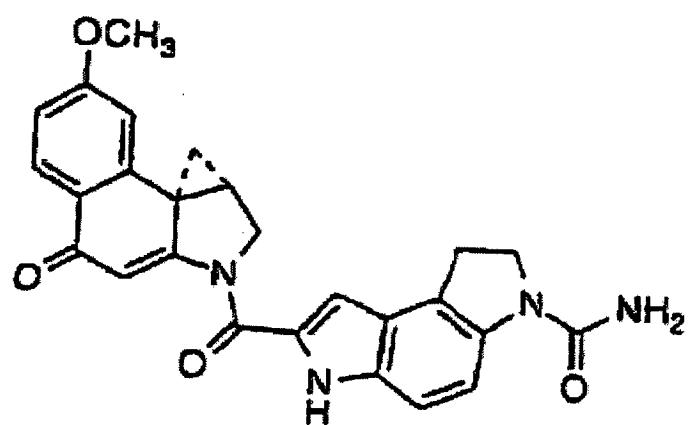


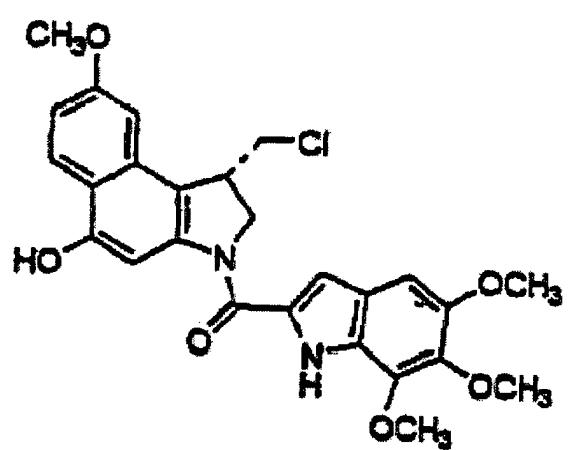
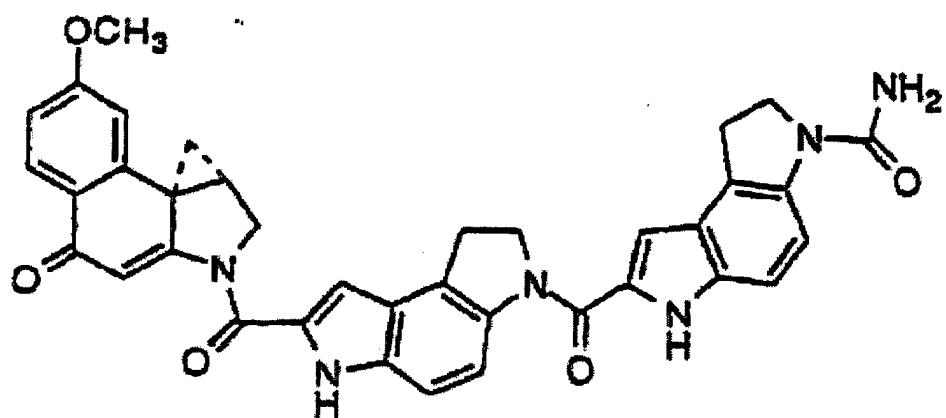
wobei V_2 die Vinylengruppe zwischen R_7 und R_8 darstellt.

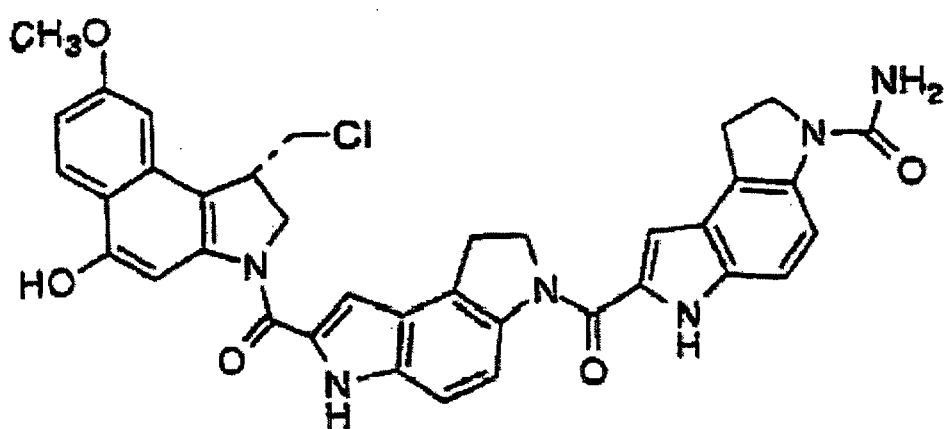
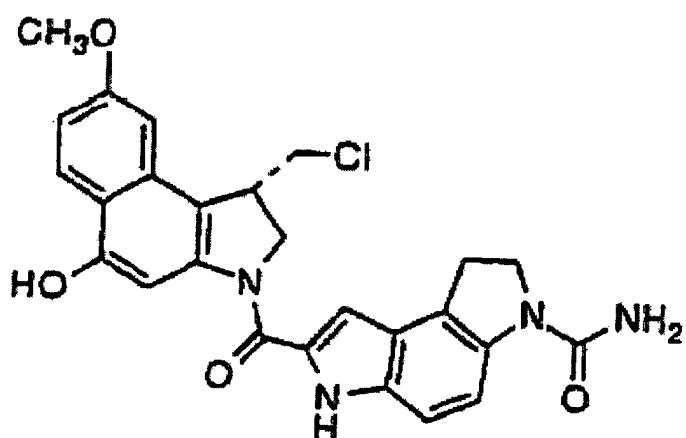
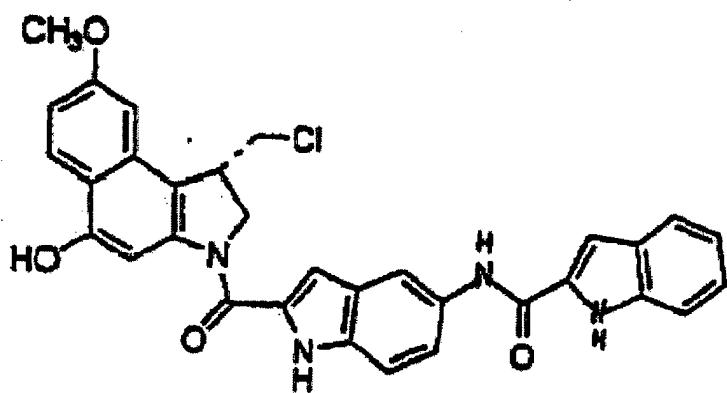
[0013] Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung weisen die folgenden Verbindungen



auf:







[0014] Eine zweite Erscheinungsform der Erfindung richtet sich auf die Verwendung der oben angegebenen Verbindungen für die Alkylierung von DNA.

[0015] MCBI (7-Methoxy-1,2,9,9a-tetrahydrocyclopropa[c]benz[e]indol-4-on) ist ein substituiertes CBI-Derivat, das eine C7-Methoxygruppe in Parastellung zum C4-Carbonyl trägt. Die Kernstruktur der MCBI-Alkylierungsuntereinheit wurde durch eine modifizierte Stobbe-Kondensation-Friedel-Crafts-Acylierung zur Erzeugung der geeignet funktionalisierten Naphthalin-Vorläufer (210 und 220) hergestellt, gefolgt von der 5-exo-trig-Arylradikal-Alken-Zyklisierung (228 bis 230, 246 bis 248) zum Abschließen der Synthese des 1,2-Dihydro-3H-benz[e]indol-Skeletts und abschließender Ar-3'-Alkylierung von 236 zur Einführung des aktivierten

Cyclopropans. Zwei Ansätze für die Umsetzung der Schlüssel 5-exo-trig-Freiradikalzyklisierung werden detailliert mit dem früheren Verfahren mit der Schließung von 228 beschrieben, um 230 bereitzustellen, bei denen die geforderte Produktfunktionalisierung vor der Zyklisierung und die letztere mit dem TEMPO-Trap des Zyklisierungsproduktes des nicht funktionalisierten Alkensubstrats 246 eingeführt wurde, um 248 bereitzustellen. Der letztere präzise Ansatz stellte die MCBI-Untereinheit und ihre unmittelbaren Vorläufer in 12–13 Schritten in ausgezeichneten Gesamtumwandlungen (27–30%) bereit. Die Auflösung eines unmittelbaren MCBI-Vorläufers und sein Einbau in beide Enantiomere von 257–266, Analoga von CC-1065 und die Duocarmycine werden detailliert angeführt. Eine Untersuchung der Solvolysereaktivität und Regioselektivität von N-BOC-MCBI (238) wird beschrieben, und es wurde festgestellt, dass die Einführung der C7-Methoxygruppe die Solvolyserate nur um das 1,6fache erhöht. Dieser überraschend mäßige Effekt weist darauf hin, dass die Protonierung des C4-Carbonyls nicht der ratenbestimmende Schritt der Solvolyse oder der säurekatalysierten nukleophilen Addition ist, dass ein kleiner Differenzladungsaufbau im Übergangszustand auftritt und den Vorschlag weiter unterstützt, dass die Cyclopropanring öffnende Reaktion die Anwesenheit und Unterstützung eines Nucleophils erfordert (SN2-Mechanismus). Zweifellos trägt dies zur DNA-Alkylierungsselektivität dieser Klasse von Agenzien bei und impliziert, dass die Positionierung eines zugänglichen Nucleophils (Adenin-N₃) und nicht die C₄-Carbonylprotonierung das ratenbestimmende Ereignis ist. Dieser bemerkenswert kleine elektronische Effekt auf die Solvolyserate hatte keine Auswirkung auf die Solvolyse-Regioselektivität, und es wurde ausschließlich die stereo-elektronisch kontrollierte nucleophile Addition zu dem am geringsten substituierten Kohlenstoff des aktivierten Cyclopropans beobachtet.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

- [0016] [Fig. 1](#) stellt die Strukturen von (+)CC-1065 (1) und der Duocarmycine 2–3 dar.
- [0017] [Fig. 2](#) stellt die Strukturen der Agenzien 4–9 dar, die tiefliegenden Modifikationen in der Alkylierungsuntereinheit enthalten. Das untere Schema zeigt einen direkten Vergleich von MCBI mit CBI.
- [0018] [Fig. 3](#) stellt die Synthese von frühen Zwischenprodukten 204, 206, 208 mit 210 dar.
- [0019] [Fig. 4](#) stellt die Synthese von fortgeschrittenen MCBI-Zwischenprodukten 238 und 240 dar.
- [0020] [Fig. 5](#) stellt die Synthese des fortgeschrittenen MCBI-Zwischenproduktes 230 dar.
- [0021] [Fig. 6](#) stellt die Synthese der gekoppelten MCBI-Agenzien 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264 und 266 dar.
- [0022] [Fig. 7](#) stellt die Solvolyse der fortgeschrittenen MCBI-Zwischenprodukte 29 zu einer einzigen Produktverbindung 47 dar.
- [0023] [Fig. 8](#) stellt eine Tabelle von untersuchten Agenzien dar, wobei k die Solvolyseratenkonstante, gemessen bei pH 3, darstellt; t_{1/2} stellt die Halbwertszeit des Agens, gemessen bei pH 3, bei den angegeben IC₅₀-Werten und Ultravioletten- und Infrarot-Spektraldaten dar. Die angegebenen hochgestellten Zeichen sind folgendermaßen definiert:
 (a) pH = 3: 50% CH₃OH-Puffer, Puffer ist 4:1:20 (v:v:v) 0,1 M Zitronensäure, 0,2 M Na₂HPO₄ bzw. H₂O; (b) CH₃OH; (c) KBr; (d) THF; (e) Film; (f) Nujol; (g) bei pH 2, k = 1,53 × 10⁻⁵ s⁻¹, t_{1/2} = 12,5 Stunden; (h) bei pH 2, k = 1,62 × 10⁻⁵ s⁻¹, t_{1/2} = 11,5 Stunden.
- [0024] [Fig. 9](#) stellt eine Solvolyse-Untersuchung (UV-Spektren) von N-BOC-MCBI (238, oben) und MCBI (240, unten) in 50%igem wässrigem CH₃OH-Puffer (pH 3,0; 4:1:20 (v/v/v) 0,1 M Zitronensäure, 0,2 M NaH₂PO₄ bzw. H₂O) dar. Die Spektren wurden in regelmäßigen Intervallen aufgezeichnet, und es werden aus Gründen der Übersichtlichkeit nur ein paar von ihnen gezeigt. Oben: 1, Stunde 0; 2, 4 Stunden; 3, 27 Stunden; 4, 70 Stunden; 5, 105 Stunden; 6, 177 Stunden. Unten: 1, Stunde 0; 2, 4 Stunden; 3, 27 Stunden; 4, 70 Stunden; 5, 177 Stunden; 6, 752 Stunden.
- [0025] [Fig. 10](#) stellt die cytotoxische in vitro-Aktivität der untersuchten MCBI-Agenzien dar und diese werden im Vergleich zu CBI-Agenzien gezeigt.
- [0026] [Fig. 11](#) veranschaulicht, dass die untersuchten Agenzien entsprechend den Ergebnissen einer direkten Beziehung zwischen der funktionellen Stabilität (−log k) und der cytotoxischen Wirksamkeit (−log IC₅₀) gehorchen.

[0027] [Fig. 12](#) stellt Enantiomerunterschiede dar, was zeigt, dass die MCBI-TMI-Enantiomere entsprechend den Ergebnissen analoge Unterschiede aufweisen, die aber etwas kleiner sind als die bei CBI-TMI festgestellten.

[0028] [Fig. 13](#) stellt die thermisch induzierte Strangspaltung von doppelsträngiger DNA (SV40-DNA-Fragment, 144 bp, Nucleotid Nr. 5238-138, Klon w794) nach 72stündiger Inkubation von Agens-DNA bei 37°C dar, gefolgt vom Entfernen von ungebundenem Agens und 30minütiger Inkubation bei 100°C; 8%ige Denaturierung PAGE und Autoradiographie. Bahn 1, Kontroll-DNA; Bahnen 2–4, (–)-MCBI-TMI (254, 1×10^{-5} bis 1×10^{-7} M); Bahnen 5–7, (–)-Duocarmycin SA (2, 1×10^{-5} bis 1×10^{-7} M); Bahnen 8–11, Sanger G, C, A und T-Reaktionen; Bahnen 12–14, (–)-CC-1065 (1, 1×10^{-5} bis 1×10^{-7} M); Bahnen 15–17, (–)-MCBI-CDPI₂ (266, 1×10^{-5} bis 1×10^{-7} M); Bahnen 18–20, (–)-MCBI-CDPI₁ (262, 1×10^{-5} bis 1×10^{-7} M); Bahnen 21–23 (–)-MCBI-Indol₂ (258, 1×10^{-5} bis 1×10^{-7} M).

[0029] [Fig. 14](#) illustriert die lineare Beziehung zwischen $\ln[(A_f - A_i)/(A_f - A)]$; Solvolyseuntersuchung (UV-Spektren) von N-BOC-MCBI (238, oben) und MCBI (240, unten) in 50%igem wässrigem CH₃OH-Puffer (pH 3,0, 4:1:20 (v/v/v) 0,1 M Zitronensäure, 0,2 M Na₂HPO₄ bzw. H₂O. Die Spektren wurden in regelmäßigen Intervallen aufgezeichnet, und aus Gründen der Übersichtlichkeit werden nur ein paar davon gezeigt. Oben: 1, Stunde 0; 2, 4 Stunden; 3, 27 Stunden; 4, 70 Stunden; 5, 105 Stunden; 6, 177 Stunden. Unten: 1, Stunde 0; 2, 4 Stunden; 3, 27 Stunden; 4, 70 Stunden; 5, 177 Stunden; 6, 752 Stunden.

[0030] [Fig. 15](#) zeigt ein Diagramm mit der prozentualen integrierten optischen Dichte (% IOD) versus der Zeit, das durch Autoradiographie von 5'-³²P und markierter DNA aufgestellt und zur Überwachung der relativen Rate der w794-Alkylierung an der 5'-AATTA-Stelle hoher Affinität für 1, 254, 258, (+)-CBI-TMI und (+)-DAS-Indol₂ verwendet wurde.

[0031] [Fig. 16](#) stellt die thermisch induzierte Strangspaltung von am 5'-Ende markierter DNA (SV40-DNA-Fragment, 144 bp, Nucleotid Nr. 5238-138, Klon w794) dar. Wie angegeben, wurde das DNA-Agens bei 37°C 24 Stunden oder 48 Stunden lang inkubiert, anschließend wurde ungebundenes Agens entfernt; weiter 30 Minuten Inkubation bei 100°C; 8% denaturierendes PAGE und Autoradiographie.

[0032] [Fig. 17](#) stellt die thermisch induzierte Strangspaltung von doppelsträngiger DNA (SV40-DNA-Fragment, 144 bp, Nucleotid Nr. 5238-138, Klon w794) nach 24 Stunden Inkubation von Agens-DNA bei 25°C dar, gefolgt vom Entfernen von ungebundenem Agens und 30 Minuten Inkubation bei 100°C; 8% denaturierende PAGE und Autoradiographie. Bahn 1, Kontroll-DNA; Bahnen 2–4, (+)-Duocarmycin SA ($2,1 \times 10^{-5}$ bis 1×10^{-7} M); Bahnen 5–7, (+)-MCBI-TMI (254, 1×10^{-5} bis 1×10^{-7} M); Bahnen 8–11, Sanger G, C, A und T-Reaktionen; Bahnen 12–14, (+)-CC-1065 (1, 1×10^{-5} bis 1×10^{-7} M); Bahnen 15–17, (+)-MCBI-Indol₂ (258, 1×10^{-5} bis 1×10^{-7} M); Bahnen 18–20, (+)-MCBI-CDPI₂ (266, 1×10^{-5} bis 1×10^{-7} M).

[0033] [Fig. 18](#) veranschaulicht, dass die relativen Raten der DNA-Alkylierung für die verschiedenen Agenzien nicht den relativen Raten der säurekatalysierten Solvolyse folgen (k = jeweilige Ratenkonstante).

Ausführliche Beschreibung:

[0034] Die Erfindung verkörpert die erste Synthese von substituierten MCBI-Derivaten, 7-Methoxy-1,2,9,9a-tetrahydrocyclo-propa[c]benz[e]-indol-4-on (MCBI, die einen C7-Methoxy-Substituenten in Parastellung zum C4-Carbonyl tragen. Beim direkten Vergleich von MCBI mit CBI wurde erwartet, dass damit eine Beurteilung der Stärke der elektronischen Effekte des C7-Substituenten auf die chemische Reaktivität und schließlich auf die Beziehung dieser funktionellen Reaktivität zu den biologischen Eigenschaften ermöglicht ([Fig. 2](#): MCBI-Struktur).

Synthese von MCBI (240) und N-BOC-MCBI (238):

[0035] Stobbe-(Stobbe, H., Chem. Ber. 1893, 26, 2312; Johnson et al., Org. React. 1951, 6, 1) Kondensation von 3-Methoxybenzaldehyd (200, [Fig. 3](#)) mit Diethylsuccinat (3–6 Äquiv.), die durch Behandlung mit t-BuOK (Johnson et al., Org. React. 1951, 6, 1; Baghos et al. Helv. Chim. Acta 1979, 62, 90) (2–4 Äquiv., t-BuOH, Rückfluss, 1–2 Stunden, 74%) erreicht wurde, ergab eine 2:1-Mischung von Halbestern 202, die der Friedel-Crafts-Acylierung unterworfen wurden (1,0 Äquiv. NaOAc, Ac₂O, Rückfluss 5 Stunden), was eine Mischung von 210, ihrem entsprechenden O-Acetat 208 und beträchtliche Mengen der isomeren Friedel-Crafts-Produkte 204–206 ergab ([Fig. 3](#)). Die nachfolgende Ethanolyse (K₂CO₃, EtOH) der erhaltenen Mischung diente zum Hydrolysieren der O-Acetate 204 und 208, was eine Mischung von 210 und seinem Isomer 206 lieferte, die sofort

durch Chromatographie aufgetrennt wurde. Die Verwendung dieses Ansatzes lieferte 210 mit einer zufrieden stellenden Gesamtausbeute aus 200 ohne behutsame Reinigung der Zwischenstufen 202 oder 208, war aber beeinträchtigt durch fehlerhafte Konversionen und der präparative Trennung der isomeren Endprodukte. Die besten Konversionen wurden beobachtet, wenn die Friedel-Crafts-Acylierung unter mäßig verdünnten Reaktionsbedingungen (0,1 gegenüber 0,5 M) durchgeführt wurde. Zum Teil diktieren die 2:1-E:Z-Mischung der anfänglichen Halbester 202 einen harten Satz von Friedel-Crafts-Acylierungsbedingungen, mit denen eine Isomerisierung und Cyclisierung des unproduktiven Z-Isomers möglich ist. Versuche zur Verbesserung des Verhältnisses der isomeren Produkte unter Verwendung milderer Reaktionsbedingungen lieferten im allgemeinen niedrigere Gesamtkonversionen zu 210 auf Grund der weniger effektiven Cyclisierung des Z-Isomers unter den untersuchten Bedingungen ([Fig. 1](#), oben).

[0036] Dies wurde beträchtlich verbessert, durch Ausführen der Stobbe-Kondensation einer in mehr kontrollierten Weise. Die Kondensation von 200 mit dem Wadsworth-Horner-Emmons-Reagens 212 (Owten et al. Synth. Commun. 1993, 23, 2119; Gallagher et al. Tetrahedron Lett. 1994, 35, 289; Hughes et al. J. Chem. Soc., Perkin Trans. I. 1989, 449; Comber et al. J. Chem. Soc., Perkin Trans. I. 1991, 2783) (1 Äquiv., 1,05 Äquiv. NaH, THF, 0 bis 25°C, 10 Stunden, 81%) lieferte 214, bei dem das gewünschte E-Isomer mit ≥ 20:1 vorherrschte ([Fig. 3](#)). Die selektive säurekatalysierte Schutzaufhebung des t-Butylesters (98%), gefolgt von der Friedel-Crafts-Acylierung, die durch die Behandlung mit Ac₂O-NaOAc (Rückfluss, 1 Stunde) bewirkt wurde, ergab eine Mischung von 202–210. Die nachfolgende Hydrolyse der O-Acetate (K₂CO₃, EtOH) lieferte 210 (68% gesamt) und 206. Bemerkenswerterweise verringerte sich die Reaktionszeit, die für den Abschluss der Friedel-Crafts-Acylierung erforderlich war, bei der Verwendung des reinen E-Isomers von 202 deutlich, und die Ausbeute an 210 verbesserte sich ebenfalls. Weiters erlaubte dies die Verwendung von milderen Friedel-Crafts-Reaktionsbedingungen (Ac₂O, 1,1 Äquiv. NaOAc, 70°C, 10 Stunden), und diese Modifikation verbesserte weiters die Umwandlungen und das Verhältnis von 210:206 (8:1). Nach diesem Protokoll wurde 210 mit 76%iger Gesamtausbeute aus 202 isoliert. Analog lieferte die Behandlung von 202 mit TFAA-NaOAc (Bonnell-Delpon et al., J. Org. Chem. 1988, 53, 754) (Rückfluss, 30 Stunden, 57%) 210 in leicht geringeren Konversionen als eine 9:1-Mischung von 210:206. Alternative Bemühungen, zuerst 202 in das entsprechende saure Chlorid (2 Äquiv. (COCl)₂) umzuwandeln, gefolgt von der Lewis-Säure katalysierten Cyclisierung (AlCl₃, 38%; FeCl₃, 46%; SnCl₄, 54%) ergab keine Verbesserungen bei diesen Konversionen. Bei Verwendung dieser Modifikation der Stobbe-Kondensation war nicht nur die Gesamtkonversion von 200 zu 210 verbessert, sondern die Fähigkeit, reine Zwischenstufen auf dem Weg zu 210 zu isolieren und zu charakterisieren, ermöglichte eine genaue Beurteilung und Optimierung jedes Reaktionsschrittes ([Fig. 3](#)).

[0037] Der Schutz des Phenols 210 als sein Benzylether 216 (98%), gefolgt von der Hydrolyse des Ethylesters (98%) und die Curtius-Umordnung der sich ergebenden Carbonsäure 218, die das Shiori-Yamada-Reagens verwendet (DPPA; Shiori et al., J. Am. Chem. Soc. 1972, 94, 6203; Ninomiya et al., Tetrahedron 1974, 30, 2151), in t-BuOH lieferte direkt das Carbamat 220 mit ausgezeichneten Umwandlungen (69%), [Fig. 4](#). Die säurekatalysierte C-4-Bromierung von 220 bei niedriger Temperatur (1,2 Äquiv. NBS, Kat. H₂SO₄, THF, -78°C, 5 Stunden, 98%), lieferte klar 222, dessen Struktur durch Beobachtung eines diagnostischen C₃-H/OCH₂Ph-NOE-Kreuzpeaks im 2D-¹H-¹H-NMR-Spektrum bestätigt wurde. Die Alkylierung des Natriumsalzes von 222 (1,3 Äquiv. NaH, DMF, 25°C, 30 Minuten) mit 1-Brom-3-methyl-2-but en (3 Äquiv., DMF, 25°C, 8 Stunden, 95%), gefolgt von einer sorgfältig überwachten Tieftemperatur-Ozonolyse von 224 und nachfolgender Reduktionsbearbeitung (Me₂S) des rohen Ozonids ergab 226 (81%). Bei der Optimierung der Ozonolysereaktion wurde festgestellt, dass die Verwendung von verlängerten Reaktionszeiten ohne sofortige Niedertemperatur-Abschreckung von überschüssigem O₃ zur schnellen Erzeugung eines weiteren Oxidationsproduktes führt. Folglich waren das Einhalten der Reaktionsbedingungen und besonders die angegebene Reaktionszeit kritisch für den Umwandlungserfolg von 224 in 226. Die Wittig-Einführung des Vinylethers 228 erwies sich als äußerst wirksam bei der Niedertemperaturerzeugung von Ph₃P=CHOTHP (Schlude, H., Tetrahedron 1975, 31, 89) in THF, gefolgt von der Reaktion mit 226 in THF-HMPA über eine längere Reaktionszeit und lieferte eine Mischung von E:Z-Olefinisomeren mit ausgezeichneter Ausbeute (88%). Die Behandlung von 228 mit Bu₃SnH (2 Äquiv., C₆H₆, Kat. AIBN, 80°C, 2 Stunden, 95–98%) lieferte 230, das Produkt der 5-exo-trig-Arylradikal-Alkencyclisierung, mit ausgezeichneter Ausbeute. Die nachfolgende THP-Schutzaufhebung (Bongini et al., Synthesis, 1979, 618) von 230 lieferte den freien Alkohol 232 (99%) und wurde ohne Nachweis der N-BOC-Schutzaufhebung bewerkstelligt. Die Umwandlung von 232 in das primäre Chlorid 234 (2 Äquiv. Ph₃P, 6 Äquiv. CCl₄, CH₂Cl₂, 25°C, 20 Stunden, 99–100%; Hooz et al., Can. J. Chem. 1968, 46, 86), gefolgt von der Transfer-Hydrogenolyse (Beig et al., Synthesis 1985, 76) des Benzylethers (99–100%) und der nachfolgenden Spirocyclisierung, die durch Behandlung von 236 mit NaH (3 Äquiv., THF, 0°C, 30 Minuten, 89%) bewirkt wurde, lieferte N-BOC-MCBI (238). Analog lieferte die säurekatalysierte Schutzaufhebung von 236 (3 N HCl-EtOAc, 25°C, 20 Minuten), gefolgt von der Spirocyclisierung des rohen Indolinhydrochloridsalzes bei Einwirkung durch 5%iges wässriges NaHCO₃-THF (1:1, 25°C, 1,5 Stunden, 93%) sauber MCBI (240) ([Fig. 4](#)).

[0038] Nach dem Abschluss dieser Synthese von 238 und 240 wurden alternative Methoden zur Realisierung der Schlüssel-5-exo-trig-Arylradikal-Alkencyclisierung untersucht (Boger et al. J. Org. Chem. 1995, 60, 1271). Bei unserem anfänglichen Ansatz lief die Cyclisierung des Enolethers 228 mit ausgezeichneter Umwandlung ab, zum Teil auf Grund der Verwendung eines aktivierten Akzeptoralkens, das die Rate des Ringschlusses erhöht und die inhärente Bevorzugung für die 5-exo-trig-Cyclisierung verstärkt. Zusätzlich integriert der Vinylether in das Cyclisierungssubstrat die für das gewünschte Cyclisierungsprodukt geforderte volle Funktionalisierung. Die natürliche Begrenzung für diesen Ansatz ist jedoch die Forderung, die Produktfunktionalität in das Akzeptoralken des Substrats der Freiradikalcyclisierung zu integrieren, und dies brachte eine sorgfältig festgelegte Ozonolysereaktion und der nachfolgenden Wittig-Reaktion mit einem funktionalisierten Methylentriphenylphosphoran mit sich. Eine kürzere, effizientere Herstellung von 232 wurde auf Basis des erfolgreichen Tempo-Traps (Boger et al., J. Org. Chem. 1995, 60, 1271) einer Arylradikalalken-5-exo-trig-Cyclisierung eines nicht aktivierten Alkens erreicht, was die Notwendigkeit für die Alkenfunktionalisierung prior zur Cyclisierung erübrig. Die selektive säurekatalysierte C4-Iodierung von 220, die durch die Tieftemperaturbehandlung mit NIS (1,1 Äquiv., Kat. TsOH, THF-CH₃OH, -78°C, 3 Stunden, 89%) bewirkt wurde, gefolgt von der Alkylierung des Natriumsalzes von 242 (1,25 Äquiv. NaH, DMF, 0°C, 50 Minuten) mit Allylbromid (3 Äquiv., DMF, 25°C, 3 h, 93%), lieferte 246 (**Fig. 5**). Die Behandlung einer Mischung von 246 und Tempo (6 Äquiv.) in Benzol mit Bu₃SnH (5 × 1,0 Äquiv., 70°C, 1 Stunde) lieferte sauber 248 (82%). Analog lieferte die Behandlung von 246 und Tempo (6 Äquiv.) in Toluol mit (Me₃Si)₃SiH (5 × 1 Äquiv., 80°C, 10 Stunden) 248 (84%) in einer Reaktion, die zur Fertigstellung etwas längere Reaktionszeiten benötigte. Die Tempo-Wasserstoffatomextraktion von Bu₃SnH oder (Me₃Si)₃SiH (Bu₃SnH > (Me₃Si)₃SiH) dient vermutlich dazu, die Reaktionskaskade der Tributylzinnradikalextraktion von Iodid aus der 246, 5-exo-trig-Arykardikal-Alkencyclisierung, die mit einer außergewöhnlich hohen Rate abläuft und keine kompetitive Reduktion oder intermolekulare Tempo-Traps erleidet, und das endgültige Tempo-Trap des Primärradikals des Cyclisierungsproduktes ohne kompetitive Wasserstoffatomextraktion aus Bu₃SnH in Gang zu setzen. Die kompetitive Reaktion des Tributylzinnradikals mit Tempo im Vergleich zu 246 erklärt wahrscheinlich die Forderung nach überschüssigem Bu₃SnH (3–5 Äquiv.) und Tempo (6 Äquiv.). Die Reduktionsspaltung von 248 zur Bereitstellung von 230 wurde durch Behandlung mit Zn (12 Äquiv., 3:1:1 HOAc-THF-H₂O, 70°C, 2 Stunden, 86%) bewirkt (**Fig. 5**).

[0039] Auflösung. Das höhere synthetische Zwischenprodukt 236, das vorletzte Zwischenprodukt vor den Analoga auf MCBI-Basis, wurde direkt und wirksam in einer analytischen oder präoperativen Daicel Chiralcel-OD-Säule ($\alpha = 1,17$) (Boger et al. J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 7996) analysiert. Es wurde festgestellt, dass diese praktische Methode, welche diastomerische Derivatisierung, Trennung und die Entderivatisierung vermeidet, am besten mit 236 ausgeführt wird, obwohl 234 ($\alpha = 1,12$) und N-BOC-MCBI (238, $\alpha = 1,16$) ebenfalls zur Auflösung in den Chiralcel-OD-Säulen fähig waren. Für unsere Zwecke konnte 236 in einer halbpräparativen 10 um, 2 × 25 cm OD-HLPC-Säule (2% i-PrOH-Hexan, 5 ml/min) mit einer 90–100%igen Rückgewinnung der Gesamtprobe abgetrennt werden. Die Umwandlung von natürlichem (1S)- und ent-(1R)-236 zu (+)- und ent-(-)-N-BOC-CBI (238) und (+)- und ent-(-)-CBI (240) wurde entsprechend den in **Fig. 4** angeführten experimentellen Verfahren durchgeführt.

[0040] Die Zuweisung der absoluten Konfiguration beruhte zu Beginn auf den relativen cytotoxischen Wirksamkeiten von natürlichem (+)- und ent-(+)-N-BOC-MCBI und entsprechenden Analoga, wobei die ersten eine wirksamere Aktivität aufwiesen, die in Übereinstimmung mit den bei 4–9 gemachten Beobachtungen sind. Schließlich wurde dies in einer vorläufigen Untersuchung der DNA-Alkylierungsselektivität der Enantiomere der höheren Analoga 257–266 bestätigt. Bemerkenswerterweise wurde festgestellt, dass der Drehsinn für die natürlichen und nicht natürlichen Enantiomere von N-BOC-MCBI und MCBI sowie der der höheren Analoga mit dem der bei 4–7 und 9 und ihren höheren Analoga beobachteten übereinstimmt.

MCBI-TMI (254), MCBI-Indol₂ (258), MCBI-CDPI₁ (262) und MCBI-CDPI₂ (266):

[0041] Die MCBI-Alkylierungsuntereinheit wurde in die CC-1065- und die Duocarmycin-Analoga wie in **Fig. 6** detailliert wird, integriert. Säurekatalysierte Schutzauflöschung von 236 (4 M HCl-EtOAc, 25°C, 30 Minuten), gefolgt von der unmittelbaren Kopplung des instabilen Aminhydrochloridsalzes 250 mit 5,6,7-Trimethoxyindol-2-carbonsäure (300, 3 Äquiv. EDCI, DMF, 25°C, 10 Stunden, 85%; Boger et al. J. Org. Chem. 1990, 55, 4499), 58 (3 Äquiv. EDCI, DMF, 25°C, 10 Stunden, 78%; Boger et al., J. Org. Chem. 1984, 49, 2240), CDPI₁ (320, 3 Äquiv. EDCI, DMF, 25°C, 12 Stunden, 71%; Boger, J. Org. Chem. 1987, 52, 1521) und CDPI₂ (340, 3 Äquiv. EDCI, DMF, 25°C, 6 Stunden, 68%; Boger et al., J. Org. Chem. 1987, 52, 1521; Boger et al., J. Org. Chem. 1984, 49, 2240), die bewusst bei Fehlen von zugefügter Base durchgeführt wurde, welche die kompetitive Schließung von 250 zu 240 fördert, lieferte die unmittelbaren Vorläufer 257, 256, 260 bzw. 264. Bemerkenswerterweise verringerte sich die Leichtigkeit der Bildung von Kopplungen von 250 mit den Carbonsäuren 300–340 bei im gleichen Maße wie ihre Löslichkeit sich verringerte (300, 58 > 320 > 340), was notwendiger-

weise die Reaktionsgeschwindigkeit verringert. Die nachfolgende Behandlung der gekoppelten Agenzien mit NaH (3,0 Äquiv., THF-DMF 3:1, 0°C, 30 Minuten) lieferte MCBI-TMI (254, 90%), MCBI-Indol₂ (258, 86%), MCBI-CDPI₁ (262, 90%) bzw. MCBI-CDPI₂ (266, 94%) mit ausgezeichneten Umwandlungen. Optimale Umwandlungen wurden beobachtet, wenn die Aufarbeitung der Spirocyclisierungsreaktion mit einem wässrigen Phosphatpuffer (0,2 M, pH 7) bei niedriger Temperatur (0°C) durchgeführt wurde. Unter diesen Bedingungen wurde die nebensächliche Hydrolyse zu MCBI (240) minimiert ([Fig. 6](#)).

Chemische Solvolyse: Reaktivität:

[0042] Zwei grundlegende Charakteristika der Alkylierungsuntereinheiten haben sich als wichtig bei den Untersuchungen von 4–9 bis heute herausgestellt. Das erste ist die stereo-elektronisch kontrollierte säurekatalysierte Ringöffnung des aktivierten Cyclopropans, die die bevorzugte Addition eines Nucleophils an den am wenigsten substituierten Cyclopropan-Kohlenstoff diktiert. Das zweite ist die relative Rate der säurekatalysierten Solvolyse, die entsprechend den Feststellungen genau die funktionelle Reaktivität der Agenzien widerspiegelt und einer grundlegenden direkten Beziehung zwischen Solvolysestabilität und der cytotoxischen *in vitro*-Wirksamkeit folgt (Boger et al. J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 6461; Boger et al. J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 11335).

[0043] Vorausgesetzt die C7-Substitution des CBI-Kerns stört die stereo-elektronischen Wirkungen auf die säurekatalysierte Ringöffnung nicht, würde man erwarten, dass diese feine Strukturänderung bei Einführung eines C7-Methoxysubstituenten die solvolytische Reaktivität der Agenzien durch elektronische Aktivierung der für die Solvolyse erforderlichen C4-Carbonylprotonierung erhöht. Weiters wird erwartet, dass die Solvolyse dennoch stattfinden würde, bei ausschließlicher Spaltung der C8b-C9-Bindung mit Addition eines Nucleophils an den am wenigsten substituierten C9-Cyclopropan-Kohlenstoff statt durch die Spaltung der C8b-C9a-Bindung mit Ringerweiterung und Addition eines Nucleophils an C9a. Bemerkenswerterweise würde durch die letztere Spaltung die sich entwickelnde positive Ladung auf einem bevorzugten sekundären statt primären Zentrum positioniert werden, und bei vorherigen Agenzien wurde diese Präferenz durch die inhärente stereo-elektronische Kontrolle ausgeschaltet.

[0044] In Übereinstimmung mit den Erwartungen erwies sich, dass N-BOC-MCBI (238, $t_{1/2} = 80$ Stunden, $k = 2,41 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$) reaktiver in Bezug auf die chemische Solvolyse bei pH 3 war als N-BOC-CBI (4, $t_{1/2} = 133$ Stunden), aber der Unterschied war weniger ausgeprägt als erwartet, und 238 war immer noch wesentlich stabiler als N-BOC-CPI (6, $t_{1/2} = 36,7$ Stunden), [Fig. 8](#). Daher weist N-BOC-MCBI eine Halbwertszeit auf, die nur 0,6 mal kürzer als die des Ausgangsagens N-BOC-CBI (4) bei pH 3 ist. Bei pH 7 (1:1 H₂O-CH₃OH), bei dem 4–7 keine Zeichen von Solvolyse aufweisen, wenn sie 1–2 Wochen lang überwacht werden, wies N-BOC-MCBI analog ebenfalls keine Zeichen von Solvolyse auf. Die Solvolyse wurde spektrophotometrisch mittels UV anhand des Verschwindens des langwelligen Absorptionsbandes des MCBI-Chromophors (324 nm) und anhand des Erscheinen eines kurzwelligen Absorptionsbandes (266 nm), das seco-N-BOC-MCBI zuzuschreiben ist, verfolgt ([Fig. 9](#)). Wie CPI und CBI erwies sich MCBI (240 $t_{1/2} = 334$ Stunden, $k = 5,76 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$) als wesentlich stabiler gegenüber der Solvolyse als N-BOC-MCBI (238), und dies ist vermutlich das Ergebnis der bevorzugten N³-Protonierung im Vergleich zur O-Protonierung, die für die Katalyse der Solvolyse erforderlich ist. Nahezu identisch zu den Trends die von 4–9 aufgezeigt werden, erwies sich, dass MCBI (240, $t_{1/2} = 334$ Stunden, $k = 5,76 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$) nur etwas reaktiver als CBI ($t_{1/2} = 930$ Stunden, $k = 2,07 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$)²⁵ und 6–7 mal reaktiver als DAS ($t_{1/2} = 2150$ Stunden, $k = 8,9 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$)¹⁶, aber weniger reaktiv als CPI ist ([Fig. 8](#)–9).

[0045] Daher war die Rate der säurekatalysierten Solvolyse von N-BOC-MCBI (238) auf Grund der elektronischen Aktivierung durch den C7-Methoxy-Substituenten vorhersehbar größer als die von N-BOC-CBI (4), die Größenordnung dieses Effektes ist jedoch bemerkenswert mäßig (1,6×) und aufschlussreich. Zuerst und an erster Stelle weist dies darauf hin, dass die Protonierung des C4-Carbonyls nicht der ratenbestimmende Schritt der Solvolyse oder der säurekatalysierten nucleophilen Addition ist. Unter Verwendung des α_{p+} -Wertes von –0,78 für den Methoxy-Substituenten liefert dies einen bemerkenswert kleinen Wert für ρ von –0,28 für die säurekatalysierte Solvolysereaktion. Obwohl dieser kleine Wert für ρ auf einem einzelnen Vergleich beruht und Fehlern unterliegt, ist er analog zu einem ähnlich niedrigen ρ -Wert, der aus einer größeren Menge von Vergleichen abgeleitet wurde (–0,30). Obwohl viele mechanistische Interpretationen von ρ bekannt sind, gibt die Allgemeinste an, dass er ein Maß für die Ladung ist, die vom Substituenten bei der Reaktion gesehen wird, schließt aber auch andere Faktoren ein, einschließlich Elektronenbedarf, Ladungsverschiebung, Übergangszustandsposition und Übertragung von Substituenteneffekten für die untersuchte Reaktion (Bradamante, S.; Pagani, G. A., J. Org. Chem. 1980, 45, 10). Da diese Faktoren nicht unabhängig sind, ist es oft nicht möglich, die Effekte zu unterscheiden. Ein ungewöhnlich kleiner negativer ρ -Wert von –0,30 kann jedoch den Aufbau einer kleinen differentiellen positiven Ladung am Reaktionszentrum anzeigen und auf einen strengen SN2-Me-

chanismus für die Ringöffnung hinweisen. Qualitativ wird dies leicht durch die Erkenntnis wahrgenommen, dass der C7-Methoxy-Substituent von 238 und 240 nur einen sehr mäßigen 1,6fachen Effekt auf die säurekatalisierte Solvolysereaktion besitzt. Die Beobachtung der reinen SN₂-Solvolyseprodukte für die anomale Ringerweiterungsaddition zum aktivierten Cyclopropan des eng verwandten 8, das mit dem überraschend kleinen p-Wert gekoppelt ist, weist darauf hin, dass der Aufbau der kleinen differentiellen Ladung im Übergangszustand auftritt und dass die Beobachtung der Reaktion die Anwesenheit und Hilfe des Nucleophils erfordert. Zweifellos trägt dies zur DNA-Alkylierungsselektivität dieser Klasse von Agenzien bei und impliziert, dass die Positionierung eines zugänglichen Nucleophils (Adenin-N3) und nicht die C4-Carbonylprotonierung das ratenbestimmende Ereignis sein könnte.

Chemische Solvolyse: Regioselektivität:

[0046] Die Behandlung von N-BOC-MCBI (238) mit 0,1 Äquiv. CF₃SO₃H in CH₃OH (0°C, 3 Stunden) führte zur sauberen Solvolyse um ein einziges Produkt 268 (95%) zu ergeben, [Fig. 7](#). Es wurde keine N-BOC-Schutzaufhebung oder Olefin beobachtet, und die Methanolyse verlief ohne Änderung der stereo-elektronisch kontrollierten Regioselektivität. Es wurde beobachtet, dass die saubere Spaltung der C8b-C9-Bindung mit Addition von CH₃OH an den am niedrigsten substituierten C9-Cyclopropan-Kohlenstoff 268 liefert, und es wurde keine Spaltung der C8b-C9a-Bindung bei Ringerweiterung und Addition von CH₃OH an C9a um 270 bereitzustellen, nachgewiesen (> 20:1). Bemerkenswerterweise steht dies in scharfem Gegensatz zu Solvolyseuntersuchungen der reaktiveren Alkylierungsuntereinheiten von CC-1065, Duocarmycin A und CBQ, wo beträchtliche Mengen der anomalen Ringerweiterungssolvolyseprodukte nachgewiesen wurden. Trotzdem sind die Beobachtungen vereinbar mit unseren früheren Untersuchungen von N-BOC-CBI (4), bei denen kein (> 20:1) Ringerweiterungssolvolyseprodukt nachgewiesen wurde (Boger et al., J. Org. Chem. 1990, 55, 5823). Bisher sind anomale Ringerweiterungssolvolyseprodukte nur bei den chemisch reaktiveren Agenzien, d.h. 6–8, festgestellt worden, und diese sind nur in einem System besonders vorherrschend, in dem die stereo-elektronische Ausrichtung beider Cyclopropanbindungen gleichwertig sind, d.h. 8 (Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 6461; Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 11335). Wichtig ist, dass diese stereo-elektronisch gesteuerte säurekatalisierte nucleophile Addition zu den Agenzien auf CBI-Basis, einschließlich der Agenzien auf MCBI-Basis, die mit einer Regioselektivität > 20:1 abläuft, einen zusätzlichen Vorteil für die Agenzien gegenüber den Analoga von CC-1065 auf CPI-Basis liefert, bei denen festgestellt wurde, dass sie eine eher mäßige 4:1-Selektivität zeigen (Warpehoski et al., J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 7573).

Cytotoxische in vitro-Aktivität:

[0047] Es wurde festgestellt, dass die natürlichen Enantiomere der Agenzien auf MCBI-Basis eine cytotoxische Wirksamkeit aufweisen, die etwas weniger wirksam als oder nicht unterscheidbar von der des entsprechenden Agens auf CBI-Basis ist ([Fig. 10](#)). Obwohl die Größenordnung der Reaktivitätsunterschiede zu klein und die Variabilität in den cytotoxischen Analysen zu groß ist, um einen kritischen Vergleich der CBI- und MCBI-Agenzien zu erlauben, entsprechen die qualitativen Trends im allgemeinen den erwarteten. Wichtig und in Übereinstimmung mit ihrer relativen Reaktivität, wurde herausgefunden, dass die Agenzien der gut etablierten direkten Beziehung zwischen der funktionellen Stabilität und der cytotoxischen Wirksamkeit folgen, welche in früheren Studien mit allen Agenzien, die bisher untersucht wurden ([Fig. 11](#)), beobachtet wurde. Analog zu früheren Untersuchungen zeigten die entsprechenden seco-Vorläufer 236, 252, 256, 260 und 264 eine cytotoxische Aktivität, die von den Cyclopropanhaltigen Agenzien nicht zu unterscheiden ist.

DNA-Alkylierungsselektivität, Effizienz und Relative Raten:

[0048] Die DNA-Alkylierungseigenschaften der Agenzien wurden in vier 150-Basenpaar-Segmenten von Doppelstrang-DNA untersucht, für die Vergleichsergebnisse für verwandte Agenzien zur Verfügung stehen. Vier Klone des Phagen M13mp10 wurden für die Untersuchung ausgewählt und enthalten die SV40 nucleosomalen DNA-Inserts w794 (Nukleotid Nr. 5238-138) und ihr Komplement w836 (Nukleotid Nr. 5189-91) und c 988 (Nukleotid Nr. 4359-4210) und ihr Komplement c820 (Nukleotid Nr. 4201-4356). Die Alkylierungsortsidentifizierung und die Beurteilung der relativen Selektivität unter den verfügbaren Orten wurden durch thermisch induzierte Strangspaltung der einfach 5'-endmarkierten Doppelstrang-DNA nach Einwirkung durch die Agenzien gewonnen. Nach der Behandlung der endmarkierten Doppelstrang-DNA mit einer Reihe von Agenskonzentrationen wurde ungebundenes Agens durch EtOH-Präzipitation der DNA entfernt. Wiederauflösung der DNA in wässrigem Puffer, Thermolyse (100°C, 30 Minuten) zur Induzierung der Strangspaltung an den Stellen der DNA-Alkylierung, denaturierende hoch auflösende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) angrenzend an Sanger-Didesoxynucleotid-Sequenzierungsnormen und Autoradiographie führten zur Identifizierung der DNA-Spaltungs- und Alkylierungsorte. Die vollständigen Details dieses Verfahrens sind an anderer Stelle of-

fenbart und diskutiert worden (10). Die DNA-Alkylierungsreaktionsselektivitäten, die unter Inkubationsbedingungen von 25°C (24 Stunden) für die hierin detailliert angeführten Agenzien beobachtet wurden, haben sich als identisch mit den Alkylierungsselektivitäten herausgestellt, die bei kürzeren oder längeren Reaktionszeiten beobachtet wurden oder wenn die Reaktionen bei verschiedenen Temperaturen (37 oder 4°C, 0,5–7 Tage) durchgeführt wurden. Wie unten diskutiert, wurden die Raten und die Wirkungsgrade, aber nicht die letztendlichen relativen Wirkungsgrade der DNA-Alkylierung durch Ändern der Reaktionstemperaturen verändert.

DNA-Alkylierungseigenschaften der Natürlichen Enantiomere von MCBI-TMI (254), MCBI-Indol₂ (258), MCBI-CDPI₁ (262) und MCBI-CDPI₂ (266):

[0049] Ein Vergleich der DNA-Alkylierung durch die natürlichen Enantiomere von 254, 258, 262 und 266 neben den natürlichen Produkten (+)-Duocarmycin SA (2) und (+)-CC-1065 (1) innerhalb der w794-DNA wird in [Fig. 17](#) dargestellt und ist repräsentativ für den vollen Umfang an Vergleichen, die mit den Agenzien durchgeführt wurden. Bei den Vergleichen waren (+)-Duocarmycin SA (2) und (+)-MCBI-TMI (254) nicht unterscheidbar und die beiden Agenzien zeigten dieselbe Selektivität und Effizienz der DNA-Alkylierung. Das wird gut innerhalb der w794-DNA in [Fig. 17](#) gezeigt, wo die beiden Agenzien nachweisbar denselben Affinitätsort von 5'-AATTA bei 10⁻⁶ bis 10⁻⁷ M alkylieren, beide alkylieren die drei zusätzlichen unbedeutenden Orte in vergleichbarem Umfang nur bei höheren Konzentrationen, und beide weisen denselben Umfang an Alkylierung über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich auf. Das ist genau analog zu den Beobachtungen, die bei unseren früheren Untersuchungen von Duocarmycin SA (2) und CBI-TMI gemacht wurden (Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 7996).

[0050] In ähnlicher Weise erwiesen sich bei unseren Vergleichen (+)-MCBI-CDPI₂ (266) und (+)-CC-1065 (1) als im wesentlichen nicht unterscheidbar. Das wird gut in [Fig. 17](#) bei w794-DNA illustriert, wo die beiden Agenzien nachweisbar die hoch affinen Orte von 5'-AATTA bei 10⁻⁷ M alkylieren, beide alkylieren die zusätzlichen unbedeutenden Orte in vergleichbarem Umfang bei höheren Agenskonzentrationen, und beide weisen denselben Umfang an Alkylierung über den ganzen untersuchten Konzentrationsbereich auf. Das wird am besten beim Vergleich der Menge der nicht umgesetzten DNA sichtbar, die bei jeder Reaktionskonzentration vorhanden ist. In ähnlicher Weise alkyliert (+)-MCBI-Indol₂ (258) DNA nachweisbar bei 10⁻⁷ M.

[0051] Obwohl dies innerhalb w794 nicht so ausgeprägt ist, wo nur feine Unterschiede in der Alkylierungsselektivität bei den relativen Effizienzen der Alkylierung von unbedeutenden Orten beobachtet werden, sind die Unterschiede zwischen Duocarmycin SA/MCBI-TMI gegenüber CC-1065/MCBI-CDPI₂ in den zusätzlichen Segmenten der untersuchten DNA deutlicher erkennbar. Bei diesen Vergleichen weisen die kleineren Agenzien, einschließlich Duocarmycin SA, MCBI-TMI und MCBI-CDPI₁, eine klare 3,5-Basenpaar AT-reiche Alkylierungsselektivität auf, während die längeren Agenzien, einschließlich CC-1065 und MCBI-CDPI₂, die größeren 5-Basenpaar AT-reichen Alkylierungsorte stark bevorzugen. Diese Beobachtungen sind analog zu denen, die bei direkten Vergleichen der Agenzien auf CBI-Basis mit CC-1065 oder den Duocarmycinen gemacht wurden (Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 7996), und es wurden keine Merkmale festgestellt, die das Verhalten der natürlichen Enantiomere der Agenzien auf MCBI- und CBI-Basis unterscheiden. Diese Alkylierungsselektivitäten wurden an anderer Stelle dokumentiert und detailliert beschrieben (Boger et al., J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 7996), und jeder festgestellte Alkylierungsort war Adenin, gefolgt von zwei 5'-A oder -T-Basen an einem Ort mit drei Basenpaaren, der die folgende Präferenz aufweist: 5'-AAA > 5'-TTA > 5'-TAA > 5'-ATA. Für die kürzeren Agenzien MCBI-TMI und MCBI-CDPI₁ bestand ebenfalls eine starke Präferenz, aber keine absolute Forderung, dass die vierte 5'-Base A oder T statt G oder C sein soll, und diese Präferenz unterschied viele der höheren von den niedrigeren Affinitätsorten (z.B. 5'-AAAA). Für das längere Agens MCBI-CDPI₂ bestand nicht nur eine stärkere Präferenz dafür, dass die vierte Base A oder T ist, sondern diese Präferenz war erweitert und schloss eine fünfte 5'-A-oder-T-Base ein (z.B. 5'-AAAAA). Daher wiesen die Agenzien auf MCBI-Basis wie die vorhergehenden Agenzien AT-reiche Adenin-N3-Alkylierungsselektivitäten auf, die am 3'-Adenin-N3-Alkylierungsort beginnen, wobei sich das Agens an die kleine Furche in 3'-5'-Richtung im Umfang von 3,5 oder 5 Basenpaaren bindet.

[0052] Analog zu den relativen Raten der DNA-Alkylierung, die für (+)-Duocarmycin SA (1) und (+)-CBI-TMI am Hochaffinitätsort von w794, 5'-AATTA, aufgestellt wurden, wurden die relativen Raten der DNA-Alkylierung für (+)-Duocarmycin SA (1), (+)-CBI-TMI und (+)-MCBI-TMI (254) gemessen (4°C, 0–48 Stunden, 10⁻⁶ M Agenskonzentration), und die drei Agenzien haben sich als nahezu ununterscheidbar herausgestellt. Es wurde festgestellt, dass (+)-MCBI-TMI den 5'-AATTA-Hochaffinitätsort bei 40°C kinetisch schneller alkyliert als Duocarmycin SA oder CBI-TMI, obwohl die Unterschiede recht gering sind: k(254):k(CBI-TMI):k(2) = 1,8:1,0:0,9 ([Fig. 15](#)). Ähnliche relative Raten wurden in früheren Vergleichen von Duocarmycin SA und CBI-TMI beobachtet, und die drei Agenzien liegen so dicht beieinander, dass Unterschiede zwischen CBI-TMI und MCBI-TMI

nicht unmittelbar festzustellen sind. Bei 25°C sind die Unterschiede noch schwieriger zu beobachten, und die drei Agenzien sind im wesentlichen nicht unterscheidbar übereinstimmend mit den relativen Reaktivitäten der Agenzien, die bei den chemischen Solvolyseuntersuchungen ermittelt wurden.

[0053] Ein ähnlicher Ratenvergleich von (+)-DAS-Indol₂ und (+)-MCBI-Indol₂ (258), der repräsentativ für dieses Problem bei der Feststellung der relativen Raten für diese drei Klassen von Agenzien ist und der bei 25°C (0–24 Stunden) und bei 10⁻⁶ M Agenskonzentration durchgeführt wurde, wies eine im wesentlichen nicht unterscheidbare Rate auf: k(DAS-Indol₂)(k(MCBI-Indol₂) = 1,05 (**Fig. 15**). Wichtig ist, dass diese beiden Vergleiche darauf hinweisen, dass kleine, wenn überhaupt experimentell unterscheidbare Differenzen bei den relativen Raten der DNA-Alkylierung mit den natürlichen Enantiomeren der Agenzien auf DSA-, CBI- oder MCBI-Basis beobachtet werden. In scharfem Gegensatz dazu alkylieren alle drei DNA kinetisch viel schneller als das entsprechende Agens auf CPI-Basis (10–50×), wobei die Unterschiede viel ausgeprägter und experimentell leichter festzustellen sind.

DNA-Alkylierungseigenschaften der nicht natürlichen Enantiomere von MCBI-TMI (254), MCBI-Indol₂ (258), MCBI-CDPI₁ (262) und MCBI-CDPI₂ (266):

[0054] Ein repräsentativer Vergleich der DNA-Alkylierung durch die nicht natürlichen Enantiomere der Agenzien auf MCBI-Basis neben den nicht natürlichen Enantiomeren von Duocarmycin SA (2) und CC-1065 (1) mit demselben DNA-Segment w794 wird in **Fig. 13** dargestellt. Mehrere wichtige Beobachtungen analog zu denen, die in unseren früheren Untersuchungen mit den Agenzien auf CBI-Basis gemacht wurden, werden auch bei den Agenzien auf MCBI-Basis beobachtet. Erstens ist die DNA-Alkylierung mit nicht natürlichen Enantiomeren beträchtlich langsamer, und die in **Fig. 13** gezeigten Ergebnisse für die nicht natürlichen Enantiomere wurden bei der Inkubation bei 37°C (72 Stunden) im Vergleich zu der Inkubation bei 25°C (24 Stunden, **Fig. 17**) für die natürlichen Enantiomere erhalten. Selbst bei kräftigeren Reaktionsbedingungen ist der Umfang der Alkylierung durch die nicht natürlichen Enantiomere geringer, was zum Nachweis höhere Konzentrationen des Agens erfordert. Es wurden sogar längere Reaktionszeiten bei 37°C benötigt, um dieselbe Alkylierungseffizienz zu erreichen, die mit den natürlichen Enantiomeren bei 25°C (24 Stunden) beobachtet wurden. Dieser charakteristische Unterschied in der Rate der DNA-Alkylierung war am auffälligsten bei den kleineren Agenzien MCBI-TMI (254) und Duocarmycin SA (2), dagegen leicht wahrnehmbar, aber weniger auffällig bei den Agenzien mittlerer Größe MCBI-CDPI₁ (262) und MCBI-Indol₂ (258) und wahrnehmbar, aber noch weniger auffällig bei den größten Agenzien MCBI-CDPI₂ (266) und CC-1065 (1). Dieser Trend ist dem ähnlich, der bei der relativen cytotoxischen Wirksamkeit von Paaren von Enantiomeren beobachtet wird. (+)-MCBI-TMI ist 50 mal wirksamer als das entsprechende nicht natürliche Enantiomer, während die natürlichen Enantiomere der größeren Agenzien (258, 262, 266) nur 1 bis 3 mal wirksamer sind, wobei die Enantiomere 262 und 266 im wesentlichen nicht unterscheidbar sind. Das ist gut an der w794-DNA-Alkylierung in **Fig. 13** erkennbar, in der MCBI-TMI und Duocarmycin SA eine nachweisbare Alkylierung bei 10⁻⁵ M zeigen, während die von MCBI-CDPI₁, MCBI-Indol₂ und MCBI-CDPI₂ bei 10⁻⁶ bis 10⁻⁷ M nachweisbar sind. Bei 25°C (24 Stunden) alkylieren alle natürlichen Enantiomere w794 nachweisbar bei 10⁻⁶ bis 10⁻⁷ M (**Fig. 17**).

[0055] Die DNA-Alkylierungsselektivität und -effizienz von (–)-MCBI-TMI (254) und ent-(–)-Duocarmycin SA (2) waren nahezu nicht zu unterscheiden, wobei das letztere Agens etwas wirksamer war. Diese Beobachtung ist analog zu der, die in unseren früheren Vergleichen von (–)-CBI-TMI und ent-(–)-Duocarmycin SA (2) gemacht wurden, außer dass der Unterschied größer war (10×). In ähnlicher Weise waren (–)-MCBI-CDPI₂ (266) und ent-(–)-CC-1065 nahezu nicht zu unterscheiden, wie es auch (–)-MCBI-Indol₂ und (–)-MCBI-CDPI₁ waren. Das ist vielleicht am besten ersichtlich beim Vergleich des relativen Ausmaßes der markierten DNA, die bei 10⁻⁵ M in **Fig. 13** verbraucht wurde. Wieder waren keine Unterschiede in der DNA-Alkylierungsselektivität der nicht natürlichen Enantiomere von Agenzien auf MCBI-Basis und den vorher beschriebenen Agenzien wahrnehmbar. Jeder der Alkylierungsorte erwies sich als Adenin, das fast immer auf beiden Seiten von einer A- oder T-Base flankiert wurde, und die Präferenz für diesen AT-reichen Dreibasenort war 5'-AAA > 5'-TAA > 5'-AAT > 5'-TAT. Für die kürzeren Agenzien gab es eine starke Präferenz dass die zweite 3'-Base ein A oder T (z.B. 5'-AAAA) ist, die sich für die größeren Agenzien auch auf die dritte 3'-Base ausdehnte (z.B. 5'-AAAAAA). Daher erwies sich jeder Alkylierungsort für die nicht natürlichen Enantiomere als übereinstimmend mit der Adenin-N₃-Alkylierung, wobei das Agens sich an die kleine Furche in umgekehrter 5'-3'-Richtung über einem mit 3,5 oder 5 Basenpaaren AT-reichen Ort, der den Alkylierungsort umgibt, bindet. Dies ist analog zur Alkylierungsselektivität der natürlichen Enantiomeren, außer dass sie sich in umgekehrter 5'-3'-Richtung in der kleinen Furche erstreckt und wegen der diastereomeren Natur der Addukte um ein Basenpaar relativ zu den natürlichen Enantiomeren versetzt ist.

DNA-Alkylierungseigenschaften von (+)- und ent-(–)-N-BOC-MCBI:

[0056] Ein repräsentativer Vergleich der DNA-Alkylierungseigenschaften von beiden Enantiomeren von N-BOC-MCBI (238) im selben w794-DNA-Segment ist in [Fig. 16](#) dargestellt. Es wurden keine wesentlichen Unterschiede zwischen N-BOC-CBI (4) und N-BOC-MCBI (238) festgestellt, außer dass die relative Effizienz der DNA-Alkylierung durch das nicht natürliche Enantiomer von 238 im wesentlichen nicht von der seines natürlichen Enantiomers unter den Untersuchungsbedingungen zu unterscheiden war und signifikant besser war als das nicht natürliche Enantiomer von N-BOC-CBI: (+)-N-BOC-CBI/ent-(–)-N-BOC-CBI ($5\text{--}10\times$)³⁴ im Vergleich zu (+)-N-BOC-MCBI/ent-(–)-N-BOC-MCBI (1–2×). Die beiden Enantiomere von 238 alkylierten DNA weitaus weniger effizient als 257–266 ($10^4\times$, [Fig. 6](#)), was eine nachweisbare Alkylierung bei 10^{-2} bis 10^{-3} M (37°C , 24–48 Stunden) lieferte, weitaus weniger selektiv als 257–266, die eine 2-Basenpaar AT-reiche Alkylierungsselektivität (5'-AA > 5'-TA) zeigt und tat dies bei der Alkylierung an denselben Orten. Dieses ungewöhnliche Verhalten der zwei Enantiomeren, die dieselben Orte alkylieren, ist analog zu früheren Beobachtungen, die mit 4–9 gemacht wurden. Es ist eine natürliche Konsequenz der umgekehrten Bindungsorientierungen der zwei Enantiomeren und der diastereomeren Beziehung der zwei Addukte, die dazu führen, dass die beiden Enantiomere den genau selben Bindungsort erfassen, der das alkylierte Adenin umgibt. N-BOC-MCBI (238) passt gut zu diesen früheren Beobachtungen und Modellen.

Unterscheidungsmerkmale von Enantiomeren:

[0057] Frühere Untersuchungen haben eine attraktive Erklärung für das verwirrende Verhalten von enantiomeren Paaren von Agenzien nahe gelegt, das nach unserem Vorschlag einem einzigen strukturellen Merkmal zugeordnet werden kann – dem Grad der sterischen Masse, die das CPI/DAS-C7- oder CBI/MCBI-C8-Zentrum in der Alkylierungsuntereinheit umgibt, für die die nicht natürlichen Enantiomere besonders empfindlich sind. Die Enantiomerunterschiede haben sich bei einfachen Derivaten der Alkylierungsuntereinheiten selbst (d.h. N-BOC-MCBI) als unterscheidbar herausgestellt, sind sehr markant bei den Agenzien auf Dimerbasis (d.h. MCBI-TMI) und sind weniger markant oder nicht leicht bei den größeren Agenzien auf Trimer- oder Tetramerbasis (d.h. MCBI-CDPI₂). Im allgemeinen wurden geringere Unterschiede in der biologischen Wirksamkeit und relativen Alkylierungseffizienz bei den enantiomeren CI- und Duocarmycin SA-Paaren beobachtet, wobei bei den die Substituenten oder sterische Masse an dieser Position fehlt.

[0058] Weiters sind die Unterschiede unter den enantiomeren Agenzien auf CI-Basis, denen der Pyrrolring insgesamt fehlt, klein und weniger ausgeprägt als jene bei den Agenzien auf DSA-Basis beobachteten (DAS > CI). Im Gegensatz dazu weisen Agenzien auf CPI-, CBI- und DA-Basis ausgeprägtere Unterschiede auf (CPI > DA > CBI), wobei sie einer Ordnung, die die relativen sterischen Unterschiede widerspiegelt, folgen. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen wurde festgestellt, dass die MCBI-TMI-Enantiomere analoge, aber kleinere Unterschiede aufweisen als jene bei CBI-TMI beobachteten ([Fig. 12](#)). Dieses charakteristische Verhalten der nicht natürlichen Enantiomere ist aus einer ausgeprägten sterischen Wechselwirkung des CPI/DAS-C7- oder CBI/MCBI-C8-Zentrums mit der 5'-Base neben dem Adenin-N3-Alkylierungsort, der in dem 5'-3'-Bindungsmodell für nicht natürliche Enantiomere vorhanden ist, abgeleitet.

[0059] Es ist wichtig, dass der einzige bedeutende Unterschied zwischen den Agenzien auf CBI- und MCBI-Basis bei den nicht natürlichen Enantiomeren beobachtet wurde, wo festgestellt wurde, dass die MCBI-Derivate bei cytotoxischen Untersuchungen 4–40 mal so wirksam sind und beim Alkylieren von DNA effizienter sind als die entsprechenden CBI-Derivate. Zusätzlich waren die nicht natürlichen Enantiomere von MCBI-CDPI₁, MCBI-Indol₂ und MCBI-CDPI₂ nahezu so wirksam wie die entsprechenden natürlichen Enantiomere in den cytotoxischen Untersuchungen.

[0060] Obwohl ein solches Verhalten bei (+)-CC-1065/ent-(–)-CC-1065 und einigen höheren Analoga (z.B. CPI-CDPI₂) beobachtet wurde, haben sich die nicht natürlichen Enantiomere der Indol₂- und CDPI₁-Derivate von verschiedenen Alkylierungsuntereinheiten als weniger wirksam als die natürlichen Enantiomere herausgestellt. Die Vergleiche der cytotoxischen Eigenschaften der nicht natürlichen Enantiomere der CBI-Derivate, die in [Fig. 10](#) detailliert dargestellt werden, mit jenen von MCBI-Indol₂, MCBI-CDPI₁, und MCBI-CDPI₂ sind repräsentativ für solche vergangenen und gegenwärtigen Beobachtungen. Im Gegensatz zu den Agenzien auf CBI-Basis, bei denen die nicht natürlichen Enantiomere 8–400 mal weniger wirksam wie die natürlichen Enantiomere sind, wobei nur die zwei Enantiomere von CBI-CDPI₂ vergleichbare Wirksamkeiten aufweisen, waren beide Enantiomere von MCBI-Indol₂, MCBI-CDPI₁ und MCBI-CDPI₂ in ihrer cytotoxischen Wirksamkeit (1–3×) vergleichbar und die Unterschiede im wesentlichen fehlten bei den fester bindenden CDPI₁- und CDPI₂-Derivaten.

[0061] Diese Beobachtungen können wichtig für die Feststellung des Ursprungs der biologischen Wirksamkeit dieser Klasse von reversiblen DNA-alkylierenden Agenzien sein. Es wurden zwei Vorschläge gemacht, bei denen darauf hingewiesen wird, dass die biologische Wirksamkeit entweder mit der Rate der DNA-Alkylierung oder mit der thermodynamischen Stabilität der Addukte und der sich daraus ergebenden relativen Effizienz der DNA-Alkylierung verbunden ist. Offensichtlich variieren nicht nur die Raten der DNA-Alkylierung zwischen den verschiedenen natürlichen Enantiomeren der MCBI-Derivate beträchtlich, sondern die Raten der DNA-Alkylierung variieren zwischen den enantiomeren Paaren sogar noch in größerem Umfang. Die nahezu gleichwertigen Wirksamkeiten in der ganzen Palette von natürlichen MCBI-Enantiomeren und die vergleichbare cytotoxische Wirksamkeit der meisten nicht natürlichen MCBI-Enantiomere ist unvereinbar mit dem Vorschlag, dass die Raten der DNA-Alkylierung in Beziehung zur cytotoxischen Wirksamkeit gesetzt werden können, aber ist zur Gänze vereinbar mit dem Vorschlag, dass die thermodynamische Stabilität und die daraus resultierende Effizienz der DNA-Alkylierung direkt in Beziehung zueinander stehen können. Die nicht natürlichen Enantiomere bilden von Natur aus weniger stabile Addukte und können leichter umgekehrt werden als die entsprechenden natürlichen Enantiomere. Für die natürlichen Enantiomere ist eine einzige DNA-Alkylierungsuntereinheit ausreichend, um funktionell stabile Addukte (d.h. TMI, CDPI₁) zu liefern, und diese liefert vollkommen wirksame Agenzien, die fähig zur effizienten DNA-Alkylierung sind. Für die nicht natürlichen Enantiomere sind volle biologische Wirksamkeit und effiziente DNA-Alkylierung im allgemeinen nur mit Agenzien erreicht worden, die zwei große DNA-Bindungsuntereinheiten enthalten (d.h. CDPI₂).

[0062] Mittlere Wirksamkeiten werden bei den kleineren Agenzien beobachtet, welche abnehmen, mit dem Maße wie sich ihre Größe und nicht-kovalenter Bindungsaaffinität verringert. Repräsentativ für solch einen Trend ist das Verhalten der nicht natürlichen Enantiomere der Agenzien auf CBI-Basis ([Fig. 10](#)). Die nicht natürlichen Enantiomere von MCBI folgen demselben Trend, außer dass sie sich mehr wie die natürlichen Enantiomere in dem Sinne verhalten, dass sie wirksamer sind und mit einigen einfacheren, einzelnen von DNA-Bindungsuntereinheiten Derivaten ein Plateau der cytotoxischen Wirksamkeit erreichen. Für uns ist dies ein Hinweis darauf, dass der C7-Methoxy-Substituent an der Alkylierungsuntereinheit der nicht natürlichen MCBI-Enantiomere für eine ausreichende zusätzliche nicht-kovalente Bindungsstabilisierung sorgt, die die scheinbare Effizienz oder Stabilität der nicht natürlichen Enantiomer-DNA-Alkylierung verstärkt. In Übereinstimmung mit diesem Vorschlag wurde festgestellt, dass selbst die N-BOC-MCBI- und die MCBI-TMI-Enantiomere weniger Unterschied als die von CBI-TMI aufweisen. Obwohl diese Auswirkung einer einzigen Methoxy-Gruppe als spekulativ erscheinen mag, sind ähnliche potenzierende Wirkungen eines einzelnen Methoxy-Substituenten innerhalb der TMI-Untereinheit von (+)-Duocarmycin SA beobachtet worden. In ähnlicher Weise kann die Duocarmycin SA-C6-Methoxycarbonylgruppe zur Potenzierung der nicht natürlichen DSA-Enantiomere beitragen.

[0063] Diese Interpretation und Beziehung der cytotoxischen Wirksamkeit zur Effizienz der DNA-Alkylierung und Stabilität der Addukte ist besonders attraktiv, da sie in Übereinstimmung mit der direkten Beziehung zwischen der cytotoxischen Wirksamkeit und der funktionellen Stabilität ist, die bei den Derivaten von 4–9 beobachtet wurde. In Übereinstimmung mit der Interpretation, dass es nicht die Rate der DNA-Alkylierung und die funktionelle Reaktivität sind, die die cytotoxische Wirksamkeit verstärken, sondern vielmehr die Nettoeffizienz und relative Stabilität des DNA-Alkylierungsprozesses, sind es die chemisch beständigeren Agenzien, welche ihr intrazelluläres biologisches Ziel am effizientesten erreichen die die größere wirksame cytotoxische Aktivität aufweisen, vorausgesetzt, dass sie ausreichend reaktiv sind, um die DNA unter Bildung von funktionell stabilen Addukten zu alkylieren.

Zusammenfassung:

[0064] Eine kurze und effektive 12–13-stufige (27–30% insgesamt) Synthese von MCBI und seinen unmittelbaren Vorläufern wird detailliert beschrieben und bildet das erste substituierte offene CBI-Derivat. Seine Evaluierung erlaubt die erste Beurteilung des elektronischen Effekts von Substituenten auf die chemische und funktionelle Reaktivität der Agenzien und die Auswirkung, die diese auf ihre biologischen Eigenschaften haben kann. Eine Untersuchung der Solvolysereakтивität von N-BOC-MCBI zeigte, dass die Einführung der starken, Elektronen abgebenden C7-Methoxygruppe die Rate der Solvolyse nur um 1,2–1,06× erhöht. Dieser bemerkenswert kleine Effekt zeigt, dass die Protonierung des C4-Carbonyls nicht der ratenbestimmende Schritt der Solvolyse oder säurekatalysierten nucleophilen Addition ist, und unterstützt weiter den Vorschlag, dass die Cyclopropanring Öffnungsreaktion die Anwesenheit und Hilfe eines Nucleophils benötigt (S_N2-Mechanismus). Zweifellos trägt dies zur DNA-Alkylierungsselektivität bei und weist darauf hin, dass die Positionierung eines zugänglichen Nucleophils (Adenin N3) und nicht die C4-Carbonylprotonierung oder Lewis-Säurekomplexbildung, der ratenbestimmende Schritt ist, der die Sequenzselektivität der DNA-Alkylierung reguliert. Dieser außergewöhnlich kleine elektronische Effekt auf die Solvolyserate hatte keine Auswirkung auf die Solvolyse-Regioselektivität, und es wurde ausschließlich die stereo-elektronisch kontrollierte nucleophile Addition an den

am wenigsten substituierten Kohlenstoff des aktivierten Cyclopropans beobachtet. Für die natürlichen Enantiomere hatte dieser sehr kleine elektronische Effekt auf die funktionelle Reaktivität eine kleine oder keine wahrnehmbare Auswirkung auf ihre DNA-Alkylierungsselektivität, Effizienz und relativen Raten oder auf ihre biologischen Eigenschaften im Vergleich zum entsprechenden Agens auf CBI-Basis. Es wurden wahrnehmbare Effekte der C7-Methoxygruppe auf die nicht natürlichen Enantiomere festgestellt, und sie erwiesen sich als 4–40x wirksamer als die entsprechenden nicht natürlichen Enantiomere auf CBI-Basis und vergleichbar in ihrer cytotoxischen Wirksamkeit mit dem entsprechenden natürlichen MCBI-Enantiomer. Dieser Effekt auf die nicht natürlichen Enantiomere wird durchwegs am besten rationalisiert nicht durch die Wirkung eines C7-Methoxy-Substituenten auf die funktionelle Reaktivität, sondern vielmehr durch die Einführung von zusätzlichen stabilisierenden nicht-kovalenten Wechselwirkungen, welche die DNA-Alkylierungseffizienz erhöhen und eine von Natur aus reversible DNA-Alkylierungsreaktion weiter stabilisieren.

Syntheseverfahren:

Herstellung von Ethyl-1-hydroxy-6-methoxynaphthalin-3-carboxylat (210), wie in [Fig. 3](#) dargestellt:

Verfahren A:

[0065] Eine Lösung von t-Kaliumbutoxid (21,0 g, 0,19 mol, 2 Äquiv.) in t-Butanol (81 ml) wurde einer Lösung von m-Anisaldehyd 200 (10,8 ml, 11,8 g, 0,087 mol) der Firma Aldrich und Diethylsuccinat (40,2 ml, 0,242 mol, 3 Äquiv.) hinzugefügt, und die Mischung wurde unter Rückfluss 45 Minuten lang erwärmt. Zusätzliches Diethylsuccinat (40,2 ml, 0,242 mol, 3 Äquiv.) und t-Kaliumbutoxid (21,0 g, 0,19 mol, 2 Äquiv.) in t-Butanol (81 ml) wurden hinzugefügt, und die Mischung wurde unter Rückfluss weitere 45 Minuten lang erwärmt. Die Mischung wurde gekühlt, durch Zusatz von 25%iger wässriger HCl angesäuert und mit Diethylether (3×15 ml) extrahiert. Die organische Schicht wurde mit 5%iger wässriger Na_2CO_3 -Lösung (6×40 ml) extrahiert. Die resultierende wässrige Phase wurde durch den Zusatz von 25%iger wässriger HCl angesäuert und mit Diethylether (3×15 ml) wieder extrahiert. Die zusammengeführten organischen Schichten wurden getrocknet (Na_2SO_4) und bei verringertem Druck konzentriert, was ein öliges Produkt lieferte, welches sich als 2:1-Mischung der isomeren Halbester 202 (15,0 g, 23,2 g theoretisch, 74%) herausstellte.

[0066] Die Mischung von 202 (15,0 g, 64 mmol) wurde mit Ac_2O (320 ml) und NaOAc (5,25 g, 64 mmol, 1,0 Äquiv.) behandelt und bei Rückfluss 5 Stunden erwärmt. Das Lösungsmittel wurde bei verringertem Druck entfernt, und der Rückstand wurde mit 15%igem wässrigem Na_2CO_3 (6×40 ml) behandelt und mit Ethylacetat (3×30 ml) extrahiert. Die organische Schicht wurde getrocknet (Na_2SO_4) und im Vakuum konzentriert. Ohne weitere Reinigung wurde das dunkelbraune Öl in Ethanol (100 ml) aufgelöst und mit K_2CO_3 (10 g, 74,4 mmol) behandelt. Die Mischung wurde unter Rückfluss 18 Stunden vor dem Abkühlen erwärmt, konzentriert, mit H_2O (40 ml) verdünnt, durch den Zusatz von 10%iger wässriger HCl auf pH 6 angesäuert und mit Ethylacetat (3×20 ml) extrahiert. Die organische Schicht wurde getrocknet (Na_2SO_4) und unter verringertem Druck konzentriert. Die Flash-Chromatographie (5×20 cm SiO_2 , 10–30% Ethylacetat-Hexan-Gradientenelution) lieferte 210 (8,90 g, 21,4 g theoretisch, 42% für 3 Stufen) als weißen Feststoff: Schmelzpunkt 168°C (Hexan, farblose Platten); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8,15 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, C8-H), 8,10 (s, 1H, C4-H), 7,38 (s, 1H, C2-H), 7,23 (dd, $J = 3,2, 8,8$ Hz, 1H, C7-H), 7,20 (d, $J = 3,2$ Hz, 1H, C5-H), 4,40 (q, $J = 8,0$ Hz, 2H), 3,90 (s, 3H, OCH_3), 1,40 (t, $J = 8,0$ Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 166,1, 157,5, 152,9, 134,4, 127,9, 123,3, 121,7, 119,8, 118,6, 106,0, 104,8, 60,0, 54,5, 13,7; IR(KBr) μ_{max} 3385, 1683, 1608, 1397, 1283, 1225, 1028, 878, 833, 768 cm^{-1} ; FABHRMS (NBA) m/e 246,0885 (M^+ , $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_4$ erfordert 246,0892). Anal. berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_4$: C, 68,28; H, 5,73. Gefunden: C, 68,22; H, 5,77.

[0067] Es wurden auch unterschiedliche Mengen an 206 isoliert. Für 206: Schmelzpunkt 88–89°C; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 9,32 (s, 1H, OH), 8,03 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H, C4-H), 7,50 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, C5-H), 7,43 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H, C2-H), 7,37 (t, $J = 8,2$ Hz, 1H, C6-H), 6,86 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, C7-H), 4,39 (q, $J = 7,8$ Hz, 2H), 4,09 (s, 3H, OCH_3), 1,39 (t, $J = 7,8$ Hz, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) μ 166,5, 155,9, 154,6, 135,8, 129,5, 126,4, 123,1, 121,5, 117,1, 109,6, 106,0, 61,1, 56,2, 14,3; IR (Film) μ_{max} 3404, 3056, 2980, 1718, 1711, 1611, 1583, 1468, 1450, 1380, 1290, 1220, 1126, 1087 cm^{-1} ; FABHRMS (NBA-Na) m/e 269,0786 ($\text{M}^+ + \text{Na}$, $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_4$ erfordert 269,0790). Anal. berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_4$: C, 68,28; H, 5,73. Gefunden: C, 68,23; H, 5,64.

Verfahren B, von 214:

[0068] Eine 9:1-Mischung von $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}-\text{H}_2\text{O}$ (50 ml) bei 0°C wurde 214 (3,10 g, 9,68 mmol) hinzugefügt, und die Reaktionsmischung wurde auf 25°C erwärmt und 2 Stunden lang gerührt. Die Reaktionsmischung wurde im Vakuum konzentriert, und zwei getrennte Volumina von jeweils 50 ml Toluol wurden sequenziell hinzuge-

fügt und unter verringertem Druck entfernt, was 202 (2,50 g, 2,56 g theoretisch, 98%) als farbloses Öl ergab.

[0069] Eine Mischung von 202 (2,50 g, 9,46 mmol) und NaOAc (0,750 g, 9,50 mmol) in 50 ml Ac₂O wurde 10 Stunden bei 70°C erwärmt. Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt, und eine Lösung des Rohproduktes und K₂CO₃ (1,38 g, 10,0 mmol) in 35 ml Ethanol wurde unter Rückfluss 4 Stunden lang erwärmt. Die Reaktionsmischung wurde auf 0°C abgekühlt, durch den Zusatz von 1M HCl (pH 6) angesäuert und mit Diethylether (4 × 30 ml) extrahiert. Die organischen Schichten wurden zusammengeführt, mit gesättigtem wässrigem NaCl (1 × 10 ml) gewaschen, getrocknet (Na₂SO₄) und unter verringertem Druck konzentriert. Zentrifugale Dünnschichtchromatographie (SiO₂, 4 mm Chromatotron-Platte, 5–20% Ethylacetat-Hexan-Gradientenelution) lieferte 210 (1,79 g, 2,33 g theoretisch, 76%) und 206 (0,22 g, 9%) als weiße kristalline Feststoffe.

[0070] Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse der zusammengehörenden Bemühungen um 202 zusammen umzuwandeln, das aus 214 bis 210 abgeleitet wurde:

| Bedingungen | Reaktionszeit (h) | Verhältnis 210:206 | % 210 isoliert |
|----------------------------------------------|-------------------|--------------------|----------------|
| Ac ₂ O-NaOAc, 160 °C* | 1 | 5:1 | 61 |
| Ac ₂ O-NaOAc, 70 °C* | 10 | 8:1 | 76 |
| TFAA-NaOAc, 40 °C* | 30 | 9:1 | 57 |
| (COCl) ₂ ; AlCl ₃ 0 °C | 1 | 11:1 | 38 |
| (COCl) ₂ ; FeCl ₃ 0 °C | 2 | 10:1 | 46 |
| (COCl) ₂ ; SnCl ₄ 0 °C | 2 | 11:1 | 54 |

* Nachfolgende Behandlung mit K₂CO₃-Ethanol

Herstellung von tert-Butyl E-3-ethoxycarbonyl-4-(3-methoxyphenyl)-3-butenoat (214):

Verbindung 214, wie in [Fig. 3](#) dargestellt:

[0071] Eine Suspension von NaH (0,64 g, 16 mmol, 60% in Öl) in 25 ml Tetrahydrofuran wurde einer Lösung von 212 (5,00 g, 14,8 mmol) siehe Owen et al., Synth. Commun. 1993, 23, 2119 in 40 ml Tetrahydrofuran bei 0°C hinzugefügt, und die Reaktionsmischung wurde auf 25°C erwärmt und 10 Stunden gerührt. Die Lösung wurde auf 0°C abgekühlt, 200 (2,00 g, 14,8 mmol) der Firma Aldrich Chemical in 25 ml Tetrahydrofuran wurde hinzugefügt, und die Mischung wurde auf 25°C erwärmt und 10 Stunden lang gerührt. Der größte Teil des Tetrahydrofurans wurde bei verringertem Druck entfernt, und gesättigtes wässriges NaHCO₃ (20 ml) wurde hinzugefügt. Die wässrige Schicht wurde mit Ethylacetat (4 × 30 ml) extrahiert, und die organischen Schichten wurden zusammengeführt, mit gesättigtem wässrigem NaCl gewaschen, getrocknet (Na₂SO₄) und im Vakuum konzentriert.

[0072] Chromatographie (SiO₂, 6 × 15 cm, 5–10% Ethylacetat-Hexan-Gradientenelution) lieferte 214 (3,65 g, 4,74 g theoretisch, 77%) als farbloses Öl als einzelnes Isomer durch ¹H-NMR (> 20:1): ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7,80 (s, 1H, C2'-H), 7,28 (t, J = 7,8 Hz, 1H, C5'-H), 6,92–6,86 (m, 3H, C4-H, C4'-H, C6'-H), 4,26 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 3,79 (s, 3H, OCH₃), 3,44 (s, 2H, C2-H₂), 1,44 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,31 (t, J = 7,1 Hz, 3H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 170,3, 167,5, 159,6, 141,1, 136,5, 129,5, 127,0, 121,4, 114,7, 114,0, 81,0, 61,0, 55,2, 35,0, 28,0, 14,2; IR (Film) 2978, 2933, 1726, 1708, 1578, 1368, 1278, 1194, 1155, 1096 cm⁻¹; FABHRMS (NBA) m/e 321,1716 (M⁺, +H, C₁₈H₂₄O₅ erfordert 321,1702).

Herstellung von Ethyl-1-benzyloxy-6-methoxynaphthalin-3-carboxylat (216), wie in [Fig. 4](#) dargestellt:

Verbindung 216:

[0073] Eine Lösung von 210 (900 mg, 3,65 mmol) in wasserfreiem Dimethylformamid (12,5 ml) unter N₂ wurde mit wasserfreiem K₂CO₃ (700 mg, 5,1 mmol, 1,4 Äquiv.), Benzylbromid (0,51 ml, 4,3 mmol, 1,2 Äquiv.) und Bu₄NI (0,7 mg) behandelt. Die Mischung wurde bei 25°C 5 Stunden gerührt, bevor sie unter verringertem Druck konzentriert wurde. Chromatographie (SiO₂, 2–5% Ethylacetat-Hexan-Gradientenelution) lieferte 216 (1,20 g, 1,23 g theoretisch, 98%) als farblosen halbfesten Stoff: ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8,20 (d, J = 9,6 Hz, 1H, C8-H), 8,10 (s, 1H, C4-H), 7,53 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 7,40 (t, J = 8,0 Hz, 1H), 7,37 (d, J = 2,4 Hz, 1H, C5-H), 7,34

(m, 2H), 7,19 (dd, $J = 2,4, 9,6$ Hz, 1H, C7-H), 7,18 (s; 1H, C2-H), 5,20 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 4,40 (q, $J = 8,0$ Hz, 2H), 3,90 (s, 3H, OCH₃), 1,40 (t, $J = 8,0$ Hz, 3H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 166,9, 158,6, 154,7, 136,8, 134,9, 128,6, 128,56, 128,3, 128,2, 127,6, 123,9, 122,6, 106,9, 102,4, 119,9, 106,9, 102,4, 71,1, 61,1, 55,2, 14,3; IR (Film) ν_{max} 2978, 1715, 1603, 1455, 1406, 1366, 1345, 1286, 1237, 1149, 1097, 1029 cm⁻¹; FABHRMS (NBA-Csl) m/e 469,0422 (M⁺, +Cs, C₂₁H₂₀O₄ erfordert 469,0416). Anal. berechnet für C₂₁H₂₀O₄: C, 74,98; H, 5,99. Gefunden: C, 75,21; H, 5,91.

Herstellung von 1-Benzylxyloxy-6-methoxynaphthalin-3-carbonsäure (218), wie in Fig. 4 dargestellt:

Verbindung 218:

[0074] Eine Lösung von 216 (2,49 g, 7,40 mmol) in Tetrahydrofuran-CH₃OH-H₂O (4:1:1, 50 ml) wurde mit Li-OH-H₂O (930 mg, 22,2 mmol, 3 Äquiv.) behandelt. Die Suspension wurde bei 23°C 18 Stunden gerührt, bevor H₂O (20 ml) hinzugefügt wurde. Die Lösung wurde durch den Zusatz von 10%iger wässriger HCl angesäuert, und das weiße Präzipitat wurde gesammelt. Die Kristallisation aus Ethanol lieferte 218 (2,17 g, 2,28 g theoretisch, 95%, üblicherweise 95–98%) als weiße Nadeln; Schmelzpunkt 185°C (Ethanol, weiße Nadeln); ¹H-NMR (Dimethylsulfoxid-d₆, 400 MHz) δ 8,15 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H, C8-H), 8,10 (s, 1H, C4-H), 7,57 (d, $J = 9,6$ Hz, 2H), 7,50 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, C5-H), 7,43 (t, $J = 9,6$ Hz, 1H), 7,37 (d, $J = 9,6$ Hz, 2H), 7,34 (s, 1H, C2-H), 7,27 (dd, $J = 2,0, 9,6$ Hz, 1H, C7-H), 5,30 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 3,90 (s, 3H, OCH₃); ¹³C-NMR (Dimethylsulfoxid-d₆, 100 MHz) δ 167,6, 158,2, 154,1, 136,9, 134,8, 129,0, 128,5, 127,9, 127,5, 123,3, 122,2, 122,1, 120,0, 107,6, 102,6, 69,5, 55,4; IR (KBr) δ_{max} 2932, 2647, 2543, 1685, 1629, 1420, 1296, 1201, 1030, 891, 768, 638 cm⁻¹; FABHRMS (NBA) m/e 308,1040 (M⁺, C₁₉H₁₆O₄ erfordert 308,1049). Anal. berechnet für C₁₉H₁₆O₄: C, 74,01; H, 5,23. Gefunden: C, 73,86; H, 5,33.

[0075] Herstellung von N-(tert-Butyloxycarbonyl)-1-(benzyloxy)-6-methoxy-3-naphthylamin (220), wie in Fig. 4 dargestellt. Verbindung 220. Eine Lösung von 218 (1,20 g, 3,91 mmol) in t-Butanol (75 ml) wurde nacheinander mit Diphenylphosphorylazid (DPPA, 1,29 g, 4,69 nmol, 1,2 Äquiv., siehe Shiori et al., J. Am. Chem. Soc. 1972, 94, 6203) und Triethylamin (0,67 ml, 4,69 mmol, 1,2 Äquiv.) behandelt, und die Mischung wurde unter Rückfluss 10 Stunden gerührt. Die Mischung wurde gekühlt und im Vakuum konzentriert. Zentrifugale Dünnschichtchromatographie (SiO₂, 4 mm Chromatotron-Platte, 5–10% Ethylacetat-Hexan-Gradientenelution) lieferte 220 (1,01 g, 1,48 theoretisch, 68%, üblicherweise 60–69%) als weißen Feststoff: mp. 138°C (Hexan, weiße Nadeln); ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8,10 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H, C8-H), 7,50 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,40 (m, 2H), 7,35 (m, 2H), 6,98 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, C4-H), 6,95 (dd, $J = 2,5, 9,6$ Hz, 1H, C7-H), 6,86 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, C2-H), 6,65 (s, 1H, NH), 5,20 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 3,80 (s, 3H, OCH₃), 1,50 (s, 9H, C(CH₃)₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 158,7, 155,3, 152,7, 136,9, 136,3, 129,8, 128,6, 127,9, 127,4, 123,7, 117,6, 116,0, 106,7, 105,3, 97,2, 80,6, 70,1, 55,2, 28,4; IR (KBr) ν_{max} 3323, 2978, 1698, 1591, 1549, 1422, 1346, 1228, 1148, 1024, 945, 869, 820, 756, 701 cm⁻¹; FABHRMS (NBA-Csl) m/e 512,0846 (M⁺, +Cs, C₂₃H₂₅NO₄ erfordert 512,0838). Anal. berechnet für C₂₃H₂₅NO₄: C, 72,80; H, 6,64; N, 3,69. Gefunden: C, 72,42; H, 6,77; N, 3,92.

Herstellung von N-(tert-Butyloxycarbonyl)-4-benzyloxy-1-brom-7-methoxy-2-naphthylamin (222), wie in Fig. 4 dargestellt:

Verbindung 222:

[0076] Eine Lösung von 220 (620 mg, 1,63 mmol) in Tetrahydrofuran (35 ml) unter Stickstoff wurde auf -78°C abgekühlt und mit einer Lösung von Tetrahydrofuran (2 ml), die 10 µl konzentrierte H₂SO₄ enthielt, behandelt. Nach 5 Minuten wurde eine Lösung von NBS (320 mg, 1,80 mmol, 1,1 Äquiv.) in Tetrahydrofuran (10 ml) hinzugefügt, und die Mischung wurde bei -78°C 2 Stunden gerührt. Die Mischung wurde mit Diethylether (50 ml) verdünnt und mit gesättigtem wässrigem NaHCO₃ (2 × 10 ml) und mit gesättigtem wässrigem NaCl (20 ml) gewaschen, getrocknet (Na₂SO₄) und im Vakuum konzentriert. Zentrifugale Dünnschichtchromatographie (SiO₂, 4 mm Chromatotron-Platte, 5–10% Ethylacetat-Hexan) lieferte 222 (720 mg, 747 mg theoretisch, 96%, üblicherweise 90–98%) als weißen Feststoff: Schmelzpunkt 125–127°C (Hexan, weißer Feststoff); ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8,10 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, C5-H), 7,98 (s, 1H, C3-H), 7,55 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H), 7,40 (m, 5H), 7,02 (dd, $J = 2,4, 9,2$ Hz, 1H, C6-H), 5,20 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 3,90 (s, 3H, OCH₃), 1,50 (s, 9H, C(CH₃)₃); die 2D ¹H-¹H-NOESY-NMR (CDCl₃, 400 MHz) zeigte einen diagnostischen Kreuzpeak für C3-H/CH₂C₆H₅; ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 159,8, 154,7, 152,5, 136,6, 135,6, 133,9, 128,6, 128,1, 128,0, 127,8, 124,5, 118,3, 116,3, 105,1, 97,6, 81,2, 70,3, 55,3, 28,6; IR (KBr) ν_{max} 3409, 2977, 1733, 1623, 1506, 1367, 1222, 1153, 1030, 989, 882, 829, 753 cm⁻¹; FABHRMS (NBA) m/e 457,0880 (M⁺, C₂₃H₂₄BrNO₄ erfordert 457,0889).

Herstellung von 2-[N-(tert-Butyloxycarbonyl)-N-(3-methyl-2-buten-1-yl)]amino-4-benzyloxy-1-brom-7-methoxynaphthalin (224), wie in **Fig. 4** dargestellt:

Verbindung 224:

[0077] Eine Suspension von NaH (44 mg, 0,92 mmol, 50% in Öl, 1,3 Äquiv.) in Dimethylformamid (4 ml) bei 24°C unter Ar wurde mit 222 (315 mg, 0,71 mmol) behandelt, und die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten gerührt. Die Mischung wurde bei 0°C gekühlt und 4-Brom-2-methyl-2-butene (0,25 ml, 2,1 mmol, 3 Äquiv.) wurde langsam hinzugefügt. Die Mischung konnte sich auf 24°C erwärmen und wurde 8 Stunden gerührt, bevor sie in H₂O (15 ml) gegossen wurde. Die Mischung wurde mit Ethylacetat (3 × 10 ml) extrahiert, und die zusammengeführten organischen Extrakte wurden mit H₂O (10 ml), gesättigtem wässrigem NaCl (5 ml) gewaschen, getrocknet (Na₂SO₄) und im Vakuum konzentriert. Chromatographie (SiO₂, 5–7% Ethylacetat-Hexan-Gradientenelution) lieferte 224 (357 mg, 374 mg theoretisch, 95%) als einen cremefarbigen Feststoff: mp 108–109°C (Hexan, weißer Feststoff); ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) Mischung von Amid-Rotameren, für das Hauptrotamer μ 8,10 (d, J = 9,2 Hz, 1H, C5-H), 7,56 (d, J = 2,4 Hz, 1H, C8-H), 7,47 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,38 (m, 3H), 7,13 (dd, J = 2,4, 9,2 Hz, 1H, C6-H), 6,55 (s, 1H, C3-H), 5,30 (t, J = 6,8 Hz, 1H, CH=CH), 5,20 (d, J = 11,7 Hz, 1H, CHHC₆H₅), 5,14 (d, J = 11,7 Hz, 1H, CHHC₆H₅), 4,42 (dd, 3 = 6,1 15,0 Hz, 1H, NCHH), 4,05–3,90 (m, 1H, NCHH), 3,96 (s, 3H, OCH₃), 1,53 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,30 (s, 6H, zwei CH₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) μ 159,4, 154,2, 153,9, 139,6, 136,5, 135,7, 134,3, 128,6, 128,1, 127,5, 127,2, 124,2, 119,8, 118,2, 113,6, 106,3, 106,2, 80,0, 70,3, 55,4, 46,4, 28,2, 25,7 17,6; IR (KBr) μ_{max} 2929, 1680, 1623, 1452, 1414, 1381, 1223, 1151, 1035, 972, 916, 841, 700 cm⁻¹; FABHRMS (NBA) m/e 526,1569 (M⁺, +H, C₂₈H₃₂BrNO₄ erfordert 526,1593). Anal. berechnet für C₂₈H₃₂BrNO₄: C, 63,88; H, 6,13; N, 2,66; Gefunden: C, 63,66; H, 6,15; N, 2,68.

Herstellung von 2-[N-(tert-Butyloxycarbonyl)-N-(formyhnethyl)]amino-4-benzyloxy-1-brom-7-methoxynaphthalin (226), wie in **Fig. 4** dargestellt:

Verbindung 226:

[0078] Eine Lösung von 224 (755 mg, 1,43 mmol) in 20%igem CH₃OH-CH₂Cl₂ (45 ml) wurde auf –78°C abgekühlt und wurde mit einem Strom von 3%igem O₃/O₂ (100 l/h) 2,9 Minuten lang behandelt. Die Reaktionsmischung wurde sofort durch den Zusatz von 4,5 ml (61 mmol, 43 Äquiv.) von Me₂S abgeschrackt. Die Reaktionsmischung wurde bei –78°C 5 Minuten und bei 24°C 6 Stunden gerührt, bevor das Lösungsmittel im Vakuum entfernt wurde. Zentrifugale Dünnschichtchromatographie (SiO₂, 2 mm Chromatotron-Platte, 10–20% Ethylacetat-Hexan-Gradientenelution) lieferte 226 (580 mg, 718 mg theoretisch, 81%) als weißen Feststoff: Schmelzpunkt 170°C (dec, Ethylacetat-Hexan, weißer Feststoff); ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) zwei Amid-Rotamere, μ 9,70 und 9,75 (zwei s, 1H, CHO), 8,20 und 8,10 (zwei d, J = 9,2 Hz, 1H, C5-H), 7,50 (d, J = 2,4 Hz, 1H, C8-H), 7,45 (d, J = 7,6 Hz, 2H), 7,30 (m, 3H), 7,10 (dd, J = 2,4, 9,2 Hz, 1H, C6-H), 6,80 und 6,75 (zwei s, 1H, C3-H), 5,21–5,06 (m, 2H, OCH₂C₆H₅), 4,58 und 4,46 (zwei d, J = 18,8 Hz, 1H, CHHCHO), 3,90 (m, 1H, CHHCHO), 3,91 und 3,89 (zwei s, 3H, OCH₃), 1,50 und 1,30 (zwei s, 9H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) μ Hauptrotamer 198,1, 159,7, 154,4, 139,5, 136,3, 134,3, 128,7, 128,2, 127,8, 127,4, 124,4, 118,6, 112,7, 106,3, 105,5, 105,2, 81,3, 70,4, 59,2, 55,4, 28,2; IR (KBr) μ_{max} 2977, 2911, 2850, 2835, 1735, 1695, 1624, 1599, 1458, 1417, 1365, 1225, 1155, 1107, 1026, 839, 741 cm⁻¹; FABHRMS (NBA) m/e 499,0969 (M⁺, C₂₅H₂₆BrNO₅, erfordert 499,0994). Anal. berechnet für C₂₅H₂₆BrNO₅: C, 59,01; H, 5,24; N, 2,80. Gefunden: C, 59,81; H, 5,19, N, 3,07.

Herstellung von 2-[N-(tert-Butyloxycarbonyl)-N-(3-tetrahydropyranloxy-2-propen-1-yl)]amino-4-benzyloxy-1-brom-7-methoxynaphthalin (228), wie in **Fig. 4** dargestellt:

Verbindung 228:

[0079] Eine Suspension von Triphenyl[(2-tetrahydropyranloxy)methyl]-phosphoniumchlorid (371 mg, 0,90 mmol, 3 Äquiv., siehe Schlude, H., Tetrahedron 1975, 31, 89) in 2 ml Tetrahydrofuran bei –78°C wurde tropfenweise mit n-BuLi (0,727 ml, 1,18 M in Hexan, 0,86 mmol, 2,86 Äquiv.) behandelt. Diese Reaktionsmischung wurde bei –78°C 5 Minuten gerührt und konnte sich dann auf 24°C über 10 Minuten lang erwärmen. Die Mischung wurde wieder auf –78°C abgekühlt, und 23 (154 mg, 0,30 mmol) in Tetrahydrofuran (1 ml) wurde tropfenweise hinzugefügt, gefolgt von HMPA (1,2 ml, 24 Äquiv.). Die Reaktionsmischung wurde bei –78°C 20 Minuten und bei 24°C 5 Stunden gerührt, bevor die Reaktion durch den Zusatz von Phosphatpuffer (51 ml, pH 7,4) abgeschreckt wurde. Die Mischung wurde mit Ethylacetat (3 × 20 ml) extrahiert, und die zusammengeführte organische Phase wurde getrocknet (Na₂SO₄) und im Vakuum konzentriert. Chromatographie (SiO₂, 5–30% Ethylacetat-Hexan-Gradientenelution mit 2% Triethylamin) lieferte 228 (154 mg, 175 mg theoretisch, 88%) als Öl und als Mischung von E- und Z-Olefinisomeren: ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) E- und Z-Isomere und Amid-Rota-

mere μ 8,10 (m, 1H, C5-H), 7,5–7,3 (m, 7H), 7,00 (m, 1H, C6-H), 6,7–6,5 (m, 1H, CH=CH), 6,3–6,0 (m, 1H, CH=CH), 5,2–5,0 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 4,8–4,2 (m, 3H), 3,98–2,70 (m, 5H, OCH₃ und OCH₂CH₂), 1,6–1,3 (m, 15H); IR (Film) μ_{max} 2947, 2871, 1704, 1622, 1597, 1453, 1415, 1367, 1227, 1161, 1035, 960, 901, 841, 742, 697, 651 cm⁻¹; FABHRMS (NBA-Csl) m/e 730,0800 ($\text{M}^+ + \text{Cs}$, $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{BrNO}_6$ erfordert 730,0780). Anal. berechnet für $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{BrNO}_6$: C, 62,21; H, 6,06; N, 2,34. Gefunden: C, 62,42; H, 6,27; N, 2,45.

Herstellung von 5-(Benzylxy)-3-(tert-butyloxycarbonyl)-8-methoxy-1-(tetrahydropyranoxymethyl)-1,2-dihydro-3H-benz[e]indol (230) wie in **Fig. 4** dargestellt:

Verbindung 230:

[0080] Eine Lösung von 228 (950 mg, 1,59 mmol) und AIBN (4,4 mg, 0,32 mmol, 0,2 Äquiv.) in C_6H_6 (60 ml) bei 24°C unter Ar wurde mit Bu₃SnH (925 mg, 3,18 mmol, 2 Äquiv.) behandelt, und die Reaktionsmischung wurde bei Rückfluss 2 Stunden erwärmt. Die Reaktionsmischung wurde gekühlt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Zentrifugale Dünnschichtchromatographie (SiO₂, 4 mm Chromatotron-Platte, 5–10% Ethylacetat-Hexan-Gradientenelution mit 2% Triethylamin) lieferte 230 (785 mg, 826 mg theoretisch, 96%, üblicherweise 95–98%) als hellgelbes Öl: ¹H-NMR (CDCl_3 , 400 MHz) μ 8,10 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, C6-H), 7,65 (br s, 1H, C4-H), 7,45–7,25 (m, 5H), 6,95 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, C9-H), 6,88 (dd, $J = 2,4, 9,2$ Hz, 1H, C7-H), 5,20 (br s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 4,60 und 4,50 (zwei br s und m, 1H, OCHCH₂), 4,20–3,20 (n, 10H), 1,90–1,50 (m, 15H); ¹³C-NMR (CDCl_3 , 100 MHz) μ 158,7, 155,6, 153,0, 137,0, 132,0, 128,51, 128,45, 127,9, 127,5, 125,0, 117,4, 115,0, 101,4, 100,1, 98,3, 94,6, 70,1, 68,9, 62,7, 60,4, 55,3, 52,9, 30,6, 28,5, 25,9, 19,7, 14,2; IR (Film) μ_{max} 2942, 1700, 1623, 1451, 1405, 1368, 1228, 1141, 1029, 986, 907, 834, 737 cm⁻¹; FABHRMS (NBA) m/e 519,2597 ($\text{M}^+ + \text{Cs}$, $\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{NO}_6$ erfordert 519,2621).

Herstellung von 5-(Benzylxy)-3-(tert-butyloxycarbonyl)-1-(hydroxymethyl)-8-methoxy-1,2-dihydro-3H-benz[e]indol (232) wie in **Fig. 4** dargestellt:

Verbindung 232:

[0081] Eine Lösung von 230 (207 mg, 0,40 mmol) in CH_3OH (6,5 ml) wurde mit Amberlyst 15 (12,5 mg) behandelt, und die Reaktionsmischung wurde 6 Stunden auf 45°C erwärmt. Das Harz wurde durch Filtration entfernt, und das Lösungsmittel wurde im Vakuum konzentriert. Die Chromatographie (SiO₂, 20–40% Ethylacetat-Hexan-Gradientenelution) lieferte 232 (171 mg, 172,5 mg theoretisch, 99%) als farblosen Feststoff: Schmelzpunkt 158–160°C (Hexan, farbloser Feststoff); ¹H-NMR (CDCl_3 , 400 MHz) μ 8,10 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H, C6-H), 7,80 (br s, 1H, C4-H), 7,51 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H), 7,40 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 7,36–7,32 (m, 1H), 6,96 (br s, 1H, C9-H), 6,95 (dd, $J = 11,0, 8,4$ Hz, 1H, C7-H), 5,20 (br s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 4,17 (d, $J = 11,0$ Hz, 1H, C2-H), 4,10 (dd, $J = 11,0, 8,4$ Hz, 1H, C2-H), 3,93–3,90 (m, 1H, C1-H), 3,89 (s, 3H, OCH₃), 3,70 (m, 2H, CH_2OH), 1,50 (s, 9H, C(CH₃)₃); ¹³C-NMR (CDCl_3 , 100 MHz) μ 158,9, 155,0, 151,0, 128,5, 127,9, 127,6, 125,2, 114,9, 101,2, 94,6, 70,2, 64,6, 53,3, 52,4, 41,2, 28,5; IR (KBr) μ_{max} 3405, 1691, 1625, 1588, 1478, 1449, 1407, 1366, 1227, 1140, 1028 cm⁻¹; FABHRMS (NBA-Csl) m/e 568,1101 (M^+ , $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{NO}_5$ erfordert 568,1100).

Herstellung von 5-(Benzylxy)-3-(tert-Butyloxycarbonyl)-1-(chloromethyl)-8-methoxy-1,2-dihydro-3H-benz[e]indol (234), wie in **Fig. 4** dargestellt:

Verbindung 234:

[0082] Eine Lösung von 232 (112 mg, 0,25 mmol) und Ph₃P (135 mg, 0,50 mmol, 2 Äquiv.) in CH_2Cl_2 (0,9 ml) bei 24°C unter Ar wurde mit CCl₄ (0,15 ml, 1,5 mmol, 6 Äquiv.) behandelt, und die Reaktionsmischung wurde bei 24°C 20 Stunden gerührt. Chromatographie (SiO₂, 10% Ethylacetat-Hexan) lieferte 234 (113 mg, 113 mg theoretisch, 100%) als weißen Feststoff: Schmelzpunkt 148–150°C (Hexan, weißer Feststoff); ¹H-NMR (CDCl_3 , 400 MHz) μ 8,10 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, C6-H), 7,70 (br s, 1H, C4-H), 7,50 (d, $J = 6,4$ Hz, 2H), 7,40–7,35 (m, 3H), 6,97 (dd, $J = 2,4, 9,2$ Hz, 1H, C7-H), 6,86 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, C9-H), 5,20 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 4,22 (m, 1H, C2-H), 4,10 (t, $J = 9,8$ Hz, 1H, C2-H), 3,92–3,86 (m, 2H, CHHCl, C1-H), 3,91 (s, 3H, OCH₃), 3,40 (t, $J = 11,4$ Hz, 1H, CHHCl), 1,58 (s, 9H, C(CH₃)₃); ¹³C-NMR (CDCl_3 , 100 MHz) μ 159,2, 156,3, 153,0, 137,0, 131,0, 128,5, 128,0, 127,6, 125,4, 118,0, 114,9, 100,8, 94,5, 70,2, 55,4, 53,0, 46,2, 28,5; IR (KBr) μ_{max} 2971, 1699, 1626, 1456, 1405, 1367, 1334, 1144, 1029, 958, 907 cm⁻¹; FABHRMS (NBA) m/e 453,1710 (M^+ , $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{ClNO}_4$ erfordert 453,1706). Anal. berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{ClNO}_4$: C, 68,79; H, 6,22; N, 3,09. Gefunden: C, 68,70; H, 6,51; N, 2,78.

Herstellung von 3-(tert-Butyloxycarbonyl)-1-(chlormethyl)-5-hydroxy-8-methoxy-1,2-dihydro-3H-benz[e]indol (236), wie in **Fig. 4** dargestellt:

Verbindung 236:

[0083] Eine Mischung von 234 (80 mg, 0,17 mmol), HCO_2NH_4 (70 mg, 1,11 mmol, 6 Äquiv.), 10% Pd-C (80 mg) in Aceton (6 ml) wurde unter Rückfluss 30 Minuten erwärmt. Der Katalysator wurde durch Filtration entfernt, und das Lösungsmittel wurde unter verringertem Druck verdampft. Zentrifugale Dünnschichtchromatographie (SiO_2 , 40% Ethylacetat-Hexan) lieferte 236 (61 mg, 64 mg theoretisch, 95%, üblicherweise 95–100%) als weißen Feststoff; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8,10 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, C6-H), 7,50 (br s, 1H, C4-H), 6,95 (dd, $J = 2,4, 9,2$ Hz, 1H, C7-H), 6,84 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, C9-H), 6,05 (br s, 1H, OH), 4,22 (m, 1H, C2-H), 4,10 (t, $J = 11,6$ Hz, 1H, C2-H), 3,98–3,80 (m, 2H, CHHCl, C1-H), 3,91 (s, 3H, OCH_3), 3,40 (t, $J = 11,4$ Hz, 1H, CHH-Cl), 1,60 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); IR (KBr) μ_{\max} 3336, 2929, 1674, 1629, 1595, 1477, 1421, 1374, 1223, 1141, 1029, 822, 713 cm^{-1} ; FABHRMS (NBA-Csl) m/e 496,0287 ($\text{M}^+ + \text{Cs}$, $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{ClNO}_4$ erfordert 496,0292).

[0084] Auflösung von 236. Die Enantiomere von 236 wurden auf einer halbpräparativen HPLC Diacel Chiralcel OD-Säule (10 μm , 2 × 25 cm) unter Verwendung von 2% i-PrOH-Hexan-Eluens (5 ml/min) aufgelöst. Die Enantiomere wurden mit Retentionszeiten von 48,03 (nicht natürliches Enantiomer) und 41,05 Minuten (natürliches Enantiomer, $\mu = 1,17$) eluiert. Natürliches (1S)-236: $[\mu]^3 - 42$ (c 0,25, CH_2Cl_2). ent-(1R)-236: $[\mu]^3 + 41$ (c 0,25, CH_2Cl_2).

Herstellung von N-(tert-Butyloxycarbonyl)-7-methoxy-1,2,9,9a-tetrahydrocyclopropa[c]benz[e]indol-4-on (238, N-BOC-MCBI), wie in **Fig. 4** dargestellt:

Verbindung 238:

[0085] Eine Lösung von 236 (1,5 mg, 4,1 μmol) in Tetrahydrofuran-Dimethylformamid (3:1, 200 μl) bei 0°C unter N_2 wurde mit einer Suspension von NaH (0,5 mg, 60% in einer Öldispersion, 12 μmol , 3 Äquiv.) behandelt. Die Reaktionsmischung wurde bei 0°C 30 Minuten gerührt, bevor pH 7 Phosphatpuffer (0,2 M, 259 μl) und 2 ml Tetrahydrofuran hinzugefügt wurden. Die organische Schicht wurde getrocknet (Na_2SO_4) und im Vakuum konzentriert. Chromatographie (SiO_2 , 20–30% Ethylacetat-Hexan-Gradientenelution) lieferte 238 (1,2 mg, 1,3 mg theoretisch, 89%) als weißen Schaum: Schmelzpunkt 90–92°C (Hexan-Ethylacetat, farblose Prismen); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8,10 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, C5-H), 6,90 (dd, $J = 2,4, 8,7$ Hz, 1H, C6-H), 6,70 (br s, 1H, C3-H), 6,25 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, C8-H), 4,10 (m, 2H, Cl-H₂), 3,80 (s, 3H, OCH_3), 2,60 (dt, $J = 4,1, 7,6$ Hz, 1H, C9a-H), 1,56 (s, 9H), 1,43 (t, $J = 5$ Hz, 1H, C9-H), 1,23 (t, $J = 7,1$ Hz, 1H, C9-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (C_6D_6 , 100 MHz) μ 184,5, 162,6, 157,9, 151,8, 142,6, 129,6, 127,4, 111,9, 109,4, 106,7, 82,4, 54,9, 52,4, 33,2, 28,6, 27,9, 23,1; IR (Film) μ_{\max} 2974, 1724, 1622, 1599, 1477, 1398, 1370, 1297, 1239, 1162, 1122, 1021 cm^{-1} ; UV(CH_3OH) μ_{\max} 312 ($\mu = 18000$) 275 nm ($\mu = 16000$); uv (Tetrahydrofuran) μ_{\max} 301 ($\mu = 25000$), 270 nm ($\mu = 20000$); FABHRMS (NBA) m/e 328,1561 ($\text{M}^+ + \text{H}$, $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ erfordert 328,1549). Natürlich (+)-238: $[\mu]^3 + 144$ (c 0,043, Tetrahydrofuran) ent-(–)-238: $[\mu]^3 - 142$ (c 0,031, Tetrahydrofuran).

Herstellung von 7-Methoxy-1,2,9,9a-tetrahydrocyclopropa[c]-benz[e]indol-4-on (240), wie in **Fig. 4** dargestellt:

Verbindung 240:

[0086] Phenol 236 (5 mg, 1,37 μmol) wurde mit wasserfreiem 3 N HCl-Ethylacetat (0,4 ml) bei 24°C 20 Minuten behandelt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, um das rohe, instabile Aminhydrochlorid zu erhalten. Dieser Rückstand wurde mit 5%igem wässrigem NaHCO_3 (0,4 ml) und Tetrahydrofuran (0,4 ml) bei 24°C unter N_2 behandelt, und die Zwei-Phasen-Mischung wurde 1,5 Stunden (24°C) gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Ethylacetat (3 × 2 ml) extrahiert, und die zusammengeführten Extrakte wurden mit H_2O (2 ml) gewaschen, getrocknet (Na_2SO_4) und im Vakuum konzentriert. Chromatographie (SiO_2 , 10% $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$) lieferte 240 (2,9 mg, 3,1 mg theoretisch, 93%) als gelbbraunes Öl: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 8,10 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, C5-H), 6,87 (dd, $J = 2,4, 8,7$ Hz, 1H, C6-H), 6,27 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, C8-H), 5,65 (s, 1H, C3-H), 4,80 (br s, 1H, NH), 3,80 (s, 3H, OCH_3), 3,79 (dd, $J = 5,2, 10,2$ Hz, 1H, C1-H), 3,63 (d, $J = 10,2$ Hz, 1H, C1-H), 2,78 (dt, $J = 7,8, 4,6$ Hz, 1H, C9a-H), 1,40 (dd, $J = 4,0, 7,8$ Hz, 1H, C9-H), 1,23 (t, $J = 4,4$ Hz, 1H, C9-H); IR (Film) μ_{\max} 3384, 2917, 2848, 1738, 1611, 1525, 1462, 1361, 1236, 1028 cm^{-1} ; FABHRMS (NBA) m/e 228,1023 ($\text{M}^+ + \text{H}$, $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_2$ erfordert 228,1025). Natürliches (+)-240: $[\mu]^3 + 200$ (c 0,04, Tetrahydrofuran) ent-(–)-240: $[\mu]^3 - 194$ (c 0,05, Tetrahydrofuran).

Herstellung von N-(tert-Butyloxycarbonyl)-4-benzyloxy-1-iod-7-methoxy-2-naphthylamin (242), wie in [Fig. 5](#) dargestellt:

Verbindung 242:

[0087] Eine Lösung von 220 (985 mg, 2,60 mmol) in 40 ml einer 1:1-Mischung von Tetrahydrofuran-CH₃OH wurde auf -78°C abgekühlt, und 30 ml von P-Toluensulfonsäure-H₂O in 1 ml Tetrahydrofuran wurde hinzugefügt. N-Jodsuccinimid (652 mg, 2,90 mmol) in 10 ml Tetrahydrofuran wurden mittels Kanüle im Verlauf von 5 Minuten hinzugefügt. Bei Abschluss der Reaktion (ca. 3 Stunden bei -78°C) wurden 10 ml gesättigtes wässriges NaHCO₃ und 50 ml Diethylether hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde auf 25°C erwärmt, und festes NaCl wurde hinzugefügt, um die wässrige Schicht zu sättigen. Die organische Phase wurde abgetrennt, und die wässrige Phase wurde mit Diethylether (3 × 10 ml) extrahiert. Die organischen Phasen wurden zusammengeführt, mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (1 × 10 ml) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 × 10 ml) gewaschen, getrocknet (Na₂SO₄) und konzentriert. Chromatographie (SiO₂, 2 × 4 cm, 20% Ethylacetat-Hexan) lieferte 242 (1,17 g, 131 g theoretisch, 89%, üblicherweise 85–95%) als kristallinen weißen Feststoff; Schmelzpunkt 139–141°C (Ethylacetat-Hexan, Nadeln). ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8,12 (d, J = 9,1 Hz, 1H, C5-H), 7,90 (s, 1H, C3-H), 7,52 (d, J = 7,1 Hz, 2H), 7,41 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 7,36 (d, J = 2,4 Hz, 1H, C8-H), 7,34 (t, J = 7,4 Hz, 1H), 7,28 (br s, 1H, NH), 6,99 (dd, J = 9,1, 2,4 Hz, 1H, C6-H), 5,24 (s, 2H, OCH₂Ph), 3,95 (s, 3H, OCH₃), 1,56 (s, 9H, C(CH₃)₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 160,1, 155,8, 152,7, 138,9, 136,6, 136,4, 128,5, 128,0, 127,8, 124,6, 118,5, 116,3, 110,8, 98,1, 81,1, 79,4, 70,3, 55,3, 28,3; IR (Film) μ _{max} 3387, 2978, 2923, 1730, 1621, 1602, 1572, 1503, 1366, 1230, 1152 cm⁻¹; FABHRMS (NBA-Csl) m/e 637,9836 (M⁺ + Cs, C₂₃H₂₄INO₄ erfordert 637,9804). Anal. berechnet für C₂₃H₂₄INO₄: C, 54,67; H, 4,79; N, 2,77. Gefunden: C, 54,61; H, 4,85; N, 2,92.

Herstellung von 2-[N-(tert-Butyloxycarbonyl)-N-(2-propenyl)]amino-4-benzyloxy-1-iod-7-methoxy-2-naphthylamin (246), wie in [Fig. 5](#) dargestellt:

Verbindung 246:

[0088] Eine Lösung von 242 (820 mg, 1,62 mmol) in 25 ml Dimethylformamid, auf 0°C gekühlt, wurde mit NaH (80 mg, 60% in Öl, 2,0 mmol) in mehreren Portionen 10 Minuten lang behandelt. Nach 45 Minuten wurde Allylbromid (605 mg, 5 mmol) hinzugefügt, und die Reaktionsmischung konnte sich auf 25°C erwärmen und wurde 3 Stunden gerührt. Die Reaktionsmischung wurde dann durch Zusatz von gesättigtem wässrigem NaHCO₃ (15 ml) abgeschreckt, und die wässrige Schicht wurde mit Ethylacetat (4 × 15 ml) extrahiert. Die organischen Schichten wurden zusammengeführt, mit H₂O (2 × 10 ml) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 × 10 ml) gewaschen, getrocknet (Na₂SO₄), filtriert und unter reduziertem Druck konzentriert. Zentrifugale Dünnschichtchromatographie (SiO₂, 4 mm Chromatotron-Platte, 5–15% Ethylacetat-Hexan-Gradientenelution) lieferte 246 (822 mg, 884 mg theoretisch, 93%, üblicherweise 90–95%) als kristallinen weißen Feststoff (Mischung von Amid-Rotameren in CDCl₃): Schmelzpunkt 112–113°C (Ethylacetat-Hexan); ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) Hauptrotamer δ 8,21 (d, J = 9,1 Hz, 1H, C5-H), 7,53 (s, 1H, C8-H), 7,46 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,39 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 7,33 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 7,13 (dd, J = 9,1, 1,8 Hz, 1H, C6-H), 6,60 (s, 1H, C3-H), 5,97–5,87 (m, 1H, CH=CH₂), 5,28–4,98 (m, 4H, CH₂Ph, C=CH₂), 4,51 (dd, J = 15,0, 5,9 Hz, 1H, NCHH), 3,97 (s, 3H, OCH₃), 3,81 (dd, J = 15,0, 7,2 Hz, 1H, NCHH), 1,30 (s, 9H, C(CH₃)₃); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 159,9, 155,1, 153,9, 143,6, 137,0, 136,5, 133,6, 128,6, 128,1, 127,2, 124,4, 120,2, 118,3, 117,9, 111,9, 106,3, 93,9, 80,3, 70,2, 55,4, 52,2, 28,3; IR (Film) 3077, 2976, 2923, 1703, 1621, 1594, 1450, 1410, 1367, 1324, 1263, 1226, 1149, 1030 cm⁻¹; FABHRMS (NBA-Csl) m/e 678,0089 (M⁺ + Cs, C₂₆H₂₈INO₄ erfordert 678,0017). Anal. berechnet für C₂₆H₂₈INO₄: C, 57,26; H, 5,17; N, 2,57. Gefunden: C, 57,16; H, 5,25; N, 2,54.

Herstellung von
5-(Benzylxy)-3-(tert-butyloxycarbonyl)-8-methoxy-1-(2',2',6',6'-tetramethylpiperidinyl-N-oxymethyl)-1,2-dihydro-3H-benz[e]indol (248), wie in [Fig. 5](#) dargestellt:

Verbindung 248:

[0089] Eine Lösung von 246 (720 mg, 1,32 mmol) und Tempo (619 mg, 3,96 mmol) in 45 ml frisch destilliertem Benzol (Na/Benzophenon) unter N₂ wurde mit Bu₃SnH (384 mg, 1,32 mmol) behandelt. Die Lösung wurde auf 70°C erwärmt, und drei zusätzliche Äquivalentgewichte von Tempo (3 × 206 mg) und Bu₃SnH (4 × 384 mg) nacheinander in vier Portionen über die nächsten 45 Minuten hinzugefügt. Nach 1 Stunde wurde die Lösung auf 25°C abgekühlt, und die flüchtigen Bestandteile wurden unter verringertem Druck entfernt. Zentrifugale Dünnschichtchromatographie (SiO₂, 4 mm Chromatotron-Platte, 0–10% Ethylacetat-Hexan-Gradientenelution)

lieferte 248 (622 mg, 758 mg theoretisch, 82%, üblicherweise 75–90%) als weißen Feststoff: Schmelzpunkt. 128–130°C (Hexan, weiße Nadeln); $^1\text{H-NMR}$ (Dimethylsulfoxid-d₆, 400 MHz) μ 8,01 (d, J = 9,2 Hz, 1H, C6-H), 7,62 (br s, 1H, C4-H), 7,52 (br s, 2H), 7,42 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 7,35 (t, J = 7,3 Hz, 1H), 7,01 (d, J = 2,4 Hz, 1H, C9-H), 6,95 (dd, J = 9,2, 2,4 Hz, 1H, C7-H), 5,23 (s, 2H, OCH₂Ph), 4,16 (d, J = 11,0 Hz, 1H, C2-H), 4,01 (t, J = 11,0 Hz, 1H, C2-H), 3,92 (dd, J = 8,1, 4,6 Hz, 1H, CHHOR), 3,82 (s, 3H, OCH₃), 3,79–3,70 (m, 2H, CHHOR und C1-H), 1,51 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,46–1,19 (m, 6H, Piperidin-(CH₂)₃-), 1,14 (s, 3H, CH₃), 1,02 (s, 3H, CH₃), 0,91 (s, 3H, CH₃), 0,82 (s, 3H, CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (Dimethylsulfoxid-d₆, 100 MHz) μ 158,7, 155,5, 152,7, 141,5, 137,0, 131,9, 128,5, 127,9, 127,5, 125,0, 117,4, 115,3, 112,8, 100,9, 94,6, 80,4, 70,1, 59,8, 59,7, 55,0, 52,8, 39,6, 39,5, 38,4, 33,2, 32,9, 31,2, 28,5, 20,14, 20,52, 17,0; IR (Film) μ_{max} 2974, 2923, 1697, 1620, 1584, 1471, 1446, 1400, 1359, 1323, 1220, 1169, 1133, 1031 cm⁻¹; FABHRMS (NBA-NaI) m/e 597,3288 (M⁺ + Na, C₃₅H₄₆N₂O₅ erfordert 597,3304). Anal. berechnet für C₃₅H₄₆N₂O₅: C, 73,13; H, 8,07; N, 4,88; Gefunden: C, 73,30; H, 7,94; N, 4,85.

Herstellung von 3-(tert)-Butyloxycarbonyl)-1-(hydroxymethyl)-5-hydroxy-8-methoxy-1,2-dihydro-3H-benz[e]indol (230), wie in [Fig. 5](#) dargestellt:

Verfahren B, aus 248:

Verbindung 230:

[0090] Eine Lösung von 248 (750 mg, 1,30 mmol) in 30 ml einer 3:1:1-Mischung von HOAc-Tetrahydrofuran-H₂O wurde mit Zinkpulver (1,05 g, 16 mmol) behandelt, und die resultierende Reaktionsmischung wurde auf 70°C unter rigorosen Röhren erwärmt. Nach 2 Stunden wurde die Reaktionsmischung auf 25°C abgekühlt, und das Zink wurde durch Filtration entfernt. Die flüchtigen Bestandteile wurden unter verringertem Druck entfernt, und der sich ergebende Rückstand wurde in 30 ml Ethylacetat aufgelöst und filtriert. Die Lösung wurde konzentriert und der zentrifugalen Dünnschichtchromatographie (SiO₂, 4 mm Chromatotron-Platte, 15–35% Ethylacetat-Hexan-Gradientenelution) unterworfen, die 230 (487 mg, 566 mg theoretisch, 86%, üblicherweise 80–90%) als weißen Feststoff lieferte, der in allen Belangen identisch mit dem echten Material war.

Herstellung von seco-MCBI-TMI (252), wie in [Fig. 6](#) dargestellt:

Verbindung 252:

[0091] Eine Lösung von 236 (3,5 mg, 9,6 μmol) in 4 M HCl-Ethylacetat (300 μl) bei 0°C wurde 30 Minuten gerührt, bevor die flüchtigen Bestandteile durch einen Strom von N₂ entfernt wurden, und der Rückstand wurde unter Vakuum (0,02 mm) 15 Minuten getrocknet. Das resultierende rohe 250 wurde in Dimethylformamid (200 μl) aufgelöst und nacheinander mit 300 (2,7 mg, 10,6 μmol , für die Herstellung siehe Boger et al., J. Org. Chem. 1990, 55, 4499) und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDCI) (5,5 mg, 29 μmol , 3 Äquiv.) behandelt, und die Reaktionsmischung wurde 10 Stunden bei 25°C gerührt. Wasser (0,5 ml) wurde der Reaktionsmischung hinzugefügt, und die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (4 \times 1 ml) extrahiert. Die organischen Schichten wurden zusammengeführt, getrocknet (Na₂SO₄) und im Vakuum konzentriert. Die präparative Dünnschichtchromatographie (SiO₂, 20 cm \times 20 cm \times 0,25 mm, 5% Dimethylformamid-Toluol, R_F = 0,60) lieferte 252 (4,1 mg, 4,8 mg theoretisch, 85%) als weißen Feststoff: $^1\text{H-NMR}$ (Dimethylsulfoxid-d₆, 400 MHz) μ 11,48 (d, J = 2,0 Hz, 1H, NH), 10,35 (s, 1H, OH), 8,02 (d, J = 9,2 Hz, 1H, C6-H), 7,74 (br s, 1H, C4-H), 7,12 (d, J = 2,4 Hz, 1H, C9-H), 7,08 (d, J = 2,0 Hz, 1H, C3'-H), 7,00 (d, J = 9,2, 2,4 Hz, 1H, C7-H), 6,98 (s, 1H, C4'-H), 4,72 (t, J = 10,5 Hz, 1H, C2-H), 4,47 (dd, J = 11,1, 1,3 Hz, 1H, C2-H), 4,19–4,15 (m, 1H, C1-H), 4,05 (dd, J = 11,3, 3,3 Hz, 1H, CHHCl), 3,95 (s, 3H, OCH₃), 3,93 (s, 3H, OCH₃), 3,84 (s, 3H, OCH₃), 3,82 (s, 3H, OCH₃), 3,80 (dd, J = 10,4, 5,5H₂, 1H, CHHCl); IR (Film) μ_{max} 3238, 2946 1631, 1585, 1522, 1493, 1463, 1338, 1313, 1220 cm⁻¹; FABHRMS (NBA) m/e 497,1500 (M⁺ + H, C₂₆H₂₅CIN₂O₆ erfordert 497,1479). Natürlich (1S)-252: $[\mu]^3$ – 23 (c 0,07, Dimethylformamid), ent-(1R)-252: $[\mu]^3$ + 23 (c 0,10, Dimethylformamid).

Herstellung von MCBI-TMI (254), wie in [Fig. 6](#) dargestellt:

Verbindung 254:

[0092] Eine Lösung von 252 (3,5 mg, 7,04 μmol) in Tetrahydrofuran-Dimethylformamid (3:1, 350 μl) bei 0°C wurde mit NaH (0,85 mg, 60%ig in Öl, 21 μmol , 3 Äquiv.) behandelt. Die Reaktionsmischung wurde 30 Minuten bei 0°C gerührt, bevor pH 7 Phosphatpuffer (0,2 M, 400 μl) und 3 ml Tetrahydrofuran hinzugefügt wurden. Die organische Lösung wurde getrocknet (Na₂SO₄), im Vakuum konzentriert, und das Rohprodukt wurde durch präparative Dünnschichtchromatographie (SiO₂, 20 cm \times 20 cm \times 0,25 mm, 5% Dimethylformamid-Toluol, R_F =

0,55) gereinigt, was 254 (2,9 mg, 3,2 mg theoretisch, 90%) als weißen Feststoff ergab: $^1\text{H-NMR}$ (Dimethylsulfoxid-d₆, 400 MHz) μ 11,60 (s, 1H, NH), 7,91 (d, J = 8,8 Hz, 1H, C5-H), 7,08 (d, J = 2,0 Hz, 1H, C3'-H), 6,97 (dd, J = 8,7, 2,4 Hz, 1H, C6-H), 6,92 (s, 1H, C4'-H), 6,70 (d, J = 2,4 Hz, 1H, C8-H), 6,60 (s, 1H, C3-H), 4,50 (dd; J = 10,5, 5,0 Hz, 1H, C1-H), 4,32 (d, J = 10,5 Hz, 1H, C1-H), 3,90 (s, 3H, OCH₃), 3,84 (s, 3H, OCH₃), 3,80 (s, 3H, OCH₃), 3,79 (s, 3H, OCH₃), 3,32–3,28 (m, 1H, C9a-H, teilweise verdeckt durch H₂O), 1,78 (dd, J = 7,7, 4,0 Hz, 1H, C9-H), 1,69 (t, J = 4,3 Hz, 1H, C9-H); IR (Film) μ_{max} 2937, 1646, 1626, 1595, 1533, 1518, 1467, 1446, 1394, 1302, 1270, 1232, 1108 cm⁻¹; FABHRMS (NBA) m/e 461,1732 (M⁺ + H, C₂₆H₂₄N₂O₆ erfordert 461,1713). Natürliches (+)-254: $[\mu]^3 + 204$ (c 0,05, Tetrahydrofuran) ent-(–)-254: $[\mu]^3 - 206$ (c 0,05, Tetrahydrofuran).

Herstellung von seco-MCBI-Indol₂ (256), wie in [Fig. 6](#) dargestellt:

Verbindung 256:

[0093] Eine Lösung von 236 (4,3 mg, 11,8 μmol) in 4 M HCl-Ethylacetat (350 μl) bei 0°C wurde 30 Minuten gerührt, bevor die flüchtigen Bestandteile durch einen Strom von N₂ entfernt wurden und der Rückstand unter Vakuum (0,02 mm) 15 Minuten getrocknet wurde. Das resultierende rohe 250 wurde in Dimethylformamid (250 μl) aufgelöst und nacheinander mit 58 (4,2 mg, 13,0 μmol , wie hierin hergestellt) und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDCI) (6,8 mg, 35 μmol , 3 Äquiv.) behandelt, und die Mischung wurde 10 Stunden bei 25°C gerührt. Wasser (0,5 ml) wurde der Reaktionsmischung hinzugefügt, und die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (4 \times 1 ml) extrahiert. Die organischen Schichten wurden zusammengeführt, getrocknet (Na₂SO₄) und im Vakuum getrocknet. Die präparative Dünnschichtchromatographie (20 cm \times 20 cm \times 0,25 mm, 15% Dimethylformamid-Toluol, R_F = 0,45) lieferte 256 (5,2 mg, 6,7 mg theoretisch, 78%) als gelbbrauen Feststoff: $^1\text{H-NMR}$ (Dimethylsulfoxid-d₆, 400 MHz) μ 11,72 (s, 2H, NH), 10,32 (s, 1H, OH), 10,16 (s, 1H, NH), 8,22 (s, 1H, C4'-H), 8,02 (d, J = 9,2 Hz, 1H, C6-H), 7,82 (br s, 1H, C4-H), 7,67 (d, J = 8,2 Hz, 1H, C4"-H), 7,58 (dd, J = 8,9, 1,8 Hz, 1H, C6"-H), 7,49 (d, J = 8,4 Hz, 1H, C7"-H), 7,47 (d, J = 7,8 Hz, 1H, C7-H), 7,42 (s, 1H, C3'-oder C3"-H), 7,23 (s, 1H, C3'-oder C3"-H), 7,21 (t, J = 8,1 Hz, 1H, C6"-H), 7,12 (d, J = 2,2 Hz, 1H, C9-H), 7,06 (t, J = 7,2 Hz, 1H, C5"-H), 6,98 (dd, J = 9,2, 2,4 Hz, 1H, C7-H), 4,79 (t, J = 10,4 Hz, 1H, C2-H), 4,57 (d, J = 10,1 Hz, 1H, C2-H), 4,25–4,21 (m, 1H, C1-H), 4,04 (dd, J = 11,0, 3,0 Hz, 1H, CHHCl), 3,86 (dd, J = 11,0, 6,3 Hz, 1H, CHHCl), 3,91 (s, 3H, OCH₃); IR (Film) μ_{max} 3280, 2920, 1693, 1647, 1630, 1589, 1518, 1455, 1417, 1308, 1220 cm⁻¹; FABHRMS (NBA-CsI) m/e 565,1655 (M⁺ + H, C₃₂H₂₅CIN₄O₄ erfordert 565,1643). Natürliches (1S)-256: $[\mu]^3 + 54$ (c 0,08, Dimethylformamid). ent-(1R)-256: $[\mu]^3 - 55$ (c 0,07, Dimethylformamid).

Herstellung von MCBI-Indol₂ (258), wie in [Fig. 6](#) dargestellt:

Verbindung 258:

[0094] Eine Lösung von 256 (2,8 mg, 4,95 μmol) in Tetrahydrofuran-Dimethylformamid (3:1, 250 μl) bei 0°C wurde mit NaH (0,59 mg, 60%ig in Öl, 15 μmol , 3 Äquiv.) behandelt, und die Mischung wurde 30 Minuten bei 0°C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde durch den Zusatz von pH 7-Phosphatpuffer (0,2 M, 250 μl) und 3 ml Tetrahydrofuran abgeschreckt. Die organische Lösung wurde getrocknet (Na₂SO₄), im Vakuum konzentriert und durch präparative Dünnschichtchromatographie (20 cm \times 20 cm \times 0,25 mm, 15% Dimethylformamid-Toluol, R_F = 0,40) gereinigt, was 258 (2,25 mg, 2,62 mg theoretisch, 86%) als gelbbrauen Feststoff lieferte: $^1\text{H-NMR}$ (Dimethylsulfoxid-d₆, 400 MHz) μ 11,82 (s, 1H, NH), 11,70 (s, 1H, NH), 10,17 (s, 1H, NH), 8,21 (s, 1H, C4'-H), 7,94 (d, J = 8,7 Hz, 1H, C5-H), 7,66 (d, J = 8,0 Hz, 1H, C4"-H), 7,59 (dd, J = 8,8, 1,7 Hz, 1H, C6-H), 7,47 (anscheinend d, J = 9,2 Hz, 2H, C7'-H und C7"-H), 7,41 (s, 1H, C3'-H oder C3"-H), 7,27 (d, J = 1,6 Hz, 1H, C3'-oder C3"-H), 7,21 (t, J = 7,2 Hz, 1H, C6"-H), 7,06 (t, J = 7,2 Hz, 1H, C5"-H), 6,98 (dd, J = 8,7, 2,3 Hz, 1H, C6-H), 6,89 (s, 1H, C3-H), 6,72 (d, J = 2,3 Hz, 1H, C8-H), 4,62 (dd, J = 10,3, 5,0 Hz, 1H, C1-H), 4,49 (d, J = 10,3 Hz, 1H, C1-H), 3,92–3,87 (m, 1H, C9a-H), 3,85 (s, 3H, OCH₃), 1,77 (dd, J = 7,7, 4,0 Hz, 1H, C9-H), 1,67 (d, J = 4,0 Hz, 1H, C9-H); IR (Film) μ_{max} 2944, 1647, 1586, 1550, 1517, 1391, 1234, 1137, 1067, 1025 cm⁻¹; FABHRMS (NBA) m/e 529,1889 (M⁺ + H, C₃₂H₂₄N₄O₄ erfordert 529,1876). Natürliches (+)-258: $[\mu]^3 + 122$ (c 0,04, Dimethylformamid) ent-(–)-258: $[\mu]^3 - 120$ (c 0,07, Dimethylformamid).

Herstellung von seco-MCBI-CDPI₁ (260), wie in [Fig. 6](#) dargestellt:

Verbindung 260:

[0095] Eine Lösung von 236 (3,9 mg, 10,7 μmol) in 4 M HCl-Ethylacetat (300 μl) bei 0°C wurde 30 Minuten gerührt, bevor die flüchtigen Bestandteile durch einen Strom von N₂ entfernt wurden und der Rückstand unter Vakuum (0,02 mm) 15 Minuten getrocknet wurde. Das resultierende rohe 250 wurde in Dimethylformamid (200

μl) aufgelöst und nacheinander mit 320 (2,9 mg, 11,8 μmol , wie bei Boger et al., J. Org. Chem. 1987, 52, 1521, beschrieben) und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDCI) (6,1 mg, 32 μmol , 3 Äquiv.) behandelt, und die Mischung wurde bei 25°C 12 Stunden gerührt. Wasser (0,5 ml) wurde der Reaktionsmischung hinzugefügt, und die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat ($4 \times 1 \text{ ml}$) extrahiert. Die organischen Schichten wurden zusammengeführt, getrocknet (Na_2SO_4) und im Vakuum konzentriert. Die präparative Dünnschichtchromatographie (24 cm \times 20 cm \times 0,25 cm; 30% Dimethylformamid-Toluol, $R_F = 0,65$) lieferte 260 (3,7 mg, 5,2 mg theoretisch, 71%) als leicht gelben Feststoff: $^1\text{H-NMR}$ (Dimethylsulfoxid-d₆, 400 MHz) μ 11,60 (d, $J = 2,0 \text{ Hz}$, 1H, NH), 10,31 (s, 1H, OH), 8,01 (d, $J = 9,2 \text{ Hz}$, 1H, C6-H), 7,99 (d, $J = 8,9 \text{ Hz}$, 1H, C4'-H), 7,80 (br s, 1H, C4-H), 7,23 (d, $J = 8,9 \text{ Hz}$, 1H, C5'-H), 7,10 (d, $J = 2,4 \text{ Hz}$, 1H, C9-H), 7,00 (d, $J = 1,5 \text{ Hz}$, 1H, C8'-H), 6,98 (dd, $J = 9,2, 2,4 \text{ Hz}$, 1H, C7-H), 6,10 (br s, 2H, NH₂), 4,77 (t, $J = 10,8 \text{ Hz}$, 1H, C2-H), 4,54 (dd, $J = 11,0, 1,4 \text{ Hz}$, 1H, C2-H), 4,22–4,17 (m, 1H, C1-H), 4,04 (dd, $J = 11,1, 3,1 \text{ Hz}$, 1H, CHHCl), 3,98 (t, $J = 8,8 \text{ Hz}$, 2H, C2'-H₂), 3,92 (s, 3H, OCH₃), 3,86 (dd, $J = 11,1, 7,2 \text{ Hz}$, 1H, CHHCl), 3,25 (t, $J = 8,8 \text{ Hz}$, 2H, C1'-H₂ teilweise durch H₂O verdeckt); IR (Film) μ_{max} 3292, 2923, 1659, 1630, 1595, 1504, 1446, 1415, 1384, 1224 cm⁻¹; FABHRMS (NBA) m/e 490,1411 (M^+ , $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{CIN}_4\text{O}_4$ erfordert 490,1408). Natürliches (1S)-260: $[\mu]^3 + 74$ (c 0,09, Dimethylformamid) ent-(1R)-260: $[\mu]^3 - 76$ (c 0,11 Dimethylformamid).

Herstellung von MCBI-CDPI₁ (262), wie in [Fig. 6](#) dargestellt:

Verbindung 262:

[0096] Eine Lösung von 260 (1,8 mg, 3,67 μmol) in Tetrahydrofuran-Dimethylformamid (3:1, 200 μl) bei 0°C wurde mit NaH (0,44 mg, 60%ig in Öl, 11 μmol , 3 Äquiv.) behandelt. Die Mischung wurde bei 0°C 30 Minuten gerührt, bevor die Reaktion durch Addition von pH 7-Phosphatpuffer (0,2 M, 200 μl) und 3 ml Tetrahydrofuran abgeschrackt wurde. Die organische Lösung wurde getrocknet (Na_2SO_4), im Vakuum konzentriert und durch präparative Dünnschichtchromatographie (20 cm \times 20 cm \times 0,25 mm, 30% Dimethylformamid-Toluol, $R_F = 0,65$) gereinigt, was 262 (1,50 mg, 1,67 mg theoretisch, 90 %) als leicht gelben Feststoff lieferte: $^1\text{H-NMR}$ (Dimethylsulfoxid-d₆, 400 MHz) μ 11,70 (s, 1H, NH), 8,01 (d, $J = 9,2 \text{ Hz}$, 1H, C4'-H), 7,93 (d, $J = 8,4 \text{ Hz}$, 1H, C5-H), 7,21 (d, $J = 8,8 \text{ Hz}$, 1H, C5'-H), 7,06 (s, 1H, C8'-H), 6,98 (dd, $J = 8,6, 2,2 \text{ Hz}$, 1H, C6-H), 6,86 (s, 1H, C3-H), 6,71 (d, $J = 2,2 \text{ Hz}$, 1H, C8-H), 6,11 (br s, 2H, NH₂), 4,58 (dd, $J = 10,3, 4,9 \text{ Hz}$, 1H, C1-H), 4,46 (d, $J = 10,3 \text{ Hz}$, 1H, C1-H), 3,97 (t, $J = 8,5 \text{ Hz}$, 2H, C2'-H₂), 3,85 (s, 3H, OCH₃), 3,38–3,30 (m, 3H, C9a, C1'-H₂ teilweise verdeckt durch H₂O), 1,77 (dd, $J = 7,8, 4,1 \text{ Hz}$, 1H, C9-H), 1,66 (t, $J = 4,1 \text{ Hz}$, 1H, C9-H); IR (Film) μ_{max} 3375, 2937, 1652, 1597, 1572, 1501, 1455, 1426, 1388, 1359, 1334, 1300, 1267, 1229 cm⁻¹; FABHRMS (NBA) m/e 455,1730 ($M^+ + H$, $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4$ erfordert 455,1719). Natürliches (+)-262: $[\mu]^3 + 183$ (c 0,07, Dimethylformamid). ent(-)-262: $[\mu]^3 - 187$ (c 0,08, Dimethylformamid).

Herstellung von seco-MCBI-CDPI₂ (264), wie in [Fig. 6](#) dargestellt:

Verbindung 264:

[0097] Eine Lösung von 236 (3,6 mg, 9,8 μmol) in 4 M HCl-Ethylacetat (300 μl) bei 0°C wurde 30 Minuten gerührt, bevor die flüchtigen Bestandteile durch einen Strom von N₂ entfernt wurden, und der Rückstand unter Vakuum (0,02 mm) 15 Minuten getrocknet wurde. Das resultierende rohe 250 wurde in Dimethylformamid (200 μl) aufgelöst und nacheinander mit 340 (4,6 mg, 10,7 μmol , wie in Boger et al., J. Org. Chem., 1984, 49, 2240, beschrieben) und 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDCI) (5,6 mg, 29 μmol , 3 Äquiv.) behandelt, und die Mischung wurde 6 Stunden bei 25°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt, Wasser (0,5 ml) wurde der Mischung zugesetzt, und das unlösliche Rohprodukt wurde durch Zentrifugation gewonnen. Die präparative Dünnschichtchromatographie (20 cm \times 20 cm \times 0,25 mm, 33% Dimethylformamid-Toluol, $R_F = 0,50$) lieferte 264 (4,5 mg, 6,6 mg theoretisch, 68%) als leicht gelben Feststoff: $^1\text{H-NMR}$ (Dimethylsulfoxid-d₆, 400 MHz) μ 11,80 (d, $J = 1,6 \text{ Hz}$, 1H, NH), 11,55 (d, $J = 1,2 \text{ Hz}$, 1H, NH), 10,31 (s, 1H, OH), 8,28 (d, $J = 7,0 \text{ Hz}$, 1H, C4'-H), 8,01 (d, $J = 9,2 \text{ Hz}$, 1H, C6-H), 7,97 (d, $J = 8,9 \text{ Hz}$, 1H, C4''-H), 7,82 (br s, 1H, C4-H), 7,38 (d, $J = 9,0 \text{ Hz}$, 1H, C5''-H), 7,22 (d, $J = 8,8 \text{ Hz}$, 1H, C5'-H), 7,16 (d, $J = 1,3 \text{ Hz}$, 1H, C8''-H), 7,12 (d, $J = 2,3 \text{ Hz}$, 1H, C9-H), 6,98 (dd, $J = 9,2, 2,4 \text{ Hz}$, 1H, C7-H), 6,97 (s, 1H, C8'-H), 6,10 (br s, 2H, NH₂), 4,80 (t, $J = 10,8 \text{ Hz}$, 1H, C2-H), 4,66 (t, $J = 8,3 \text{ Hz}$, 2H, C2'-H₂), 4,57 (d, $J = 11,0 \text{ Hz}$, 1H, C2-H), 4,23–4,21 (m, 1H, C1-H), 4,05 (dd, $J = 11,0, 3,0 \text{ Hz}$, 1H, CHHCl), 3,96 (t, $J = 8,8 \text{ Hz}$, 2H, C2''-H₂), 3,91 (s, 3H, OCH₃), 3,87 (dd, $J = 11,0, 4,2 \text{ Hz}$, 1H, CHHCl), 3,52–3,35 (m, 4H, C1'-H₂, C1''-H₂ teilweise durch H₂O verdeckt); IR (Film) μ_{max} 3374, 2913, 2851, 2851, 1662, 1651, 1605, 1446, 1425, 1359, 1282, 1241, 1164 cm⁻¹; FABHRMS (NBA) m/e 675,2143 ($M^+ + H$, $\text{C}_{37}\text{H}_{31}\text{CIN}_6\text{O}_5$ erfordert 675,2123). Natürliches (1S)-264: $[\mu]^3 + 50$ (c 0,05, Dimethylformamid). ent-(1R)-264: $[\mu]^3 - 52$ (c 0,04, Dimethylformamid).

Herstellung von MCBI-CDPI₂ (266), wie in [Fig. 6](#) dargestellt:

Verbindung 266:

[0098] Eine Lösung von 264 (0,57 mg, 0,84 µmol) in Tetrahydrofuran-Dimethylformamid (3:1,50 µl) bei 0°C wurde mit NaH (0,10 mg, 2,5 µmol, 3 Äquiv.) behandelt, und die Mischung wurde bei 0°C 30 Minuten gerührt. Die Reaktionsmischung wurde durch Addition von pH 7-Phosphatpuffer (0,2 M, 50 µl) und 2 ml Tetrahydrofuran abgeschreckt. Die organische Lösung wurde getrocknet (Na₂SO₄), im Vakuum konzentriert und durch präparative Dünnschichtchromatographie (5 cm × 20 cm × 0,25 mm, 33% Dimethylformamid-Toluol, R_F = 0,45) gereinigt, was 266 (0,51 mg, 0,54 mg theoretisch, 94 %) als leicht gelben Feststoff lieferte: ¹H-NMR (Dimethylsulfoxid-d₆, 400 MHz) δ 11,90 (d, J = 2,0 Hz, 1H, NH), 11,55 (d, J = 2,0 Hz, 1H, NH), 8,29 (d, J = 8,1 Hz, 1H, C4'-H), 7,97 (d, J = 8,9 Hz, 1H, C4"-H), 7,93 (d, J = 8,8 Hz, 1H, C5-H), 7,36 (d, 3 = 8,9 Hz, 1H, C5"-H), 7,22 (d, J = 1,7 Hz, 1H, C8"-H), 7,21 (d, J = 8,7 Hz, 1H, C5'-H), 6,98 (dd, 7 = 8,8, 2,4 Hz, 1H, C7-H), 6,96 (d, J = 1,3 Hz, 1H, C8'-H), 6,88 (s, 1H, C3-H), 6,73 (d, J = 2,4 Hz, 1H, C8-H), 6,10 (br s, 2H, NH₂), 4,65 (t, J = 8,2 Hz, 2H, C2'-H2), 4,61 (dd, J = 10,5, 4,8 Hz, 1H, C1-H), 4,50 (d, J = 10,5 Hz, 1H, C1-H), 3,98 (t, J = 8,7 Hz, 2H, C2"-H₂), 3,86 (s, 3H, OCH₃), 3,50–3,35 (m, 5H, C1'-H₂, C1"-H₂, C9a-H teilweise durch H₂O verdeckt), 1,78 (dd, J = 7,8, 4,0 Hz, 1H, C9-H), 1,68 (t, J = 4,3 Hz, 1H, C9-H); IR (Film) μ_{max} 3372, 2920, 1656, 1602, 1581, 1501, 1430, 1392, 1363, 1338, 1267, 1229, 1141, 1019 cm⁻¹; FABHRMS (NBA-Csl) m/e 771,1244 (M⁺ + Cs, C₃₇H₃₀N₆O₅ erfordert 771,1332. Natürliches (+)-266: [μ]³ + 145 (c 0,01, Dimethylformamid). ent-(–)-266: [μ]³ – 149 (c 0,01, Dimethylformamid).

Solvolysereakтивität:

[0099] N-BOC-MCBI (238, 0,1 mg) wurde in CH₃OH (1,5 ml) aufgelöst und mit wässrigem pH 3-Puffer (1,5 ml) gemischt. Der Puffer enthielt im Verhältnis 4:1:20 (v:v:v) 0,1 M Zitronensäure, 0,2 M Na₂HPO₄ bzw. H₂O. Die Solvolyselösung wurde dicht verschlossen und bei 25°C lichtgeschützt aufbewahrt. Das UV-Spektrum wurde in regelmäßigen Abständen alle 2 Stunden am ersten Tag, alle 12 Stunden für eine Woche und alle 24 Stunden für eine weitere Woche gemessen. Die Abnahme der langwelligen Absorption bei 324 nm und die Zunahme der kurzweligen Absorption bei 266 nm wurde überwacht, [Fig. 1](#). Die Solvolyseratenkonstante ($k = 2,41 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$) und die Halbwertszeit ($t_{1/2} = 80$ Stunden) wurden aus den Daten berechnet, die bei der kurzen Wellenlänge aus der Fehlerquadratbehandlung ($r = 0,995$) des Anstiegs der Kurve über der Zeit aufgezeichnet wurden $1 - [(A - A_0)/(A_t - A_0)]$.

[0100] In ähnlicher Weise wurde MCBI (240, 0,1 mg) in CH₃OH (1,5 ml) aufgelöst und mit wässrigem pH Puffer (1,5 ml) gemischt. Die Solvolyselösung wurde dicht verschlossen und bei 25°C im Dunkeln gerührt. Das UV-Spektrum wurde 2 Monate lang alle 24 Stunden aufgezeichnet. Die Abnahme der langwelligen Absorption bei 324 nm und die Zunahme der kurzweligen Absorption bei 266 nm wurde überwacht, [Fig. 1](#). Die Solvolyseratenkonstante ($k = 5,76 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$) und die Halbwertszeit ($t_{1/2} = 334$ Stunden) wurden bestimmt, wie oben beschrieben ($r = 0,98$).

Solvolyse-Regioselektivität:

3-(tert-Butyloxycarbonyl)-5-hydroxy-8-methoxy-1-methoxymethyl-1,2-dihydro-3H-benz[e]indol (268), wie in [Fig. 7](#) dargestellt:

Verbindung 268:

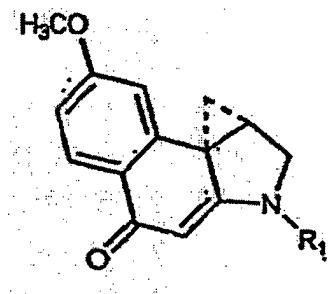
[0101] Eine Lösung von 238 (10,1, mg, 30,8 µmol) in 2,5 ml CH₃OH wurde auf 0°C abgekühlt, und CF₃SO₃H-CH₃OH (185 µl, 0,02 M, 0,12 Äquiv.) wurde hinzugefügt. Nach 3 Stunden wurde die Reaktionsmischung durch Addition von NaHCO₃ (10 mg) abgeschreckt, und die Mischung wurde auf 25°C erwärmt, filtriert, und die Lösung wurde konzentriert. Die zentrifugale Dünnschichtchromatographie (SiO₂, 0,3 mm Chromatotron-Platte, 30% Ethylacetat-Hexan) lieferte 268 (10,5 mg, 11,1 mg theoretisch, 95%) als weißen Feststoff: Schmelzpunkt 157–159°C (Hexan, weiße Prismen); ¹H-NMR (C₆D₆, 400 MHz) δ 8,46 (d, J = 8,3 Hz, 1H, C6-H), 8,15 (br s, 1H, C4-H), 7,06 (dd, J = 9,2, 2,4 Hz, 1H, C7-H), 6,99 (d, J = 2,4 Hz, 1H, C9-H), 6,95 (br s, 1H, OH), 4,22 (d, J = 10,6 Hz, 1H, C2-H), 3,85–3,80 (m, 1H, C2-H), 3,66–3,63 (m, 1H, CHHOCH₃), 3,55 (dd, 3 = 9,2, 3,7 Hz, 1H, CHHOCH₃), 3,41 (s, 3H, OCH₃) 3,01–2,95 (m, 1H, C1-H), 2,97 (s, 3H, OCH₃), 1,44 (s, 9H, C(CH₃)₃); ¹³C-NMR (C₆D₆, 100 MHz) δ 159,4, 154,5, 153,4, 142,4, 132,9, 125,9, 117,5, 115,1, 114,4, 102,0, 98,0, 80,8, 74,7, 58,5, 54,7, 53,3, 37,8, 28,4; IR (Film) μ_{max} 3329, 2974, 2932, 1697, 1674, 1629, 1590, 1476, 1418, 1368, 1331, 1224, 1141, 1028 cm⁻¹; FABHRMS (NBA-Nal) m/e 359,1720 (M⁺, C₂₀H₂₅NO₅ erfordert 359,1733).

Anomale Relative Raten der DNA-Alkylierung:

[0102] Es wurde beobachtet, dass die relativen Raten der DNA-Alkylierung nicht den relativen Raten der säurekatalysierten Solvolyse entsprechen ([Fig. 18](#)). Obwohl dies zuerst bei einer Reihe von Agenzien (16–18) offenbart wurde, die ausreichend unterschiedliche Strukturen besitzen, so dass der Ursprung der Effekte ungewiss war, sind die letzteren Serien (20 und 254) so eng verbunden, dass die geringen strukturellen Unterschiede wahrscheinlich nicht zu einer Änderung der erwarteten Größenordnung der Reaktivität beitragen. Vielmehr kann die unerwartete Größenordnung der DNA-Alkylierungsraten, die bei den letzteren Agenzien beobachtet wurde, durch einen vorher unerkannten Effekt beeinflusst werden, der eng mit der Katalyse verbunden ist. In dieser letzten Reihe steht die Auswirkung des C7-Substituenten (20 und 254, R=OCH₃ > H) mit seiner einfachen Anwesenheit und nicht mit seiner elektronischen Natur (R=OCH₃ > H) in Verbindung. Es wird vorgeschlagen, dass diese Auswirkung auf die erweiterte Länge der Alkylierungsuntereinheit und den entsprechenden Anstieg der inhärenten Verdrehung des verbindenden N2-Amids zurückzuführen ist, die mit der Bindung der DNA an die kleine Furche verbunden sein würde, was somit für eine nicht offensichtliche Rolle für die Methoxy-Gruppe sorgt.

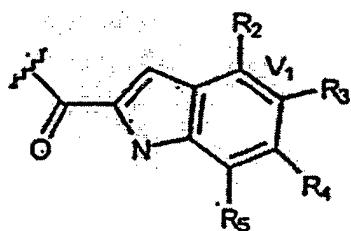
Patentansprüche

1. Verbindung, die durch die folgende Strukturformel repräsentiert ist:

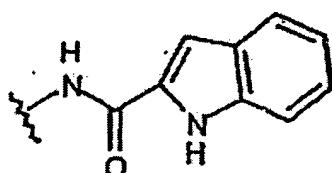


in welcher:

R₁ ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, tert-Butoxycarbonyl und einem Radikal, das durch die folgende Strukturformel repräsentiert ist:



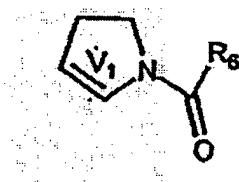
R₂ ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Hydroxyl und O-Alkyl(C1-C6); R₃ ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Hydroxyl und O-Alkyl(C1-C6) und einem Radikal, das durch die folgende Strukturformel repräsentiert ist:



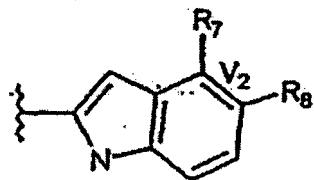
R₄ ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff Hydroxyl und O-Alkyl(C1-C6); und R₅ ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Hydroxyl und O-Alkyl(C1-C6); und

V₁, repräsentiert eine Vinylengruppe zwischen R₂ und R₃; oder

R₂ und R₃ und die dazwischen liegende Vinylengruppe V₁ bilden zusammen einen N-substituierten Pyrrolidinring, der durch die folgende Strukturformel repräsentiert ist:



worin V_1 die Vinylengruppe zwischen R_2 und R_3 repräsentiert; und
 R_6 ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus $-NH_2$ und einem Radikal, das durch die folgende Strukturformel repräsentiert ist:



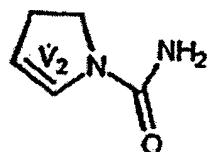
worin:

R_7 ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Hydroxyl und O-Alkyl(C1-C6);

R_8 ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Hydroxyl und O-Alkyl(C1-C6); und

V_2 repräsentiert eine Vinylengruppe zwischen R_7 und R_8 ; oder

R_7 und R_8 und die dazwischen liegende Vinylengruppe V_2 bilden zusammen einen N-substituierten Pyrrolidinring, der durch die folgende Strukturformel repräsentiert ist:

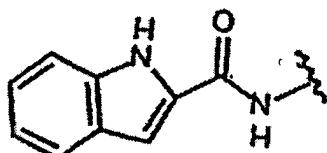


worin:

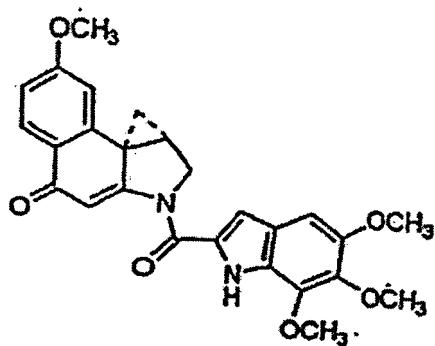
V_2 repräsentiert die Vinylengruppe zwischen R_7 und R_8 mit den folgenden Bedingungen:

wenn R_2 und R_3 im ersten N-substituierten Pyrrolidinring beteiligt sind, dann sind R_4 und R_5 Wasserstoff,

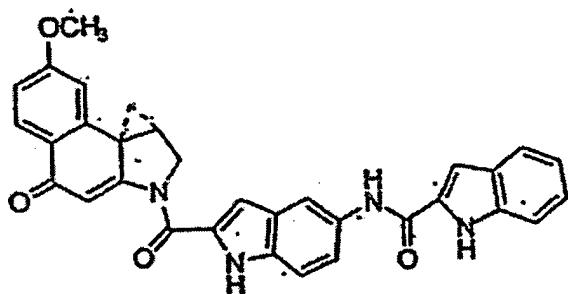
wenn R_2 Wasserstoff ist, dann sind R_4 und R_5 Wasserstoff und R_3 ist ein Radikal, das durch die folgende Strukturformel repräsentiert ist:



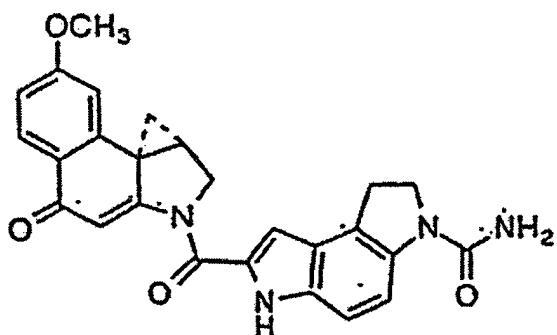
2. Verbindung nach Anspruch 1, die durch die folgende Strukturformel repräsentiert ist:



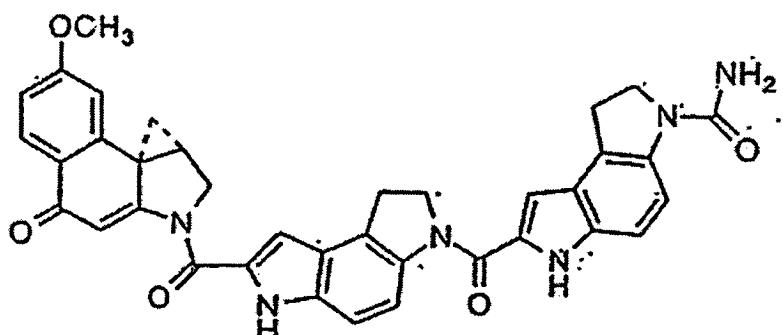
3. Verbindung nach Anspruch 1, die durch die folgende Strukturformel repräsentiert ist:



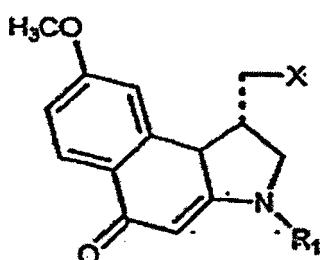
4. Verbindung nach Anspruch 1, die durch die folgende Strukturformel repräsentiert ist



5. Verbindung nach Anspruch 1, die durch die folgende Strukturformel repräsentiert ist:



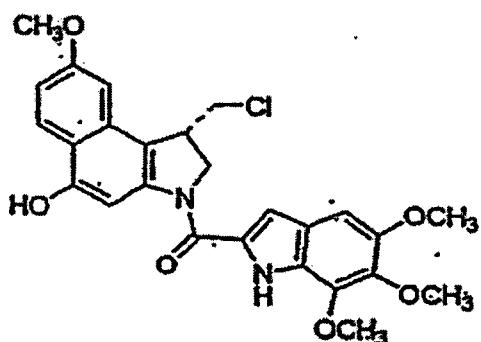
6. Verbindung die durch die folgende Strukturformel repräsentiert ist:



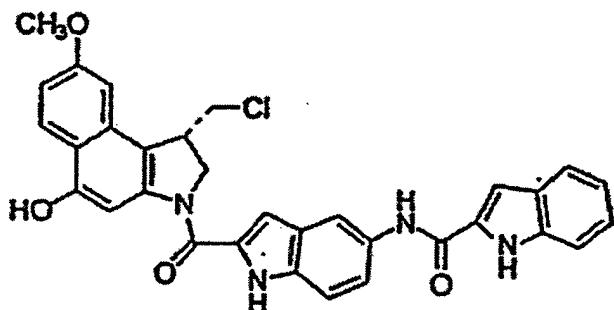
worin:

X ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Chlor, Brom, Jod und OTOS; und R₁ ist wie in Anspruch 1 definiert.

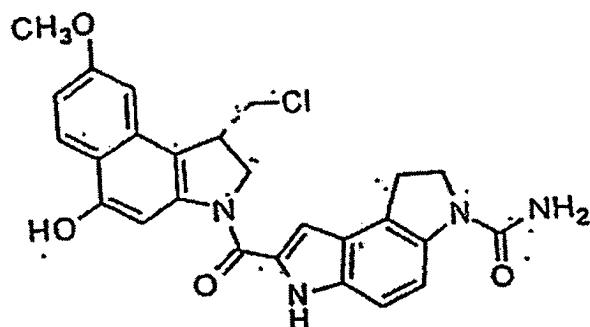
7. Verbindung nach Anspruch 6, die durch die folgende Strukturformel repräsentiert ist:



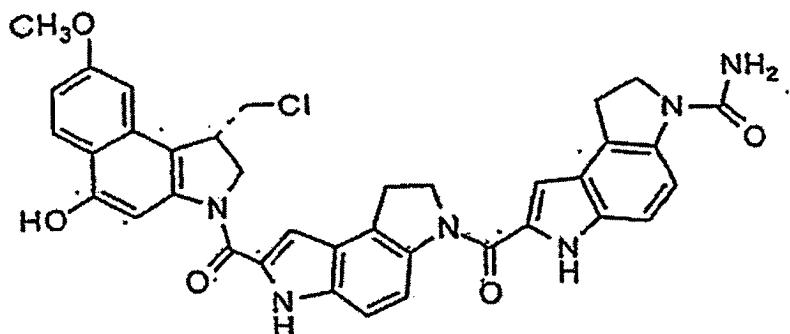
8. Verbindung nach Anspruch 6, die durch die folgende Strukturformel repräsentiert ist:



9. Verbindung nach Anspruch 6, die durch die folgende Strukturformel repräsentiert ist:



10. Verbindung nach Anspruch 6, die durch die folgende Strukturformel repräsentiert ist:



11. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 in Mischung mit seinem Enantiomer.

12. Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 11 zur Verwendung in der Therapie.

13. Verwendung der Verbindungen nach einem der Ansprüche 1 bis 11 bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Tumoren.

Es folgen 20 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

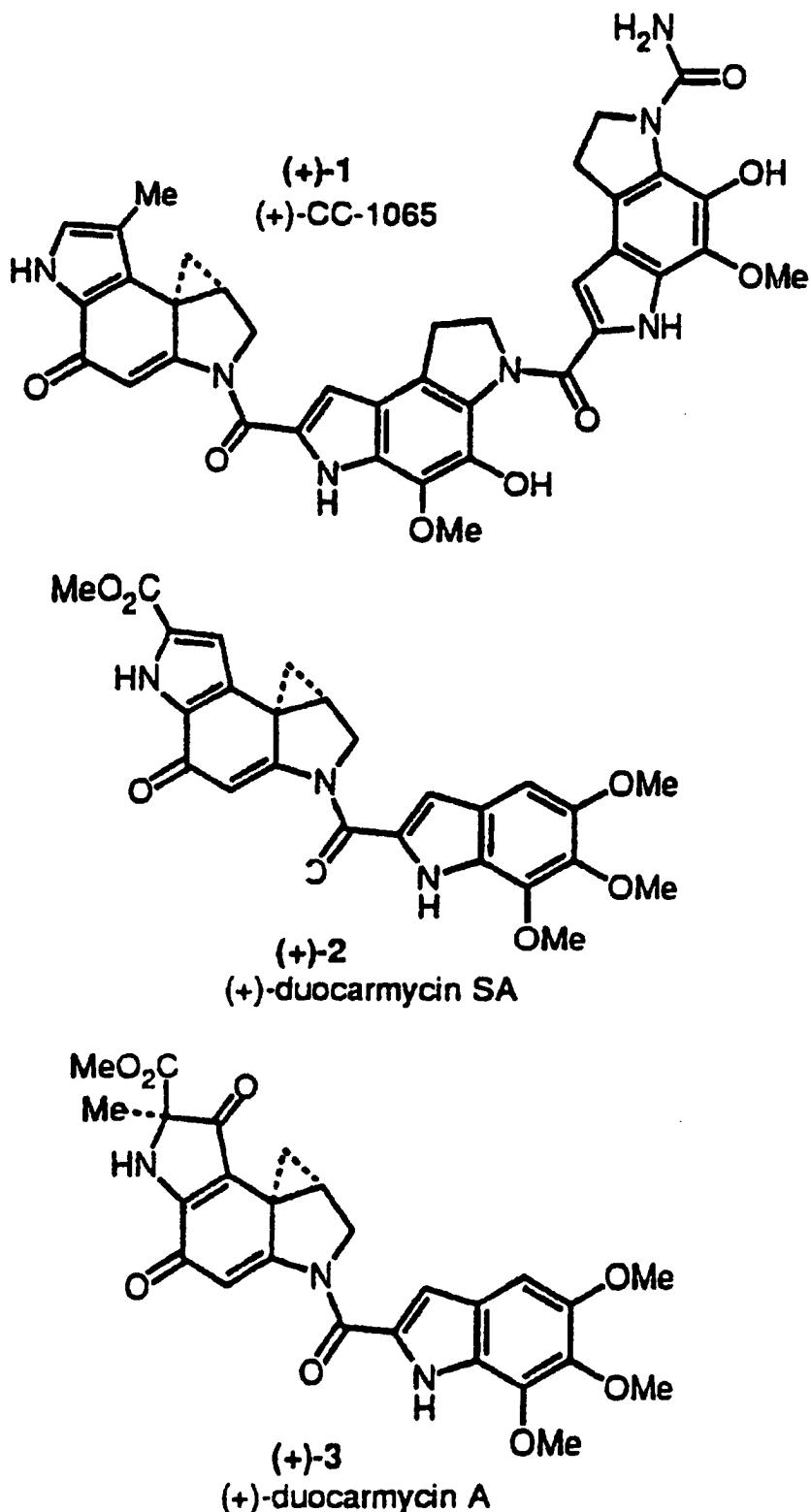
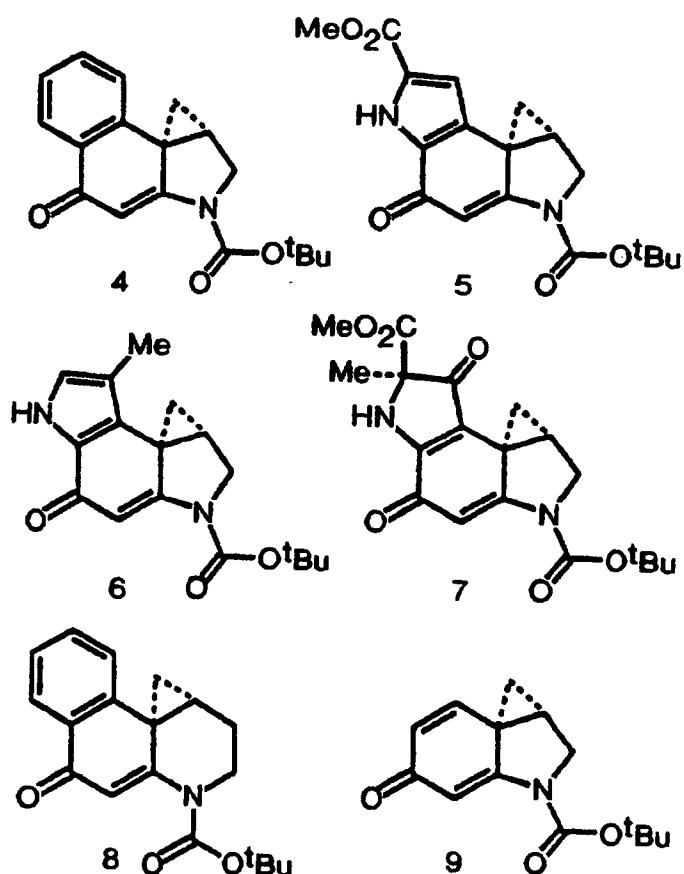


FIG. 1



| | k ($s^{-1}, \text{pH } 3$) | $t_{1/2}$ | $\text{IC}_{50}(\text{L1210})$ |
|---|--------------------------------|-----------|--------------------------------|
| 5 | 1.1×10^{-6} | 177 h | 6 nM |
| 4 | 1.5×10^{-6} | 133 h | 80 nM |
| 6 | 5.3×10^{-6} | 37 h | 330 nM |
| 7 | 1.7×10^{-5} | 11 h | 1000 nM |
| 8 | 9.1×10^{-5} | 2 h | 4000 nM |
| 9 | 2.0×10^{-2} | 0.01 h | 18000 nM |

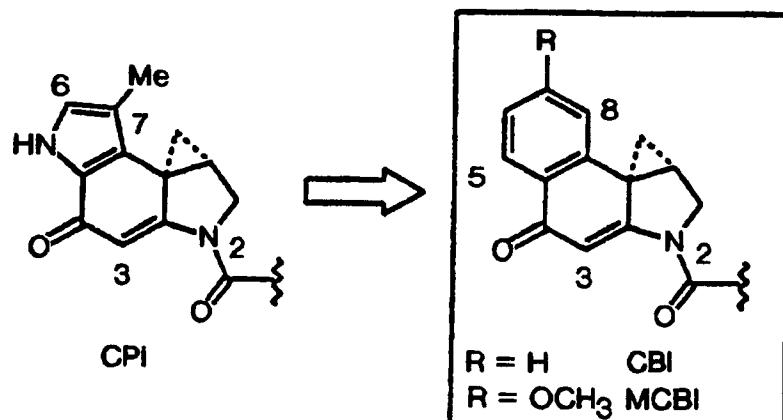


FIG. 2

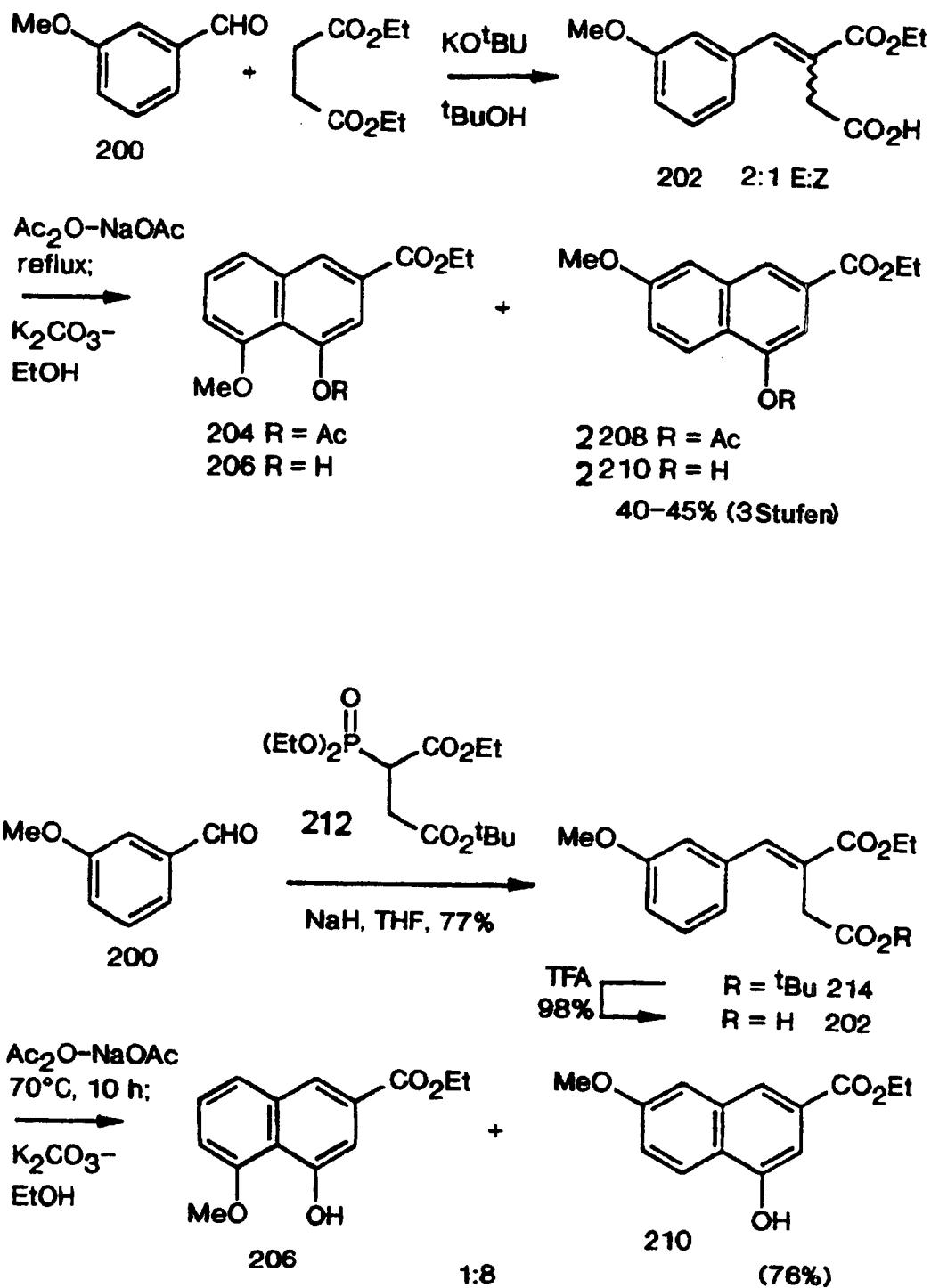


FIG. 3

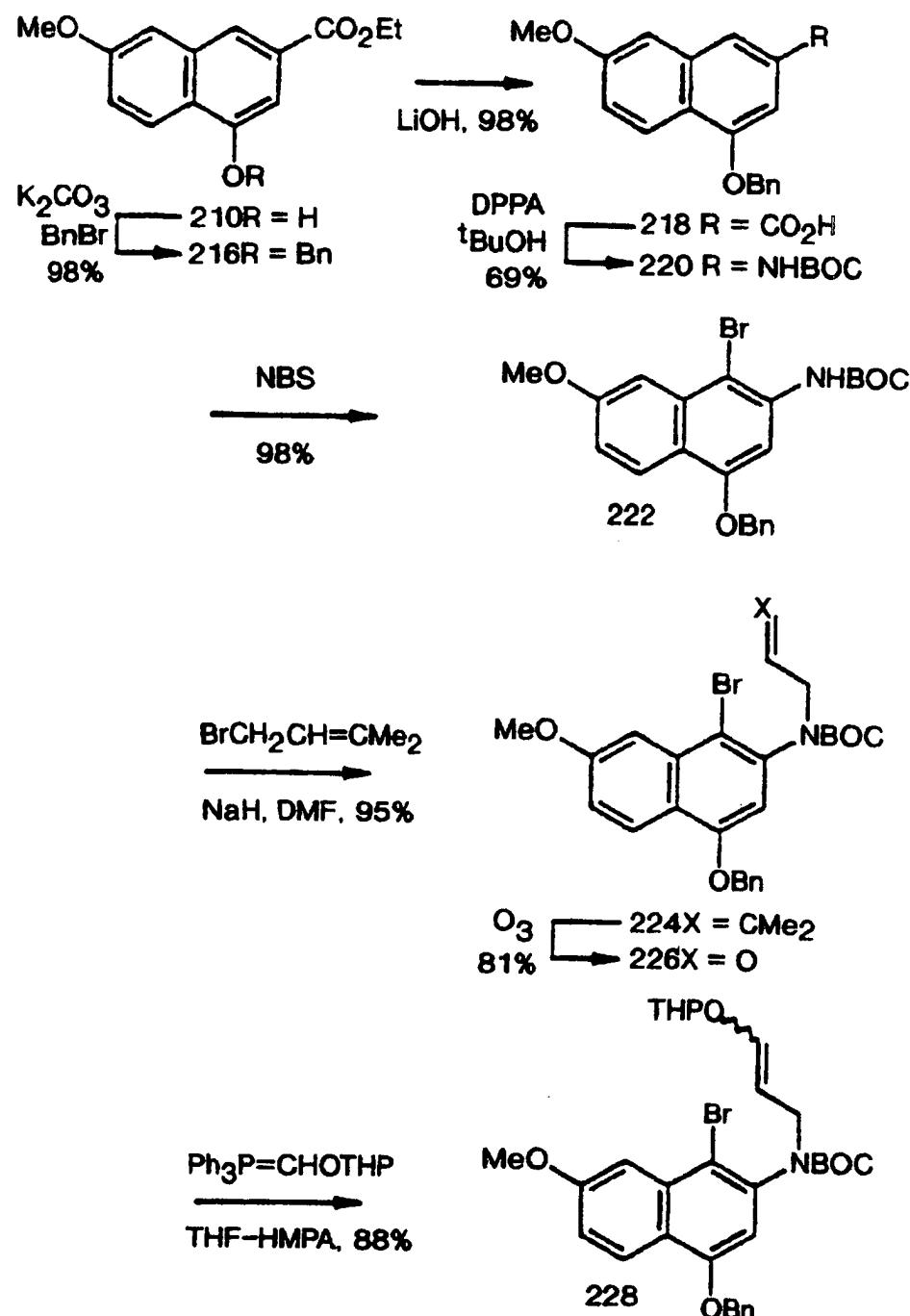


FIG. 4A

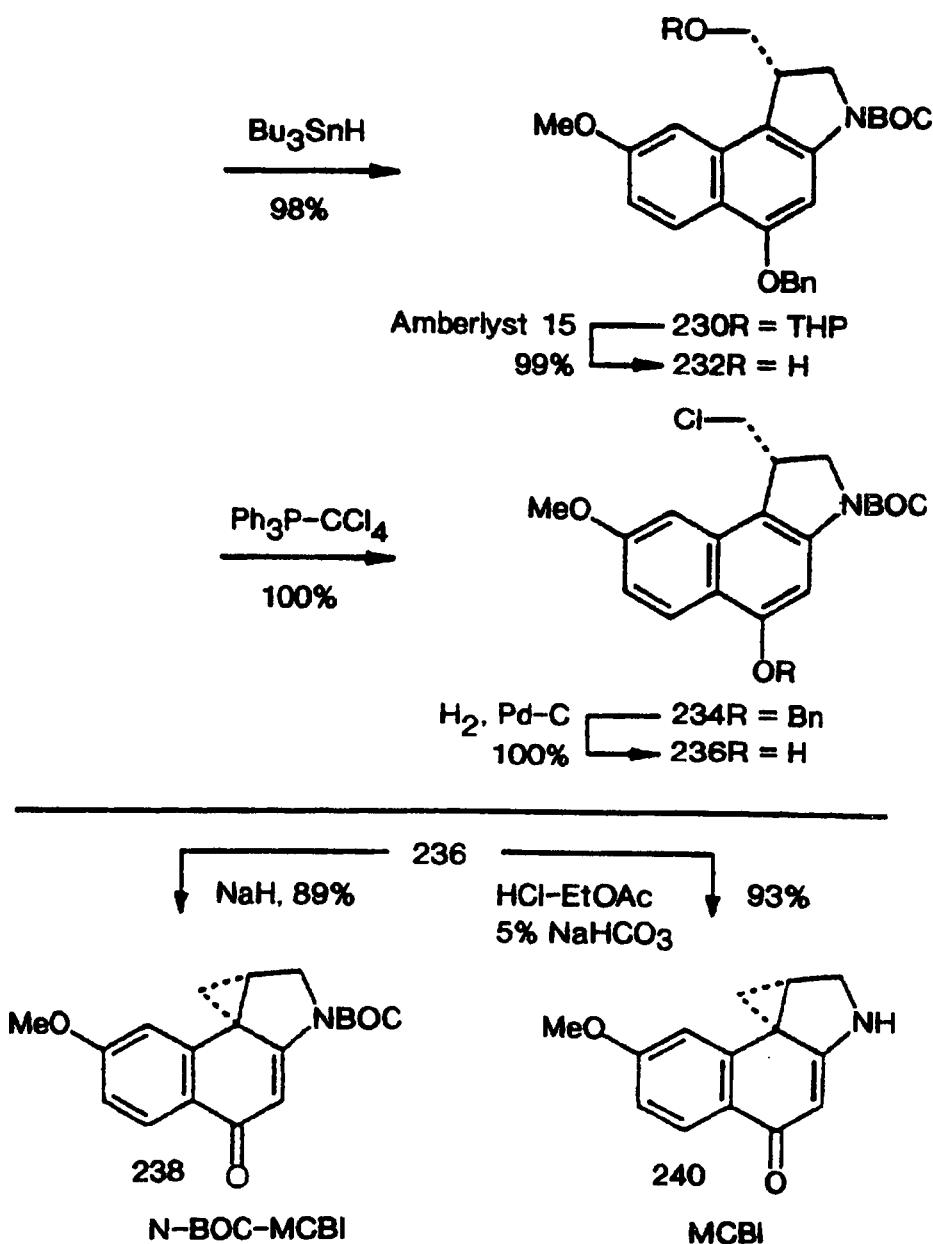


FIG. 4B

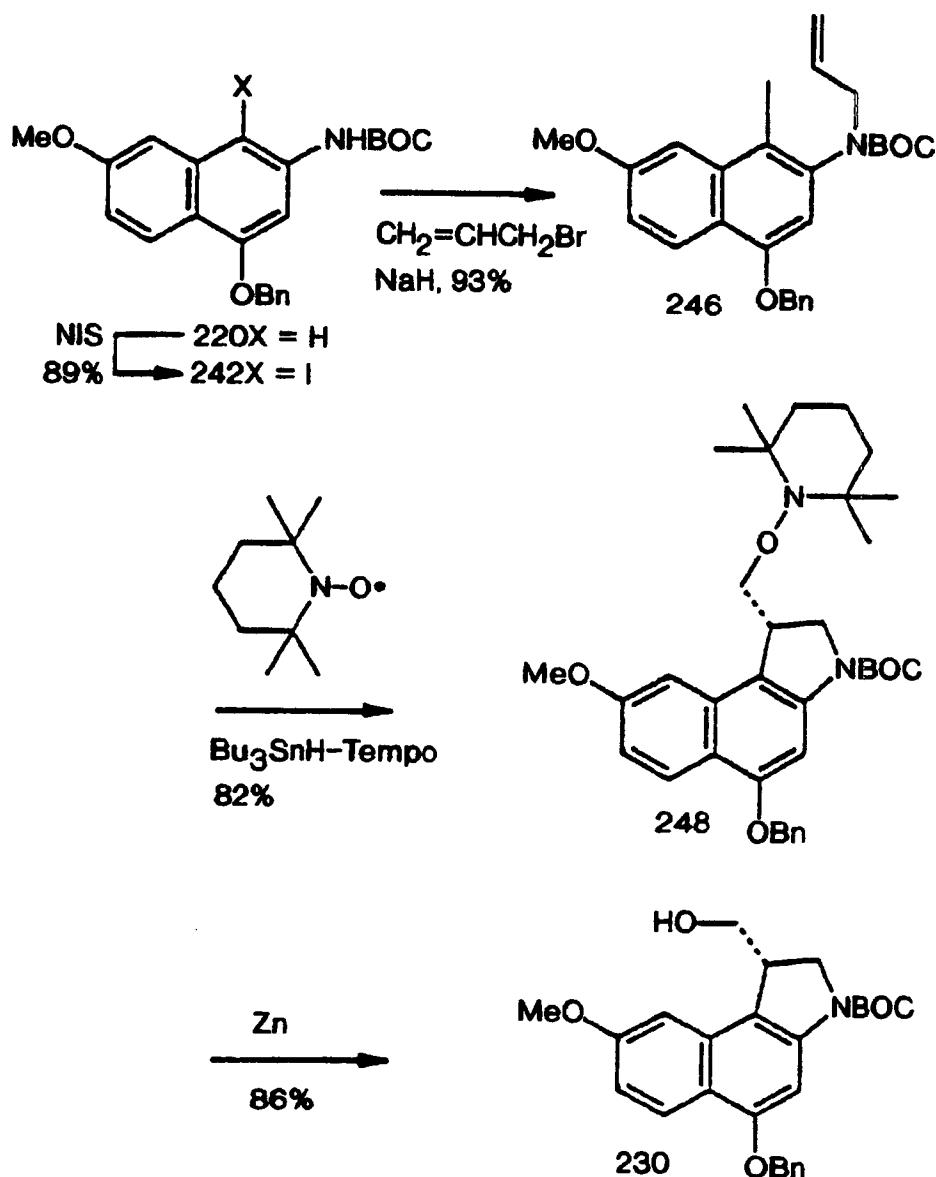


FIG. 5

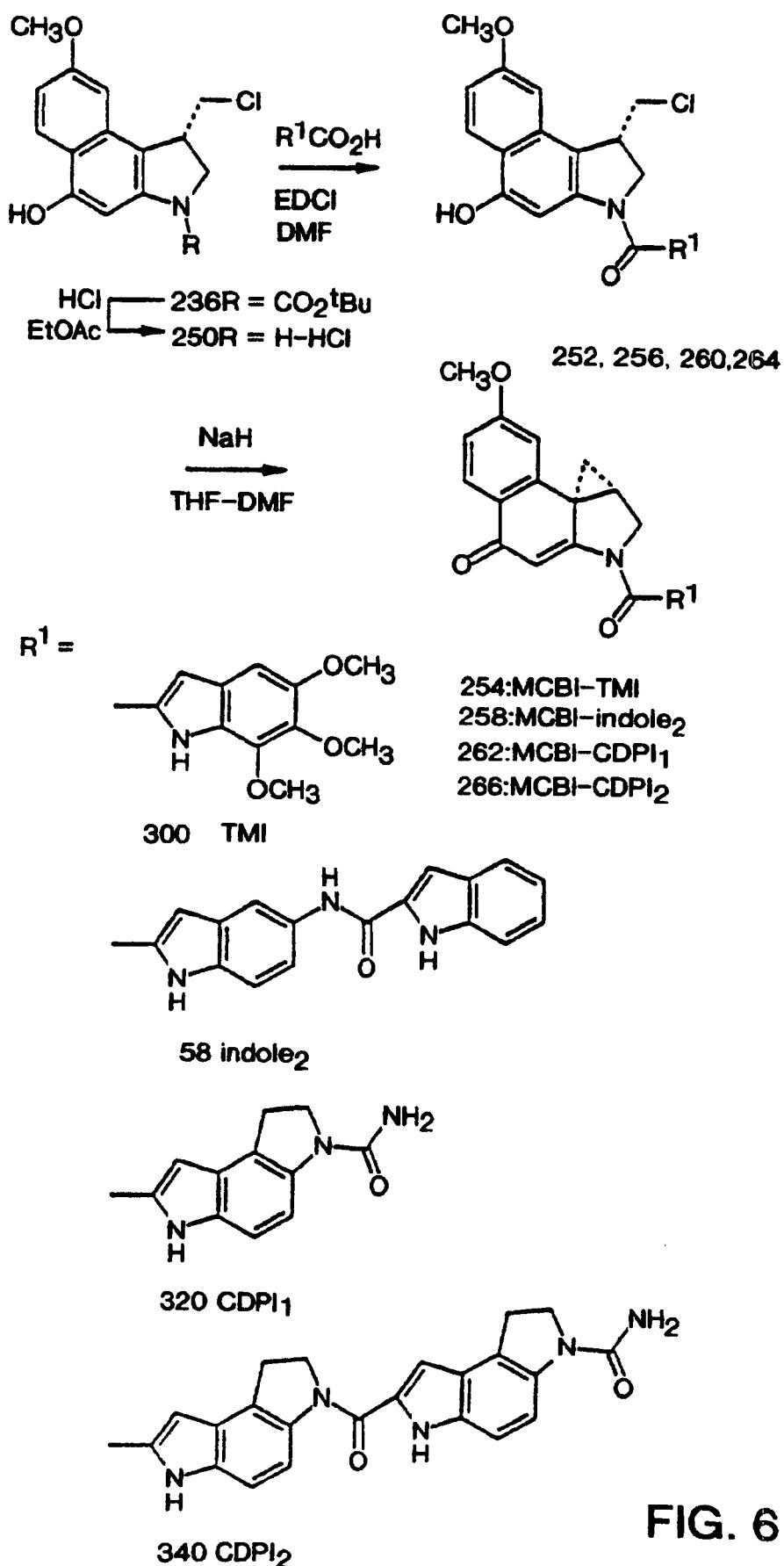


FIG. 6

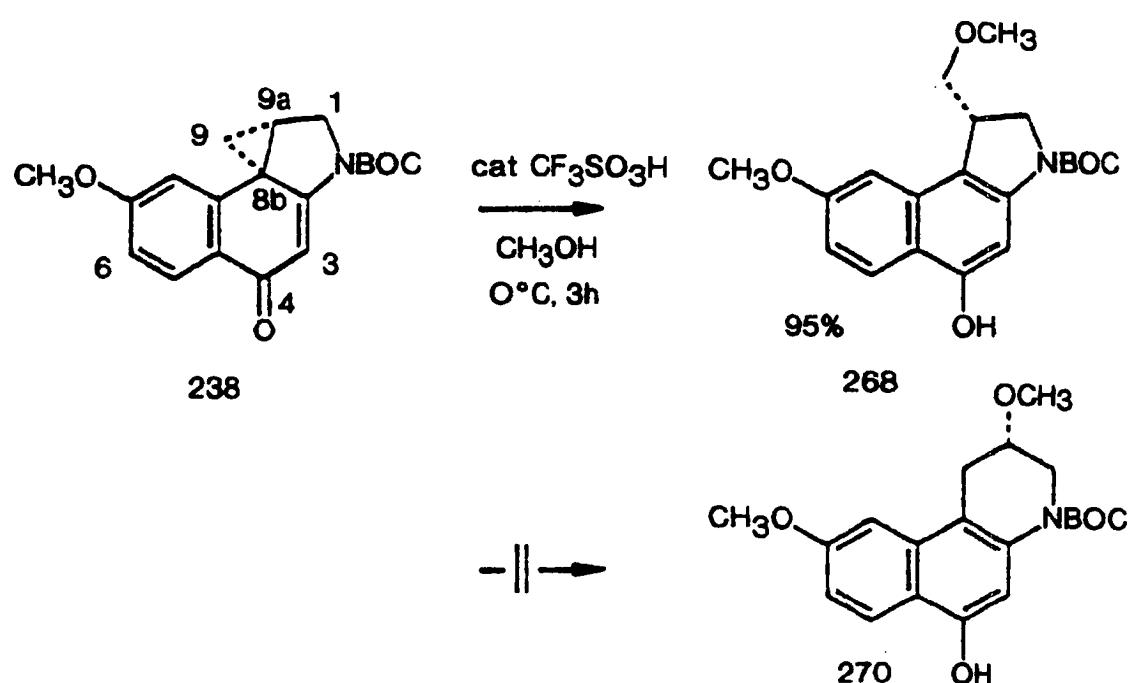
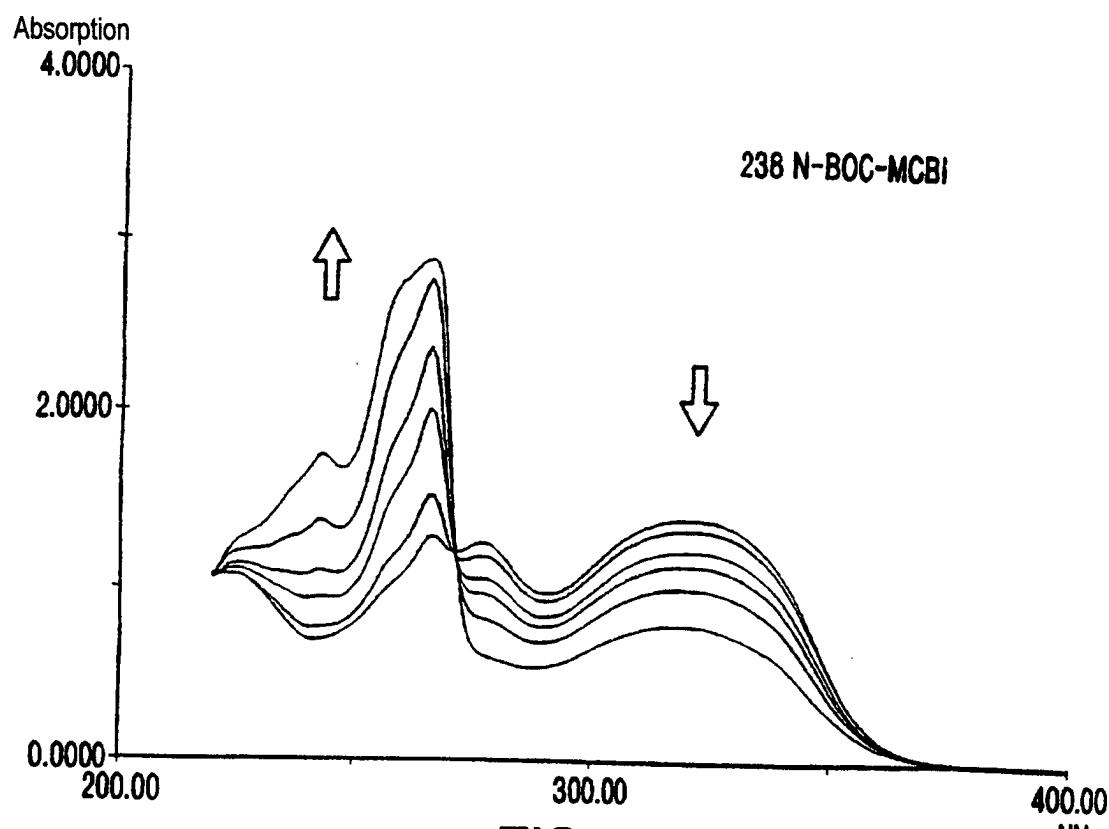


FIG. 7

| Agents | k (s^{-1} , pH 3) ^a | $t_{1/2}(h, \text{pH } 3)^b$ | IC ₅₀ (μM , L1210) | UV, λ_{max} nm (ϵ) | IR (C=O, cm ⁻¹) |
|--------------|-------------------------------------|------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| 5 | 1.08×10^{-6} | 177 | 0.006 | 339 (18000) ^b 301 (14000) 255 (10000) | 1719, 1610 ^c |
| 4 | 1.45×10^{-6} | 133 ^g | 0.08 | 300 (19000) ^d 264 (5700) 1718, 1628 1602 ^e | |
| 2 3 8 | 1.75×10^{-6} | 110 ^h | 0.09 | 301 (25000) ^d 270 (20000) 312 (18000) ^b 275 (16000) | 1724, 1622 1599 ^e |
| 6 | 5.26×10^{-6} | 37 | 0.3 | 344 (12000) ^b 278 (17000) | 1725, 1570 ^f |
| 7 | 1.75×10^{-5} | 11 | 1 | nd | |
| 8 | 9.07×10^{-5} | 2.1 | 2 | 314 (19000) ^b 260 (9000) 218 (17000) | 1705, 1639 1604 ^c |
| 9 | 1.98×10^{-2} | 0.01 | 18 | 294 (14000) ^d 258 (21000) | 1705, 1617 ^c |

FIG. 8



Absorption

4.0000

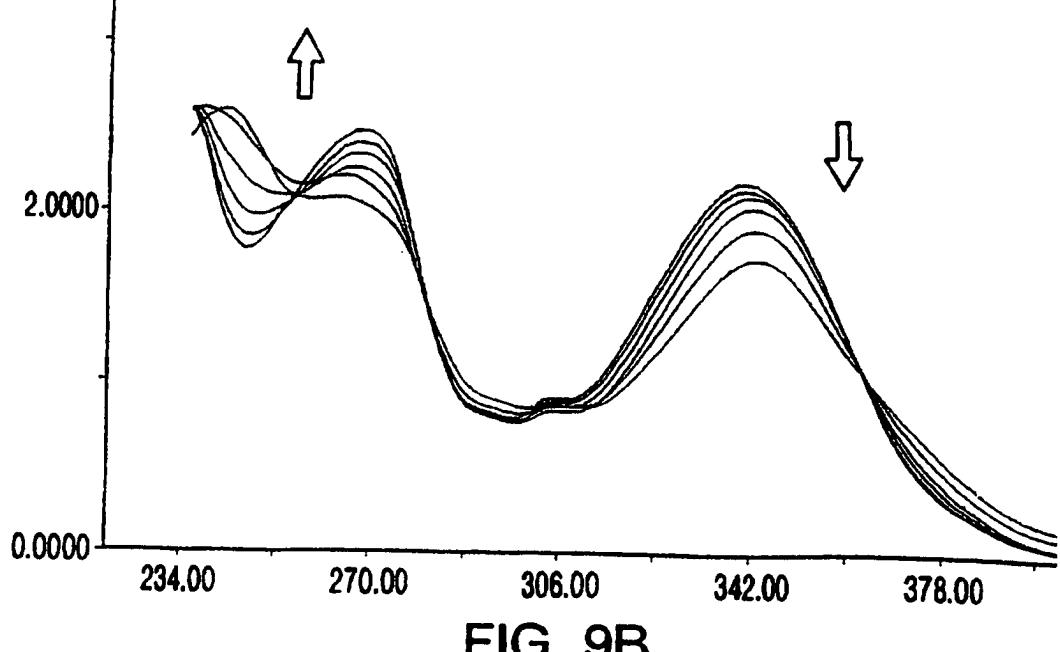
2.0000

0.0000

234.00 270.00 306.00 342.00 378.00

NM

240 MCBI



| Agens | IC ₅₀ (L1210) | Agens | IC ₅₀ (L1210) |
|-------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Natürliche Enantiomere | | | |
| 2 3 8 (+)-N-BOC-MCBI | 90 nM | (+)-N-BOC-CBI | 80 nM |
| 2 5 4 (+)-MCBI-TMI | 12 pM | (+)-CBI-TMI | 30 pM |
| 2 5 8 (+)-MCBI-indole ₂ | 10 pM | (+)-CBI-indole ₂ | 10 pM |
| 2 6 2 (+)-MCBI-CDPI ₁ | 6 pM | (+)-CBI-CDPI ₁ | 5 pM |
| 2 6 6 (+)-MCBI-CDPI ₂ | 6 pM | (+)-CBI-CDPI ₂ | 5 pM |
| Nicht natürliche Enantiomere | | | |
| 2 3 8 (-)-N-BOC-MCBI | 200 nM | (-)-N-BOC-CBI | 900 nm |
| 2 5 4 (-)-MCBI-TMI | 400 pM | (-)-CBI-TMI | 2000 pM |
| 2 5 8 (-)-MCBI-indole ₂ | 30 pM | (-)-CBI-indole ₂ | 4000 pM |
| 2 6 2 (-)-MCBI-CDPI ₁ | 10 pM | (-)-CBI-CDPI ₁ | 380 pM |
| 2 6 6 (-)-MCBI-CDPI ₂ | 10 pM | (-)-CBI-CDPI ₂ | 40 pM |

FIG. 10

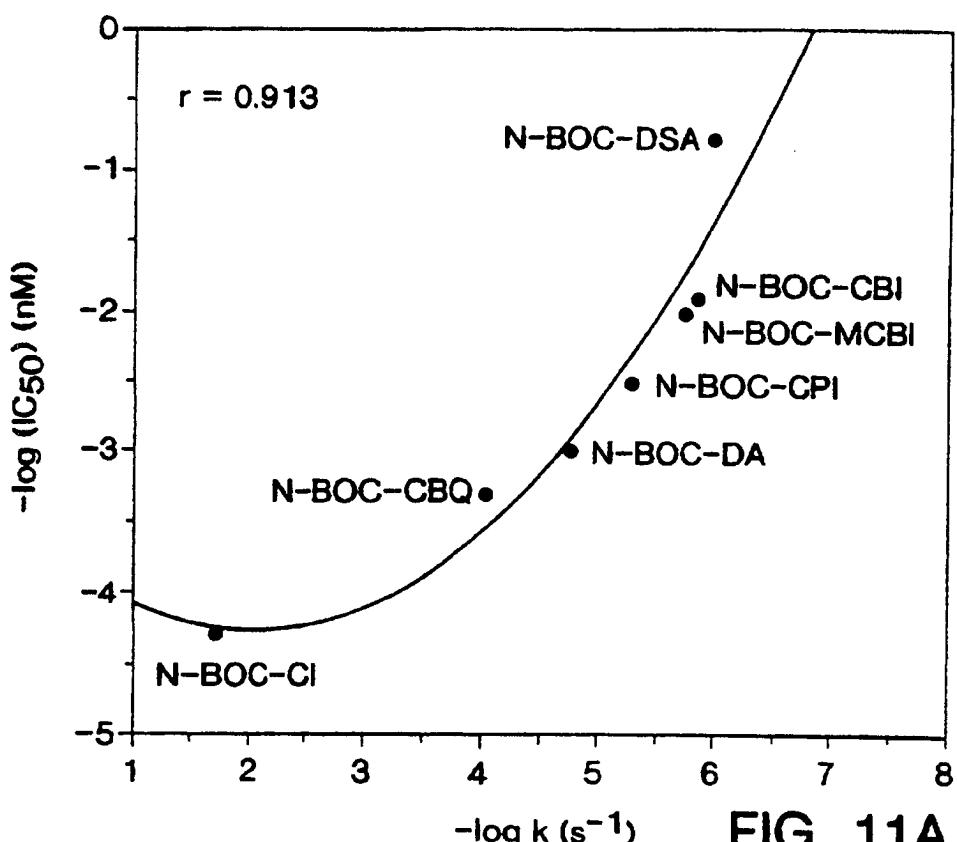


FIG. 11A

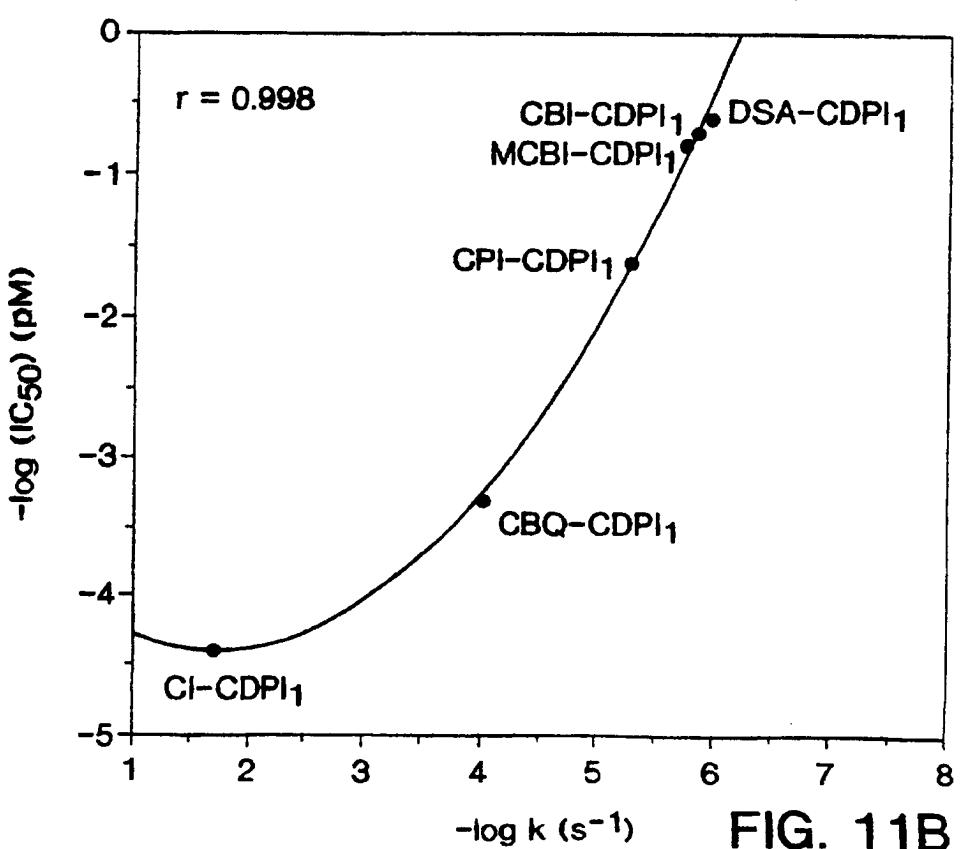
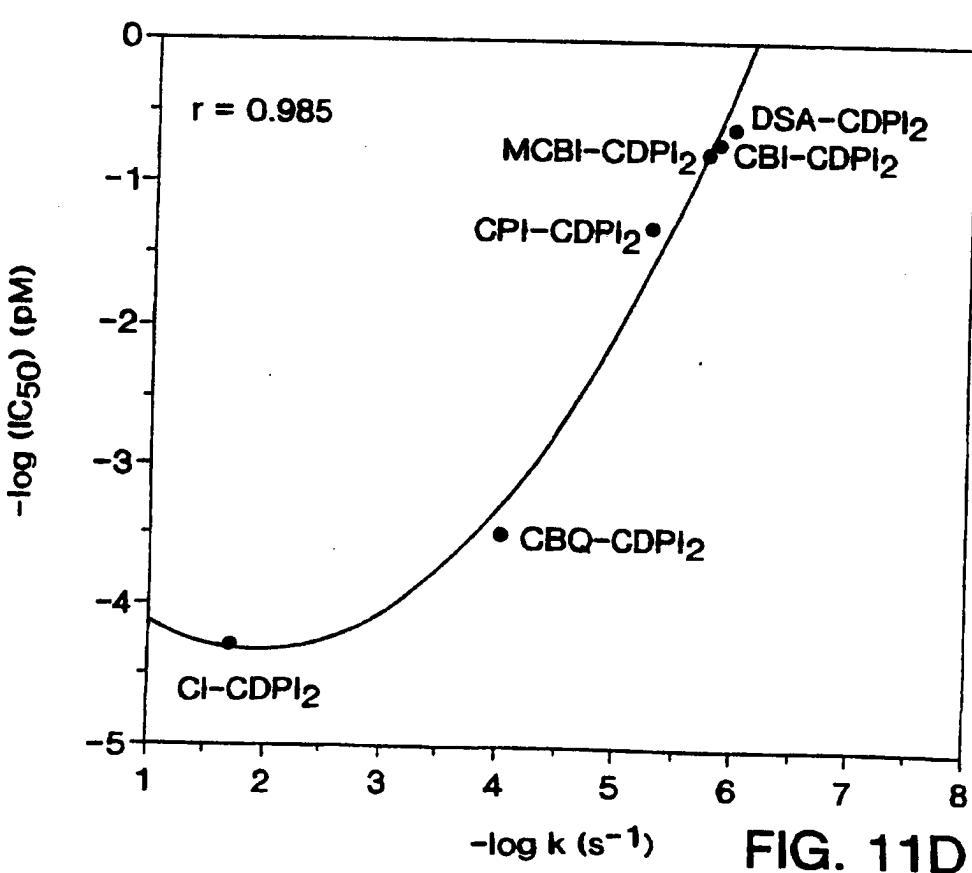
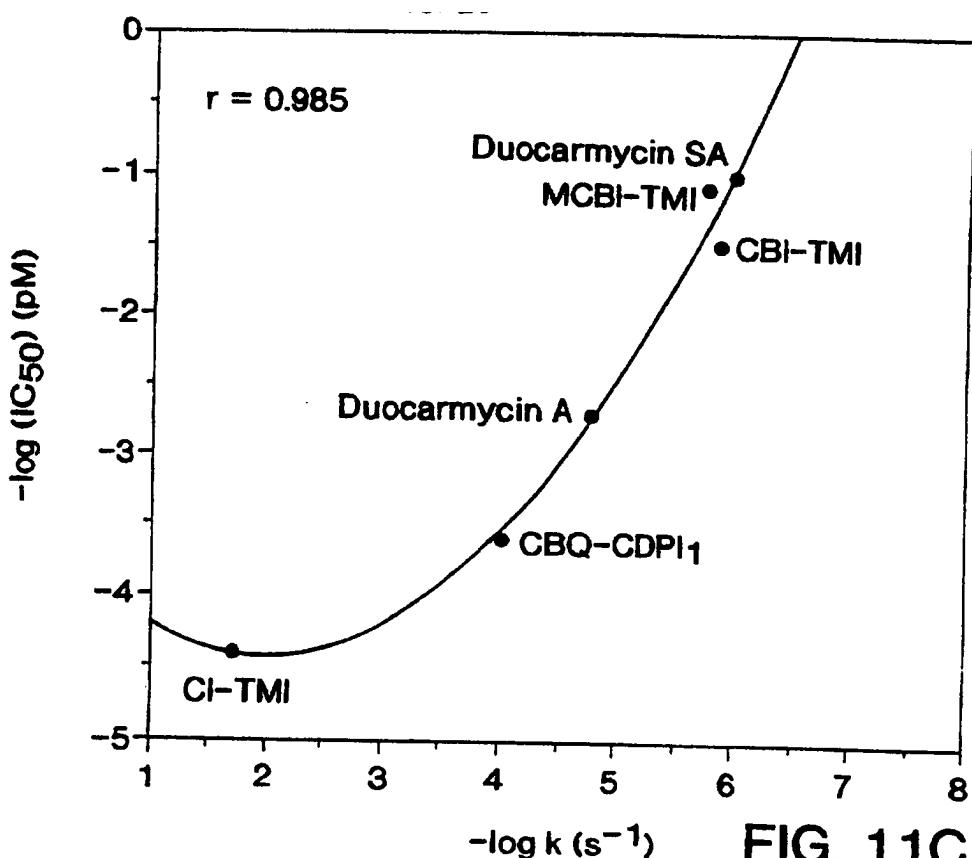


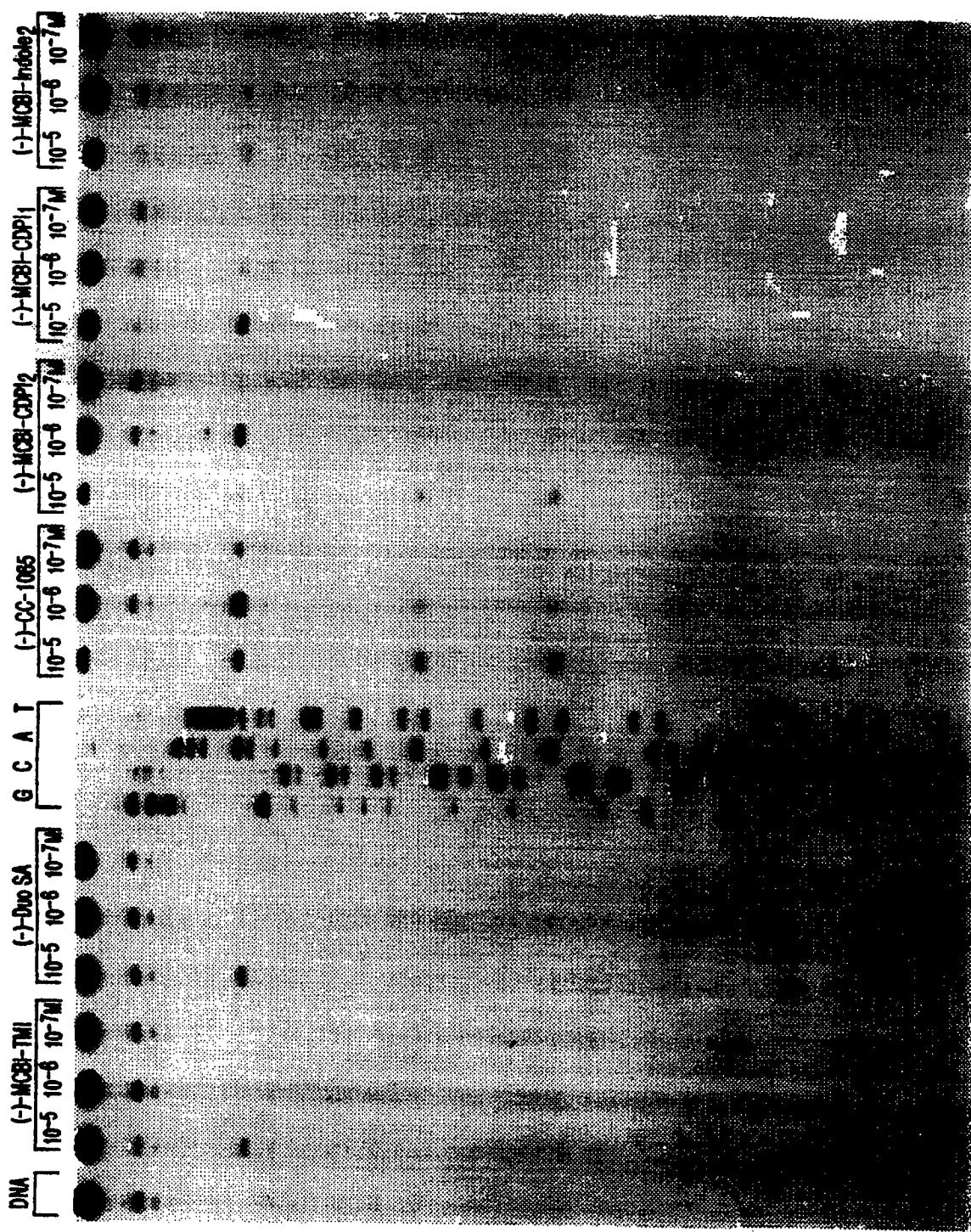
FIG. 11B

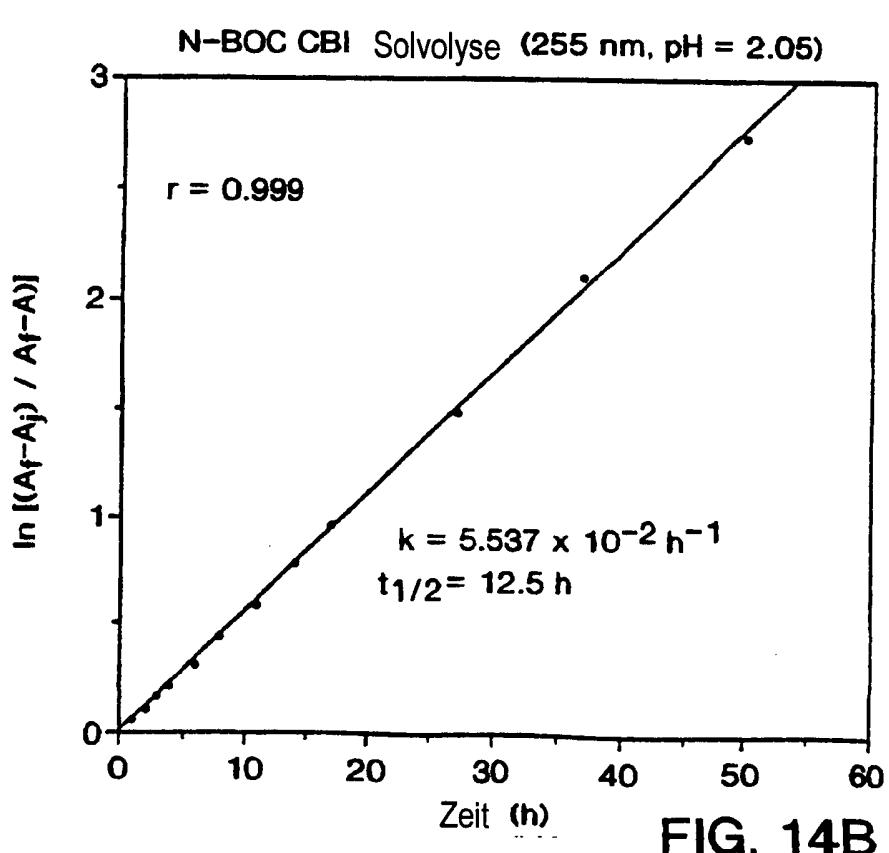
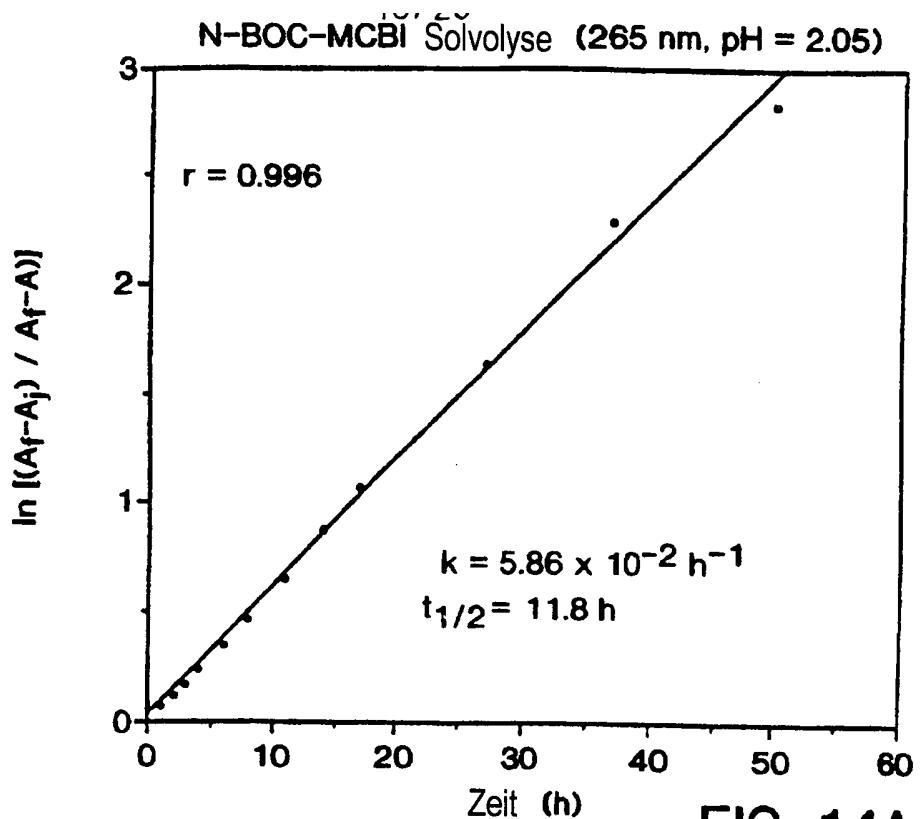


| Agens | Relativer IC ₅₀ (L1210) ^a | Relative DNA-Alkylierungsintensität ^b |
|----------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| CI-TMI | 1 | 0.5-2.0 |
| duocarmycin SA | 10 | 10 |
| MCBI-TMI | 50 | 50 |
| CBI-TMI | 100 | 100 |
| duocarmycin A | > 100 | > 100 |

FIG. 12

FIG. 13





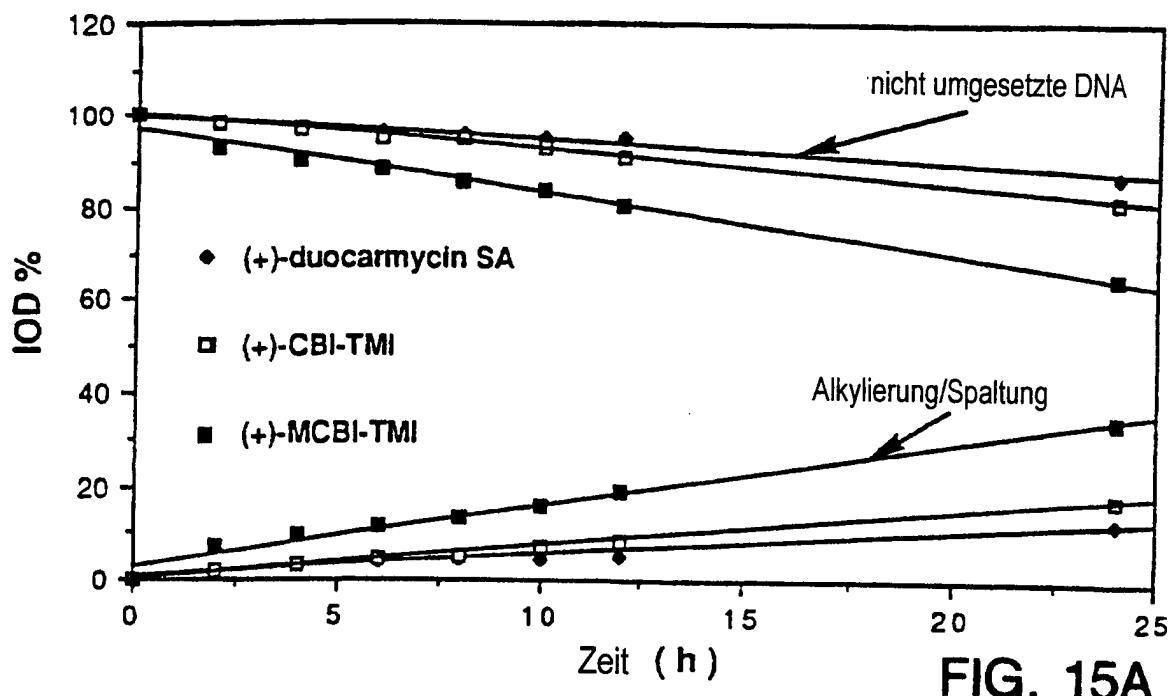


FIG. 15A

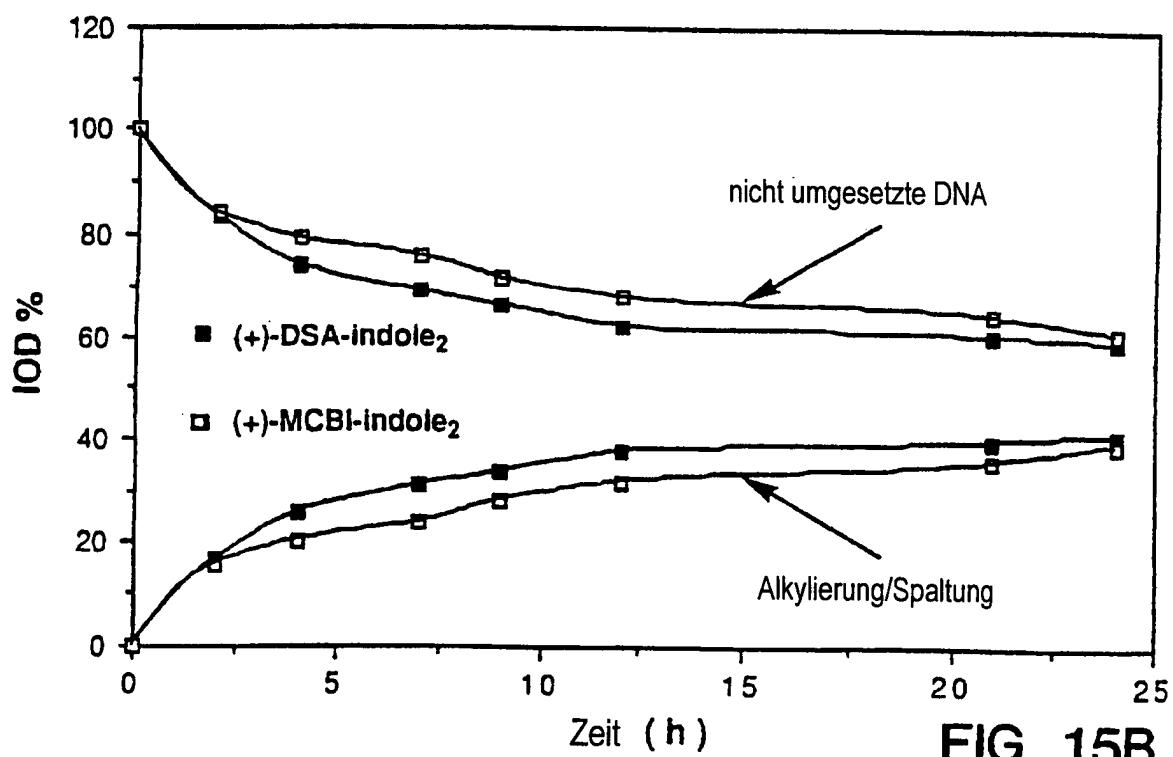
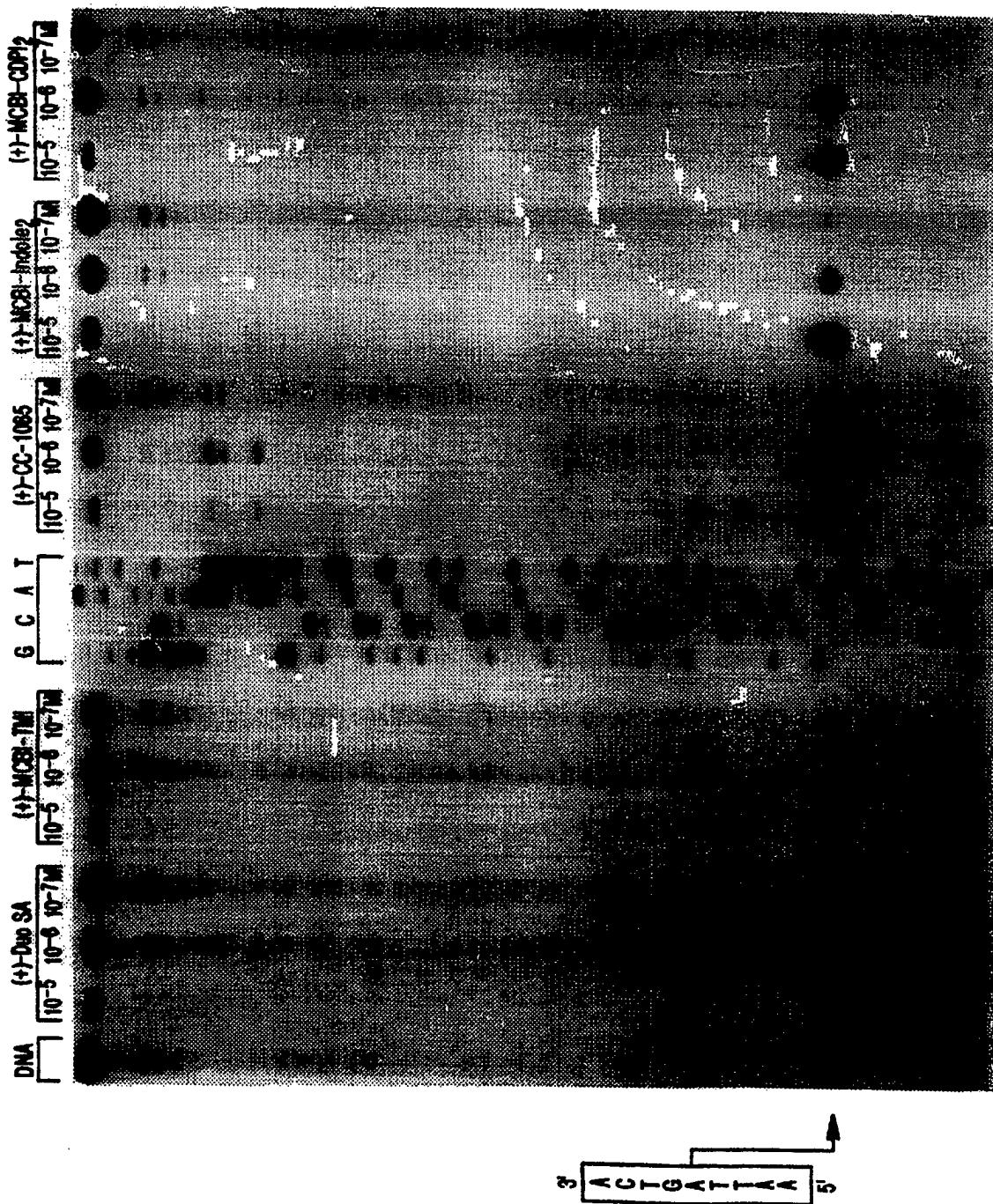


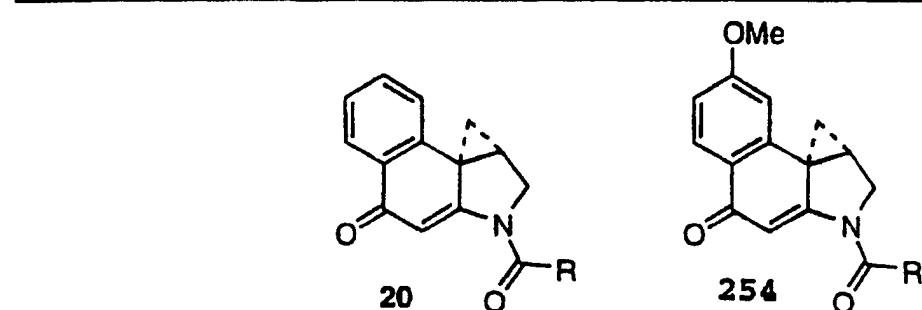
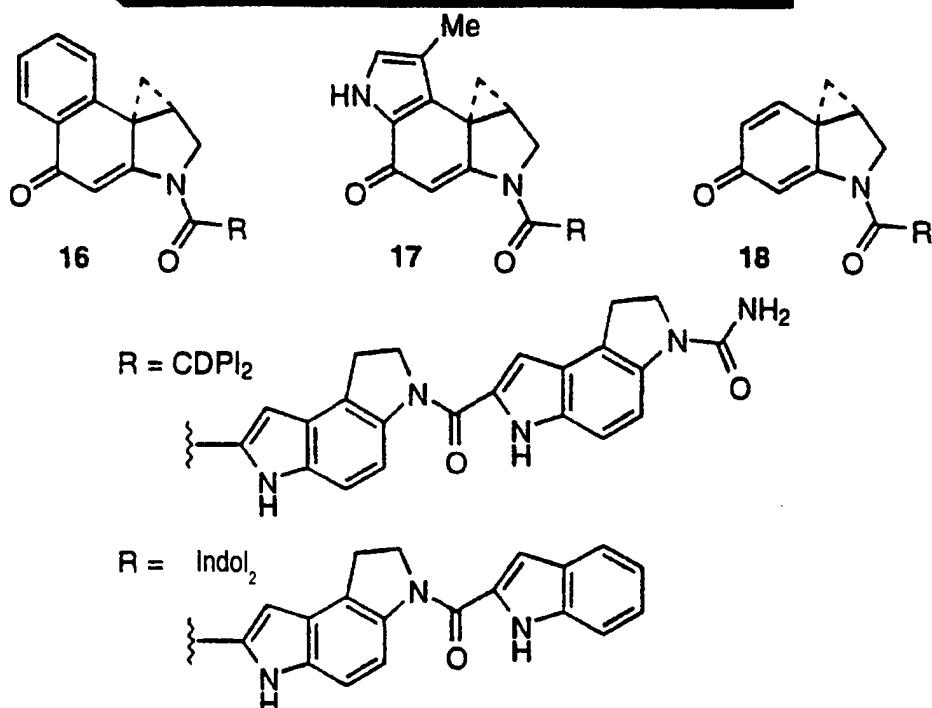
FIG. 15B

FIG. 16

FIG. 17



| $R = CDPI_2$ | 16 | 17 | 18 |
|---------------------------|-----------|-----------|-------|
| rel k (Solvolyse, pH 3) | 1.0 | 3.6 | 13700 |
| rel k (DNA Alkylierung) | 1.0 | 0.05 | <0.01 |
| $R = Indol_2$ | 16 | 17 | |
| rel k (Solvolyse, pH 3) | 1.0 | 3.6 | |
| rel k (DNA Alkylierung) | 1.0 | 0.07-0.05 | |



| $R = TMII$ | 20 | 254 |
|---------------------------|-----------|------------|
| rel k (Solvolyse, pH 3) | 1.0 | 1.2 |
| rel k (DNA Alkylierung) | 1.0 | 1.9 |
| $R = Indol_2$ | 20 | 254 |
| rel k (Solvolyse, pH 3) | 1.0 | 1.2 |
| rel k (DNA Alkylierung) | 1.0 | 1.4 |

FIG. 18