



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑪ **CH 655 724 A5**

⑤① Int. Cl.⁴: C 07 D 487/04
A 61 K 31/40

// (C 07 D 487/04, 209:00)

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑳ Gesuchsnummer: 6895/81

㉔ Anmeldungsdatum: 28.10.1981

③① Priorität(en): 18.11.1980 US 207838

㉔ Patent erteilt: 15.05.1986

④⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 15.05.1986

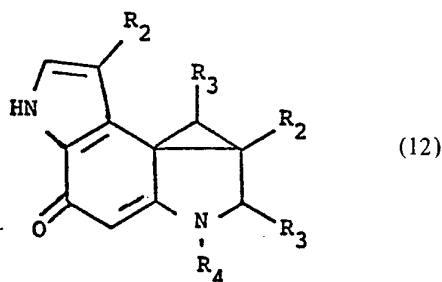
㉓ Inhaber:
The Upjohn Company, Kalamazoo/MI (US)

㉔ Erfinder:
Wierenga, Wendell, Kalamazoo/MI (US)

㉔ Vertreter:
E. Blum & Co., Zürich

⑤④ **1,2,8,8a-Tetrahydro-cyclopropa(c)-benzo(1,2-b:-4,3-b')-dipyrrol-4(5H)-on-Verbindungen sowie ein Verfahren zu ihrer Herstellung.**

⑤⑦ 1,2,8,8a-Cyclopropa[c]-benzo[1,2-b:-4,3-b']-dipyrrol-4(5H)-on-Verbindungen weisen die Formel auf

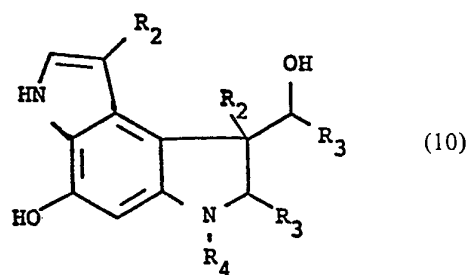


worin bedeuten:

R₂ und R₃, die gleich oder verschieden sein können, jeweils Wasserstoff, Alkyl mit 1 bis 5 C-Atomen oder den Phenylrest und

R₄ einen Rest der Formel SO₂R₂', SO₂CH₂CO-Phenyl oder OCH₂Z, worin R₂' C₁-C₅-Alkyl oder Phenyl und Z CH₂I, CCl₃, CH₂SO₂R₂, den Phenyl- oder Fluorenylmethylrest bedeuten.

Die Verbindungen werden nach einem neuen Verfahren erhalten, indem man eine Verbindung der Formel

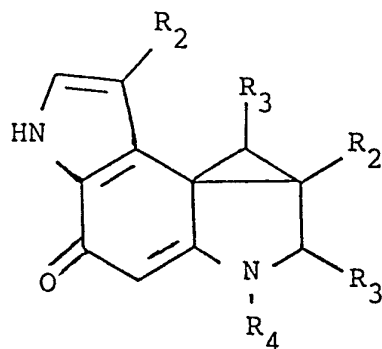


zuerst mit Triphenylphosphin/Tetrahalogenkohlenstoff umgesetzt und dann zur Bildung der gewünschten Verbindung eine Base zugefügt.

Die Verbindungen sind Bakterien gegenüber aktiv und können zur Desinfektion von mit Bakterien verunreinigten Gegenständen verwendet werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verbindungen der Formel

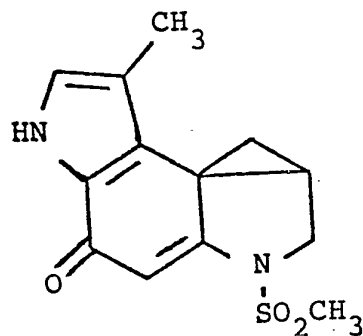


worin bedeuten:

R_2 und R_3 , die gleich oder verschieden sein können, jeweils Wasserstoff, Alkyl mit 1 bis 5 C-Atomen oder den Phenylrest und

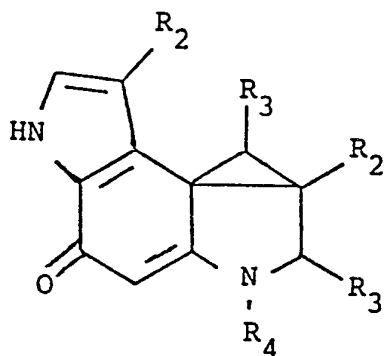
R_4 einen Rest der Formel SO_2R_2' , SO_2CH_2CO -Phenyl oder $OOCH_2Z$, worin R_2' C_1 - C_5 -Alkyl oder Phenyl und Z CH_2I , CCl_3 , $CH_2SO_2R_2$, den Phenyl- oder Fluorenylmethylrest bedeuten.

2. Verbindung der Formel



gemäß Anspruch 1.

3. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel

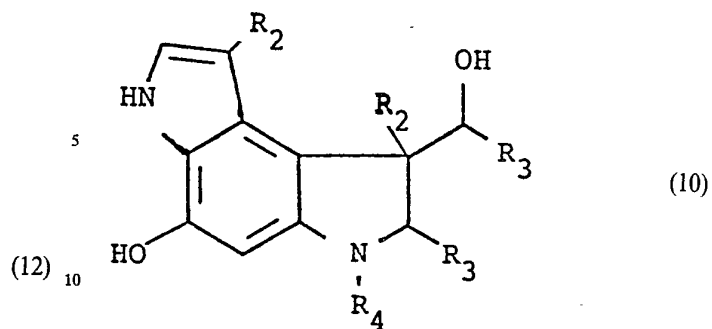


worin bedeuten:

R_2 und R_3 , die gleich oder verschieden sein können, jeweils Wasserstoff, Alkyl mit 1 bis 5 C-Atomen oder den Phenylrest und

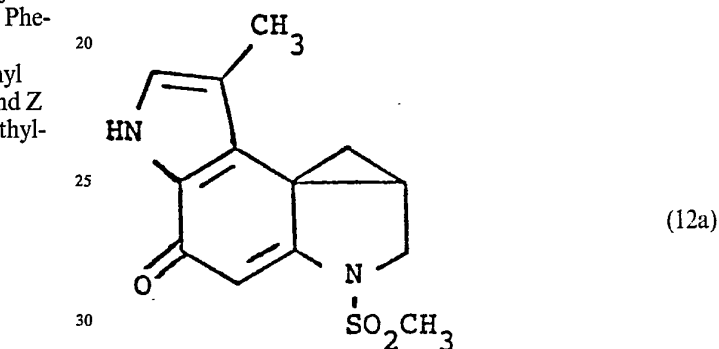
R_4 einen Rest der Formel SO_2R_2' , SO_2CH_2CO -Phenyl oder $OOCH_2Z$, worin R_2' C_1 - C_5 -Alkyl oder Phenyl und Z CH_2I , CCl_3 , $CH_2SO_2R_2$, den Phenyl- oder Fluorenylmethylrest bedeuten, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der allgemeinen Formel

2

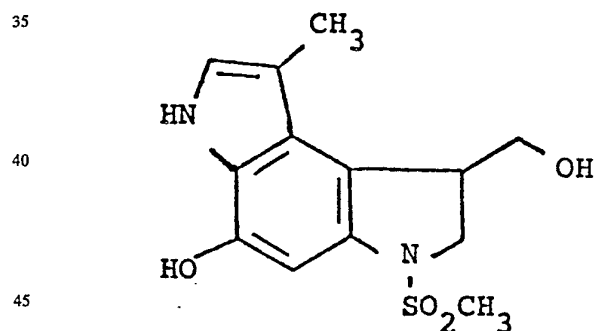


worin R_2 , R_3 und R_4 die oben angegebene Bedeutung besitzen, mit Triphenylphosphin/Tetrahalogenkohlenstoff umgesetzt und anschliessend zur Bildung der gewünschten Verbindung eine Base zusetzt.

4. Verfahren nach Anspruch 3 zur Herstellung einer Verbindung der Formel

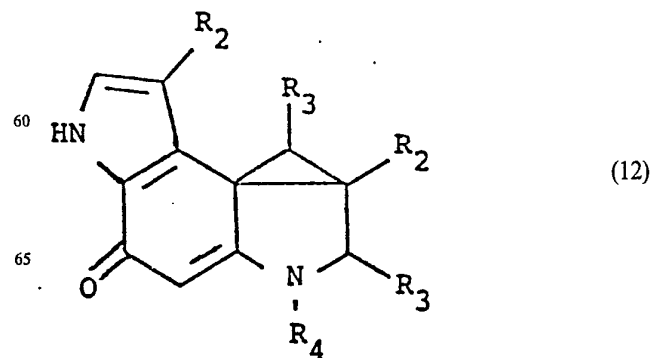


(12a) dadurch gekennzeichnet, dass man als Ausgangsverbindung der Formel (10) eine Verbindung der Formel



einsetzt.

(12) Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf 1,2,8,8a-Tetrahydro-cyclopropa [c]-benzo[1,2-b:-4,3-b']-dipyrrol-4(5H)-on-Verbindungen sowie auf ein Verfahren zu ihrer Herstellung. Die erfindungsgemässen Verbindungen weisen die folgende Formel auf

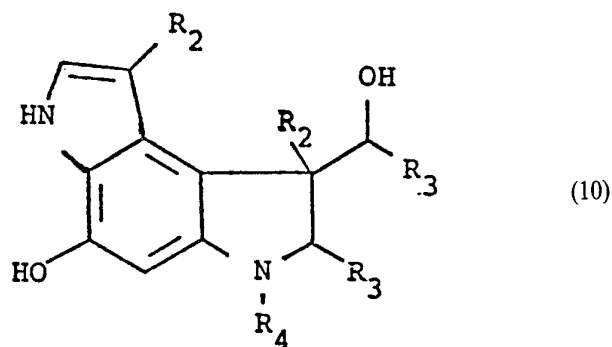


worin bedeuten:

R_2 und R_3 , die gleich oder verschieden sein können, jeweils Wasserstoff, Alkyl mit 1 bis 5 C-Atomen oder den Phenylrest und

R_4 einen Rest der Formel SO_2R_2' , SO_2CH_2CO -Phenyl oder $OOCCH_2Z$, worin R_2' C_1 - C_5 -Alkyl oder Phenyl und Z CH_2I , CCl_3 , $CH_2SO_2R_2$, den Phenyl- oder Fluorenylmethylrest bedeuten.

Das Verfahren zu ihrer Herstellung ist neu, und es ist dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der allgemeinen Formel



worin R_2 , R_3 und R_4 die oben angegebene Bedeutung besitzen, mit Triphenylphosphin/Tetrahalogenkohlenstoff umgesetzt und anschliessend zur Bildung der gewünschten Verbindung eine Base zusetzt.

Aus der US-PS 4 169 888 ist das Antibiotikum CC-1065 bekannt. Über die Strukturklärung des Antibiotikums CC-1065 wird von D.G. Martin, C.G. Chidester, D.J. Duchamp und S.A. Mizesak in «J. Antibiot.», Band 33, Seite 902 (1980), «Structure Proof of Antibiotic CC-1065» berichtet. Die Struktur des Antibiotikums CC-1065 ist in Fig. 1 dargestellt. Das Antibiotikum CC-1065 besteht aus einem System aus 3-Fragmenten, dessen labilster Molekülteil das als 1,2,8a-Tetrahydro-cyclopropa [c]benzo[1,2-b:4,3-b'] dipyrrol-4(5H)-on bezeichnete Fragment ist. Dieses wird im folgenden als Verbindung (12) bezeichnet. Versuche zur Gewinnung dieses Fragments durch Abbau des Antibiotikums CC-1065 haben nicht zum Ziel geführt. Somit gibt es kein bekanntes Verfahren zur Herstellung der Verbindung (12).

Das erfindungsgemässe Verfahren sowie auch die Verfahren zur Herstellung der Ausgangsverbindung der Formel (10) sind in dem nachfolgenden Reaktionsschema der Figur 2 dargestellt. Die erfindungsgemässe Verbindung (12) sowie bestimmte, bei ihrer Herstellung anfallende Zwischenprodukte, sind aktiv gegen bestimmte Bakterien, beispielsweise *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* und *Mycobacterium avium*. Folglich lassen sich die betreffenden Verbindungen zur Desinfektion gewaschener und gestapelter, mit *S. aureus* verunreinigter Gegenstände, die mit Nahrungsmitteln in Berührung gelangen, verwenden. Ferner können die antibakteriell wirksamen Verbindungen gemäss der Erfindung auch als bakteriostatische Spülungen für gewaschene Kleidung, zum Imprägnieren von Papier und Geweben, zur Unterdrückung des Wachstums empfindlicher Organismen bei Plattentests und in mikrobiologischen Medien verwendet werden. In der Regel können die antibakteriell wirksamen Verbindungen gemäss der Erfindung in gleicher Weise zum Einsatz gebracht werden wie das aus der US-PS 4 169 888 bekannte Antibiotikum CC-1065. Die betreffenden Einsatzgebiete sind dem mit Antibiotika befassten Fachmann bekannt.

Bei den in Fig. 2 schematisch dargestellten Verfahren handelt es sich hierbei um folgende Verfahrensstufen; wobei bevorzugte Methoden beschrieben werden:

Stufe 1: Die erste Stufe (aromatische nukleophile Substitution) des Synthesewegs wird von J. Bourdais und C. Mahieu in «Compt. Rendus» [C], 263, 84 (1966), beschrieben (vgl. auch J. Bourdais und C. Germain in «Tet. Letters», 195 (1970)). Die verschiedenen Reste R_1 lassen sich in den Phenolvorläufer von (1) nach in der Literatur beschriebenen Verfahren einführen (vgl. hierzu die bei Stufe 8 zitierten Literaturstellen). Die verschiedenen verwendeten Malonate, β -Ketoester und β -Diketone sind bekannte Verbindungen.

Stufe 2: Reduktion. Wenn R_3' für einen Alkoxyrest und R_3 für Wasserstoff stehen, ist Diisobutylaluminiumhydrid das Reagens der Wahl. Die Reaktionsbedingungen sind im Hinblick auf optimale Ausbeuten sehr spezifisch) vgl. Präparat 1). Wenn $R_3' (= R_3)$ für einen Alkyl- oder Phenylrest steht, kann man sich üblicher Standardreduktionsmassnahmen unter Verwendung von Natriumborhydrid bedienen.

Stufe 3: Austausch einer funktionellen Gruppe. Der im folgenden speziell beschriebene Chemismus gilt für den Fall, dass X für $-OSO_2CH_3$ steht. Das Mesylat oder Tosylat (beispielsweise) erhält man unter bekannten Standardbedingungen unter Verwendung von Pyridin (mit oder ohne Lösungsmittel, wie Methylchlorid) oder sonstiger Säureakzeptoren, wie Trialkylaminen (mit Lösungsmittel) und dem entsprechenden Sulfonylchlorid. Die Halogenanalogen von (4) erhält man nach bekannten Standardmassnahmen unter Verwendung von beispielsweise Ph_3P/CCl_4 (CBr_4) und N-Jodsuccinimid/Triphenylphosphin.

Stufe 4: Reduktion-Cyclisierung. Diese Stufe ermöglicht eine neuartige Herstellung von Indolinen (Dihydroindolen). Hierbei erfolgt eine Reduktion der Nitro- zu der Aminogruppe unter gleichzeitiger intramolekularer Cyclisierung unter Bildung von (5). Bei der noch im einzelnen beschriebenen Reduktionsstufe wird mit H_2 und PtO_2 in Alkohol in Gegenwart eines tertiären Amins gearbeitet. Hierbei handelt es sich um Standardhydrierbedingungen. Es können auch Palladium- oder Nickelkatalysatoren und andere Basen als ein tertiäres Amin, z.B. Pyridin, verwendet werden. Bei anderen Reduktionsmassnahmen lassen sich Fe oder $TiCl_3$ in Säure oder $SnCl_2$ verwenden. In diesem Fall kann eine eigene Stufe in Form einer Behandlung mit einer Base zur Einleitung der Cyclisierung zu (5) erforderlich sein. Ein Beispiel für die Reduktion mit Eisen ist die Verwendung von $Fe/CH_3CO_2H/CH_3CH_2OH$ (vgl. G.S. Ponticello und J.J. Baldwin in «J. Org. Chem.», 44, 4003 (1979)). Diese Bedingungen sind erforderlich, wenn R_1 für CH_2Ph oder $-CH_2CH=CH_2$ steht.

Das Konzept einer Nitroreduktion und anschliessender in situ-Cyclisierung zu Indolen ist aus der DE-OS 20 57 840 bekannt. Die diesbezügliche Lehre stellt eine deutliche Verbesserung gegenüber dem älteren Reissert-Verfahren einer reduktiven Cyclisierung zu Indolen dar (vgl. R.J. Sundberg, «The Chemistry of Indoles», Seiten 176-183, Verlag Academic Press, New York, 1970).

Stufe 5: Substitution einer labilen Gruppe. Diese Stufe muss wegen der Unverträglichkeit von X mit dem Chemismus der Stufe 8 durchgeführt werden. Hierbei wird X unter Standardbedingungen (Alkalicarboxylat in Aceton, Dimethylformamid, oder Alkohol) durch ein Acetat oder die konjugierte Base einer C_1 - C_5 -Alkylcarbonsäure ersetzt. Da im Falle, dass X für $-OSO_2CH_3$ steht, eine gewisse Hydrolyse stattfinden kann, wird das Reaktionsgemisch vor der Isolierung von (6) mit Essigsäureanhydrid behandelt.

Stufe 6: Die Nitrierung kann unter den verschiedensten bekannten Bedingungen, z.B. mit Salpetersäure in Essigsäure, Essigsäureanhydrid, Schwefelsäure, Essigsäure/ H_2O , Alkohol und Nitroalkanen erfolgen. Die Ortsselektivität dieser Reaktion wird durch die erhaltenen spektroskopischen Daten gestützt.

Stufe 7: Die Reduktion der Nitro- zu der Aminogruppe

entspricht dem im Zusammenhang mit Stufe 4 geschilderten Chemismus, wobei jedoch die Base weggelassen wird.

Stufe 8: Indolsynthese. Diese Synthese beruht im wesentlichen auf dem Indolchemismus von Gassman (vgl. P.G. Gassman und Mitarbeiter in «J. Am. Chem. Soc.», 96, 5494, 5508, 5512 (1974)). Es sind jedoch bestimmte, von Gassman weder beschriebene noch angeregte Modifizierungen erforderlich. Der Ablauf der chemischen Vorgänge und einige Zwischenprodukte sind in Fig. 3 dargestellt. Die α -Thiome-thylester sind bekannt.

Das Verfahren weicht von dem bekannten Gassman-Weg darin ab, dass der Chlorsulfoniumkomplex A verwendet und dieser mit dem Anilin (6) reagieren gelassen wird. Gassman stellt das Chloramin des Anilins her und lässt dieses zur Bildung von Oxindolen mit dem Thioäther reagieren. Zweitens werden bei dem vorliegenden Verfahren zwei verschiedene Basen verwendet, wohingegen Gassman zwei Äquivalente des Anilins und dann eine Base₂ einsetzt. Obwohl Triethylamin, Diisopropylethylamin, Bis(1,8-dimethylamino) naphthalin und dergl. sowohl als Base₁ und Base₂ wirken, ist die bevorzugte Base₁ Bis(1,8-dimethylamin) naphthalin und die bevorzugte Base₂ Triethylamin. Es können unterschiedliche Lösungsmittel, wie Chloroform, Acetonitril, Tetrahydrofuran und vorzugsweise Methylenchlorid verwendet werden. Die Temperatur reicht von -50°C bis 80°C . Die Reaktion wird in einer inerten Atmosphäre ablaufen gelassen. Die Cyclisierung des Oxindols B wird am besten durch eine Säure katalysiert (vgl. Gassman: 2N HCl, Äther und/oder Ethylacetat).

Die endgültige Reduktion zu (9) (reduktive Eliminierung) lässt sich – wie von Gassman beschrieben – mit Lithiumaluminiumhydrid oder besser mit Diboranreagentien durchführen. Vorzugsweise arbeitet man während 24 h mit $(\text{CH}_3)_2\text{S}\cdot\text{BH}_3$ in Tetrahydrofuran bei Raumtemperatur.

Stufe 9: Diese Eliminierung einer Schutzgruppe (Entfernung von R₁) wird in allen Einzelheiten für R₁ = CH₃ in Präparat 8 beschrieben. Obwohl eine Reihe von Massnahmen einschliesslich einer Methylätherspaltung bekannt sind, haben sich lediglich Alkylmercaptide in Hexamethylphosphorsäuretriamid (Hexamethylphosphor-3-amid) unter inerten Atmosphäre ($95^{\circ}\text{--}110^{\circ}\text{C}$) als wirksam erwiesen (S.C. Welch und A.S.C.P. Rao in «Tet. Letters», 505 (1977) und T.R. Kelly, H.M. Dali und W.-G. Tsang in «Tet. Letters», 3859 (1977)). Es eignet sich auch Me₂S·BBr₃ in Dichlorethan (vgl. P.G. Willard und C.B. Fryhle in «Tet. Letters», 3731 (1980)).

Wenn R₁ für CH₂Ph steht, reichen Standardhydrogenolysebedingungen (H₂, Pd/C) zur Eliminierung der Schutzgruppe aus (vgl. «Org. Reactions», 7, 263 (1953)). Wenn R₁ für CH₂SC₂H₅ steht, entfernt Quecksilber(II)-chlorid in Acetonitril/H₂O den Äther (vgl. R.A. Holton und R.G. Davis, «Tet. Letters», 533 (1977)). Wenn R₁ für CH₂OCH₃ steht, liefert eine mässig starke Säure, z.B. Essigsäure, das Phenol (10) (vgl. «J. Med. Chem.», 9, 1 (1966) oder «Synthesis», 244 (1976)). In der Tat kann diese schützende Gruppe in Stufe 6 verlorengegangen sein, sie kann jedoch vor Durchführung der Stufe 7 unter Standardbedingungen wieder eingeführt werden. Wenn R₁ für –CH₂OCH₂CH₂OCH₃ steht, lässt sich das Phenol mit ZnBr₂ oder TiCl₄ in CH₂Cl₂ herstellen (vgl. «Tet. Letters», 809 (1976)). Wenn R₁ für –CH₂CH = CH₂ steht, lässt sich der Äther nach verschiedenen zweistufigen Massnahmen von der Schutzgruppe befreien (Pd/C in Alkohol – vgl. «Ang. Chem. Int. Ed.», 15, 558 (1976); SeO₂, CH₃CO₂H in Dioxan – vgl. «Tet. Letters», 2885 (1970); tert.-BuOK, Dimethylsulfoxid und anschliessend H₂SO₄ in Aceton – vgl. «J. Chem. Soc.», 1903 (1965); RhCl(PPh₃)₃, DABCO in Alkohol, anschliessend pH₂ – vgl. «J. Org. Chem.», 38, 3224 (1973)). Wenn R₁ für –CH₂CH₂Si(R₂)₂ steht, erfolgt die Entfernung der Schutzgruppe mittels Bu₄NF (vgl. h. Gerlach und Mitarbeiter in «Helv. Chim. Acta», 60, 3039 (1977)).

Stufe 10: Vgl. Stufe 3.

Stufe 11: Diese Stufe (wenn X = Br) läuft beim Inberührunggelangen mit Silikagel sowie beim Stehenlassen (des Reaktionsgemischs) in einem protischen Lösungsmittel ab.

5 Diese Umsetzung läuft auch in Gegenwart von Basen, wie tertiären Aminen, Pyridin, tert.-Butoxid u.dgl., sowie schwachen wässrigen Basen, wie Bicarbonaten und Carbonaten, ab.

Die folgenden Präparate und Beispiele sollen die Erfindung näher veranschaulichen. Sofern nicht anders angegeben, 10 bedeuten sämtliche Prozentangaben «Gewichtsprozente». Sämtliche Mengenangaben bei Lösungsmittelgemischen beziehen sich auf das Volumen.

Präparat 1

15 Herstellung des 2-Aryl-1,3-propandiols (3) aus dem Aryldiethylmalonat (2).

400 ml Tetrahydrofuran, die unter Stickstoffatmosphäre in einem Eisbad gekühlt werden, werden mit 100 g (0,70 Mol) Diisobutylaluminiumhydrid in 400 ml Toluol versetzt. Unter 20 Rühren wird die erhaltene Lösung mit 33,0 g (0,105 Mol) des Arylmalonats (2) in 100 ml Tetrahydrofuran versetzt. Die Zugabegeschwindigkeit wird derart gesteuert, dass die Reaktionstemperatur unter 5°C bleibt. Nach beendeter Zugabe wird das Eisbad weggenommen. Nach insgesamt 3-stündiger 25 Reaktionsdauer wird das Reaktionsgemisch durch portionsweises Eintragen der Lösung in kalte 3N HCl unter Rühren (etwa 1,5 Ltr.) abgeschreckt. Danach wird das Gemisch mit 1 Ltr. Ethylacetat und anschliessend 1000 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über 30 Na₂SO₄ getrocknet und zu einem rotbraunen Rückstand (21,2 g) eingeeengt. Beim Chromatographieren des Rückstands auf 500 g Silikagel unter Verwendung von 60% Ethylacetat/Hexan $\rightarrow$ 100% Ethylacetat (Gradienteneluierung) als Eluiermittel erhält man in 49%iger Ausbeute 11,7 g des Diols 35 (3) (U-62, 598) als hellrotes Öl, das sich beim Stehenlassen im Gefrierschrank verfestigt.

Kernresonanzspektrum (CDCl₃): 7,5–7,0 (m, 3H), 3,80 (s, 3H), 4,0–3,3 (m, 7H – einschliesslich 2 OH).

Massenspektrum: Errechnet für C₁₀H₁₃NO₃: 227.0794
40 Gefunden: 227.0780

Die Elementaranalyse der erhaltenen Verbindung ergibt folgende Werte:

	C	H	N
45 ber.:	52,86	5,76	6,16
gef.:	53,40	5,77	5,99

Präparat 2

50 Herstellung des 2-Aryl-1,3-propandiol-bismesylats (4) aus dem 2-Aryl-1,3-propandiol (3)

4,7 g (0,2 Mol) des Diols (3) in 100 ml trockenen Pyridins werden unter N₂-Atmosphäre bei 0° bis 5°C unter Rühren mit 6,8 g (0,06 Mol) Methansulfonylchlorid versetzt. Nach 30-minütigem Rühren bei 5°C und 90-minütigem Rühren bei 55 Raumtemperatur wird die erhaltene Lösung im Vakuum eingeeengt und dann in CH₂Cl₂/1n HCl aufgenommen. Die organische Phase wird abgetrennt, über Na₂SO₄ getrocknet und zu einem Rückstand eingeeengt. Beim Verreiben mit Ethylacetat erhält man einen weisslichen Feststoff. Die Mutterlaugen lassen sich auf Silikagel (Eluiermittel: Ethylacetat) chromatographieren, wobei insgesamt in 86%iger Ausbeute 6,65 g Bismesylat (4) (U-62, 597) eines (nach dem Umkristallisieren aus 60 Aceton) Fp von 122° bis 123°C erhalten werden.

Kernresonanzspektrum (Acet-d₆): 7,7–7,2 (m, 3H), 4,62 65 (d, 4H, J = J Hz), 4,11 (t, 1H, J = 7 Hz), 3,92 (s, 3H), 3,06 (s, 6H).

Die Elementaranalyse der Verbindung C₁₂H₁₇NO₉S₂ ergibt folgende Werte:

	C	H	N
ber.:	37,59	4,47	3,65
gef.:	37,35	4,44	3,59

Diese Verbindung wird im Rahmen einer Standardverdünnungsreihe gegen L1210 Mäuseleukämiezellen in einer Kultur getestet, wobei folgende Ergebnisse erhalten werden.

ID₅₀ (µg/ml) = 6,0 ID₉₀ (µg/ml) = 18

Präparat 3

Herstellung des 6-Methoxyindolin-bismesylats (5) aus dem 2-Aryl-1,3-propandiol-bismesylat

1,91 g (0,005 Mol) Verbindung (4) in 30 ml Tetrahydrofuran, 20 ml Ethylacetat und 150 ml absoluten Äthanol werden mit 1,5 ml Triethylamin und 400 mg PtO₂ versetzt, worauf das Ganze 30 min lang unter einem H₂-Druck von 48 bis 68,7 kPa geschüttelt wird. Danach wird die Reaktionslösung über das Filterhilfsmittel Celite filtriert und im Vakuum eingeeengt. Nach mehrmaliger azeotroper Destillation mit CH₂Cl₂ im Vakuum wird letztlich der Rückstand in 100 ml CH₂Cl₂ aufgenommen und unter N₂-Atmosphäre in einem Eisbad gekühlt. In die gerührte Lösung werden nun 1,5 ml Triethylamin und anschliessend tropfenweise 900 µl Methansulfonylchlorid eingetragen. Nach 30-minütigem Rühren wird die Lösung sich innerhalb von 60 min auf Raumtemperatur erwärmen gelassen. Danach wird die Lösung mit 1n HCl gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Der hierbei angefallene Rückstand wird rasch auf 150 g Silikagel unter Verwendung von 500 ml 60% Ethylacetat/Hexan und dann 1000 ml 80% Ethylacetat/Hexan als Eluiermittel chromatographiert. Hierbei erhält man in 78%iger Ausbeute 1,3 g eines weisslichen Feststoffs eines (nach dem Umkristallisieren aus Ethanol) Fp von 122° bis 123 °C, nämlich das 6-Methoxyindolin-bismesylat (5) (U-62,586).

Kernresonanzspektrum (Dimethylformamid-d₇): 7,36 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 7,00 (d, 1H, J = 2 Hz), 6,69 (dd, 1H, J = 2, 8,5 Hz), 4,47 (2H, d, J = 6 Hz), 4,3–3,6 (m, 3H), 3,80 (s, 3H), 3,20 (s, 3H), 3,07 (s, 3H).

Die Elementaranalyse der Verbindung C₁₂H₁₇NS₂O₆ ergibt folgende Werte:

	C	H	N
ber.:	42,97	5,11	4,18
gef.:	42,87	5,27	4,29

Diese Verbindung wird im Rahmen einer Standardverdünnungsreihe gegen L1210 Mäuseleukämiezellen in einer Kultur getestet, wobei folgende Ergebnisse erhalten werden:

ID₅₀ (µg/ml) = 4,8 ID₉₀ (µg/ml) = 10

Präparat 4

Herstellung des 6-Methoxyindolinacetats (6) aus dem 6-Methoxyindolin-bismesylat (5)

13,0 g (39 mMole) des 6-Methoxyindolin-bismesylats (5) in 30 ml Dimethylformamid werden mit 800 ml absoluten Ethanol und anschliessend 32 g Natriumacetat versetzt, worauf die erhaltene heterogene Lösung unter N₂-Atmosphäre 24 h lang auf Rückflusstemperatur erhitzt, dann abgekühlt und schliesslich im Vakuum eingeeengt wird. Der hierbei angefallene Rückstand wird 2 h lang (Rühren bei Raumtemperatur (mit 100 ml Essigsäureanhydrid behandelt und dann im Vakuum eingeeengt. Danach wird der Verdampfungsrückstand in CH₂Cl₂/H₂O aufgenommen. Nach Abtrennen der organischen Phase wird diese über Na₂SO₄ getrocknet, durch Holzkohle filtriert und zu einem sich verfestigenden Öl eingeeengt. Man erhält 11,6 g 6-Methoxyindolinacetat (6) (100%ige Ausbeute. Erforderlichenfalls kann durch Chromatographieren auf Silikagel unter Verwendung von 60% Ethylacetat/Hexan als Eluiermittel weitergereinigt werden).

Kernresonanzspektrum (CDCl₃): 7,17 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 7,02 (d, 1H, J = 2 Hz), 6,60 (dd, 1H, J = 2, 8,5 Hz), 4,18 (d, 2H, J = 6 Hz), 4,1–3,4 (m, 3H), 3,78 (s, 3H), 2,91 (s, 3H), 2,05 (s, 3H).

Die Elementaranalyse der Verbindung C₁₃H₁₇NO₅S ergibt folgende Werte:

	C	H	N
ber.:	52,16	5,76	4,68
gef.:	52,13	5,79	5,27
10 Massenspektrum:	Berechnet:	299.0827	
	Gefunden:	299.0823	

Präparat 5

Herstellung des 5-Nitro-6-methoxyindolinacetats (7) aus dem 6-Methoxyindolinacetat (6)

500 mg (1,67 mMole) des 6-Methoxyindolinacetats (6) in 20 ml Nitromethan werden mit 90 µl 90%iger HNO₃ versetzt, worauf die auf 0° bis 5 °C gekühlte Reaktionslösung 30 min lang gerührt und sich dann innerhalb von 30 min auf Raumtemperatur erwärmen gelassen wird. Nun wird die Lösung mit CH₂Cl₂ und wässriger Natriumbicarbonatlösung verdünnt. Nach Abtrennung der organischen Phase wird diese über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Der hierbei angefallene Rückstand wird auf 50 g Silikagel (Eluiermittel 60% Ethylacetat/Hexan → 100% Ethylacetat) chromatographiert, wobei in 76%iger Ausbeute 440 mg gelben festen 5-Nitro-6-methoxyindolinacetats eines (nach dem Umkristallisieren aus Ethanol) Fp von 175° bis 177 °C erhalten werden (U-62,696).

Kernresonanzspektrum (Dimethylformamid-d₇): 7,91 (s, 1H), 7,20 (s, 1H), 4,27 (d, 2H, J = 6 Hz), 4,3–3,7 (m, 3H), 3,98 (s, 3H), 3,17 (s, 3H), 2,07 (s, 3H).

Die Elementaranalyse der Verbindung C₁₃H₁₆N₂O₇S ergibt folgende Werte:

	C	H	N
ber.:	45,34	4,68	8,14
gef.:	44,81	4,77	8,16

Diese Verbindung wird im Rahmen einer Standardverdünnungsreihe gegen L1210 Mäuseleukämiezellen in einer Kultur getestet, wobei folgende Ergebnisse erhalten werden:

ID₅₀ (µg/ml) = > 50 ID₉₀ (µg/ml) = > 50

Präparat 6

Herstellung des 5-Amino-6-methoxyindolinacetats (8) aus dem 5-Nitro-6-methoxyindolinacetat (7)

4,5 g (13 mMole) des 5-Nitro-6-methoxyindolinacetats (7) in 50 ml Tetrahydrofuran und 150 absoluten Äthanol werden mit 500 mg PtO₂ versetzt, worauf das Ganze bis zum Aufhören der H₂-Aufnahme (nach etwa 60 min) unter einem H₂-Druck von 68,7 kPa geschüttelt wird. Danach wird filtriert und im Vakuum eingeeengt. Beim Einengen fallen 3,0 g Produkt aus. Dieses wird abfiltriert. Die Mutterlaugen werden rasch auf 100 g Silikagel unter Verwendung von Ethylacetat als Eluiermittel chromatographiert, wobei noch 0,6 g Produkt erhalten wird. Die Gesamtausbeute (3,6 g) entspricht 88% der Theorie. Das erhaltene 5-Amino-6-methoxyindolinacetat (8) besitzt nach dem Umkristallisieren aus Aceton/Cyclohexan einen Fp von 134° bis 135 °C (U-62,697).

Kernresonanzspektrum (CDCl₃): 7,02 (s, 1H), 6,65 (s, 1H), 4,16 (d, 2H, J = 6 Hz), 4,1–3,5 (m, 3H), 3,83 (s, 3H), 3,6 (br. s, 2H), 2,83 (s, 3H).

Die Elementaranalyse der Verbindung C₁₃H₁₈N₂O₅S ergibt folgende Werte:

	C	H	N
ber.:	49,67	5,77	8,91
gef.:	49,74	5,72	8,94

Diese Verbindung wird im Rahmen einer Standardver-

dünnungsreihe gegen L1210 Mäuseleukämiezellen in einer Kultur getestet, wobei folgende Ergebnisse erhalten werden:

$$ID_{50} (\mu\text{g/ml}) = > 50 \quad ID_{90} (\mu\text{g/ml}) = > 50$$

Präparat 7

Herstellung des 4,5-Pyrrolo-7-methoxyindolins (9) aus dem 5-Amino-6-methoxyindolinacetat (8)

14 ml trockenes CH_2Cl_2 werden unter N_2 -Atmosphäre bei -75°C mit 6,0 ml einer $\text{Cl}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Lösung (20 μl Cl_2/ml CH_2Cl_2) versetzt, worauf zu der erhaltenen Lösung unter Rühren 370 μl (2,5 mMole) $\text{CH}_3(\text{CH}_3\text{S})\text{CHCO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ (hergestellt aus $\text{CH}_3(\text{Br})\text{CHCO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ und Methylmercaptid gemäss dem von E.H. Wick, T. Yamanishi, H.C. Wertheimer, Y.E. Hoff, B.F. Proctor und S.A. Goldblith in «J. Agr. Food Chem.», 9, 289 (1961) beschriebenen Verfahren) zugegeben werden. Nach 5 min wird innerhalb von 15 min eine Lösung von 470 mg (2,2 mMole) 1,8-Bisdimethylaminonaphthalin und 628 mg (2,0 mMole) des Anilinoindolins (8) in 3,0 ml trockenen CH_2Cl_2 zutropfen gelassen. Die hierbei gebildete rote Lösung wird 2 h lang bei -75°C gerührt und dann tropfenweise innerhalb von einigen min mit 350 μl Triethylamin in 650 μl CH_2Cl_2 versetzt. Nach Entfernen des Kühlbades und Erreichen von Raumtemperatur wird die Reaktionslösung kurz im Vakuum eingengt. Der hierbei angefallene Rückstand wird mit 5 ml Ethylacetat, 25 ml Äther und 6 ml 2n HCl versetzt, worauf das Ganze 2 h lang kräftig gerührt wird. Nach Abtrennen der organischen Phase wird die wässrige Phase mit einem 1:1-Gemisch aus Ethylacetat und Et_2O extrahiert. Die organischen Phasen werden miteinander vereinigt, über Na_2SO_4 getrocknet und eingengt. Nun wird der Rückstand in 10 ml Tetrahydrofuran aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur unter N_2 -Atmosphäre mit 3,0 ml 2M $\text{BH}_3\cdot\text{SMe}_2$ behandelt. Andererseits lassen sich die bei der Säurebehandlung gewonnenen diastereomeren Oxindole (B) auch durch Silikagelchromatographie (50 g, 60% Ethylacetat/Hexan bis 90% Ethylacetat/Hexan als Eluiermittel) isolieren.

GS-Massenspektrum: m/e M^+ 414 (15%), 227 (100%)-2' 1% Se-30.

Kernresonanzspektrum (CDCl_3): 8,4 (br. s, 1H), 7,11 (s, 1H), 4,5–3,7 (m, 5H), 3,90 (s, 3H), 2,95 (s, 3H), 2,10 (s, 3H), 1,92 (s, 3H), 1,82 (s, 3H) – Hauptdiastereomeres (2,5/1); das untergeordnete Diastereomere zeigt folgende Unterschiede – 1,99 (s, 3H), 1,76 (s, 3H) für $-\text{SCH}_3$ und $-\text{CH}_3$, das NH liegt bei 7,7 und der CH_2 -Bereich bei 4,3–3,6 ppm.

Die wässrige Phase aus der Säurebehandlung lässt sich neutralisieren und mit CH_2Cl_2 extrahieren. Die CH_2Cl_2 -Lösung kann dann getrocknet, eingengt und auf Silikagel unter Verwendung von 50% Aceton/Cyclohexan chromatographiert werden, wobei 40% Ausgangsmaterial (Anilinoindolin) und 20% entacyliertes Ausgangsmaterial zurückgewonnen werden.

Das Reaktionsgemisch aus der reduktiven Eliminierung (an B) mit Borandimethylsulfid wird aufgearbeitet, indem es mit 1n HCl bis zum Aufhören des Gasentweichens abgeschreckt und dann in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ aufgenommen wird. Die abgetrennte organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und eingengt. Der hierbei angefallene Rückstand wird auf Silikagel (Eluiermittel: 50% Aceton/Cyclohexan) chromatographiert, wobei 155 mg 4,5-Pyrrolo-7-methoxyindolin (9) eines Fp von 182 bis 183 $^\circ\text{C}$ (Phasenänderung bei 160 $^\circ\text{C}$, umkristallisiert aus Chloroform) erhalten werden (25% isolierte Ausbeute – 85%, bezogen auf rückgewonnenes Ausgangsmaterial) (U-62,233).

Kernresonanzspektrum (CDCl_3): 8,3 (br. s, 1H), 6,96 (s, 2H), 4,2–3,5 (m, 5H + OH), 3,92 (s, 3H), 2,87 (s, 3H), 2,41 (s, 3H).

Die Elementaranalyse der Verbindung $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ ergibt folgende Werte:

	C	H	N
ber.:	54,17	5,84	9,03
5 gef.:	53,49	5,96	9,42

GC-Massenspektrum: des O-Acetats – m/e M^+ 352 (13%), 213 (100%)-2' 1% SE-30, Temperatur: 150–1260 $^\circ\text{C}$ (10 $^\circ$ /min); einzelner Peak.

10 Diese Verbindung wird im Rahmen einer Standardverdünnungsreihe gegen L1210 Mäuseleukämiezellen in einer Kultur getestet, wobei folgende Ergebnisse erhalten werden: $ID_{50} (\mu\text{g/ml}) = > 4$ $ID_{90} (\mu\text{g/ml}) = > 4$.

15 Präparat 8

Herstellung des 4,5-Pyrrolo-7-hydroxyindolins (10) aus dem 4,5-Pyrrolo-7-methoxyindolin (9)

10 ml trockenen, entgasteten Hexamethylphosphorsäuretriamids werden unter N_2 -Atmosphäre bei Raumtemperatur mit 350 μl Butylmercaptan versetzt. Die Lösung wird in einem Eiswasserbad abgekühlt und tropfenweise mit 2,0 ml 1,5M n-Butyllithium in Hexan versetzt. Nachdem das Reaktionsgemisch Raumtemperatur angenommen hat, werden unter Rühren 100 mg (0,3 mMole) des Indols (9) zugegeben, worauf die Lösung 2,5 h lang auf 100 $^\circ\text{C}$ erhitzt wird. Nach der Umsetzung wird das Reaktionsgemisch einer Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von 50% Aceton/Cyclohexan als Laufmittel unterworfen. Wenn die Umwandlung als zu 75% vollständig angesehen wird (Sprühmittel: Vanillin/Phosphorsäure), wird mit dem Erhitzen aufgehört. Die gekühlte Lösung wird in 1n HCl (100 ml) gegossen und mit 20 ml Ethylacetat extrahiert. Die abgetrennte organische Phase wird mit weiteren 50 ml Wasser gewaschen. Die wässrigen Phasen werden miteinander vereinigt und mit 20 ml Ethylacetat rückextrahiert. Nach ihrer Vereinigung werden die organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet, im Vakuum eingengt und auf eine 100 g Silikagelsäule gegossen. Eluiert wird mit 50% Aceton/Cyclohexan. Erhalten werden 25 mg Ausgangsmaterial und 45 mg des Produkts 4,5-Pyrrolo-7-hydroxyindolin (10) (44% isolierte Ausbeute, 69% bezogen auf rückgewonnenes Ausgangsmaterial) (U-62,370).

Kernresonanzspektrum ($\text{Acet}-d_6$): 7,8 (br. s, 1H), 7,03 (s, 1H), 6,83 (s, 1H), 4,25–3,25 (m, 5H), 2,86 (s, 3H), 2,36 (s, 45 3H).

Das erhaltene Produkt wird über Nacht mit 1,0 ml Essigsäureanhydrid und 20 mg Natriumacetat behandelt und dann in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ aufgenommen. Danach wird die organische Phase abgetrennt, über Na_2SO_4 getrocknet und eingengt.

50 Kernresonanzspektrum (CDCl_3): 7,8 (br. s, 1H), 7,16 (s, 1H), 6,97 (s, 1H), 4,42, 3,20 (dd, 2H), 4,2–3,7 (m, 3H), 2,86 (s, 3H), 2,40 (s, 3H), 2,35 (s, 3H), 2,06 (s, 3H).

GC-Massenspektrum: m/e M^+ 380 (25%), 199 (100%)-2' 1% SE-30.

55 Diese Verbindung wird im Rahmen einer Standardverdünnungsreihe gegen L1210 Mäuseleukämiezellen in einer Kultur getestet, wobei folgende Ergebnisse erhalten werden: $ID_{50} (\mu\text{g/ml}) = > 5$ $ID_{90} (\mu\text{g/ml}) = > 5$.

60 Präparat 9

Herstellung des 4,5-Pyrrolo-7-hydroxyindolinmesylats (11) aus dem 4,5-Pyrrolo-7-hydroxyindolinalkohol (10)

20 mg (65 μMole) des Alkoholsubstrats (10) in 1,0 ml Pyridin werden in einem Eisbad unter Rühren und N_2 -Atmosphäre mit 8 μl (70 μMole) Methansulfonylchlorid versetzt. Nach 30 min werden weitere 2 μl $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$ zugegeben. Nach insgesamt 60-minütiger Reaktionsdauer wird das Ganze mit 2n HCl/ CH_2Cl_2 aufgearbeitet. Die organische Phase wird ab-

getrennt, über Na_2SO_4 getrocknet und eingeeengt. Bei der Dünnschichtchromatographie findet sich vornehmlich ein Produkt mit niedrigem R_F -Wert (0,28 in 50% Aceton/Cyclohexan, Alkohol R_F -Wert: 0,46) und etwas Produkt mit höherem R_F -Wert (0,66). Die präparative Dünnschichtchromatographie ($3-20 \times 20$ cm Silikagelplatten, 250 μm) liefert 2 mg eines Materials mit höherem R_F -Wert (das Kernresonanzspektrum zeigt lediglich eine CH_3SO_2 -Gruppe, hierbei handelt es sich wahrscheinlich um das Chlorid) und 9 mg eines Materials mit niedrigerem R_F -Wert. Es handelt sich um die Verbindung (11) (U-62,695).

Kernresonanzspektrum (Acet- d_6): 8,6 (br. s, 1H), 6,97 (s, 1H), 6,74 (s, 1H), 4,3 (m, 2H), 4,1–3,6 (m, 3H), 2,96 (s, 3H), 2,79 (s, 3H), 2,26 (s, 3H).

Diese Verbindung wird im Rahmen einer Standardverdünnungsreihe gegen L1210 Mäuseleukämiezellen in einer Kultur getestet, wobei folgende Ergebnisse erhalten werden:

ID_{50} ($\mu\text{g/ml}$) = 1,0 ID_{90} ($\mu\text{g/ml}$) = 3,3.

Beispiel 1

Herstellung von 1,2,8a-Tetrahydro-cyclopropan [C]benzo [1,2-b:4,3-b'] dipyrrol-4(5H)-on (12), N-(Methylsulfonyl)

Wenn man das Reaktionsgemisch im Rahmen der Massnahmen zur Herstellung des 4,5-Pyrrolo-7-hydroxyindolinbromids (Präparat 9, Stufe 10), anstatt das gebildete Bromid mit dem höheren R_F -Wert (0,64) zu isolieren, im Vakuum einengt und direkt auf dicke Silikagelschichtplatten aufträgt, erscheint eine neue Bande mit niedrigerem R_F -Wert (0,32). Dabei handelt es sich um die Verbindung (12).

Kernresonanzspektrum (CDCl_3): 9,5 (breites s, 1H), 6,83 (dd, H_a), 6,34 (s, H_b), 4,10 (d, H_c), 3,93 (dd, H_d), 3,04 (s, 3H), 2,93 (m, H_e), 2,00 (d, 3H), 1,97 (dd, H_f), 1,37 (dd, H_g).

$J_{c,e} = 0,0$ Hz

$J_{c,d} = 9,7$

$J_{d,e} = 4,7$

$J_{e,f} = 7,7$

$J_{e,g} = 4,4$

$J_{f,g} = 4,4$

$J_{NH,a} = 2,0$

$J_{a,CH_3} = < 1,0$

Massenspektrum: Silylierung mit BSTFA (Dimethylformamid enthaltend 1% TMS-Cl) liefert m/e M^+ 386/388 (22, 12% entsprechend dem Produkt + Me_3SiCl).

UV-Spektrum in Methanol: λ 224, 272, 338.

Diese Verbindung wird im Rahmen einer Standardverdünnungsreihe gegen L1210 Mäuseleukämiezellen in einer

Kultur getestet, wobei folgende Ergebnisse erhalten werden:

ID_{50} ($\mu\text{g/ml}$) = 0,13 ID_{90} ($\mu\text{g/ml}$) = 0,42

Beispiel 2a

- 5 Herstellung des 4,5-Pyrrolo-7-hydroxy-indolinbromids (11) aus dem 4,5-Pyrrolo-7-hydroxyindolinalkohol (10)
 25 mg (65 μMol) des Substratalkohols in 1,0 ml trockenen Acetonitrils werden unter N_2 -Atmosphäre bei Raumtemperatur mit 33 mg (100 μMole) CBr_4 und 26 mg (100 μMole)
 10 Triphenylphosphin (Ph_3P) versetzt. Nach 30-minütigem Rühren werden weitere 11 mg CBr_4 und 8 mg Ph_3P zugegeben. Nach insgesamt 60 min wird das Reaktionsgemisch in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ aufgenommen. Die organische Phase wird abgetrennt, über Na_2SO_4 getrocknet und eingeeengt. Der hierbei
 15 angefallene Rückstand wird auf drei 20 cm $\times$ 20 cm-Silikagelplatten (250 μm) aufgetragen und mit 50% Aceton/Cyclohexan eluiert. Es werden 8 mg des den höheren R_F -Wert aufweisenden Produkts (0,64; Alkohol R_F -Wert: 0,45) erhalten. Hierbei handelt es sich um das 4,5-Pyrrolo-7-hydroxyindolin-
 20 bromid (11) (U-62,694).

Kernresonanzspektrum (CDCl_3): 8,5 (br. s, 1H), 7,1 (s, 1H), 6,9 (s, 1H), 4,23 (d, 2H, $J = 6$ Hz), 4,0–3,5 (m, 3H), 2,89 (s, 3H), 2,38 (s, 3H).

Beilstein-Test: positiv.

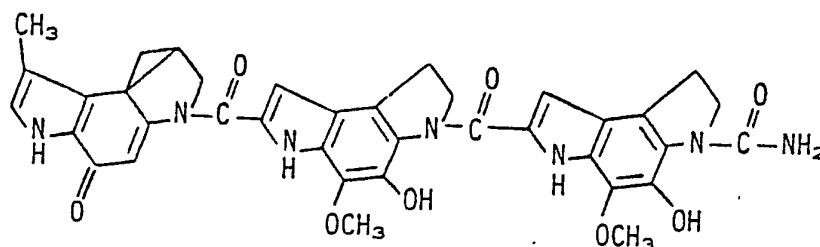
- 25 Massenspektrum: Berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3$ $^{79}\text{BrSSi}$: 430.0382, gefunden 430.0375
 (Mono-TMS); m/e M^+ 430/432 (14%), 271 (90%), 147 (100%).

- Diese Verbindung wird im Rahmen einer Standardverdünnungsreihe gegen L1210 Mäuseleukämiezellen in einer Kultur getestet, wobei folgende Ergebnisse erhalten werden:
 30 ID_{50} ($\mu\text{g/ml}$) = 0,12 ID_{90} ($\mu\text{g/ml}$) = 0,37.

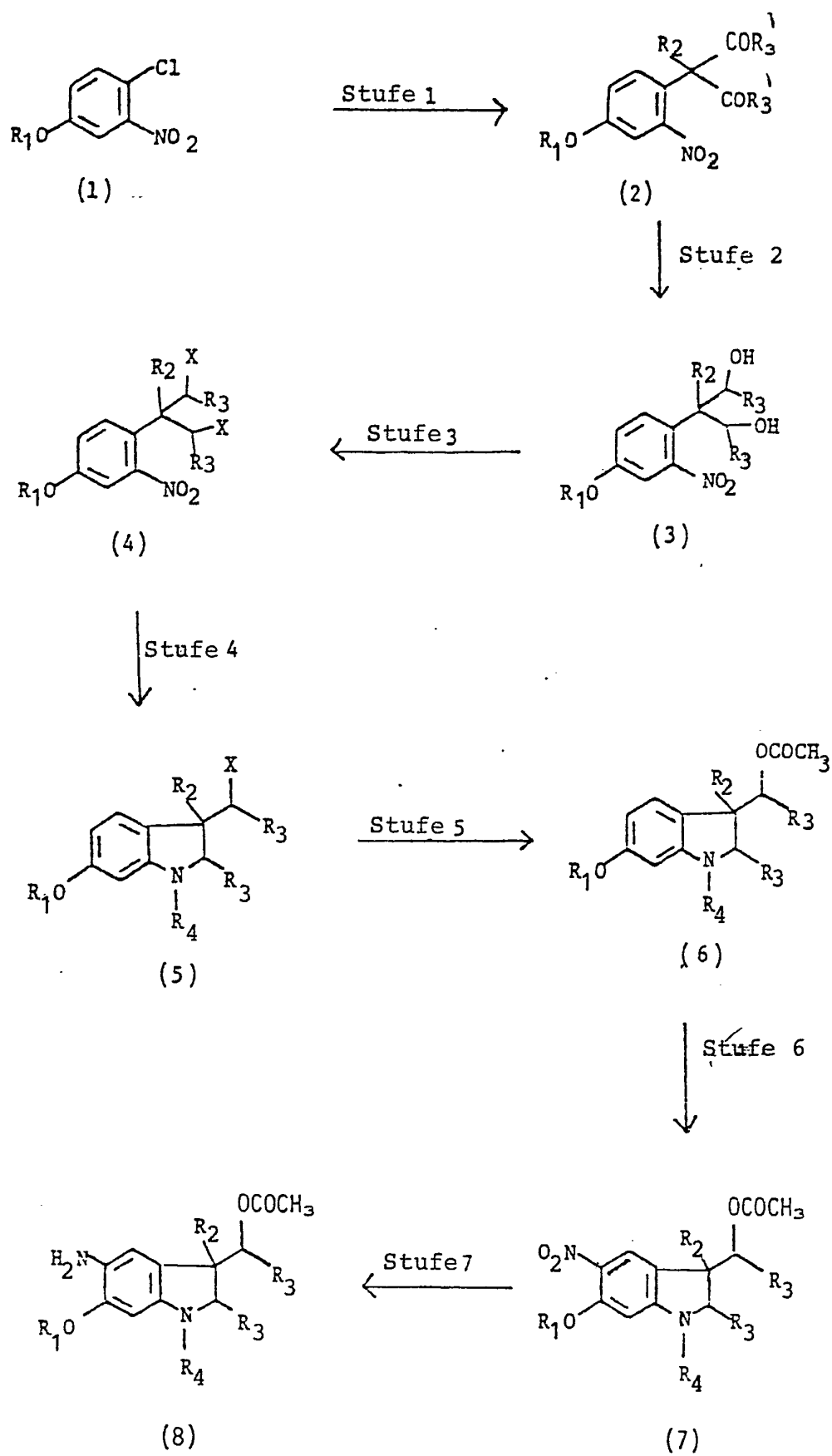
Beispiel 2b

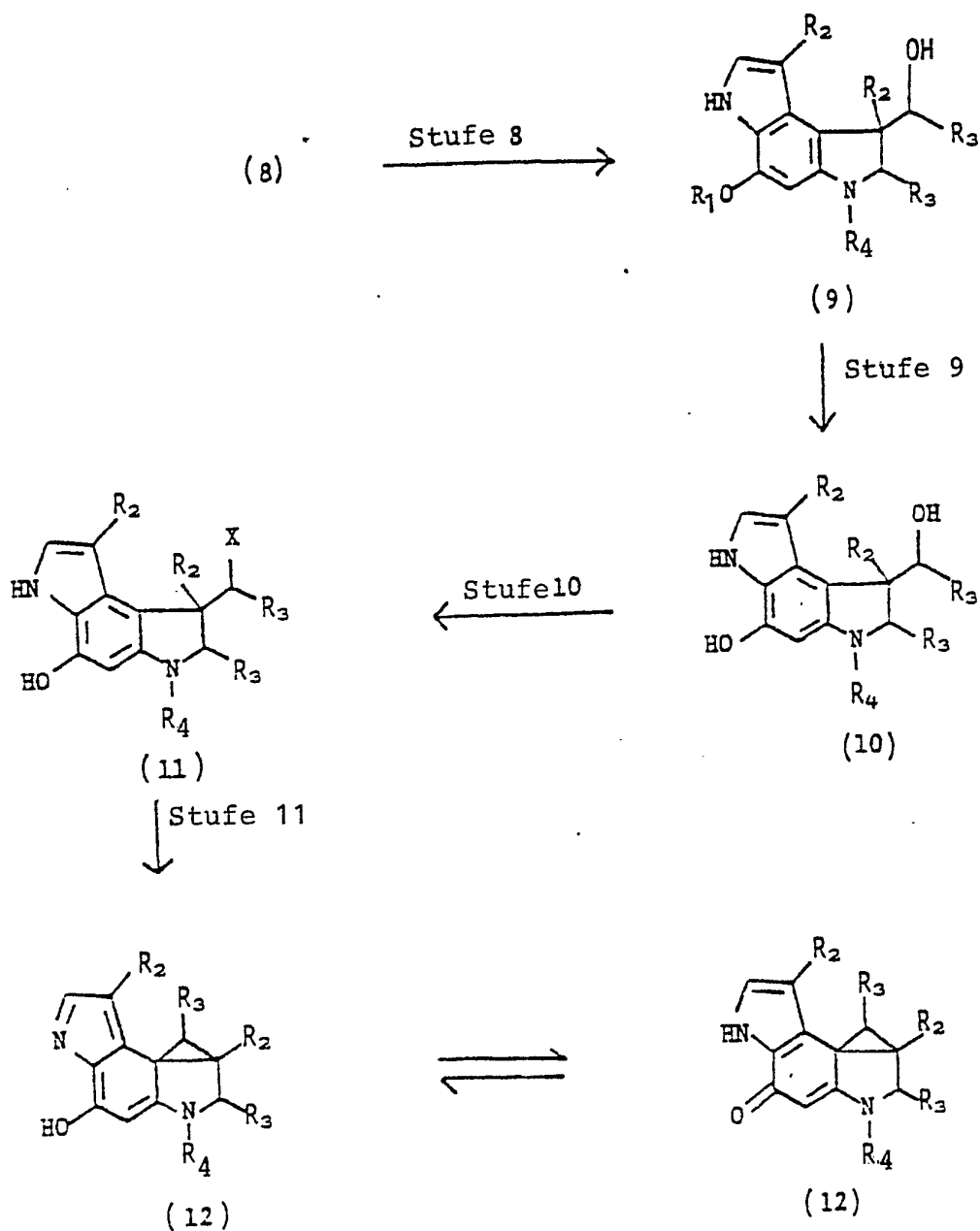
- 35 Anderes Verfahren zur Herstellung der Verbindung (12).
 Das 4,5-Pyrrolo-7-hydroxyindolinbromid (oder Mesylat) (0,1 mMol) in 1 ml Methylenchlorid wird mit 0,1 mMol Diisopropylethylamin versetzt, worauf das Ganze unter N_2 -Atmosphäre 24 h lang bei Raumtemperatur gerührt wird. Nun
 40 wird die Reaktionslösung in 10 ml Methylenchlorid aufgenommen, mit 0,1 n HCl gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und zu dem gewünschten Produkt eingeeengt. Eine weitere Reinigung lässt sich durch Silikagelchromatographie bewerkstelligen.
 45 Die Verbindungen (11) und (12) zeigen antibakterielle Wirksamkeit gegen *B. subtilis*, *K. pneumonia*, *S. lutea*, *S. aureus* und *M. avium*.

Figur 1



Figur 2



**Definitionen:**

R₁ = CH₃-, -CH₂Ph, CH₂=CHCH₂-, -CH₂SCH₃,
 -CH₂OCH₃, -CH₂OCH₂CH₂OCH₃, -CH₂CCl₃,
 -CH₂CH₂Si(R₂)₃

R₂ = Alkyl (C₁-C₅), Phenyl, Wasserstoff

R₃ = O-Alkyl (C₁-C₂), Alkyl (C₁-C₅), Phenyl, Wasserstoff (Bemerkung: R₃' = O-Alkyl lediglich bei Verbindung (2))

R₃ = Wasserstoff, Alkyl (C₁-C₅), Phenyl

R₄ = SO₂R₂, SO₂CH₂COPh, OOCCH₂Z,

X = OSO₂R₂, Cl, Br, I

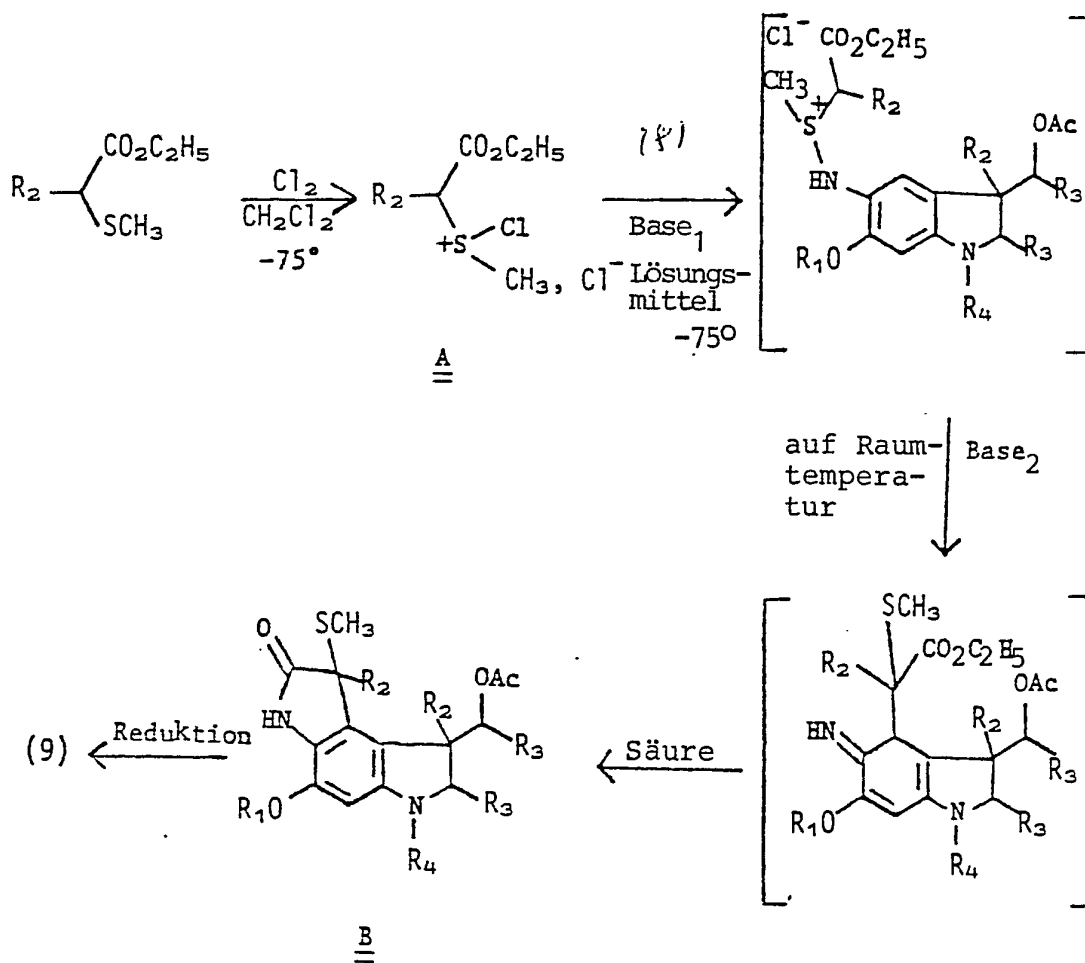
Z = CH₂I, CCl₃, CH₂SO₂R₂, Ph, Fluorenylmethyl

⁵⁵

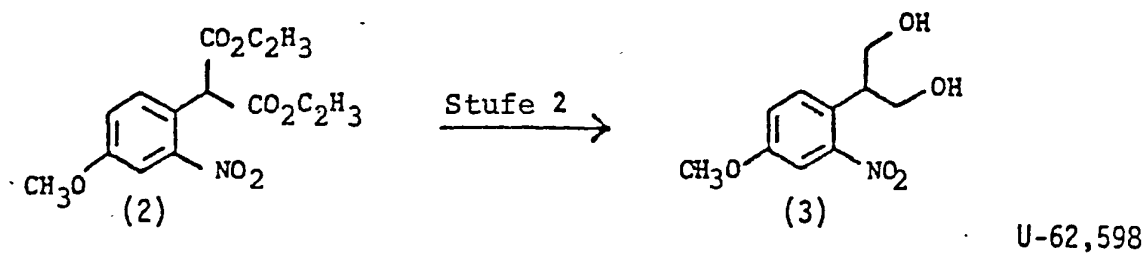
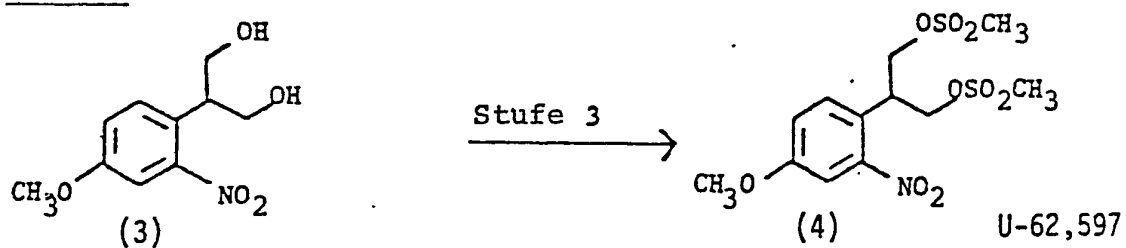
Unter «Alkylresten mit 1 oder 2 Kohlenstoffatom(en)» bzw. «Alkylresten mit 1 bis 5 Kohlenstoffatom(en)» sind beispielsweise Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl- und Pentylreste sowie deren verzweigte Isomere zu verstehen.

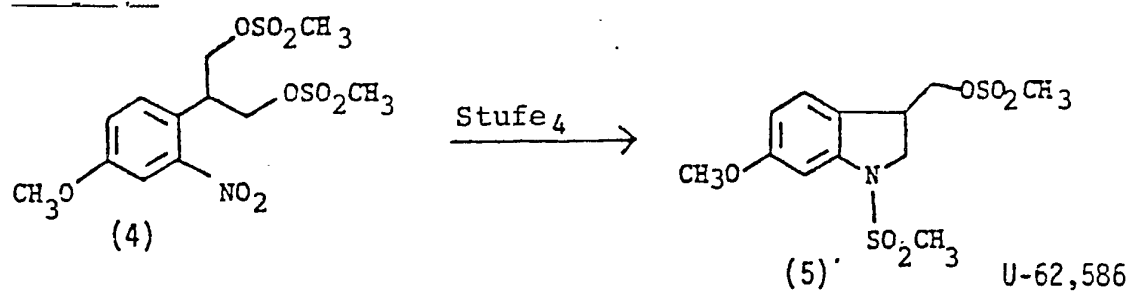
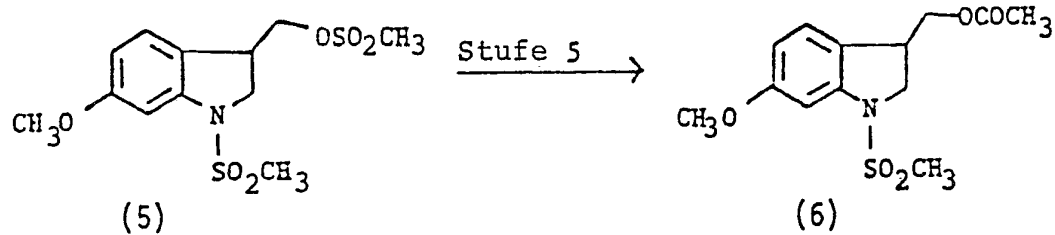
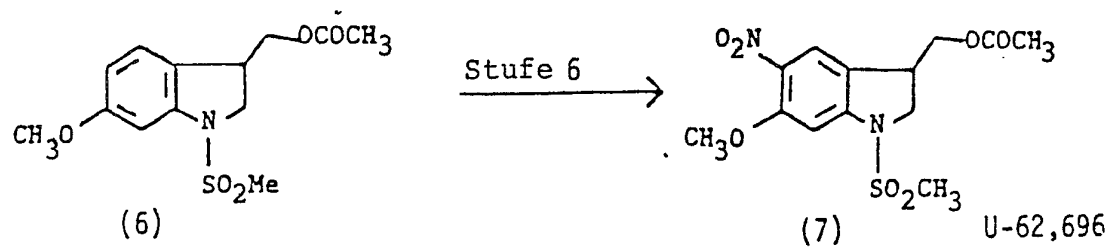
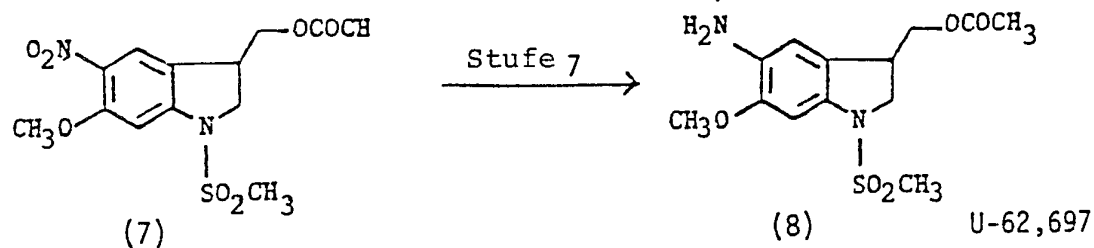
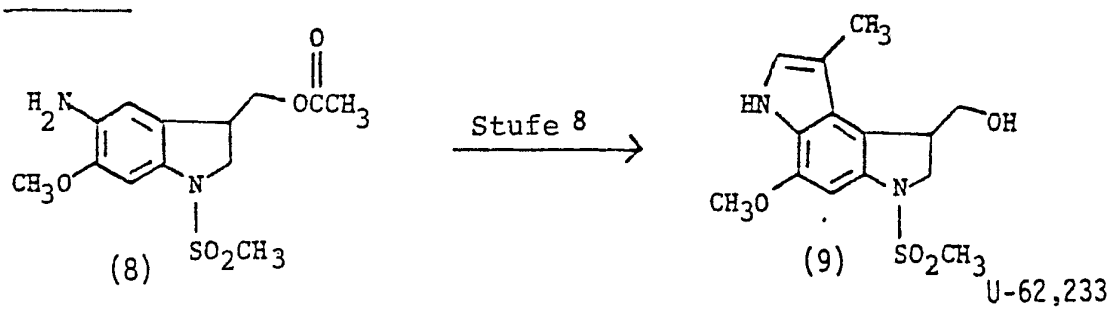
Figur 3

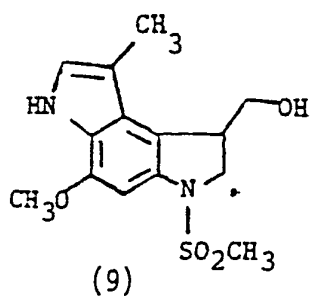
(Stufe 8)



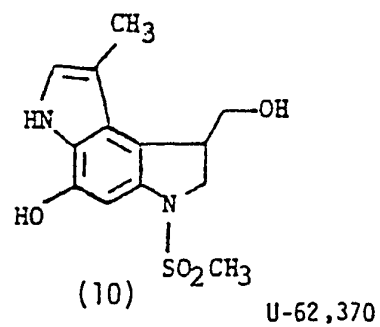
Figur 4

Präparat 1Präparat 2

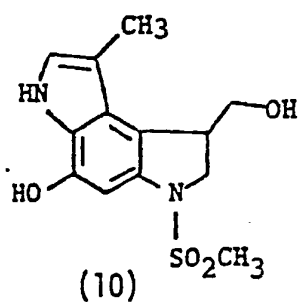
Präparat 3Präparat 4Präparat 5Präparat 6Präparat 7

Präparat 8

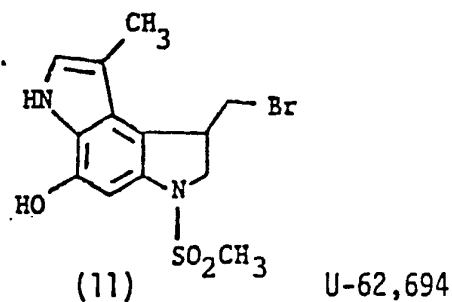
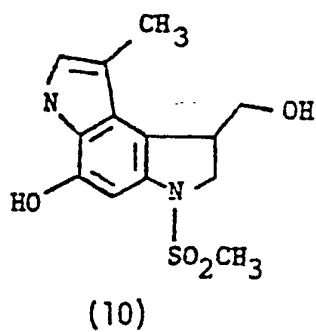
Stufe 9
→

Beispiel 2a

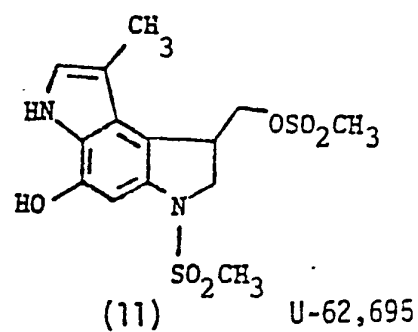
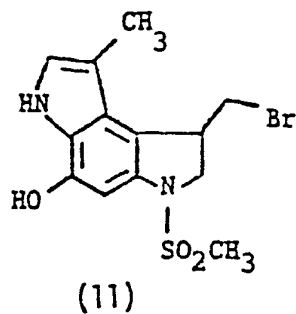
15



Stufe 10
→

Präparat 9

Stufe 10
→

Beispiel 2b

Stufe 11
→

