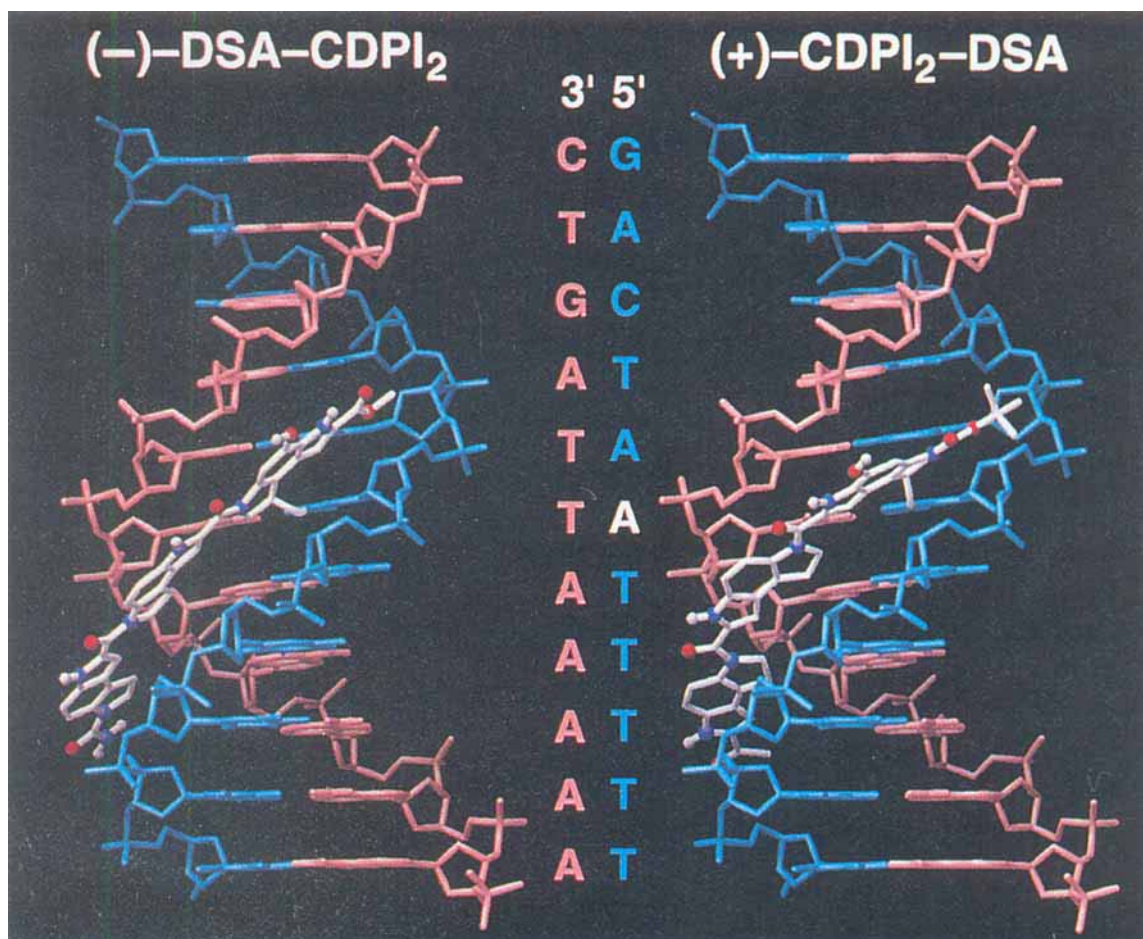


Einfaches Umdrehen der Anordnung der DNA-bindenden Strukturelemente (DSA-CDPI<sub>2</sub>→CDPI<sub>2</sub>-DSA) führt dazu, daß sich ein Substrat trotz der in der Natur vorkommenden Konfiguration der Alkylierungseinheit wie das Enantiomer des Naturstoffs verhält. Die Erklärung liefern Modeling-Studien zur Bindung der Enantiomere an DNA.



# CC-1065 und die Duocarmycine: mechanistische Studien zum Verständnis ihrer biologischen Funktion\*\*

Dale L. Boger\* und Douglas S. Johnson

Wir fassen hier Arbeiten zusammen, die sich mit den DNA-Alkylierungs-Eigenschaften einer Klasse wirksamer Cytostatica/Antibiotica, zu denen CC-1065 und die Duocarmycine zählen, befassen, sowie Untersuchungen, die für diese Verbindungen die elementaren Zusammenhänge zwischen Struktur, funktioneller Reaktivität und biologischem Verhalten ermittelten. Neben dem Studium der Naturstoffe selbst haben Untersuchungen mit strukturell stark veränderten, synthetischen Substraten und den nicht in der Natur vorkommenden („nichtnatürlichen“) Enantiomeren der Naturstoffe und verwandter Analoga dazu beigetragen, die strukturelle Grundlage für die sequenzselektive Alkylierung von Duplex-DNA zu bestimmen, und den Schlüssel zum Verständnis

der elementaren Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur, funktioneller Reaktivität und biologischem Verhalten geliefert. Die charakteristische DNA-Alkylierung erfolgt durch reversible, stereoelektronisch gesteuerte Adenin-N3-Addition an das am wenigsten substituierte Kohlenstoffatom des aktivierten Antibiotikum-Cyclopropanrings innerhalb AT-reicher Bindungsstellen in der kleinen Furche. Sowohl die natürlichen als auch die nichtnatürlichen Enantiomere alkylieren DNA, und in beiden Fällen wird die Sequenzselektivität durch die bevorzugte nichtkovalente Bindung der Substrate an AT-reiche Regionen innerhalb der schmaleren und tieferen kleinen Furche und durch die Zugänglichkeit der Alkylierungsstelle beim Eindringen in diese Furche ge-

steuert und dominiert. Unter den elementaren Beziehungen zwischen Struktur und Eigenschaften fällt besonders der direkte Zusammenhang zwischen chemischer oder funktioneller Stabilität und biologischer Wirksamkeit auf. In kurzer Zeit wurden vereinfachte, auf Naturstoff-Leitbildern basierende und leicht zugängliche synthetische Substrate mit einer vergleichbaren und außergewöhnlichen biologischen Wirksamkeit ( $IC_{50} = 1-50 \text{ pM}$ ) und einer verbesserten Wirkung entwickelt. Die bisher definierten elementaren Zusammenhänge könnten den Grundstein für künftige Entwicklungen und Fortschritte legen.

**Stichworte:** Antibiotica · Cytostatica · DNA-Alkylierung · Duocarmycine

## 1. Einleitung

Auf der Suche nach dem Ursprung der sequenzselektiven Erkennung von Duplex-DNA durch kleine organische Moleküle, zu denen auch eine große Zahl natürlich vorkommender Cytostatica/Antibiotica zählt, sind erhebliche Fortschritte erzielt worden<sup>[1-5]</sup>. Das Interesse daran resultiert vor allem aus dem Wunsch, die Basis für die therapeutischen Eigenschaften natürlich vorkommender Cytostatica/Antibiotica zu verstehen, von denen nachgewiesen ist, daß sie an DNA binden, die Art der DNA-Schädigungen zu ermitteln, die durch toxische, mutagene oder carcinogene Substanzen ausgelöst werden<sup>[6]</sup>, die Transkription, Translation oder Proteinexpression zu verändern und diese Auswirkungen für therapeutische Zwecke zu nutzen.

Bei der Untersuchung von DNA-bindenden Substanzen müssen drei elementare Fragen erörtert werden: die Ursprünge der

Bindungsaffinität, der Bindungsselektivität und der Reaktionsselektivität einschließlich DNA-Alkylierung oder -Spaltung. Jeder dieser Faktoren kann unabhängig die Steuerung der sequenzselektiven DNA-Erkennung übernehmen, und die relative Bedeutung sowie der Ursprung dieser Effekte sind ein wichtiges Thema der meisten Untersuchungen. Die Entwicklung experimenteller Verfahren für eine schnelle Sequenzierung von DNA<sup>[7-10]</sup>, für die Bestimmung der DNA-Bindungs-Selektivität und -Affinität – darunter auch Footprinting- und Affinitäts/Spaltungstechniken<sup>[11, 12]</sup> – und für die Bestimmung modifizierter DNA-Abschnitte<sup>[13]</sup> hat in Verbindung mit der Charakterisierung von definierten DNA-Komplexen durch Röntgenstrukturanalyse<sup>[14, 15]</sup>, NMR-Spektroskopie<sup>[16, 17]</sup> und Molecular Modeling<sup>[18, 19]</sup> zu einem besseren Verständnis der für die sequenzselektive Erkennung von DNA wesentlichen molekularen Wechselwirkungen geführt.

Bei von Naturstoffen abgeleiteten DNA-bindenden Substanzen bieten die Synthese und anschließende Untersuchung von Schlüsselteilstrukturen, von Substanzen mit tiefgreifenden Strukturänderungen sowie von deren Enantiomeren eine leistungsfähige Ergänzung zum oben genannten Handwerkszeug.

[\*] Prof. D. L. Boger, D. S. Johnson

Department of Chemistry, The Scripps Research Institute  
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)  
Telefax: Int. + 619/784-7550  
E-mail: boger@scripps.edu

[\*\*] Ein Anhang enthält alle wichtigen Substanzabkürzungen.

Mit Hilfe von gut durchdachten, tiefgreifenden Strukturänderungen können sowohl die strukturelle Grundlage für die sequenzselektive Erkennung von DNA als auch die elementaren Zusammenhänge zwischen Struktur, funktioneller Reaktivität und biologischen Eigenschaften direkt untersucht und bestimmt werden. Dies ist besonders wichtig im Fall von Naturstoffen, die durch zielgerichtete Screening-Verfahren identifiziert wurden. Anders als bei der Untersuchung der biologischen Bedeutung von Primärmetaboliten führen die Gegenwart von Sekundärmetaboliten und Annahmen über den Ursprung der identifizierten Leitstruktur häufig zu falschen Vorstellungen. Die Natur liefert mit ihrem umfangreichen Angebot an Sekundärmetaboliten eine mannigfaltige Sammlung kleiner organischer Moleküle für Zufalls-Screening. Nicht immer, vielleicht sogar nur selten, besteht ein Zusammenhang zwischen der Funktion der identifizierten Naturstoffe und der biologischen Basis der Screening-Verfahren, die zu ihrer Entdeckung und Identifizierung führten. Infolgedessen kann es ein Fehler sein anzunehmen, daß die Natur den Wirkstoff für Zwecke, die mit dem biologischen Prozeß, für den das Screening angesetzt wurde, im Zusammenhang stehen, optimiert oder gar entwickelt hat. Es ist vielmehr richtiger anzunehmen, daß uns die Natur nur ein neues Leitbild oder eine neue Lösung geliefert hat, die noch nicht optimiert sind. Es bleibt eine herausfordernde Aufgabe, die schönen Lösungen und kunstvollen Designelemente, die uns die Natur in Form eines Naturstoffs zur Verfügung stellt, zu durchschauen und die Lösung des Problems durch rationales Design zu verbessern, um noch selektivere, effizientere und leistungsstärkere Substrate, die spezifisch auf das gerade interessierende Problem oder Zielmolekül abgestimmt sind, zu erhalten.

Zu einer der jüngsten Wirkstoffklassen, von denen nachgewiesen wurde, daß sie DNA alkylieren, zählen (+)-CC-1065 **1**<sup>[20–23]</sup>, (+)-Duocarmycin A **2**<sup>[24–29]</sup> und (+)-Duocarmycin SA **3**<sup>[30–33]</sup> (Abb. 1). Wegen ihrer bemerkenswerten cytotoxischen Wirksamkeit sind erhebliche Anstrengungen unternom-

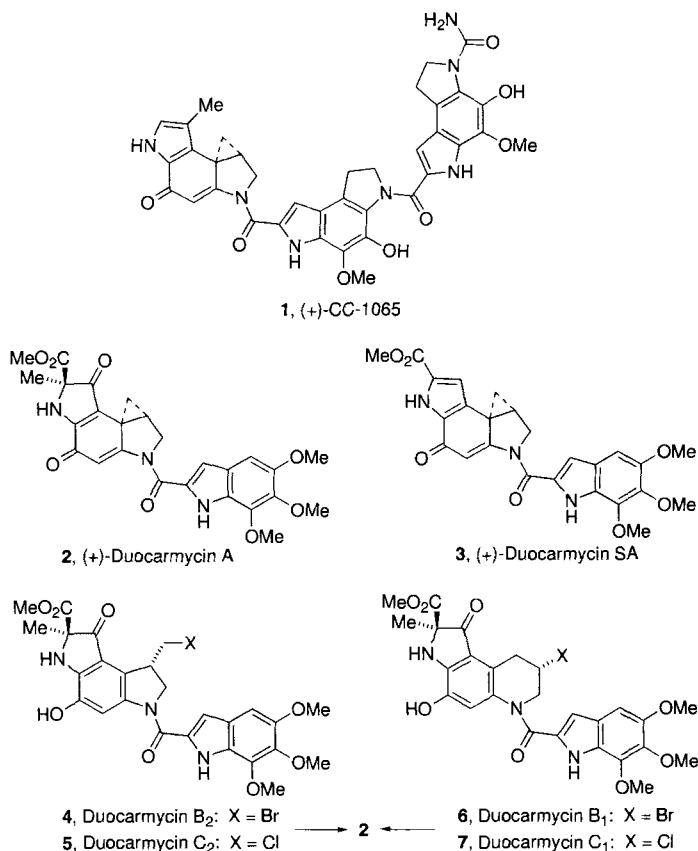


Abb. 1. Strukturen von CC-1065 und den Duocarmycinen.

men worden, um ihre Eigenschaften zu bestimmen<sup>[34–50]</sup>. Bei diesen Untersuchungen fand man heraus, daß die Verbindungen ihre biologische Wirkung durch eine sequenzselektive Alkylierung von DNA ausüben. Es zeigte sich, daß die reversible, stereoelektronisch gesteuerte Adenin-N3-Addition an das am we-

Dale L. Boger, geboren am 22. August 1953 in Hutchinson, Kansas, erhielt 1975 seinen BSc in Chemie (mit Auszeichnung) von der University of Kansas und promovierte 1980 in Chemie an der Harvard University. Danach ging er bis 1985 zurück an die University of Kansas, und zwar an das Department of Medicinal Chemistry, anschließend wechselte er an das Department of Chemistry der Purdue University, und seit 1991 arbeitet er als Richard and Alice Cramer Professor of Chemistry am Scripps Research Institute. Seine wissenschaftlichen Interessen liegen auf dem Gebiet der Organischen und Bioorganischen Chemie, wozu die Entwicklung synthetischer Methoden, die Totalsynthese von Naturstoffen, Heterocyclenchemie, medizinische Chemie, die Untersuchung von DNA-Substrat- und Protein-Ligand-Wechselwirkungen sowie Antitumorwirkstoffe gehören.



D. L. Boger



D. S. Johnson

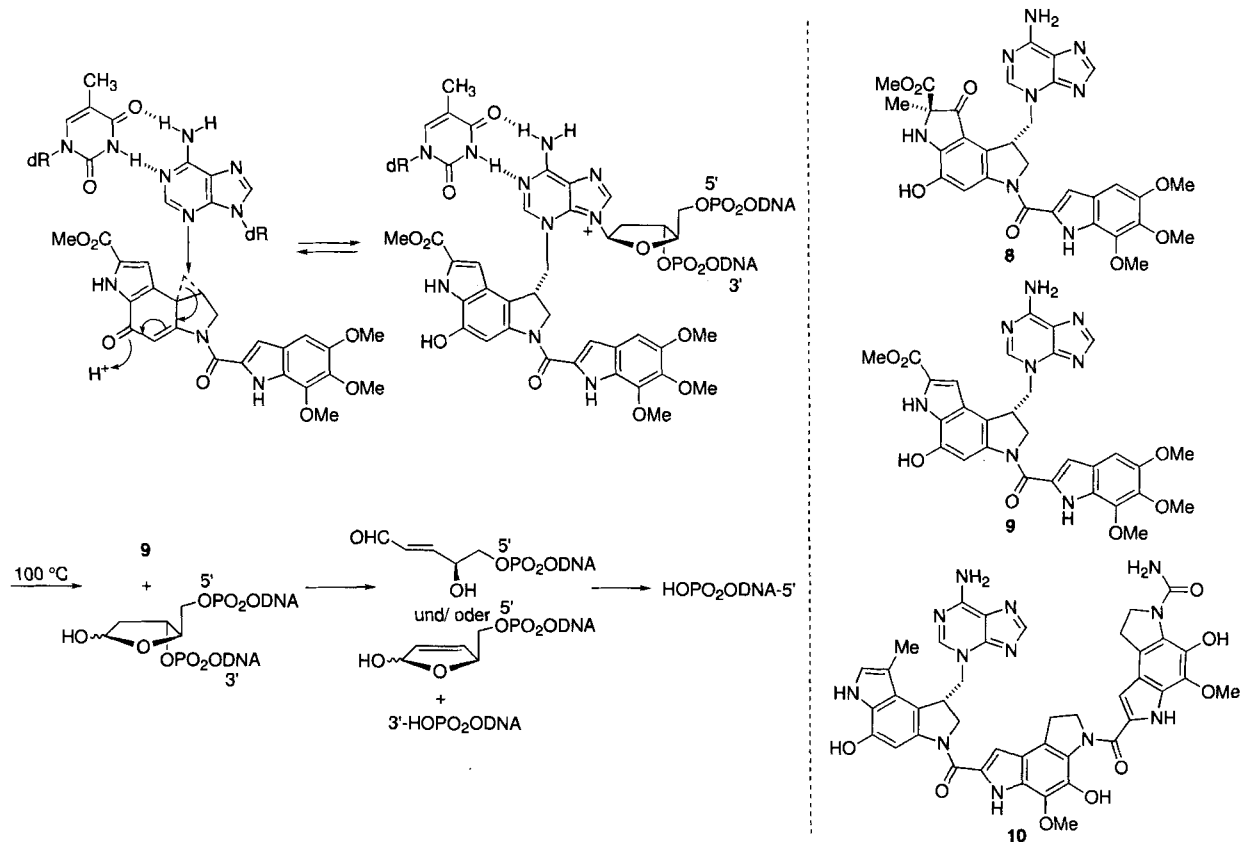
Douglas S. Johnson, geboren am 24. August 1969 in Roseville, Minnesota, erhielt seinen BSc in Chemie von der University of Minnesota (1991, summa cum laude) in der Arbeitsgruppe von Professor T. R. Hoyer. Er promovierte zur Zeit bei D. L. Boger am Scripps Research Institute über die Synthese und Bewertung von Antitumorwirkstoffen und DNA-bindenden Substraten. Zu seinen wissenschaftlichen Interessen zählen die Synthese biologisch wichtiger Moleküle sowie gezielt entworfener Analoga zur Untersuchung ihrer Wirkmechanismen.

nigsten substituierte Cyclopropan-Kohlenstoffatom innerhalb ausgewählter, AT-reicher Bindungsstellen in der kleinen Furche stattfindet. Es sind erhebliche Anstrengungen unternommen worden, um den Ursprung der Selektivität bei der DNA-Alkylierung herauszufinden, den Zusammenhang zwischen der DNA-Alkylierung und den sich daraus ergebenden biologischen Eigenschaften zu ergründen<sup>[51]</sup> und die elementaren Prinzipien hinter den Beziehungen zwischen Struktur, chemischer Reaktivität und biologischer Aktivität zu definieren. Die ersten, begrenzten Untersuchungen, die mit dem aus Naturstoffen gewonnenen Duocarmycin SA **3**, dem jüngsten Vertreter dieser Wirkstoffklasse, durchgeführt wurden, ergaben eine Kombination von Eigenschaften, die diesen Wirkstoff zum aufregendsten unter den bisher identifizierten Naturstoffen macht. Abgesehen davon, daß ihm die für (+)-CC-1065 **1** charakteristische verzögerte Toxizität fehlt<sup>[52]</sup>, ist **3** der stabilste und wirksamste Vertreter dieser Wirkstoffklasse. (Die Bezeichnung Duocarmycin SA ist eine Kurzform des ursprünglichen Namens „Duocarmycin Stable A“, der der Verbindung vor ihrer strukturellen Charakterisierung gegeben worden war.) Wie wir zeigen werden, führt diese Kombination von Eigenschaften nicht zufällig zu der höheren biologischen Wirksamkeit, vielmehr ist die verbesserte funktionelle Stabilität von **3** direkt für diesen Effekt verantwortlich. Die hier diskutierten Arbeiten sind eine Ergänzung zu Untersuchungen, die mit anderen DNA-Alkylierungsmitteln, wie Stickstoff-Senfolen, Mitomycinen, Aflatoxin, Epoxiden polyaromatischer Kohlenwasserstoffdiole, Azinomycin, Saframycin, Anthramycin und verwandten Verbindungen sowie Dichloroplatin- und verwandten Verbindungen<sup>[1–6]</sup>, durchgeführt wurden.

## 2. DNA-Alkylierungs-Eigenschaften

### 2.1. Die Selektivität der Naturstoffe bei der DNA-Alkylierung

Für die vorherrschende Art der DNA-Alkylierung durch **1–3** sind Auftreten, Sequenzselektivität, Mengenverhältnisse, Reversibilität und Alkylierungsgrad aufgeklärt worden<sup>[53–72]</sup>. Die Identifizierung der Alkylierungsposition und die Bestimmung der relativen Selektivität erfolgten mit markierter DNA durch thermisch induzierte Depurinierung und Strangspaltung nach dem Einwirken der Substrate (Schema 1). Die Alkylierungsselektivitäten von (+)-Duocarmycin A **2** und (+)-Duocarmycin SA **3** erwiesen sich als kaum unterscheidbar<sup>[54, 56]</sup>. Die Alkylierung wurde in allen Fällen an einem Adeninrest nachgewiesen, der von zwei 5'-A- oder -T-Basen flankiert war, und es zeigte sich eine Bevorzugung dieser Dreibasensequenz in der Reihenfolge 5'-AAA > 5'-TTA > 5'-TAA > 5'-ATA. Darüber hinaus dominierten als vierte 5'-Base A und T ganz deutlich über G und C, und man fand heraus, daß sich Bindungsstellen hoher und niedriger Affinität in diesem Punkt unterscheiden. Für die dem alkylierten Adeninrest benachbarte 3'-Base konnte eine zusätzliche schwache Präferenz für Purin (Pu) gegenüber Pyrimidin (Py) nachgewiesen werden, die sich am deutlichsten bei Bindungsstellen niedriger Affinität zeigt. In Tabelle 1 sind die aus den Alkylierungen mit **2**<sup>[56]</sup> und **3**<sup>[54]</sup> abgeleiteten Sequenzübereinstimmungen zusammengefaßt. Obwohl beide Substrate an denselben Positionen alkylierten, konnten zwei wichtige Unterschiede festgestellt werden: Das weniger reaktive Substrat, (+)-Duocarmycin SA **3**, alkyliert DNA mit größte-



Schema 1. Ablauf der DNA-Alkylierung durch **3** und Strukturen der charakterisierten Adeninaddukte von **1** (**10**), **2** (**8**) und **3** (**9**).



Tabelle 1. Sequenzübereinstimmung bei der DNA-Alkylierung durch 1–3 und ihre nichtnatürlichen Enantiomere [a].

Substrat	Base [b]	5'	4	3	2	1	0	–1	–2	–3	–4	3'
1	A/T (56)	67	78	94	98	100	55	–	–	–	–	–
	Übereinstimmung	A/T ≥ G/C	A/T > G/C	A/T	A/T	A	Pu ≥ Py	–	–	–	–	–
2 und 3	A/T (56)	58	79	100	100	100	69	–	–	–	–	–
	Übereinstimmung	N	A/T > G/C	A/T	A/T	A	Pu > Py	–	–	–	–	–
ent-3	A/T (56)	–	–	93	100	96	73	56	–	–	–	–
	Übereinstimmung	–	–	A/T	A	A/T	A/T > G/C	N	–	–	–	–
ent-1	A/T (56)	–	–	88	100	93	82	73	56	–	–	–
	Übereinstimmung	–	–	A/T	A	A/T	A/T > G/C	A/T > G/C	N	–	–	–

[a] Die Zahlen unter den Positionen geben den Prozentsatz an, mit dem die jeweilige Base in dieser Position relativ zur Adenin-N3-Alkylierungsstelle auftritt. [b] In Klammern prozentualer Anteil in der untersuchten DNA.

liert DNA mit größerer Wirksamkeit (10 bis 100mal) und bezüglich der zugänglichen Bindungsstellen mit höherer Selektivität. Darüber hinaus fand man heraus, daß die verwandten, natürlich vorkommenden Substrate 4–7 (siehe Abb. 1) eine DNA-Alkylierungs-Selektivität zeigen, die von der von 2 nicht zu unterscheiden ist, was auf eine leichte Bildung des 2 charakterisierenden Cyclopropanrings unter den Versuchsbedingungen zurückgeführt werden könnte<sup>[54, 56]</sup>. Dieses Verhalten der Verbindungen 4–7 setzt voraus, daß ein Ringschluß zu 2 erfolgt, bevor die DNA-Alkylierung stattfindet, und daß 2 die biologisch wichtige und wirksame Form dieser Substrate ist. Die bei 4–7 gemachten Beobachtungen treffen auf alle bisher untersuchten Wirkstoffe zu. In der Tat sind nicht nur die DNA-Alkylierungs-Selektivitäten der seco-Verbindungen 4–7 nicht von der von 2 zu unterscheiden, sondern oftmals werden auch für die DNA-Alkylierungs-Effizienz und die biologische Wirksamkeit keine Unterschiede beobachtet, was darauf hinweist, daß der Ringschluß zum Cyclopropanderivat kein limitierender Faktor ist. Ausschließlich im Fall der schwierigeren oder langsameren Spirocyclisierungen konnten Unterschiede in der DNA-Alkylierungs-Effizienz oder der biologischen Wirksamkeit beobachtet werden<sup>[33, 56]</sup>.

Die vorausgegangenen Untersuchungen mit (+)-CC-1065 1 ergaben eine ähnliche, aber sich über fünf AT-reiche Basenpaare erstreckende Alkylierungsselektivität<sup>[53, 64–72]</sup>. Tabelle 1 enthält auch die für 1 ermittelten Sequenzübereinstimmungen<sup>[53, 71, 72]</sup>. Jede Alkylierungsposition erwies sich als ein Adeninrest neben zwei 5'-A- oder -T-Basen. Die Präferenz für die Sequenzfolge in der drei Basenpaare umfassenden AT-reichen Umgebung der Alkylierungsposition entspricht der für 2 ermittelten: 5'-AAA = 5'-TTA > 5'-TAA > 5'-ATA. Darüber hinaus zeigte der Wirkstoff eine starke Bevorzugung von Positionen mit A oder T als vierter 5'-Base, eine geringere von solchen mit A oder T als fünfter 5'-Base und eine schwache von solchen mit einer Purinbase als 3'-Base. Es stellte sich heraus, daß die AT-Präferenz hinsichtlich der vierten und fünften 5'-Base zwischen Bindungsstellen hoher und niedriger Affinität unterscheidet und daß die Bevorzugung einer 3'-Purin- gegenüber einer 3'-Pyrimidinbase vor der Alkylierungsposition an Bindungsstellen mit geringerer Affinität am auffälligsten waren. Die Notwendigkeit von AT-Basenpaaren innerhalb der ersten drei Basenpaare bedeutet, daß eine Kombination der ursprünglichen 3'-Adenin-N3-Alkylierungsstelle mit einer benachbarten, zwei 5'-Basen umfassenden AT-Bindungsstelle notwendig ist, um die Bindung der zentralen Untereinheit des Substrats zu ermöglichen. Die schwächere AT-Präferenz für die vierte und

fünfte 5'-Base spiegelt – wie an Bindungsstellen mit hoher Affinität beobachtet werden konnte – die Bevorzugung einer AT-reichen Bindungsstelle für die dritte, ebenfalls in der kleinen Furche gebundene Untereinheit wider. Die Untersuchung kürzerer und längerer Analoga von CC-1065 führte zu der Erkenntnis, daß die AT-Selektivität gut mit der Länge des Substrats und damit der Größe, die die Bindungsstelle haben muß, korrespondiert<sup>[53, 71]</sup>.

Aus Abbildung 2 werden die Ähnlichkeiten von 2 und 3 und die feinen Unterschiede zu 1 im Verhalten gegenüber DNA deutlich: (+)-Duocarmycin SA 3 alkyliert DNA etwa zehnmal effektiver als (+)-Duocarmycin A 2 und ein klein wenig effektiver als (+)-CC-1065 1, wie sich aus den zum Nachweis einer Alky-

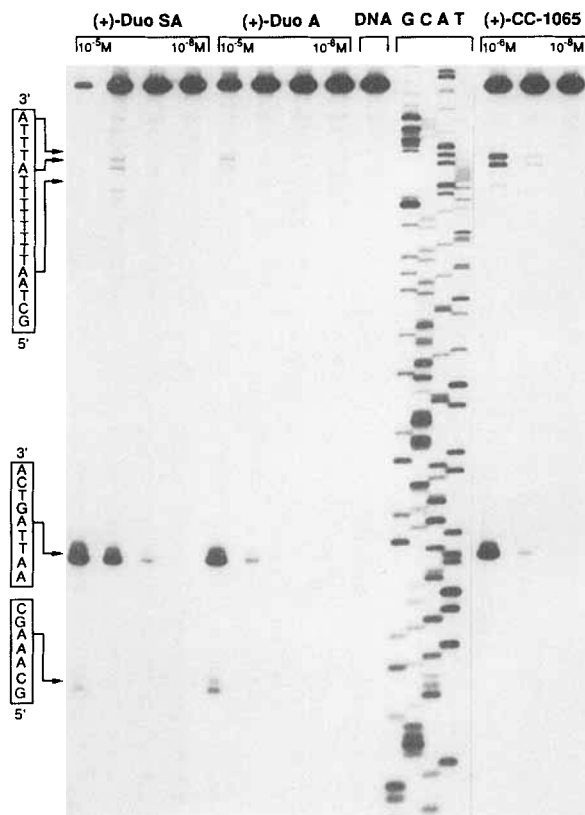


Abb. 2. Analyse des durch 30minütiges Erhitzen auf 100 °C ausgelösten Strangbruchs bei doppelsträngiger DNA (SV40-DNA-Fragment, 144 Basenpaare, Nucleotid-Nr. 5238–138, Klon w794) nach 24stündiger Inkubation mit dem Substrat bei 25 °C und Entfernung des nicht gebundenen Substrats durch EtOH-Fällung durch denaturierende PAGE (8%) und Autoradiographie. Spuren 1–4: 3 (1 × 10<sup>–5</sup>–1 × 10<sup>–8</sup> M); Spuren 5–8: 2 (1 × 10<sup>–5</sup>–1 × 10<sup>–8</sup> M); Spur 9: Vergleichs-DNA; Spuren 10–13: Sanger-G-, -C-, -A- und -T-Reaktionen; Spuren 14–16: 1 (1 × 10<sup>–6</sup>–1 × 10<sup>–8</sup> M).

lierung erforderlichen Konzentrationen ableiten läßt. Obwohl 3 und 2 dieselben Positionen alkylieren, unterscheidet 3 stärker zwischen den zur Verfügung stehenden Bindungsstellen. Dies ist aus den relativen Unterschieden in den Konzentrationen ersichtlich, die zum Nachweis der Nebenalkylierungsstellen erforderlich sind. Ähnlich gilt, daß die Alkylierungsstelle hoher Affinität in diesem DNA-Segment sowohl von 1 als auch von 2 und 3 alkyliert wird, daß sich aber dennoch bei der Alkylierung der untergeordneten Bindungsstellen Unterschiede erkennen lassen. Dazu zählt ein Fehlen der Alkylierung durch (+)-CC-1065 1 an der kürzeren, drei AT-Basen umfassenden Stelle 5'-GCAAA.

Es konnte gezeigt werden, daß die Alkylierung von intrazellulärer SV40-DNA im wesentlichen dieselbe Sequenzselektivität zeigt wie die von gereinigter SV40-DNA, nur daß höhere Konzentrationen an 1 erforderlich sind<sup>[74–76]</sup>. In-vitro-Analysen mit gereinigter DNA spiegeln somit die sequenzselektive Reaktivität von 1 gegenüber intrazellulärer DNA wider.

## 2.2. Die Selektivität der nichtnatürlichen Enantiomere bei der DNA-Alkylierung

Eine der entscheidenden Erkenntnisse, die durch die Verwendung synthetischer Substanzen gewonnen wurde, ist, daß auch die Enantiomere mit der entgegengesetzten Konfiguration wie der Naturstoff und die von ihm abgeleiteten Analoga wirksame DNA-Alkylierungsmittel und starke cytotoxische Wirkstoffe sein können<sup>[53, 54, 68, 71]</sup>. Außerdem erwies sich die Möglichkeit, das Verhalten der beiden Enantiomere zu vergleichen, als Schlüssel zum Verständnis des strukturellen Ursprungs der Sequenzselektivität bei der DNA-Alkylierung. Man fand heraus, daß (–)-Duocarmycin SA – in Übereinstimmung mit seiner relativen cytotoxischen Wirksamkeit – DNA bei Konzentrationen alkyliert, die etwa zehnmal so hoch sind wie die für das natürlich vorkommende Enantiomer<sup>[54]</sup>. In Tabelle 1 ist die Sequenzübereinstimmung für die Alkylierung durch *ent*-3 wiedergegeben. Die Alkylierungsstelle war in allen Fällen ein Adeninrest und im wesentlichen waren allen Alkylierungsstellen eine 3'- und eine 5'-A- oder -T-Base mit folgender Sequenzpräferenz benachbart: 5'-AAA > 5'-AAT > 5'-TAA > 5'-TAT. Daneben wurde eine zusätzliche starke Präferenz für eine A- oder T-Base als zweite 3'-Base beobachtet. In dieser Hinsicht verlief die Alkylierung mit (–)-Duocarmycin SA analog zur Alkylierung mit dem natürlich vorkommenden Enantiomer, nur daß die Bindungsorientierung über eine AT-reiche, 3.5 Basenpaare umfassende Bindungsstelle umgekehrt ist (5' → 3'). Während das (+)-Enantiomer eine AT-reiche, 3.5 Basenpaare umfassende Bindungsstelle ausgehend von der Adenin-N3-Alkylierungsstelle in 3' → 5'-Richtung über die benachbarten zwei bis drei 5'-Basen (d. h. 5'-AAAA) abdeckt, erstreckt sich die 3.5 Basenpaare umfassende Bindungsstelle für das nichtnatürliche (–)-Enantiomer in entgegengesetzter 5' → 3'-Richtung, und zwar ausgehend von der ersten 5'-Base vor der Adenin-N3-Alkylierungsstelle über diese bis zur ersten und zweiten benachbarten 3'-Base (d. h. 5'-AAAA). Die entgegengesetzte Bindungsorientierung ist notwendig, damit die Adenin-Bindung an das niedrigstsubstituierte Cyclopropan-Kohlenstoffatom erfolgen kann, und die Selektivität für AT-reiche Abschnitte ist die natürliche Folge der diastereomeren Beziehung der Addukte zueinander.

In ähnlicher Weise hatten vorausgegangene Untersuchungen gezeigt, daß auch (–)-CC-1065 DNA alkyliert, und zwar ähnlich effizient wie das natürliche Enantiomer, jedoch mit einer geringeren Geschwindigkeit<sup>[68, 71]</sup>. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen stellte sich heraus, daß die beiden Enantiomere von CC-1065 eine nicht unterscheidbare cytotoxische Wirksamkeit und In-vivo-Antitumor-Aktivität zeigen<sup>[68, 71]</sup>. Tabelle 1 enthält die Sequenzübereinstimmung für die Alkylierung durch (–)-CC-1065, die der von (–)-Duocarmycin SA ähnlich ist, nur daß sich die AT-Selektivität auf fünf Basenpaare erstreckt<sup>[53, 68]</sup>. Jede Alkylierungsstelle entsprach einer 5'-Adenin-N3-Alkylierung, wobei das Substrat in der kleinen Furche in der Weise gebunden war, daß es ausgehend von der Alkylierungsstelle in 5' → 3'-Richtung einen AT-reichen Abschnitt von fünf Basenpaaren abdeckte. Bei allen in den Sequenzierungsstudien nachgewiesenen Alkylierungsstellen handelte es sich um Adeninreste, und fast alle der ihnen benachbarten 3'- und 5'-Basen erwiesen sich als A- oder T-Basen, wobei eine Sequenzpräferenz in folgender Reihenfolge beobachtet wurde: 5'-AAA > 5'-TAA > 5'-AAT, 5'-TAT. Außerdem wurde eine starke Präferenz für eine A- oder T-Base als zweite und dritte 3'-Base nachgewiesen.

Anders als im Fall von Duocarmycin SA war bei Duocarmycin A das nichtnatürliche Enantiomer mehr als 100mal weniger effektiv bei der Alkylierung von DNA und mehr als 100mal weniger wirksam in cytotoxischen Tests<sup>[59]</sup> als das natürlich vorkommende Enantiomer<sup>[59]</sup>. Diese zunächst verwirrenden Befunde konnten eindeutigen Unterschieden in den von den beiden Enantiomeren gebildeten diastereomeren Addukten zugeschrieben werden, auf die Duocarmycin A besonders empfindlich reagiert<sup>[54, 73]</sup>. Die Inversion der Konfiguration an C6 von 2, die zum (+)-*epi*-Duocarmycin A 11 (Abb. 3) führt, hatte

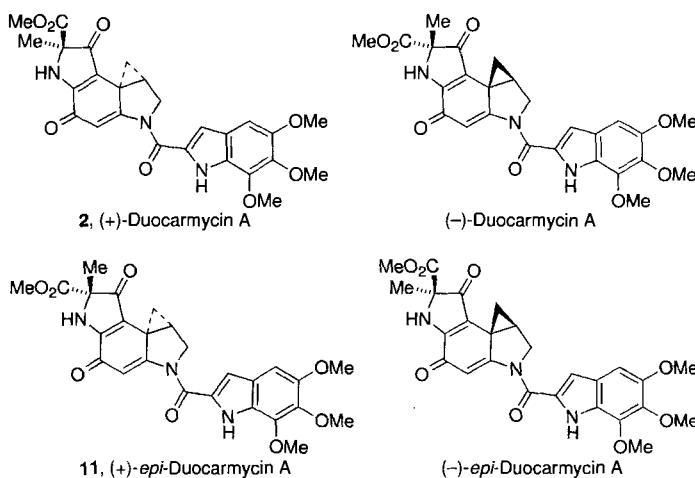


Abb. 3. Stereoisomere von (+)-Duocarmycin A 2.

keine Auswirkung auf die Sequenzselektivität bei der DNA-Alkylierung und nur einen geringen Einfluß auf die Effizienz der DNA-Alkylierung und die cytotoxische Wirksamkeit des Substrats (Tabelle 2).

Wie in den folgenden Abschnitten im einzelnen erläutert wird, erwiesen sich die DNA-Alkylierungseigenschaften und die Selektivität der nichtnatürlichen Enantiomere als außerordentlich

Tabelle 2. Cytotoxische Wirksamkeiten von **1–3** und ihren Isomeren sowie relative Effizienzen der DNA-Alkylierung durch sie.

Substrat	IC <sub>50</sub> , L1210 [pM]	rel. Alkylierungseffizienz
<b>3</b> , (+)-Duocarmycin SA	10	1
<i>ent</i> - <b>3</b> , (–)-Duocarmycin SA	100	0.1
<b>2</b> , (+)-Duocarmycin A	200	0.05
<i>ent</i> - <b>2</b> , (–)-Duocarmycin A	> 22000	< 0.0005
<b>11</b> , <i>epi</i> -(+)-Duocarmycin A	1600	0.01
<i>ent</i> - <b>11</b> , <i>epi</i> -(–)-Duocarmycin A	> 24000	< 0.0005
<b>1</b> , (+)-CC-1065	20	0.5
<i>ent</i> - <b>1</b> , (–)-CC-1065	20	0.5

wertvoll für die Bestimmung der für die Polynucleotiderkennung essentiellen Schlüsselbausteine und Strukturmerkmale. Die Synthese der nichtnatürlichen Enantiomere und ihre anschließende Bewertung Seite an Seite mit den natürlichen Isomeren führten außerdem zu tieferen Einsichten in das Verhalten der Naturstoffe selbst und zur Entwicklung von Modellen, die die für die DNA-Alkylierung erforderlichen Eigenschaften und den Ursprung der Selektivität genau beschreiben.

### 2.3. Die Alkylierung des Adenin-N3-Atoms

Da die zur Identifizierung der Alkylierungsstellen verwendete thermisch induzierte DNA-Spaltung nur Addukte erfaßt, die einer thermischen Spaltung von Glycosidbindungen zugänglich sind (Alkylierung von Adenin-N3 oder Guanin-N3 oder -N7), kann unter diesen Bedingungen das Vorkommen zusätzlicher Alkylierungsreaktionen nicht bemerkt werden. Aus diesem Grund wurde an der Quantifizierung der Adenin-N3-Alkylierung, dem Strukturbeweis durch Isolierung und Charakterisierung der thermisch erzeugten Addukte und der Suche nach nicht erfaßten Alkylierungsstellen gearbeitet. Diese Untersuchungen ergaben, daß die in Schema 1 dargestellte Adenin-N3-Alkylierung von im Überschuß vorhandener DNA durch (+)-Duocarmycin A **2**, (+)-Duocarmycin SA **3**, (–)-Duocarmycin SA und (+)-CC-1065 **1** 86–92 %<sup>[57]</sup>, 90–100 %<sup>[54]</sup>, 86–92 %<sup>[54]</sup> bzw. 80–90 %<sup>[66]</sup> des Verbrauchs dieser Substrate ausmacht und daß diese Alkylierung nahezu die einzige ist. Durch vollständige Charakterisierung der Addukte gelang die zweifelsfreie Bestimmung ihrer Strukturen als **8–10** (siehe Schema 1), was die Addition des Adenin-N3-Atoms an das nicht substituierte Cyclopropan-Kohlenstoffatom der Substrate bestätigte. Die Tatsache, daß die Verbindungen **6** und **7** ebenfalls das Addukt **8** liefern<sup>[56, 57]</sup>, erfordert, daß **6** und **7** zunächst zu **2** reagieren, bevor sie DNA alkylieren.

### 2.4. Adenin-N3- und Guanin-N3-Alkylierung

Alle drei Substrate und ihre entsprechenden seco-Vorstufen führen überwiegend oder ausschließlich zu Adenin-N3-Addukten (> 90 %). In einigen Fällen konnte jedoch mit **2** – und weniger ausgeprägt auch mit **1** – in geringem Umfang eine Guanin-N3-Alkylierung nachgewiesen werden, und zwar bei der Isolierung von thermisch freigesetztem Addukt nach einer Umsetzung von DNA mit dem Substrat im Überschuß<sup>[61, 62]</sup>, bei

Oligodesoxynucleotiden, denen eine Adenin-N3-Alkylierungsstelle mit hoher Affinität fehlt<sup>[62]</sup>, und wenn die Adenin-Alkylierungsstellen innerhalb der AT-reichen DNA-Regionen mit Substraten wie Distamycin geschützt wurden, die mit hoher Affinität an AT-reiche Stellen in der kleinen Furche binden<sup>[63]</sup>. Aus einer Untersuchung dieser untergeordneten Guanin-N3-Alkylierung mit **2** ging hervor, daß bei einer Änderung des Substrat/Basenpaar-Verhältnisses im Reaktionsgemisch von 1:10 auf 1:160 das Verhältnis von Adenin-N3- zu Guanin-N3-Alkylierung stetig von 1.4:1 auf 11:1 (92:8) anstieg<sup>[61]</sup>, woraus eindeutig hervorgeht, daß die Adenin-N3-Alkylierung, wenn möglich, bevorzugt ist<sup>[57]</sup>. Im Gegensatz dazu trat mit (+)-Duocarmycin SA **3** keine Guanin-N3-Alkylierung auf, wenn man es unter ähnlichen oder noch energischeren Reaktionsbedingungen einsetzte<sup>[54]</sup>. Selbst unter drastischen Reaktionsbedingungen wurde nicht reagiertes Substrat zurückgewonnen, und die Selektivität Adenin-N3/Guanin-N3-Alkylierung war > 25:1. Diese höhere Selektivität von **3** kann auf seine geringere Reaktivität zurückgeführt werden. Es ist bemerkenswert, daß selbst (+)-Duocarmycin A **2**, im Unterschuß eingesetzt, fast ausschließlich Adenin-N3-Alkylierung ergibt<sup>[57]</sup>. Da **3** sehr viel wirksamer ist als **2**, kann dessen untergeordnete Guanin-N3-Alkylierung für die biologischen Eigenschaften nicht wichtig sein und ist wahrscheinlich als nichtproduktive Konkurrenzreaktion zu sehen.

Die DNA-Alkylierungs-Selektivität wird somit vermutlich durch die relative Reaktivität der Substrate beeinflusst. Untersuchungen unter den Bedingungen eines begrenzten Wirkstoffangebots und eines Überschusses an DNA, unter denen keine oder nur eine sehr geringe Guanin-N3-Alkylierung stattfindet, haben gezeigt, daß die stabileren und weniger reaktiven Wirkstoffe effektiver sind und selektiver zwischen den vorhandenen Alkylierungsstellen unterscheiden. Es könnte von großem Wert sein, diese Unterschiede zu nutzen.

### 2.5. Die Reversibilität der Alkylierungsreaktion: durch nichtkovalente Wechselwirkungen unterstützte Bindungsbildung

Auch wenn sich die DNA-Alkylierungen durch CC-1065 und die Duocarmycine sehr ähnlich sind, gibt es doch ein wichtiges Merkmal, in dem sich die beiden Substrate deutlich unterscheiden. Während **1** DNA irreversibel alkyliert, ist die Alkylierung mit den Duocarmycinen **2** und **3** reversibel<sup>[54, 58]</sup>. Die Leichtigkeit der Rückreaktion erweist sich als abhängig von der relativen Reaktivität des Substrats und folglich als abhängig von der Stabilität des Addukts sowie vom Ausmaß nichtkovalenter bindender Wechselwirkungen (Abb. 4). In Übereinstimmung mit der relativen Reaktivität der Substrate und der erwarteten Stabilität der Addukte zeigte sich, daß die Retroalkylierung mit (+)-Duocarmycin A **2** langsamer verlief als mit (+)-Duocarmycin SA **3**. Darüber hinaus haben wir bei N-BOC-DSA **12** (siehe Abb. 5) eine sehr viel höhere Geschwindigkeit für die Retroalkylierung und eine sehr viel geringere Produktstabilität beobachtet als bei **3**. Diese Tatsache kann der bei **12** fehlenden Stabilisierung durch die Trimethoxyindol-Einheit zugeschrieben werden. (+)-CC-1065 **1** ist weniger reaktiv als (+)-Duocarmycin A **2**, aber reaktiver als (+)-Duocarmycin SA **3**.

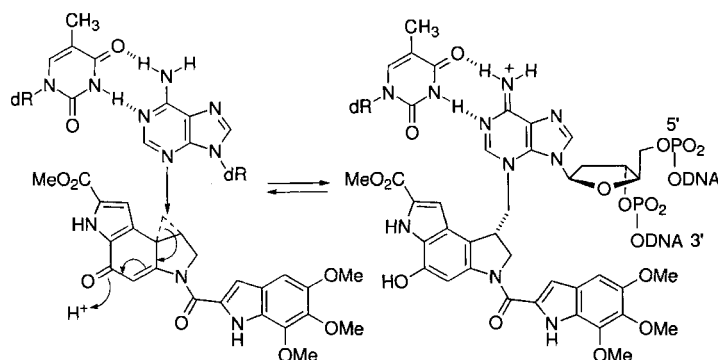


Abb. 4. Für die reversible DNA-Alkylierung (hier mit **3** gezeigt) gelten folgende Befunde: Die Rückreaktion wird mit steigendem pH, steigender Temperatur und steigender Ionenstärke wichtiger, sie ist bei Duocarmycin SA größer als bei Duocarmycin A, verringert sich mit steigender Stabilität des Addukts und mit steigender Substratreaktivität, ist bei den Duocarmycinen größer als bei CC-1065 und sogar bei N-BOC-DSA größer als bei Duocarmycin SA und verringert sich mit zunehmender Stabilisierung durch nichtkovalente bindende Wechselwirkungen.

Der fehlende Nachweis für die Reversibilität der Alkylierung durch (+)-CC-1065 unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen kann als weiterer Hinweis auf eine Abhängigkeit der Reversibilität vom Grad der Stabilisierung durch nichtkovalente Wechselwirkungen dienen. Diese Interpretation ist in Einklang mit der Beobachtung, daß zu CC-1065 analoge Verbindungen mit derselben Alkylierungseinheit, aber kleineren und einfacheren Teilstrukturen für die bindenden Wechselwirkungen die ersten derartigen Substrate waren, die DNA reversibel alkylierten<sup>[70]</sup>.

Somit kommt nicht nur der kovalenten Bindung eine entscheidende Funktion bei der Stabilisierung des DNA-Alkylierungs-Produkts zu, sondern auch den durch hydrophobe und van-der-Waals-Beziehungen entstehenden, stabilisierenden Wechselwirkungen. Das bedeutet, daß aus der reversiblen Alkylierungsreaktion durch nichtkovalente, stabilisierende Wechselwirkungen eine weniger reversible oder irreversible werden kann. Die Bedeutung dieser Beobachtungen wird klar, wenn man die Eigenschaften der Substrate vergleicht. Die außergewöhnlich hohe cytotoxische Aktivität der Naturstoffe im Vergleich zur relativ geringen der einfachen Derivate der Alkylierungseinheiten (Abb. 5) kann teilweise einfach auf die Verringe-

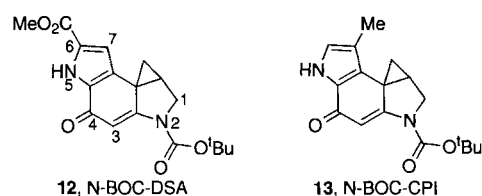
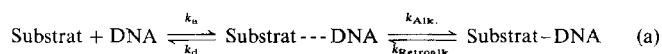


Abb. 5. Derivate der Alkylierungseinheiten von 1–3.

rung der Reversibilität der von Haus aus reversiblen Alkylierungsreaktion durch nichtkovalente Wechselwirkungen zurückgeführt werden.

Diese Reversibilität der Alkylierungsreaktion selbst macht es zusammen mit dem Gleichgewicht für das nichtkovalente Binden an die DNA erforderlich, daß für die Bewertung der sequenzselektiven Alkylierung vier Geschwindigkeitskonstanten

betrachtet werden [Gl. (a)]. Die großen Unterschiede im nachweisbaren Reversibilitätsausmaß lassen vermuten, daß zwei der



wichtigeren unter den bisherigen Versuchen<sup>[43, 46]</sup> nicht berücksichtigten Reaktionsgeschwindigkeiten die relativen Geschwindigkeiten der Retroalkylierung an konkurrierenden oder möglicherweise nicht entdeckten Bindungsstellen und die Geschwindigkeiten, mit denen die nichtkovalenten Bindungen zu den verfügbaren Bindungsstellen wieder gelöst werden („off rates“), sind. Letztere konnten für einige „nichtkovalente“ Komplexe qualitativ als recht gering nachgewiesen werden<sup>[82]</sup>.

Diese Beobachtungen führten zusammen mit Untersuchungen, die vermuten lassen, daß die Gleichgewichtseinstellung für das nichtkovalente Binden durch Dekomplexierung und nicht durch Wanderung entlang der kleinen Furche erfolgt, zu der Annahme, daß den Dissoziationsgeschwindigkeiten und nicht allein den Assoziationsgeschwindigkeiten oder  $K_b$  ( $= k_a/k_d$ ) eine besondere Bedeutung beizumessen ist<sup>[96]</sup>. In Untersuchungen mit definierten Oligonucleotiden, die über für ein nichtkovalentes Binden sehr wirksame, jedoch nicht zu alkylierende Stellen verfügen, stellte sich heraus, daß bei diesen die Geschwindigkeit der DNA-Alkylierung verringert ist. Dies könnte darauf schließen lassen, daß  $k_a$  und  $k_d$  [Gl. (a)] möglicherweise klein sind und daß die Dissoziationsgeschwindigkeit oder der relative  $K_b$ -Wert und nicht die Assoziationsgeschwindigkeit oder die Alkylierungsgeschwindigkeit geschwindigkeitsbestimmend sein könnte. Weiterhin war es für die Hemmung der Alkylierung egal, ob sie durch eine inter- oder eine intramolekulare Stelle für nichtkovalentes Binden ausgelöst wurde. Diese Untersuchungen legen nahe, daß die Einstellung des ersten Gleichgewichts in Gleichung (a) im Vergleich zur Alkylierung langsam ist und daß die „off rates“ oder relativen  $K_b$ -Werte von Bedeutung sind und nicht vernachlässigt werden sollten.

## 2.6. Modelle für die DNA-Alkylierungs-Addukte der nichtnatürlichen Enantiomere

Die Untersuchung der Naturstoffe, ihrer nichtnatürlichen Isomere sowie von Schlüsselteilstrukturen führte nicht nur zu der unerwarteten Beobachtung, daß die nichtnatürlichen Enantiomere effektive DNA-Alkylierungsmittel und wirksame Cytostatica/Antibiotica sind, sondern ermöglichte auch die Entwicklung eines detaillierten Modells<sup>[53, 54]</sup> der Strukturmerkmale, die für die selektive DNA-Alkylierung verantwortlich sind. Die Charakterisierung der Verbindungen **8–10**, die eindeutige Bestimmung der absoluten Konfiguration der Substrate und die Bestimmung der Sequenzübereinstimmung bei der Alkylierung durch **1–3** und ihre Enantiomere lieferten die notwendige Information, um genaue Modelle für die Adenin-N3-Alkylierung zu entwerfen. Abbildung 6 zeigt Modelle für die Alkylierung mit (+)- und (–)-Duocarmycin SA an einer häufigen Bindungsstelle in w794-DNA, 5'-CTAATT, die eine Bindungsstelle hoher Affinität für das nichtnatürliche Enantiomer und eine untergeordnete für das natürliche Enantiomer ist<sup>[54]</sup>. Abbildung 7 zeigt ähnliche Modelle für die Alkylierung mit (+)- und (–)-CC-



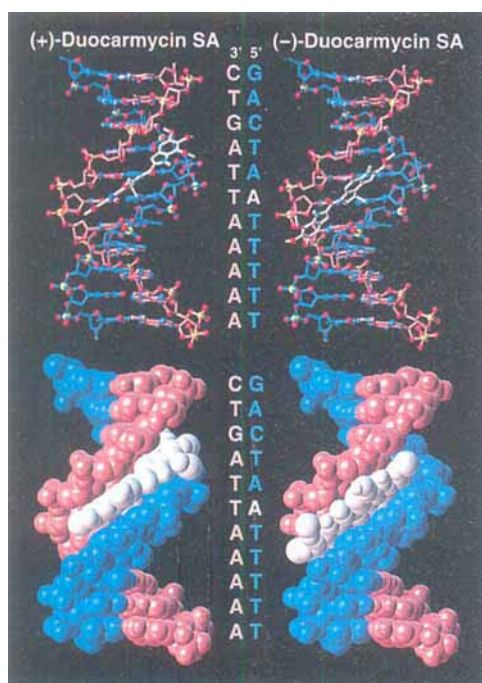


Abb. 6. Stab- und Kalottenmodelle für die Alkylierung derselben Stelle in w794-DNA (Duplex 5'-d(GACTAATTTT)) durch (+)-Duocarmycin SA (links) und (-)-Duocarmycin SA (rechts). Die Bindung des natürlichen Enantiomers erstreckt sich in 3'→5'-Richtung von der Adenin-N3-Alkylierungsstelle über die Sequenz 5'-CTAA, die des nichtnatürlichen Enantiomers in 5'→3'-Richtung über die Sequenz 5'-AATT.

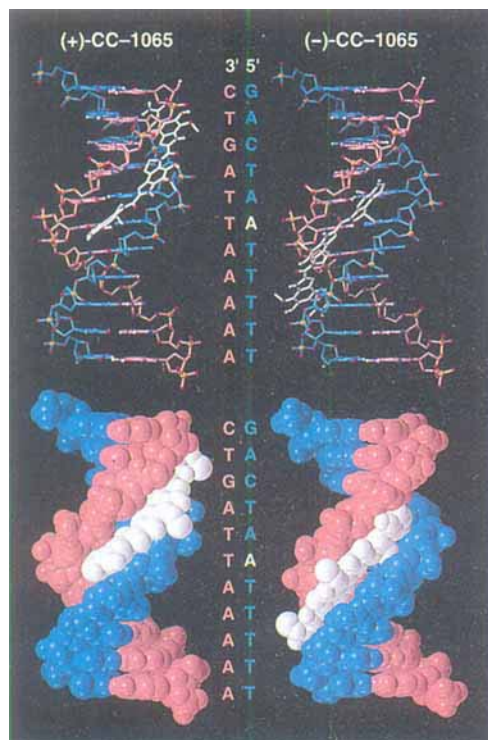


Abb. 7. Stab- und Kalottenmodelle für die Alkylierung derselben Stelle in w794-DNA (Duplex-5'-d(GACTAATTTT)) durch (+)-CC-1065 (links) und (-)-CC-1065 (rechts). Die Bindung des natürlichen Enantiomers erstreckt sich in 3'→5'-Richtung von der Adenin-N3-Alkylierungsstelle über die Sequenz 5'-ACTAA, die des nichtnatürlichen Enantiomers in 5'→3'-Richtung über die Sequenz 5'-AATTT.

1065<sup>[53]</sup>. In beiden Fällen ist die hydrophobe Seite des Substrats tief in die kleine Furche eingebettet, während die polaren funktionellen Gruppen auf der äußeren Seite des Komplexes angesiedelt sind. Die helixartige Konformation des Substrats ist der topologischen Krümmung und Steigung der kleinen Furche angepaßt und überdeckt eine AT-reiche Region von 3.5 bzw. 5 Basenpaaren. Im Falle von (+)-Duocarmycin SA reicht die Bindung über 3.5 Basenpaare; sie beginnt an der 3'-Adenin-Alkylierungsstelle und setzt sich in 3'→5'-Richtung über die 2-3 folgenden 5'-Basenpaare fort (5'-CTAA). Im Falle des Enantiomers überdeckt die Bindung in ähnlicher Weise eine 3.5 Basenpaare umfassende AT-reiche Bindungsstelle, die jedoch notwendigerweise an der der Alkylierungsstelle benachbarten 5'-Base beginnt und sich in 5'→3'-Richtung über die Alkylierungsstelle und die nächsten 1-2 3'-Basen erstreckt (5'-AATT). Diese versetzte Selektivität innerhalb eines AT-reichen Bindungsgebiets ist eine natürliche Folge der diastereomeren Beziehung zwischen den Addukten, und die in bezug auf die Alkylierungsstelle entgegengesetzte Bindungsorientierung in der kleinen Furche ist erforderlich, um die Addition des Adenin-N3-Atoms an das am wenigsten substituierte Kohlenstoffatom des elektrophilen Cyclopropanrings zu ermöglichen. Die vierte Base (A/T > G/C) in der Bindungssequenz ist der Grund dafür, daß diese Position eine hohe Affinität für das nichtnatürliche Enantiomer aufweist, während sie für das natürliche Enantiomer nur eine untergeordnete Rolle spielt. Die CC-1065-Modelle<sup>[53]</sup> geben in ähnlicher Weise die ausgedehntere, fünf Basenpaare umfassende AT-reiche Bindungsstelle, die Alkylierungsselektivitäten der enantiomeren Wirkstoffe, ihre entgegengesetzte Bindungsorientierung in der kleinen Furche sowie ihre bezogen auf die Alkylierungsstelle versetzte AT-Selektivität wieder.

Es konnte gezeigt werden, daß die scheinbar verwirrenden Unterschiede in der relativen Wirksamkeit der DNA-Alkylierung durch das natürliche und das nichtnatürliche Enantiomer sowohl von dem Ausmaß an Stabilisierung der inhärent reversiblen Addukte durch nichtkovalente Wechselwirkungen als auch vom Grad der sterischen Hinderung um das C7-Zentrum des Wirkstoffs abhängen. In Übereinstimmung mit den aus den Modelluntersuchungen resultierenden Erwartungen reagieren die nichtnatürlichen Enantiomere auf letzteres besonders empfindlich<sup>[53, 54, 73]</sup>.

### 3. Schlüsselteilstrukturen

### 3.1. N-BOC-DSA: ein DNA-Alkylierungsmittel mit einer von der absoluten Konfiguration unabhängigen Selektivität und Wirksamkeit

Die Richtigkeit der Modelle bestätigte sich, als man herausfand, daß sie eine gute Erklärung für die ungewöhnliche Beobachtung lieferten, daß bei einfachen Derivaten der Alkylierungseinheit, z.B. N-BOC-DSA **12**<sup>[54]</sup> und N-BOC-CPI **13**<sup>[53, 68]</sup> (siehe Abb. 5), beide Enantiomere DNA an denselben Positionen alkylieren. Zusätzlich dazu, daß die DNA-Alkylierung mit (+)- und (-)-**12** wesentlich weniger effizient (ca. 10<sup>4</sup>mal) und weniger selektiv (Selektivität: 5'-AA > 5'-TA) ist und im Vergleich zu der mit (+)- oder (-)-Duocarmycin SA oder -CC-1065 ein anderes Profil zeigt, ergaben die Untersuchungen, daß

Tabelle 3. Sequenzübereinstimmung bei der DNA-Alkylierung durch Schlüsselteilstrukturen und Analoga von CC-1065 und den Duocarmycinen [a].

Substrat	Base [b] 5'	6	5	4	3	2	1	0	-1	-2	-3	-4	-5 3'
<i>natürliche Enantiomere</i>													
(+)-CPI-CDPI <sub>3</sub>	A/T (56)	72	77	69	69	100	100	100	54	—	—	—	—
(+)-17	Übereinstimmung	A/T > G/C	A/T > G/C	A/T > G/C	A/T > G/C	A/T	A/T	A	N	—	—	—	—
(+)-CC-1065	A/T (56)	—	—	67	78	94	98	100	55	—	—	—	—
1	Übereinstimmung	—	—	A/T ≥ G/C	A/T > G/C	A/T	A/T	A	Pu ≥ Py	—	—	—	—
(+)-CPI-CDPI <sub>2</sub>	A/T (56)	—	—	67	78	94	98	100	55	—	—	—	—
(+)-16	Übereinstimmung	—	—	A/T ≥ G/C	A/T > G/C	A/T	A/T	A	Pu ≥ Py	—	—	—	—
(+)-CPI-PDE-I <sub>1</sub>	A/T (56)	—	—	—	65	100	100	100	58	—	—	—	—
(+)-14	Übereinstimmung	—	—	—	A/T ≥ G/C	A/T	A/T	A	Pu ≥ Py	—	—	—	—
(+)-CPI-CDPI <sub>1</sub>	A/T (56)	—	—	—	65	100	100	100	58	—	—	—	—
(+)-15	Übereinstimmung	—	—	—	A/T ≥ G/C	A/T	A/T	A	Pu ≥ Py	—	—	—	—
(+)-Duocarmycin SA	A/T (56)	—	—	—	79	100	100	100	69	—	—	—	—
3	Übereinstimmung	—	—	—	A/T > G/C	A/T	A/T	A	Pu > Py	—	—	—	—
(+)-N-BOC-CPI	A/T (56)	—	—	—	—	97	100	66	—	—	—	—	—
(+)-13	Übereinstimmung	—	—	—	—	A/T	A	Pu > Py	—	—	—	—	—
(+)-N-BOC-DSA	A/T (56)	—	—	—	—	95	100	65	—	—	—	—	—
(+)-12	Übereinstimmung	—	—	—	—	A/T	A	Pu > Py	—	—	—	—	—
<i>nichtnatürliche Enantiomere</i>													
(-)-N-BOC-DSA	A/T (56)	—	—	—	—	95	100	65	—	—	—	—	—
(-)-12	Übereinstimmung	—	—	—	—	A/T	A	Pu > Py	—	—	—	—	—
(-)-N-BOC-CPI	A/T (56)	—	—	—	—	97	100	66	—	—	—	—	—
(-)-13	Übereinstimmung	—	—	—	—	A/T	A	Pu > Py	—	—	—	—	—
(-)-Duocarmycin SA	A/T (56)	—	—	—	—	93	100	96	73	56	—	—	—
ent-3	Übereinstimmung	—	—	—	—	A/T	A	A/T	A/T > G/C	N	—	—	—
(-)-CPI-CDPI <sub>2</sub>	A/T (56)	—	—	—	—	88	100	93	82	73	56	—	—
(-)-16	Übereinstimmung	—	—	—	—	A/T	A	A/T	A/T > G/C	A/T > G/C	N	—	—
(-)-CC-1065	A/T (56)	—	—	—	—	88	100	93	82	73	56	—	—
ent-1	Übereinstimmung	—	—	—	—	A/T	A	A/T	A/T > G/C	A/T > G/C	N	—	—
(-)-CPI-CDPI <sub>1</sub>	A/T (56)	—	—	—	—	100	100	100	100	86	86	57	—
(-)-17	Übereinstimmung	—	—	—	—	A/T	A	A/T	A/T	A/T > G/C	A/T > G/C	N	—

[a] Die Zahlen unter den Positionen geben den Prozentsatz an, mit dem die jeweilige Base in dieser Position relativ zur Adenin-N3-Alkylierungsstelle auftritt. [b] In Klammern prozentualer Anteil in der untersuchten DNA.

die beiden Enantiomere von **12** – unabhängig von ihrer absoluten Konfiguration – dieselben Bindungsstellen mit im wesentlichen derselben Wirksamkeit alkylieren<sup>[54]</sup>. Dieses Verhalten zeigen alle solchen einfachen Substrate, und es wurde auch für die *N*-Acetylderivate nachgewiesen. In Abbildung 8 sind diese Besonderheiten gut veranschaulicht, und die übereinstimmende Alkylierungsselektivität von (+)- und (-)-*N*-BOC-DSA/*N*-BOC-CPI ist Tabelle 3 zu entnehmen. Obwohl diese Beobachtungen ungewöhnlich erscheinen mögen, so sind sie doch die natürliche Folge der diastereomeren Beziehung zwischen den Addukten. Das natürliche Enantiomer bindet in 3'→5'-Richtung ausgehend von der Alkylierungsstelle über die benachbarte 5'-Base, das nichtnatürliche in entgegengesetzter 5'→3'-Richtung, aber so, daß dieselbe benachbarte 5'-Base an der Bindung beteiligt ist. Diese in Abbildung 9 veranschaulichten Modellvorstellungen über die Alkylierungsstelle<sup>[53, 54]</sup> passen gut zu der für beide Enantiomere beobachteten Selektivität von 5'-AA > 5'-TA. Die scheinbare Bevorzugung von 5'-AA gegenüber 5'-TA (ca. 2:1), wenn nur ein Strang einer einfach endmarkierten DNA untersucht wurde, ist statistischer und nicht struktureller Natur: Der nichtmarkierte, komplementäre Partnerstrang einer 5'-TA-Sequenz enthält eine identische, konkurrierende Bindungsstelle, deren Alkylierung die meßbare Effizienz der Alkylierung des markierten Strangs verringert. Die Alkylierung wird einfach darüber gesteuert, wie tief das jeweilige Alkylierungsmittel in die kleine Furche einzudringen vermag. Davon hängt es ab, ob die Adenin-N3-Alkylierung durch den elektrophilen Cyclopropanring stattfinden kann. Bei einfachen Wirkstoffen wie **12** und **13** genügt es, wenn die benachbarte 5'-Base eine A- oder T-Base ist, und Modelle für die nicht beob-

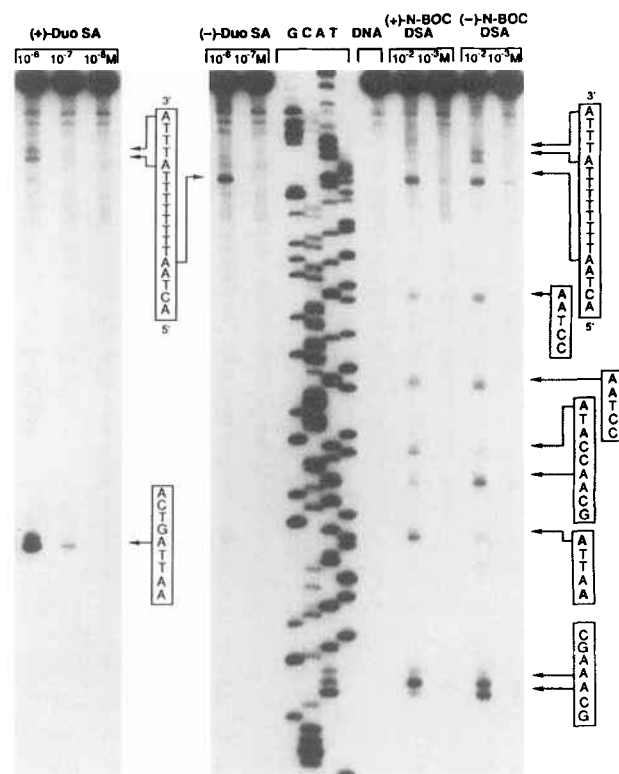


Abb. 8. Analyse des durch 30minütiges Erhitzen auf 100 °C ausgelösten Strangbruchs bei w794-DNA (SV40-DNA-Segment, 144 Basenpaare, Nucleotid-Nr. 5238-138) nach 24stündiger Inkubation mit (+)- oder (-)-Duocarmycin SA bei 25 °C und mit (+)- oder (-)-*N*-BOC-DSA bei 37 °C sowie Entfernung des nicht gebundenen Substrats durch EtOH-Fällung durch denaturierende PAGE (8%) und Autoradiographie. Spuren 1–3: **3** ( $1 \times 10^{-6}$ – $1 \times 10^{-8}$  M); Spuren 4 und 5: *ent*-**3** ( $1 \times 10^{-6}$  bzw.  $1 \times 10^{-7}$  M); Spuren 6–9: Sanger-G-, -C-, -A- und -T-Reaktionen; Spur 10: Vergleichs-DNA; Spuren 11 und 12: (+)-**12** ( $1 \times 10^{-2}$  bzw.  $1 \times 10^{-3}$  M); Spuren 13 und 14: (-)-**12** ( $1 \times 10^{-2}$  bzw.  $1 \times 10^{-3}$  M).

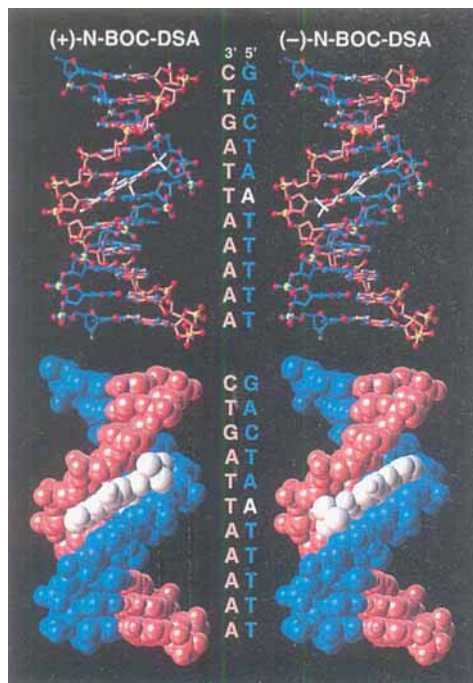


Abb. 9. Stab- und Kalottenmodelle für die Alkylierung derselben Stelle in w794-DNA (Duplex-5'-d(GACTAATTTT)) durch (+)-**12** (links) und (-)-**12** (rechts). Die Bindung des natürlichen Enantiomers erstreckt sich in 3'→5'-Richtung von der Adenin-N3-Alkylierungsstelle über die Sequenz 5'-AA, die des nichtnatürlichen Enantiomers in 5'→3'-Richtung, erfaßt aber dieselbe 5'-AA-Sequenz.

achtete 5'-GA-Alkylierung stützen diese Annahme<sup>[53, 54]</sup>. Im Falle von **3** oder **1** ist ein ausgedehnteres, 3,5 bzw. 5 Basenpaare umfassendes AT-reiches Umfeld der Alkylierungsstelle erforderlich, um ein für die Alkylierung ausreichendes Eindringen in die Furche zu ermöglichen; dazu kommt noch die bevorzugte nichtkovalente Anbindung der Substrate in der schmalen, tieferen, AT-reichen kleinen Furche<sup>[82]</sup>.

Diese Unterschiede sind von Bedeutung, werden jedoch bis heute nicht allseits akzeptiert. Während unsere Untersuchungen erhebliche Unterschiede in der Alkylierungsselektivität zwischen den Naturstoffen und den einfachen Derivaten der Alkylierungseinheit ergaben, haben die gemeinsamen Untersuchungen der Arbeitsgruppen von Hurley und Upjohn mit CPI-Derivaten eine nicht oder kaum unterscheidbare Alkylierungsselektivität von (+)-CC-1065 **1** und (+)-N-Acetyl-CPI ergeben<sup>[43, 46, 47, 67, 68]</sup>. Daraus folgerten sie, daß alle strukturellen Erfordernisse für die mit **1** beobachtete Alkylierungsselektivität in der CPI-Alkylierungseinheit enthalten sind.

Trotz des ähnlichen Verhaltens von N-BOC-DSA **12** und N-BOC-CPI **13** konnten zwei wichtige Unterschiede entdeckt werden: Zum einen alkylieren das natürliche und das nichtnatürliche Enantiomer von **12** DNA effizienter und sind zudem biologisch wirksamer als die entsprechenden Enantiomere von **13**. Dieser Unterschied kann mit der höheren Stabilität von **12** begründet werden, die eine effektivere DNA-Alkylierung bewirkt. Zum anderen wurde zwischen dem natürlichen und dem nichtnatürlichen Enantiomer von **12** kein Unterschied in der Alkylierungseffizienz beobachtet, während für das natürliche Enantiomer von **13** eine 10- bis 100mal größere Effizienz und eine 10- bis 100mal höhere Cytotoxizität als für das nichtnatürliche Enantiomer nachgewiesen werden konnten. Wie wir

später noch genauer erläutern werden, hängt dieses scheinbar verwirrende Verhalten der Enantiomerenpaare mit dem Ausmaß an sterischer Hinderung um das C7-Zentrum zusammen, ein Faktor, auf den die diastereomeren Addukte der nichtnatürlichen Enantiomere besonders empfindlich reagieren.

### 3.2. CPI-PDE-I<sub>1</sub>: eine Schlüsselteilstruktur von CC-1065

Für frühe Versuche mit dem Ziel, die Bedeutung der einzelnen Untereinheiten von CC-1065 aufzuklären, sind beide Enantiomere von CPI-PDE-I<sub>1</sub> **14** (Abb. 10) hergestellt worden<sup>[71]</sup>. Die

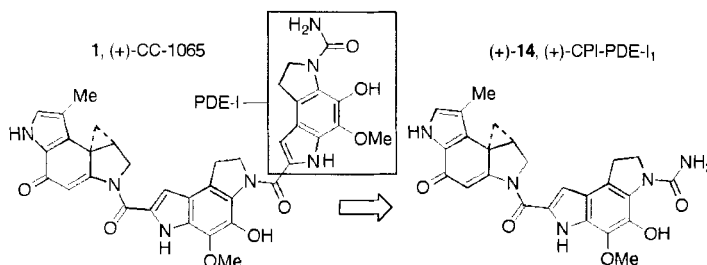


Abb. 10. CPI-PDE-I<sub>1</sub> **14**, eine Schlüsselteilstruktur von CC-1065.

se frühe Untersuchung führte zu einer Reihe interessanter Beobachtungen, von denen wir im folgenden allerdings nur zwei besonders wichtige beschreiben wollen. Zum einen zeigte (+)-CPI-PDE-I<sub>1</sub> in vitro eine cytotoxische Aktivität, die von der von (+)-CC-1065 nicht zu unterscheiden war. Dies wies darauf hin, daß die gesamte „rechte“ Teilstruktur von CC-1065 für die volle biologische Wirksamkeit nicht benötigt wird. Die spätere Entdeckung der Duocarmycine, denen dieses dritte Strukturelement ebenfalls fehlt, lieferte einen unabhängigen Beweis für die relative Bedeutungslosigkeit dieser Struktureinheit für die biologischen Eigenschaften der natürlichen Enantiomere. Zum anderen zeigte das natürliche Enantiomer (+)-**14** eine ähnliche, aber dennoch merklich von der mit (+)-CC-1065 beobachteten DNA-Alkylierungsselektivität abweichende Selektivität. Tabelle 3 (Abschnitt 3.1) enthält auch die Sequenzübereinstimmung bei der Alkylierung mit (+)-**14**. Wie im Falle von (+)-CC-1065 handelt es sich bei jeder nachgewiesenen Alkylierungsstelle um einen Adeninrest, und jede dieser Alkylierungsstellen ist von zwei 5'-A- oder -T-Basen flankiert. Für diese dreibasigen, AT-reichen Alkylierungsstellen wurde dieselbe Präferenz wie mit (+)-CC-1065 nachgewiesen: 5'-AAA ≈ 5'-TTA > 5'-TAA > 5'-ATA. Wir fanden heraus, daß die Unterschiede zwischen (+)-**14** und (+)-CC-1065 auf der auf die vierte und fünfte 5'-Base ausgedehnten AT-Präferenz beruhen: Bei (+)-**14** war die Präferenz für eine A- oder T-Base als vierte 5'-Base geringer und die für eine bestimmte fünfte 5'-Base gar nicht vorhanden. (+)-**14** zeigt also, genau wie später bei Duocarmycin A und SA beobachtet, eine kürzere, sich nur über 3,5 Basenpaare erstreckende Selektivität für AT-reiche Regionen. Folglich stellte sich heraus, daß die Gegenwart der DNA-bindenden Untereinheiten die Sequenzselektivität der DNA-Alkylierung beeinflusste, und eine umfassende Untersuchung kürzerer und längerer Analoga von (+)-CC-1065 ergab, daß die beobachtete Selektivität für AT-reiche Regionen gut mit der Länge des Alkylierungsmittels

und mit der Größe der Bindungsstelle um die Alkylierungsstelle, die für dieses Alkylierungsmittel notwendig ist, übereinstimmt (siehe Tabelle 3)<sup>[53, 71]</sup>.

Die relativen cytotoxischen Wirksamkeiten von verwandten Alkylierungsmitteln, unter denen auch solche waren, denen alle DNA-bindenden Untereinheiten fehlten, deuteten auf eine weitere wichtige funktionelle Rolle der DNA-bindenden Untereinheiten hin. (+)-N-BOC-CPI und (+)-N-Acetyl-CPI, die kein DNA-bindendes Strukturelement enthalten, erwiesen sich als 1000- bis 10000mal weniger wirksam als (+)-CC-1065. Im Gegensatz dazu zeigten die natürlichen Enantiomere von **14–17** (siehe Abb. 10 und 12) mit ein bis drei DNA-bindenden Untereinheiten eine mit der des Naturstoffs vergleichbare Wirksamkeit (Tabelle 4). Ebenso alkylieren (+)-N-BOC-CPI und (+)-N-Acetyl-CPI DNA wesentlich weniger effizient (1000- bis

Tabelle 4. Cytotoxische Aktivität von Schlüsselteilstrukturen von CC-1065 und den Duocarmycinen in vitro.

Substrat	IC <sub>50</sub> , L1210 [pM]
<i>natürliche Enantiomere</i>	
(+)- <b>12</b> , (+)-N-BOC-DSA	6000
(+)- <b>13</b> , (+)-N-BOC-CPI	300000
<b>3</b> , (+)-Duocarmycin SA	10
<b>1</b> , (+)-CC-1065	20
(+)- <b>14</b> , (+)-CPI-PDE-I <sub>1</sub>	20
(+)- <b>15</b> , (+)-CPI-CDPI <sub>1</sub>	40
(+)- <b>16</b> , (+)-CPI-CDPI <sub>2</sub>	20
(+)- <b>17</b> , (+)-CPI-CDPI <sub>3</sub>	20
<i>nichtnatürliche Enantiomere</i>	
(-)- <b>12</b> , (-)-N-BOC-DSA	60000
ent- <b>3</b> , (-)-Duocarmycin SA	100
ent- <b>1</b> , (-)-CC-1065	20
(-)- <b>14</b> , (-)-CPI-PDE-I <sub>1</sub>	≥ 2400
(-)- <b>15</b> , (-)-CPI-CDPI <sub>1</sub>	≥ 6300
(-)- <b>16</b> , (-)-CPI-CDPI <sub>2</sub>	20
(-)- <b>17</b> , (-)-CPI-CDPI <sub>3</sub>	50

10000mal), während (+)-**14**–(+)-**17** und **1** vergleichbare DNA-Alkylierungs-Effizienzen, aber verschiedene DNA-Alkylierungs-Geschwindigkeiten und – entsprechend ihrer Größe – leicht unterschiedliche Selektivitäten bezüglich AT-reicher Regionen zeigen. Diese Beobachtungen führten uns in Verbindung mit Computerstudien, Molecular-Modeling-Untersuchungen und einer Abschätzung der inneren Stabilität der Alkylierungsmittel zu der Annahme, daß die DNA-Alkylierung inhärent reversibel ist und nur durch nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen der DNA und DNA-bindenden Strukturelementen irreversibel wird. Darüber hinaus lag die Vermutung nahe, daß diese Stabilisierung bei den natürlichen Enantiomeren durch ein einziges DNA-bindendes Strukturelement erfolgt und daß allein der Stabilisierungsvorgang die volle Entfaltung der biologischen Eigenschaften bewirkt. Zu diesem Zeitpunkt war der reversible Charakter der DNA-Alkylierung noch nicht erkannt, und die Arbeitsgruppen von Hurley und Upjohn vermuteten, daß die Unterschiede den Geschwindigkeiten der DNA-Alkylierung und den kinetischen Aspekten der Bildung der DNA-Addukte zuzuschreiben seien<sup>[46]</sup>. Diese abweichenden Vorstellungen gingen der späteren Entdeckung voraus, daß die DNA-Alkylierung reversibel ist und daß die Addukte nur durch das Vorhandensein und die Größe der DNA-bindenden Strukturelemente stabilisiert werden<sup>[58, 70]</sup>.

### 3.3. CPI-CDPI<sub>2</sub>: ein genaues funktionelles Analogon von CC-1065

Unter den ersten Analoga von CC-1065, die wir untersucht haben, erwies sich das durch Entfernen der Methoxy- und Hydroxysubstituenten aus den mittleren und „rechten“ Abschnitten entstehende Derivat als besonders aufschlußreich (Abb. 11).

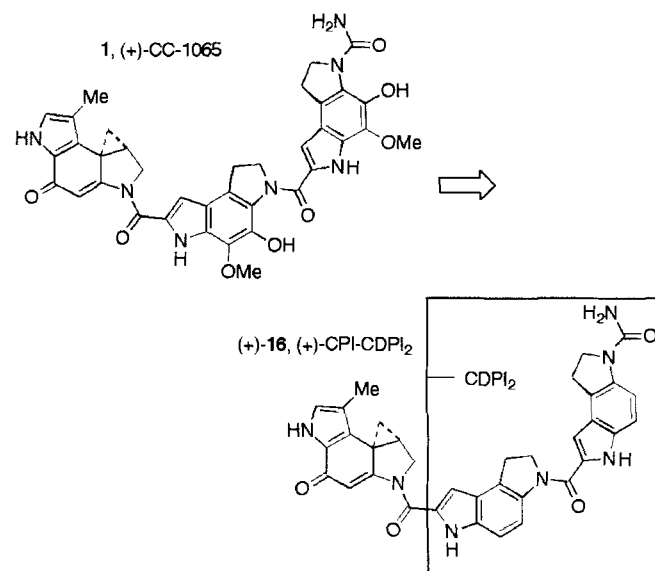


Abb. 11. CPI-CDPI<sub>2</sub> **16**, ein genaues funktionelles Analogon von CC-1065.

Seine Untersuchung schien unter der damals wachsenden Erkenntnis, daß die polaren Substituenten von CC-1065 einen erheblichen Beitrag zu dessen Eigenschaften leisten, außerordentlich wichtig. Bei der Untersuchung von CPI-CDPI<sub>2</sub> wurde drei wichtigen Fragen nachgegangen: dem Beitrag der Substituenten zur Bindung an DNA, den daraus resultierenden Alkylierungseigenschaften des Naturstoffs und ihrem Beitrag zu den biologischen Eigenschaften. Obwohl wir anfänglich erwartet hatten, daß die Substituenten die DNA-Alkylierungseigenschaften signifikant beeinflussen, konnte eine derartige Rolle der Substituenten durch ausführliche Molecular-Modeling-Studien nicht bestätigt werden<sup>[38, 41]</sup>. In ähnlicher Weise war vermutet worden, daß die C4-Hydroxygruppe die Bindung an DNA erleichtern könnte, indem sie Wasserstoffbrückenbindungen mit Carbonylgruppen anderer Untereinheiten einging und dadurch eine für die Bindung in der kleinen Furche erforderliche gekrümmte, helicale Konformation stabilisierte. Bei kritischer Untersuchung dieser Annahme kamen wir jedoch zu der Erkenntnis, daß CC-1065 durch diese intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung eine zu starke Krümmung der Helixkonformation erfährt und daß die weniger starke Krümmung der Helixkonformation von (+)-**16** der für die Bindung in der schmalen Furche erforderlichen Konformation sehr viel näher kommt<sup>[38, 77, 78]</sup>. Schließlich hatten wir angenommen, daß die Oxidation des mittleren und rechten Strukturelements von CC-1065 zu einem *para*-Chinonimin möglicherweise eine Erklärung für die verzögerte Toxizität von (+)-CC-1065 liefern könnte<sup>[80]</sup>.



Die Synthese beider Enantiomere von CPI-CDPI<sub>2</sub><sup>[77]</sup> und ihr direkter Vergleich mit den Enantiomeren von CC-1065 ergab, daß beide Alkylierungsmittel ununterscheidbar sind<sup>[71]</sup>. Beide Enantiomere von CPI-CDPI<sub>2</sub> **16** zeigten die gleiche cytotoxische Aktivität und In-vivo-Antitumor-Aktivität sowie identische DNA-Alkylierungs-Effizienzen und Selektivitäten wie das entsprechende CC-1065-Enantiomer. Außerdem wurde mit (+)-CPI-CDPI<sub>2</sub> auch die für (+)-CC-1065 charakteristische verzögerte Toxizität beobachtet, während die beiden nicht-natürlichen Enantiomere diese Besonderheit nicht zeigten<sup>[79]</sup>. Die Untersuchung von **16** führte somit zu dem Ergebnis, daß die Hydroxy- und Methoxysubstituenten im mittleren und rechten Strukturelement von CC-1065 für die Eigenschaften des Naturstoffs ohne Bedeutung sind. Eine ergänzende und zeitgleich durchgeführte Untersuchung ergab zwar zunächst abweichende Ergebnisse<sup>[79]</sup>; diese wurden aber später korrigiert<sup>[46]</sup>.

Die nicht unterscheidbaren DNA-Alkylierungs-Profile wurden besonders deutlich im Vergleich mit den Alkylierungsprofilen einer Reihe strukturell verwandter Verbindungen, die im folgenden Abschnitt beschrieben werden. Die Untersuchungen wurden durch die Entwicklung einer Methode erleichtert, mit der schnell größere, der Durchführung derartig umfangreicher Vergleichsstudien angemessene Mengen an einfach <sup>32</sup>P-endmarkierter DNA erhalten werden können<sup>[72]</sup>.

### 3.4. CPI-CDPI<sub>n</sub>: längere und kürzere Analoga von CC-1065

Um die funktionelle Bedeutung der einzelnen Struktureinheiten von CC-1065 zu ergründen, hatten wir einen vollständigen Satz kürzerer und längerer Analoga, **15**–**17**, hergestellt (Abb. 12)<sup>[71]</sup> und getestet. Dabei konnten zwischen CPI-CDPI<sub>1</sub>

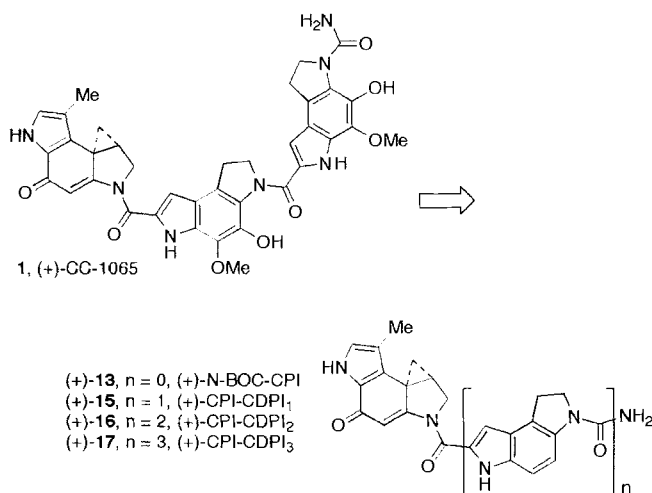


Abb. 12. CPI-CDPI<sub>n</sub>, längere und kürzere Analoga von CC-1065.

**15** und CPI-PDE-I<sub>1</sub> **14** keine Unterschiede festgestellt werden, und die natürlichen Enantiomere von CPI-CDPI<sub>n</sub> (n = 1–3) und CPI-PDE-I<sub>n</sub> (n = 1, 2) zeigten dieselbe cytotoxische Wirksamkeit. Vor dem Hintergrund, den Ursprung der DNA-Alkylierungs-Selektivität herauszufinden, war es aufschlußreich, daß die natürlichen Enantiomere (+)-CPI-CDPI<sub>1</sub> und (+)-CPI-PDE-I<sub>1</sub> sowie (+)-CPI-CDPI<sub>3</sub> Unterschiede zum Naturstoff

und zu (+)-CPI-CDPI<sub>2</sub> aufwiesen. Erstere zeigten eine kürzere, über 3.5 Basenpaare reichende AT-Selektivität, während bei letzteren eine ausgedehntere, über 6.5–7 Basenpaare reichende AT-Selektivität beobachtet wurde<sup>[53]</sup>. In Tabelle 3 (Abschnitt 3.1) sind die Sequenzübereinstimmungen bei der Alkylierung sowohl für natürliche als auch für nichtnatürliche Enantiomere dieser Schlüsselteilstrukturen von CC-1065 wiedergegeben.

Eine anfänglich verwirrende Entdeckung war die Tatsache, daß die nichtnatürlichen Enantiomere von CPI-CDPI<sub>1</sub> und CPI-PDE-I<sub>1</sub>, anders als (–)-CC-1065, DNA nicht effizient alkylieren und vergleichsweise schwach cytotoxisch wirken (Tabelle 4). Obwohl diese Beobachtung zum Zeitpunkt ihrer Entdeckung nicht einfach zu verstehen war, kann sie mittlerweile mit dem Ausmaß an Stabilisierung durch nichtkovalente Wechselwirkungen und mit der sterischen Belastung im Umfeld des C7-Zentrums der CPI- oder DSA-Alkylierungseinheit (**12** bzw. **13**), auf die die diastereomeren Addukte der nichtnatürlichen Enantiomere besonders sensibel reagieren, erklärt werden. Bei den nichtnatürlichen Enantiomeren ist dies die Folge destabilisierender sterischer Wechselwirkungen mit der 5'-Base, die sich auf dem alkylierten DNA-Strang vor dem alkylierten Adeninrest befindet, wodurch die DNA-Alkylierung langsamer und die Reversibilität der Adduktbildung erhöht wird. Das natürliche CPI-Enantiomer benötigt zur Stabilisierung des reversibel gebildeten Addukts nur ein einziges DNA-bindendes Strukturelement, während das nichtnatürliche CPI-Enantiomer zwei derartige Strukturelemente benötigt. Im krassen Gegensatz dazu genügt beim natürlichen wie auch beim nichtnatürlichen Enantiomer von DSA ein einziges DNA-bindendes Strukturelement, da die den Addukten der nichtnatürlichen Enantiomere eigenen, destabilisierend wirkenden sterischen Wechselwirkungen an C7 in diesem Fall geringer sind.

Auf Studien mit Alkylierungsmitteln mit tiefgreifenden Modifikationen und Vereinfachungen der DNA-bindenden Einheiten werden wir in Abschnitt 10 genauer eingehen.

## 4. Affinität und Selektivität bei der nichtkovalenten Bindung an DNA

### 4.1. PDE-I<sub>n</sub>, CDPI<sub>n</sub>, ACDPI<sub>n</sub> und TACDPI<sub>n</sub>

Wichtige frühe Erkenntnisse über den strukturellen Ursprung der sequenzselektiven DNA-Alkylierung konnten anhand der Charakteristika der nichtkovalenten Bindung der Verbindungen **18**–**21** an DNA gewonnen werden. **18**–**21** sind Schlüsselteilstrukturen der Substrate **1**–**3**, die keine kovalente Bindung mit DNA eingehen können (Abb. 13). Die Untersuchungen wurden mit einer ganzen Reihe von Verbindungen und unterschiedlichen DNAs durchgeführt<sup>[81–84]</sup>; in Abbildung 13 sind nur die wichtigsten Ergebnisse zusammengefaßt. Es wurden sowohl die relativen als auch die absoluten Bindungskonstanten bestimmt, und es stellte sich eine ausgeprägte Selektivität der Substrate für eine Bindung in AT-reichen Regionen der kleinen Furche heraus (Tabelle 5)<sup>[82, 83]</sup>. Darüber hinaus erwies sich CDPI<sub>3</sub> als das am besten bindende Substrat innerhalb der CDPI<sub>n</sub>-Reihe (Abb. 13 unten). Die Bindung von CDPI<sub>3</sub> in der kleinen Furche erstreckt sich über fünf Basenpaare oder eine halbe Helixdrehung, was der größtmöglichen Bindungsstelle entspricht, die – bei gleich-



Tabelle 5. Bindungskonstanten und Gibbs-Bindungsenergien für die nichtkovalente Bindung an drei DNAs.

Substrat	$K_b$ [ $M^{-1}$ ]	$\Delta G_{298}^\circ$ [kcal mol $^{-1}$ ]	Substrat	$K_b$ [ $M^{-1}$ ]	$\Delta G_{298}^\circ$ [kcal mol $^{-1}$ ]	Substrat	$K_b$ [ $M^{-1}$ ]	$\Delta G_{298}^\circ$ [kcal mol $^{-1}$ ]
<b>Poly[dA]-Poly[dT]</b>								
CDPI <sub>1</sub>	$6.4 \times 10^4$	-6.6	ACDPI <sub>1</sub>	$5.7 \times 10^3$	-5.1	TACDPI <sub>1</sub>	$3.8 \times 10^5$	-7.6
CDPI <sub>2</sub>	$3.2 \times 10^5$	-7.5	ACDPI <sub>2</sub>	$2.8 \times 10^4$	-6.1	TACDPI <sub>2</sub>	$1.4 \times 10^7$	-9.8
CDPI <sub>3</sub>	$1.8 \times 10^7$	-9.9	ACDPI <sub>3</sub>	$9.6 \times 10^5$	-8.2	TACDPI <sub>3</sub>	$1.3 \times 10^8$	-11.1
CDPI <sub>4</sub>	$1.4 \times 10^6$	-8.4	ACDPI <sub>4</sub>	$5.6 \times 10^5$	-7.8			
CDPI <sub>5</sub>	$2.1 \times 10^6$	-8.6						
CDPI <sub>3</sub> -OrBu [a]	$1.5 \times 10^7$	-9.8						
PDE-I <sub>2</sub>	$1.6 \times 10^7$	-9.8						
PDE-I <sub>3</sub>	$> 4.8 \times 10^7$	-						
Distamycin	$> 1.1 \times 10^8$	(-11.4)						
<b>Poly[d(A-T)]-Poly[d(A-T)]</b>								
CDPI <sub>1</sub>	$6.1 \times 10^4$	-6.5	ACDPI <sub>1</sub>	$4.3 \times 10^3$	-5.0	TACDPI <sub>1</sub>	$4.5 \times 10^5$	-7.7
CDPI <sub>2</sub>	$9.6 \times 10^4$	-6.8	ACDPI <sub>2</sub>	$2.1 \times 10^4$	-5.9	TACDPI <sub>2</sub>	$2.1 \times 10^7$	-10.0
CDPI <sub>3</sub>	$8.9 \times 10^6$	-9.5	ACDPI <sub>3</sub>	$1.4 \times 10^5$	-8.4	TACDPI <sub>3</sub>	$5.4 \times 10^8$	-11.9
CDPI <sub>4</sub>	$6.7 \times 10^5$	-8.0	ACDPI <sub>4</sub>	$2.2 \times 10^5$	-7.3			
CDPI <sub>5</sub>	$6.7 \times 10^5$	-8.0						
CDPI <sub>3</sub> -OrBu [a]	$7.3 \times 10^6$	-9.3						
PDE-I <sub>2</sub>	$4.6 \times 10^6$	-9.1						
PDE-I <sub>3</sub>	$> 2.6 \times 10^7$	-						
Distamycin	$> 7.2 \times 10^7$	(-12.6)						
<b>Poly[dG]-Poly[dC]</b>								
CDPI <sub>1</sub>	$5.1 \times 10^4$	-6.4	ACDPI <sub>1</sub>	$3.2 \times 10^3$	-4.8	TACDPI <sub>1</sub>	$2.1 \times 10^4$	-5.9
CDPI <sub>2</sub>	$6.9 \times 10^4$	-6.6	ACDPI <sub>2</sub>	$4.3 \times 10^3$	-5.0	TACDPI <sub>2</sub>	$1.0 \times 10^6$	-8.2
CDPI <sub>3</sub>	$2.0 \times 10^5$	-7.2	ACDPI <sub>3</sub>	$1.4 \times 10^5$	-7.0	TACDPI <sub>3</sub>	$1.6 \times 10^6$	-8.4
CDPI <sub>4</sub>	$4.1 \times 10^5$	-7.7	ACDPI <sub>4</sub>	$1.0 \times 10^5$	-6.8			
CDPI <sub>5</sub>	$4.9 \times 10^5$	-7.8						
CDPI <sub>3</sub> -OrBu [a]	$2.1 \times 10^5$	-7.3						
PDE-I <sub>2</sub>	-	-						
PDE-I <sub>3</sub>	$> 7.7 \times 10^5$	-8.0						
Distamycin	$> 2.9 \times 10^6$	-						

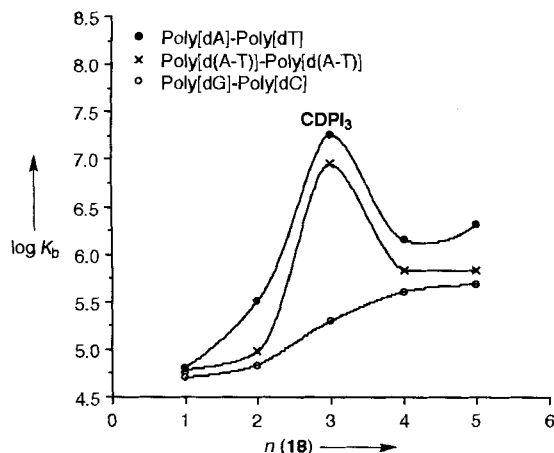
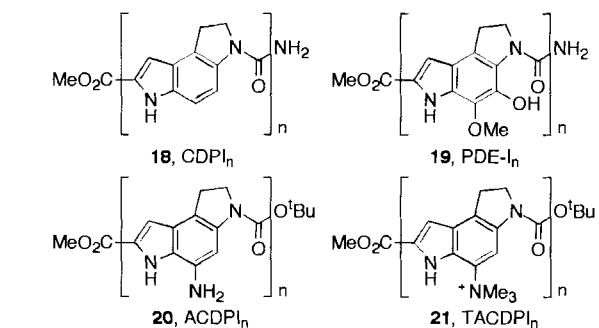
[a] NH<sub>2</sub>-Gruppe in CDPI<sub>3</sub> durch OrBu-Gruppe ersetzt.

Abb. 13. Strukturen (oben) und Bindungskonstanten (unten) von Substraten, die nicht kovalent an DNA binden.

zeitiger Bindung beider Enden – durch ein starres Substrat abgedeckt werden kann. Es konnte gezeigt werden, daß von größeren Substraten Teilabschnitte gebunden wurden (z.B. CDPI<sub>4</sub> nur über eine CDPI<sub>2</sub>-Untereinheit) und dabei effektiv stabile nichtkovalente Komplexe entstehen, daß aber CDPI<sub>4</sub> und CDPI<sub>5</sub> weniger effektiv waren als CDPI<sub>3</sub>. Das Entfernen der Hydroxy- und Methoxysubstituenten (PDE-I<sub>n</sub> → CDPI<sub>n</sub>) hatte nur eine geringe Auswirkung auf die Bindungsaffinität und keine Auswirkung auf die AT-Selektivität<sup>[82]</sup>. Das Fehlen funktioneller Gruppen in den CDPI<sub>n</sub>-Derivaten, die zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen oder zu einer elektrostatischen Stabilisierung beitragen könnten, läßt vermuten, daß die Affinität in der Hauptsache auf stabilisierenden van-der-Waals-Kontakten beruht und daß die Präferenz für eine Bindung in der AT-reichen kleinen Furche auf ein tieferes Eindringen der Substrate in diese engere Furche zurückzuführen ist, wodurch die stabilisierenden Wechselwirkungen maximal werden.

Die Untersuchungen führten folglich zu der Erkenntnis, daß (+)-CC-1065 als eine dem starren CDPI<sub>3</sub>-Gerüst aufgefropfte selektive Alkylierungsgruppe<sup>[82]</sup> und nicht als ein mit einem DNA-bindenden Substrat (PDE-I<sub>2</sub>) verknüpft reaktives Alkylierungsmittel (CPI) anzusehen ist. Die Substrate weisen eine ausgeprägte Vorliebe für eine nichtkovalente Bindung in der AT-reichen kleinen Furche auf, die für das starre Trimer optimal ist. Unter den zur Selektivität für die Bindung in der kleinen Furche beitragenden Eigenschaften sind mindestens zwei Strukturmerkmale eines AT-Basenpaares oder einer Folge von AT-Basenpaaren für Substrate, die auf die Stabilisierung durch van-der-Waals-Wechselwirkungen und hydrophobe Bindungen

bauen, besonders wichtig: Zunächst ragt beim GC-Basenpaar ein Aminosubstituent in die kleinere Furche hinein, während ein AT-Basenpaar keinen derartigen Substituenten aufweist (Abb. 14). Dieser sterisch besser zugängliche Bereich in der Nähe eines AT-Basenpaares ermöglicht dem Substrat ein tieferes

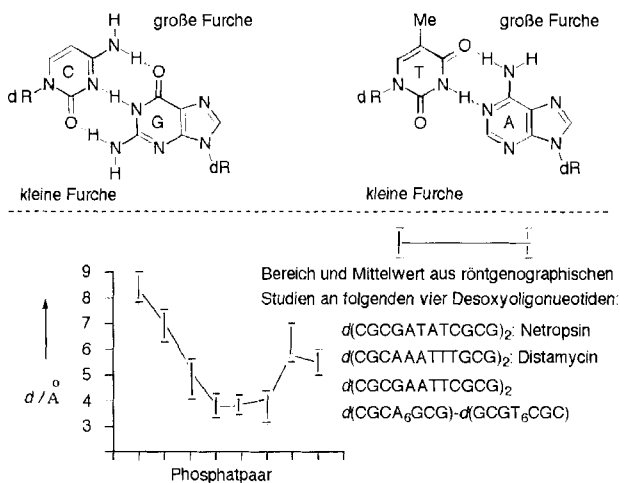


Abb. 14. GC- und AT-Basenpaare und die Veränderlichkeit der Breite der DNA-Furche.  $d$  = effektive Breite der kleinen Furche.

Eindringen in die kleine Furche und erhöht die von den van-der-Waals-Wechselwirkungen ausgehende Stabilisierung. Zusätzlich sind durch röntgenkristallographische Untersuchungen von Oligodesoxynucleotiden, die in der Mitte ihrer Struktur eine Folge von AT-Basenpaaren enthalten, charakteristische Merkmale entdeckt worden, zu denen auch die geringere Breite der AT-reichen kleinen Furche zählt<sup>[14, 15]</sup>. Abbildung 14 zeigt ein Diagramm, in dem die effektive Breite der kleinen Furche von vier derartigen Desoxyoligonucleotiden dargestellt ist, das diese engere AT-reiche kleine Furche betont. Dieses wichtige Konformationsmerkmal einer DNA mit mehreren aufeinander folgenden AT-Basenpaaren trägt hauptsächlich zur Selektivität von Substraten bei, die bei der nichtkovalenten Bindung auf Stabilisierung durch van-der-Waals-Wechselwirkungen angewiesen sind. Es ist anzunehmen, daß sich die nichtkovalenten Komplexe derartiger Substrate mit DNA bevorzugt in der engeren, sterisch besser zugänglichen AT-reichen kleinen Furche bilden, in der die stabilisierenden van-der-Waals-Wechselwirkungen am besten zum Tragen kommen.

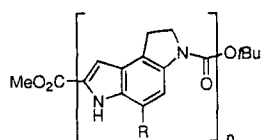
Die Untersuchung der DNA-bindenden Eigenschaften von ACDPI<sub>n</sub> (**20**,  $n = 1-4$ ) und TACDPI<sub>n</sub> (**21**,  $n = 1-3$ ) ergab folgendes<sup>[83]</sup>: Ähnlich wie im Fall der CDPI<sub>n</sub>-Substrate ist ACDPI<sub>3</sub> das am besten in der kleinen Furche bindende Substrat und zeigt eine Selektivität für AT-reiche DNA gegenüber

GC-reicher DNA. Auch TACDPI<sub>n</sub> ist durch eine ausgeprägte Selektivität für AT-reiche DNA charakterisiert ( $n = 3$ ,  $\Delta\Delta G^\circ = -2.7$  bis  $3.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Der Vergleich der CDPI<sub>n</sub>-mit den ACDPI<sub>n</sub>-Substraten macht deutlich, daß das Anbringen eines stark elektronegativen Substituenten auf der äußeren Seite des Substrats die Bindungsaffinität durch das Auftreten destabilisierender elektrostatischer Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrat der DNA herabsetzt. Das Verhalten von TACDPI<sub>n</sub> dagegen zeigte, daß die Einführung einer quartären Ammoniumgruppe an C5 die Bindungsaffinität durch das Auftreten stabilisierender elektrostatischer Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrat wesentlich erhöht (Abb. 15).

Des weiteren stellte sich im Verlauf der Untersuchungen heraus, daß die endständige Urethaneinheit zur Bindungsaffinität und -selektivität von CC-1065 keinen Beitrag leistet<sup>[82]</sup>.

## 4.2. Affinitätsspaltung: die Stellen für nichtkovalentes Binden und Alkylieren sind identisch

Eine Untersuchung der DNA-Spaltungs-Effizienz und -Selektivität des Fe<sup>III</sup>-Komplexes des Affinitätsspaltungsreagens **22**<sup>[85]</sup> (Abb. 16) lieferte einen weiteren direkten Nachweis dafür, daß sowohl im Falle von (+)-CC-1065 als auch im Falle von (–)-CC-1065 alle DNA-Alkylierungsstellen in AT-reichen Regionen für die nichtkovalente Bindung liegen<sup>[86]</sup>; keine der beobachteten DNA-Alkylierungsstellen war außerhalb jener bevorzugten Stellen für das nichtkovalente Binden zu finden. In erster Näherung verlief die relative Alkylierungseffizienz parallel zur relativen Spaltungseffizienz von Fe<sup>III</sup>-**22** bezüglich der konkurrierenden Bindungsstellen. Das Affinitätsspaltungsreagens **22** führte zu einer sauberen Spaltung an beiden Enden einer



- Affinität  
 $n = 3 > 4, 5 > 2 > 1$   
 $R = \text{NMe}_3^+ > \text{H} > \text{NH}_2$
- Spezifität  
AT > GC  
 $\Delta\Delta G^\circ = 2.2 - 2.7 \text{ kcal mol}^{-1}$

Poly[dA]-Poly[dT],  $\Delta G^\circ$  (25 °C, kcal mol<sup>-1</sup>)

R	n = 1	2	3	4	5
NH <sub>2</sub>	-5.1	-6.1	-8.2	-7.8	
H	-6.6	-7.5	-9.9	-8.4	-8.6
NMe <sub>3</sub> <sup>+</sup>	-7.6	-9.8	-11.1		

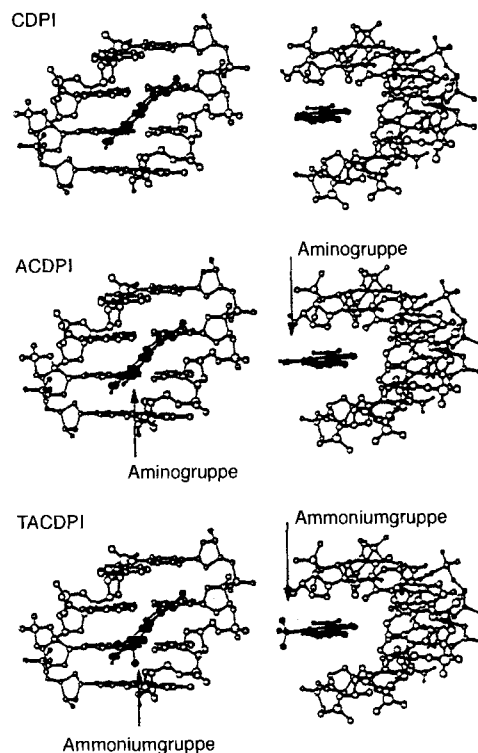
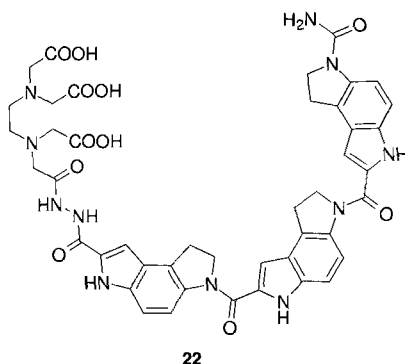


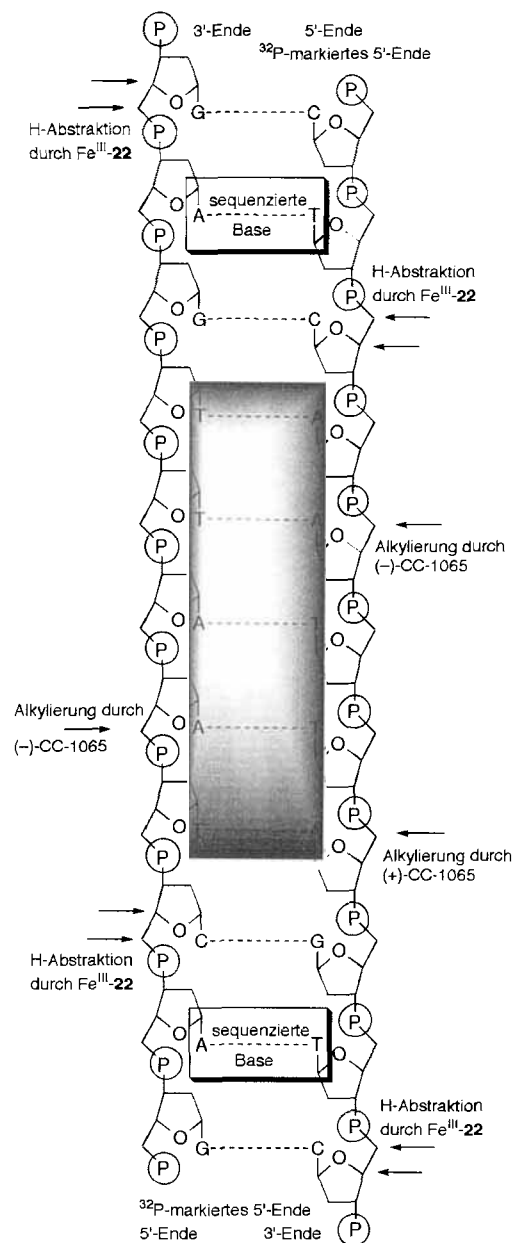
Abb. 15. Einfluß des C5-Substituenten von in der kleinen DNA-Furche bindenden Substraten auf deren Affinität und Selektivität.

Abb. 16. Struktur des Affinitätsspaltungsreagens **22**.

fünf Basenpaare umfassenden Bindungsstelle, die zu den beiden Orientierungen im gebundenen Zustand paßt. Die weiter außerhalb liegenden H-Abstraktionsstellen, über die die Spaltung herbeigeführt wird, stützen die Bindung in der kleinen Furche. In Abbildung 17 ist diese Beziehung zwischen den Stellen der DNA-Spaltung durch **22** und der fünf Basenpaare umfassenden, AT-reichen w794-DNA-Stelle, die mit hoher Affinität durch CC-1065 alkyliert wird, dargestellt. Man beachte, daß (+)-CC-1065 in dieser Sequenz nur eine Stelle und nur einen DNA-Strang alkylieren kann, da der aktivierte Cyclopropanring bei entgegengesetzter Bindungsorientierung zwei 3'-T-Basen benachbart ist.

### 4.3. Circular dichroismus-Untersuchungen

Differenz-Circular dichroismus-Untersuchungen ergaben, daß CC-1065 in der kleinen Furche von AT-reichen Regionen doppelsträngiger B-DNA bindet<sup>[87–97]</sup>. Mit dieser Technik konnte auch nachgewiesen werden, daß (+)-CC-1065 mit dem Dickerson-Dodecamer d(CGCGAATTCGCG)<sub>2</sub> einen stabilen nicht-kovalenten Komplex bildet<sup>[91, 92, 96]</sup>. Wie eine vorübergehende Absorption bei 390 nm deutlich macht, gehen alle Adenin enthaltenden Duplex-Desoxyoligonucleotide zunächst eine nicht-kovalente Bindung mit (+)-CC-1065 ein und reagieren erst anschließend unter Bildung eines kovalenten Addukts, das eine maximale Elliptizität bei 370 nm zeigt<sup>[89–97]</sup>. In den Ausnahmefällen, in denen zwar eine Bindung von CC-1065, aber keine anschließende Alkylierung erfolgt, verfügen die Bindungsstellen über keinen für eine Alkylierung passend angeordneten Adeninrest. So befindet sich der aktivierte Cyclopropanring von (+)-CC-1065 bei beiden Bindungsausrichtungen in der Nähe von zwei 3'-T-Basen des Dickerson-Dodecamers, so daß keine Alkylierungsstelle erreichbar ist. Im Widerspruch zur Annahme der Einzigartigkeit der Alkylierungsreaktion ist die Lage der nucleophilen Adenin-N3-Alkylierungsstelle nicht scharf festgelegt, es ist jedoch erforderlich, daß sie sich am rechten Ende der Bindungsstelle befindet. In Übereinstimmung mit dieser Aussage alkyliert das nichtnatürliche Enantiomer von CC-1065 das Dickerson-Dodecamer ohne Schwierigkeiten. Der aktivierte Cyclopropanring von (–)-CC-1065 ist dabei auf den anderen Strang in unmittelbarer Nähe der beiden 5'-A-Basen gerichtet. Es ist falsch anzunehmen, daß derartige Untersuchungen zeigen, die nichtkovalente Bindung sei für die DNA-Alkylierung

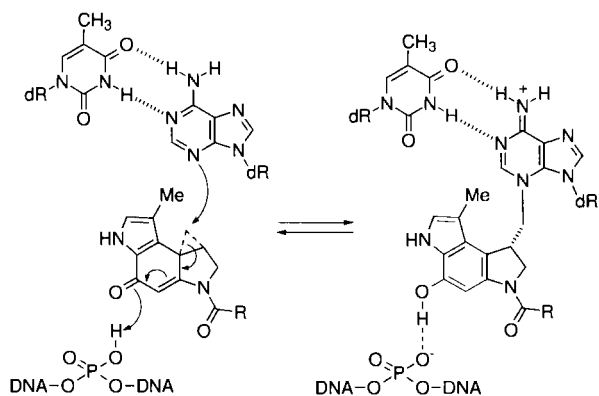
Abb. 17. Modell zur Illustration der Zusammenhänge zwischen den Positionen der Spaltung durch Fe<sup>III</sup>-**22**, den C4'- und C5'-H-Abstraktionsstellen, der sich über fünf AT-reiche Basenpaare erstreckenden Region für die nichtkovalente Bindung und den Stellen der Adenin-N3-Alkylierung durch (+)- und (–)-CC-1065 im Bereich hoher Affinität von w794-DNA.

nicht essentiell, wenn man zu dieser Aussage durch die Untersuchung nur einer einzigen unpassenden Bindungsstelle gelangt<sup>[46, 96]</sup>. Wie die Untersuchungen mit dem Affinitätsspaltungsreagens **22** verdeutlichen, garantiert die nichtkovalente Bindung in einer AT-reichen kleinen Furche zwar nicht die Alkylierung, ist aber eine notwendige Voraussetzung für sie.

### 5. Hypothesen über den Ursprung der Polynucleotiderkennung

Im Verlauf der Untersuchungen mit CC-1065 und den Duocarmycinen sind mehrere Hypothesen über den Ursprung der Alkylierungsselektivität der natürlichen Enantiomere aufge-

stellt worden. So ist sie der sequenzabhängigen Aktivierung durch Protonierung der C4-Carbonylgruppe durch ein strategisch günstig positioniertes Phosphat im DNA-Rückgrat<sup>[43–47, 67–69]</sup>, der konformativen Flexibilität der DNA und der Alkylierung an Knotenpunkten gebogener DNA<sup>[98–103]</sup> oder der bevorzugten nichtkovalenten Bindung und anschließenden Alkylierung in der schmaleren und tieferen kleinen Furche AT-reicher DNA (Schema 2) zugeschrieben worden<sup>[34–42]</sup>.



**Alkylierungsmodell:**

- Die Alkylierungsselektivitäten von (+)-CPI und (+)-CC-1065 sind identisch; die Selektivität ist der CPI-Alkylierungseinheit und der Alkylierungsreaktion inhärent.
- Die Alkylierungsselektivität ist unabhängig von der Bindungsselektivität.
- Die Alkylierung durch (–)-CC-1065 wird über andere Eigenschaften gesteuert.
- konformative Flexibilität der DNA mit Alkylierung an Knotenpunkten
- sequenzabhängige Aktivierung durch Protonierung der C4-Carbonylgruppe durch das Phosphatrückgrat; die C4-Carbonylgruppe ist für die Aktivierung und die Alkylierungsselektivität erforderlich.

**Modell der nichtkovalenten Bindung:**

- Die Alkylierungsselektivitäten von (+)-CPI und (+)-CC-1065 unterscheiden sich; CPI ist ein mäßiges Elektrophil, das einem in AT-reichen Regionen über fünf Basenpaare bindenden Substrat aufgeproßt ist.
- Die Alkylierungsselektivität wird über die Bindungsselektivität und die Zugänglichkeit der Alkylierungsstelle gesteuert.
- Die Alkylierung durch (–)-CC-1065 wird über dieselben Eigenschaften gesteuert.
- Alkylierung innerhalb geeigneter, AT-reicher Bindungssequenzen
- Die Aktivierung durch Phosphatgruppen steuert die Alkylierungsselektivität nicht; die C4-Carbonylgruppe ist nicht erforderlich.

Schema 2. Zusammenfassung der Hauptmerkmale der vorgeschlagenen Modelle.

Im Mittelpunkt der verschiedenen Interpretationen stehen die festgestellten Ähnlichkeiten<sup>[43–48, 64–68]</sup> oder Unterschiede<sup>[34–42, 53, 54]</sup> hinsichtlich der Alkylierungsselektivität einfacher Derivate wie **12** und **13** und der Naturstoffe **1–3**. Die ersten beiden Hypothesen, die von den Arbeitsgruppen von Hurley und Upjohn vertreten werden, beruhen auf der Prämisse, daß (+)-**13** und (+)-**1** dieselben Positionen alkylieren und daß die Alkylierungseinheit oder die Alkylierungsreaktion die Selektivität ohne die Beteiligung nichtkovalenter Bindungen steuert. Im Gegensatz dazu fordert die letzte, von uns favorisierte Hypothese, daß die Selektivität der Substrate für die nichtkovalente Bindung an AT-reiche Regionen und die Leichtigkeit des Zugangs zur Alkylierungsstelle die Sequenzselektivität steuern. Dieses Modell ist den entgegengesetzten und versetzten, sich über 3.5 oder fünf Basenpaare einer AT-reichen Region erstreckenden Adenin-N3-Alkylierungs-Selektivitäten der natürlichen und nichtnatürlichen Enantiomere von **3** bzw. **1** gut angepaßt und

erfordert, daß sich **12** und **13** sowie **1–3** in den Alkylierungsselektivitäten unterscheiden (siehe Abb. 8 und Tabelle 3)<sup>[53, 54, 71]</sup>.

Alle Arbeitsgruppen sind zu dem Ergebnis gekommen, daß die DNA-Alkylierungs-Selektivität der nichtnatürlichen Enantiomere – wie wir in unseren Arbeiten vertreten – durch die Selektivität der Substrate für die nichtkovalente Bindung an AT-reiche Regionen bestimmt wird<sup>[45, 53, 54, 68]</sup>. Die Hurley-Upjohn-Hypothese für die natürlichen Enantiomere verlangt jedoch, daß bei den natürlichen und den nichtnatürlichen Enantiomeren verschiedene grundlegende Polynucleotid-Erkennungselemente aktiv sind<sup>[68]</sup>. Wir wollten von diesen unterschiedlichen Interpretationen wegkommen und den Ursprung der DNA-Alkylierungs-Selektivität endgültig klären. Dies war damals besonders wichtig, weil die Alkylierung von Duplex-DNA durch (+)-CC-1065 als ein prototypisches Beispiel für sequenzabhängige DNA-Reaktivität dargestellt und oft als solches zitiert wurde<sup>[43, 46, 47]</sup>. Bevor eine solche Vorstellung allgemein anerkannt wird, sollte sie experimentell überprüft und bestätigt werden.

## 5.1. Zweifelsfreie Überprüfung der vorgeschlagenen Modelle zur Erklärung der DNA-Alkylierungs-Selektivität von CC-1065 und den Duocarmycinen

### 5.1.1. Überprüfung der Bedeutung der Protonierung der C4-Carbonylgruppe

Die Vorstellung einer sequenzabhängigen Aktivierung als Folge einer Protonierung der C4-Carbonylgruppe durch eine strategisch günstig angeordnete Phosphatgruppe im DNA-Rückgrat ist verlockend; eine direkte Überprüfung dieser Idee ergab aber, daß der Ursprung für die Sequenzselektivität der DNA-Alkylierung hier nicht zu finden war. In der entscheidenden Untersuchung<sup>[104, 105]</sup> wurde nachgewiesen, daß **23–26** (Abb. 18) – unabhängig von ihrer absoluten Konfiguration –

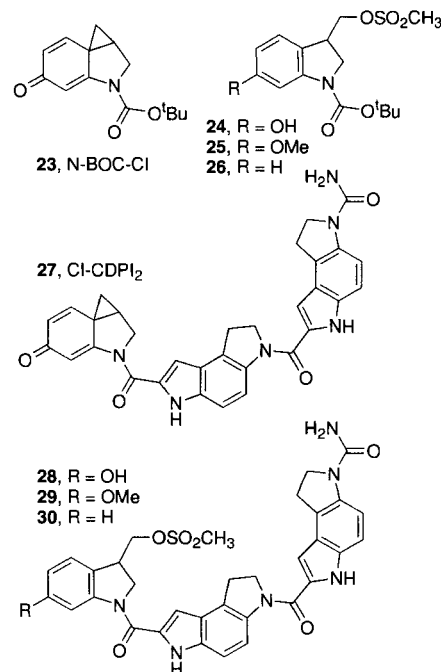


Abb. 18. Strukturen der Substrate **23–30** ohne Angabe der Konfiguration.

dieselben Alkylierungsselektivitäten ( $5'\text{-AA} > 5'\text{-TA}$ ) zeigen und daß diese mit den Alkylierungsselektivitäten der beiden Enantiomere von **12** und **13** identisch sind. Darüber hinaus zeigen die natürlichen Enantiomere der Verbindungen **27–30** (Abb. 18, 19) dieselben DNA-Alkylierungs-Selektivitäten wie (+)-CC-1065 und sind sehr viel selektiver und effizienter als die

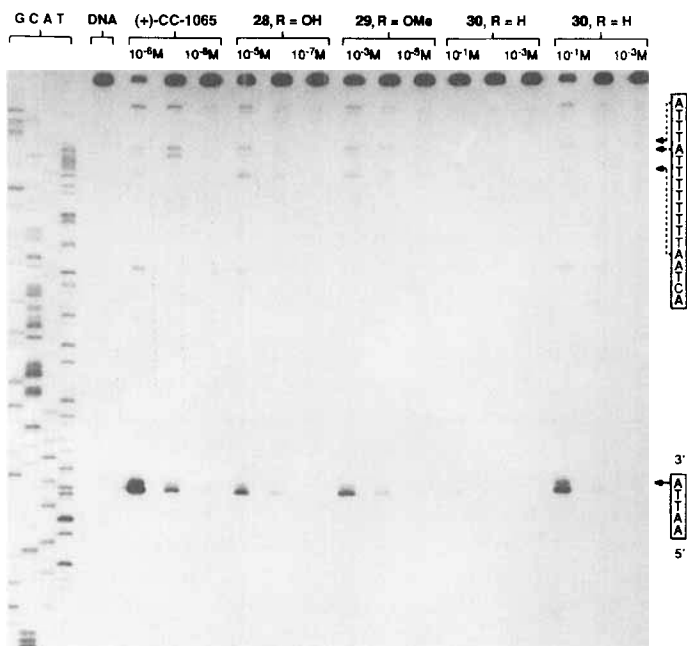


Abb. 19. Analyse des durch 30minütiges Erhitzen auf  $100^\circ\text{C}$  ausgelösten Strangbruchs bei doppelsträngiger DNA (SV40-DNA-Fragment, 144 Basenpaare, Nucleotid-Nr. 138-5238, Klon w794) nach 24stündiger Inkubation bei  $4$  oder  $37^\circ\text{C}$  sowie Entfernung des nicht gebundenen Substrats durch EtOH-Fällung durch denaturierende PAGE (8%) und Autoradiographie. Spuren 1–4: Sanger-G-, -C-, -A- und -T-Reaktionen; Spur 5: Vergleichs-DNA; Spuren 6–8: **1** ( $2.5 \times 10^{-6}$ – $2.5 \times 10^{-8}$  M,  $4^\circ\text{C}$ ); Spuren 9–11: **28** ( $2.5 \times 10^{-5}$ – $2.5 \times 10^{-7}$  M,  $4^\circ\text{C}$ ); Spuren 12–14: **29** ( $2.5 \times 10^{-3}$ – $2.5 \times 10^{-5}$  M,  $4^\circ\text{C}$ ); Spuren 15–17: **30** ( $2.5 \times 10^{-1}$ – $2.5 \times 10^{-3}$  M,  $4^\circ\text{C}$ ); Spuren 18–20: **30** ( $2.5 \times 10^{-1}$ – $2.5 \times 10^{-3}$  M,  $37^\circ\text{C}$ ). Die hier für die Racemate von **28–30** gezeigten Befunde unterscheiden sich nicht von den unter analogen Bedingungen mit den reinen natürlichen Enantiomeren erhaltenen.

von **23–26**<sup>[104]</sup>. Die Beobachtung, daß Verbindungen wie **25**, **26**, **29** und **30**, denen die C4-Carbonylgruppe fehlt, dieselben Bindungsstellen wie **23** oder **27** alkylieren, bestätigte, daß eine sequenzabhängige Protonierung und Aktivierung durch das Phosphatrückgrat nicht der die Alkylierungsselektivität bestimmende Vorgang sein konnte. Weiterhin ist die – unabhängig von der Art des Elektrophils – sehr viel selektivere DNA-Alkylierung durch **27–30/1–3** als durch **23–26/12, 13** nicht in Einklang mit den Behauptungen, daß die Alkylierungsreaktion und der Charakter der Alkylierungseinheit die Alkylierungsselektivität steuern. Dagegen sind diese Beobachtungen in Einklang mit dem Modell der nichtkovalenten Bindung.

Außerdem ist es nicht wahrscheinlich, daß die DNA-Alkylierung – wie von Warpehosi und Harper<sup>[106]</sup> vertreten wird – bei pH 7–7.6 säurekatalysiert ist, sondern es ist vielmehr zu vermuten, daß Metall-Kationen, die an das deprotonierte Phosphatrückgrat gebunden sind, als Lewisäure-Katalysatoren fungieren. Versuche, die Geschwindigkeit der DNA-Alkylierung zu erhöhen, müssen auf die Erwägung einer Lewis- oder Brønstedtsäurekatalysierten Reaktion abgestimmt sein.

### 5.1.2. Wechsel der gegebenen Enantiomeraselektivität durch Umkehrung der Substratorientierung: ein definitiver Beweis für den Ursprung der Alkylierungsselektivität

Der Schlüssel zur zweiten und eindeutigen Studie<sup>[108]</sup> über den Ursprung der Alkylierungsselektivität war die Entdeckung, daß sowohl das natürliche als auch das nichtnatürliche Enantiomer von Duocarmycin SA DNA wirksam alkyliert<sup>[54]</sup>. Eine Besonderheit von **3** ist der C6-Methylester auf der linken Seite der Alkylierungseinheit, der die die rechte Seite anbindende Amidfunktion ergänzt. Dies schafft die Möglichkeit, auf beiden Seiten der Duocarmycin-SA-Alkylierungseinheit DNA-bindende Strukturelemente anzubringen. In unseren Arbeiten haben wir sowohl die natürlichen als auch die nichtnatürlichen Enantiomere der verlängerten und reversen Duocarmycin-SA-Analoga **31** und **32** untersucht (Abb. 20). Es war zu erwarten, daß (+)- und (–)-DSA-CDPI<sub>2</sub> **31** eine ausgedehntere (über fünf Basenpaare reichende) Alkylierungsselektivität zeigen würden als **3** und sich wie (+)-CC-1065 (d.h.  $5'\text{-AAAAA}$ -Selektivität) bzw. (–)-CC-1065 (d.h.  $5'\text{-AAAAA}$ -Selektivität) verhalten würden<sup>[53]</sup>. Gemäß dem Modell der nichtkovalenten Bindung war zu erwarten, daß die reversen Substrate (+)- und (–)-CDPI<sub>2</sub>-DSA **32** eine ähnliche über fünf Basenpaare reichende Alkylierungsselektivität zeigen sollten, die sich jedoch in die atypische,

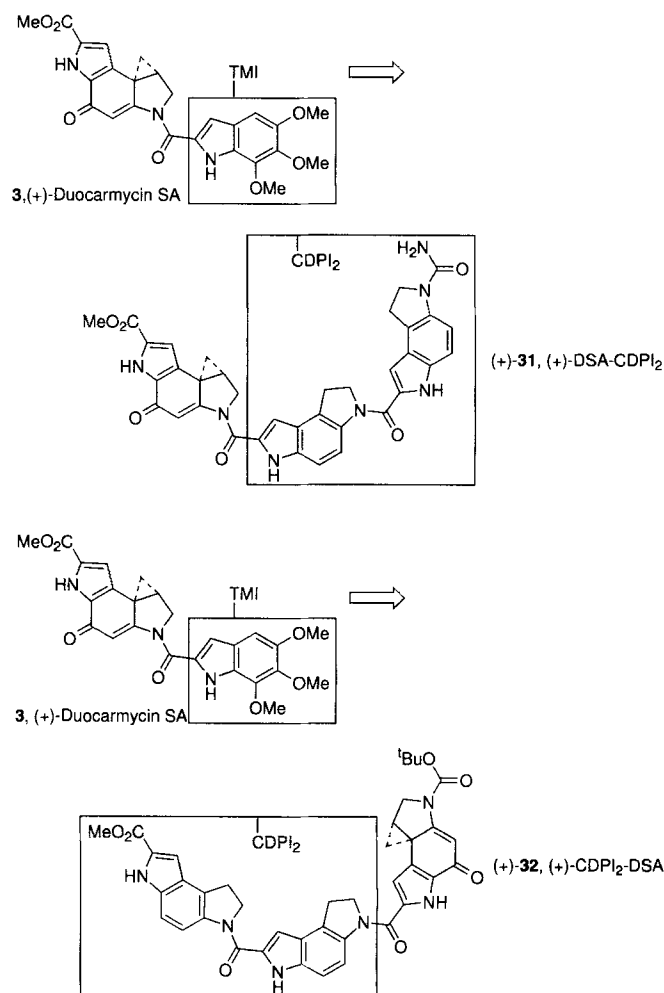


Abb. 20. Verlängerte (oben) und reverse (unten) Analoga von (+)-Duocarmycin SA **3**.



Tabelle 6. Sequenzübereinstimmung bei der DNA-Alkylierung durch die verlängerten (**31**) und reversen Duocarmycin-SA-Analoga (**32**) [a].

Substrat	Base [b] 5'	4	3	2	1	0	-1	-2	-3	-4	3'
<i>natürliche Enantiomere</i>											
(+)-CC-1065 ( <b>1</b> )	A/T (56)	67	78	94	98	100	55	—	—	—	—
	Übereinstimmung	A/T > G/C	A/T > G/C	A/T	A/T	A	Pu ≥ Py	—	—	—	—
(+)-DSA-CDPI <sub>2</sub> ((+)- <b>31</b> )	A/T (56)	71	85	100	100	100	63	—	—	—	—
	Übereinstimmung	A/T > G/C	A/T > G/C	A/T	A/T	A	Pu > Py	—	—	—	—
(+)-CDPI <sub>2</sub> -DSA ((+)- <b>32</b> )	A/T (56)	—	—	—	95	100	98	85	70	55	—
	Übereinstimmung	—	—	—	A/T	A	A/T	A/T > G/C	A/T > G/C	N	—
<i>nichtnatürliche Enantiomere</i>											
(-)-DSA-CDPI <sub>2</sub> ((-)- <b>31</b> )	A/T (56)	—	—	—	100	100	100	90	73	58	—
	Übereinstimmung	—	—	—	A/T	A	A/T	A/T	A/T > G/C	N	—
(-)-CDPI <sub>2</sub> -DSA ((-)- <b>32</b> )	A/T (56)	69	81	98	98	100	59	—	—	—	—
	Übereinstimmung	A/T > G/C	A/T > G/C	A/T	A/T	A	Pu > Py	—	—	—	—
(-)-CC-1065 ( <i>ent</i> - <b>1</b> )	A/T (56)	—	—	—	88	100	93	82	73	56	—
	Übereinstimmung	—	—	—	A/T	A	A/T	A/T > G/C	A/T > G/C	N	—

[a] Die Zahlen unter den Positionen geben den Prozentsatz an, mit dem die jeweilige Base in dieser Position relativ zur Adenin-N3-Alkylierungsstelle auftritt. [b] In Klammern prozentualer Anteil in der untersuchten DNA.

entgegengesetzte Richtung bezüglich der Alkylierungsstelle erstrecken sollte. Weiterhin war zu erwarten, daß die Alkylierungsstellen für das reverse Substrat (+)-**32** mit denen für *ent*-**1** und (-)-**31** übereinstimmen und daß Analoges für (-)-**32**, **1** und (+)-**31** gilt. Im Gegensatz dazu fordert das andere Modell, das davon ausgeht, daß die Alkylierungsselektivität in der Alkylierungseinheit enthalten und von der Bindungsselektivität unabhängig ist, daß die beiden natürlichen Enantiomere (+)-**31** und (+)-**32** dieselben Stellen alkylieren. Die Untersuchung der DNA-Alkylierungs-Selektivitäten der beiden Enantiomere von **31** und **32** bot somit einen eindeutigen Test für die beiden Modelle mit einer definitiven Lösung.

Es stellte sich heraus, daß (+)- und (-)-**31** DNA mit derselben Selektivität alkylieren wie (+)- bzw. (-)-CC-1065 (Tabelle 6)<sup>[109]</sup>. Das natürliche Enantiomer des reversen Substrats, (+)-**32**, alkylierte DNA mit derselben Selektivität wie (-)-**31** und *ent*-**1**<sup>[108,109]</sup>. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 21 sehr schön verdeutlicht, in der nicht nur die Alkylierungsselektivitäten der Enantiomere von **31** sondern auch die der Enantiomere des reversen Substrats **32** gezeigt sind. Diese

Umwandlung eines natürlichen Enantiomers der Duocarmycin-SA-Alkylierungseinheit in ein Substrat mit der DNA-Alkylierungs-Selektivität eines typischen nichtnatürlichen Enantiomers durch einfaches Umdrehen der Anordnung der DNA-bindenden Strukturelemente ist nur mit einem Modell vereinbar, bei dem die Wahl der Alkylierungsstellen durch die Bindungsselektivität und die Tiefe des Eindringens in die kleine Furche in der Umgebung der Alkylierungsstelle gesteuert wird. Überdies sind diese Beobachtungen definitiv nicht mit Modellen vereinbar, die auf der Prämisse basieren, daß die Alkylierungseinheit des natürlichen Enantiomers die Alkylierungsselektivität steuert. In ähnlicher Weise fand man heraus, daß das nichtnatürliche Enantiomer des reversen Substrats, (-)-**32**, dieselben Stellen alkyliert wie die typischen natürlichen Enantiomere (+)-**31** und **1**. Diese Umkehr der Alkylierungsselektivität, die mit dem einfachen Umdrehen der Substratorientierung einhergeht (Abb. 22), ist allgemeingültig und bestätigt, daß bei den natürlichen und den nichtnatürlichen Enantiomeren dieselben elementaren Erkennungsmerkmale wirksam sind.

Dieses Verhalten der Substrate mag aus der zweidimensionalen Darstellung von **31** und **32** nicht klar zu erkennen sein, doch eine einfache horizontale Drehung von **32** verdeutlicht die bemerkenswerte strukturelle Ähnlichkeit mit **31** und läßt erkennen, daß es das Paar natürliches/nichtnatürliches Enantiomer von **31/32** ist, in dem der Cyclopropanring relativ zu den DNA-bindenden Strukturelementen ähnlich angeordnet ist. In Abbildung 23 sind Modelle für die Alkylierung der 5'-AATTA-Bindungsstelle hoher Affinität durch (+)-**31** und (-)-**32** gezeigt und in Abbildung 24 solche für die Alkylierung der 5'-AATTT Bindungsstelle hoher Affinität durch (-)-**31** und (+)-**32**. Die Bedeutung dieser Gegenüberstellungen sollte nicht unterschätzt werden. Die Ergebnisse for-

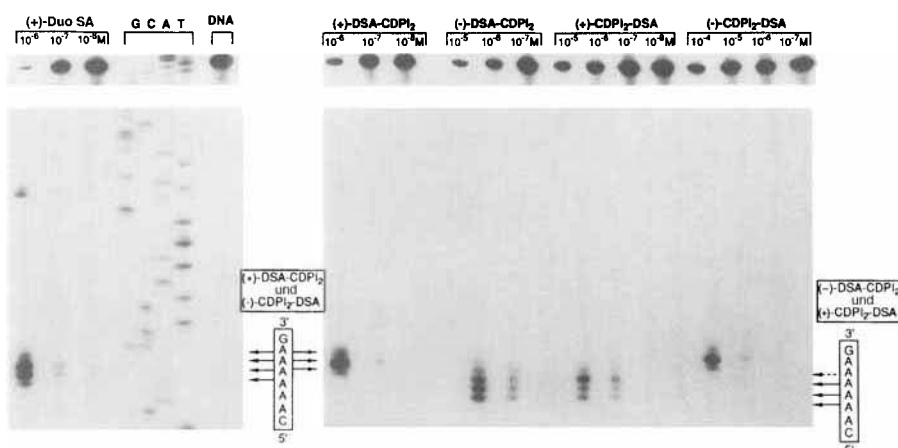


Abb. 21. Analyse des durch 30minütiges Erhitzen auf 100 °C ausgelösten Strangbruchs bei w836-DNA (146 Basenpaare, Nucleotid-Nr. 5189-91) nach Inkubation bei 25 °C sowie Entfernung des nicht gebundenen Substrats durch EtOH-Fällung durch denaturierende PAGE (8%) und Autoradiographie. Spuren 1–3:  $3 \times 10^{-6}$ – $1 \times 10^{-8}$  M; Spuren 4–7: Sanger-G, -C, -A- und -T-Sequenzierungsstandards; Spur 8: Vergleichs-DNA; Spuren 9–11: (+)-**31** ( $1 \times 10^{-6}$ – $1 \times 10^{-8}$  M); Spuren 12–14: (-)-**31** ( $1 \times 10^{-5}$ – $1 \times 10^{-7}$  M); Spuren 15–18: (+)-**32** ( $1 \times 10^{-5}$ – $1 \times 10^{-8}$  M); Spuren 19–22: (-)-**32** ( $1 \times 10^{-4}$ – $1 \times 10^{-7}$  M).

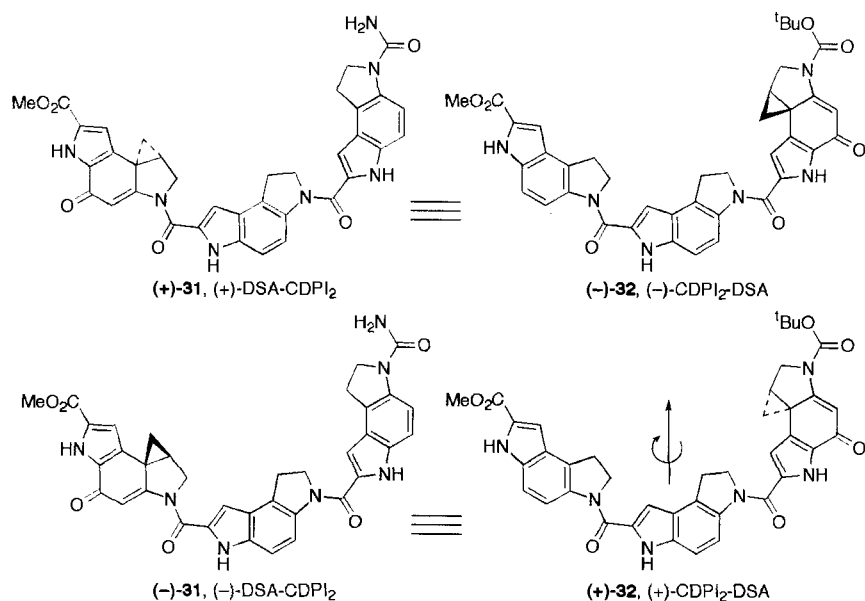


Abb. 22. Darstellungen der Enantiomere von **31** und **32**, die die Ähnlichkeiten im experimentellen Verhalten verdeutlichen. Der Pfeil gibt die horizontale Drehung um 180° an (siehe Text).

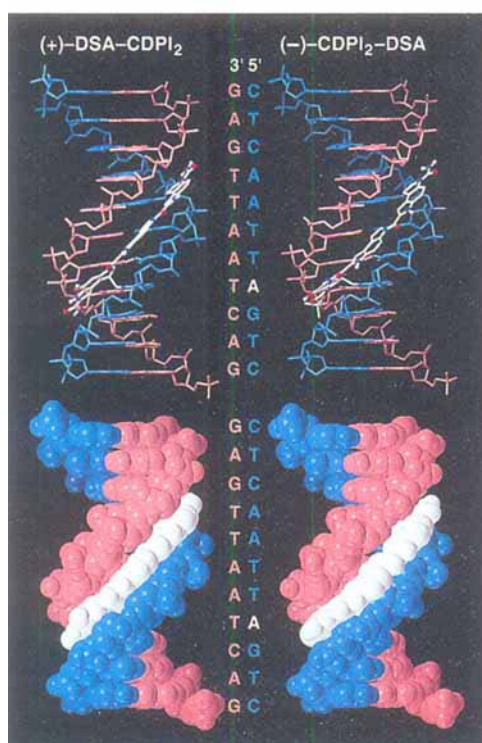


Abb. 23. Stab- und Kalottenmodelle für die Alkylierung derselben Bindungsstelle hoher Affinität in w794-DNA (5'-CTCAATTAGTC) durch (+)-**31** (links) und (-)-**32** (rechts). Die Bindung des natürlichen Enantiomers erstreckt sich in 3'→5'-Richtung von der Adenin-N3-Alkylierungsstelle über die fünf Basenpaare umfassende, AT-reiche Sequenz 5'-AATTG. Das nichtnatürliche Enantiomer des reversen Substrats bindet in derselben 3'→5'-Richtung an dieselbe fünf Basenpaare umfassende, AT-reiche Sequenz 5'-AATTG.

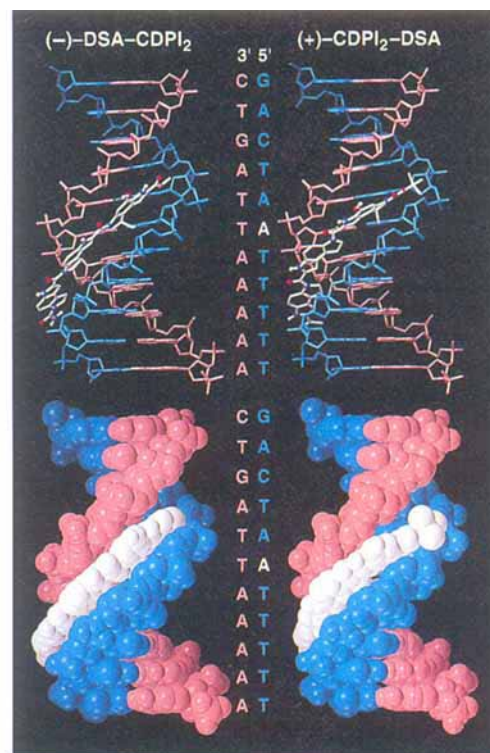


Abb. 24. Stab- und Kalottenmodelle für die Alkylierung derselben Bindungsstelle hoher Affinität in w794-DNA (5'-GACTAATTTT-3') durch (-)-**31** (links) und (+)-**32** (rechts). Das nichtnatürliche Enantiomer bindet in 5'→3'-Richtung an die fünf Basenpaare umfassende, AT-reiche Sequenz 5'-AATTT. Das natürliche Enantiomer des reversen Substrats bindet in derselben 5'→3'-Richtung an dieselbe fünf Basenpaare umfassende, AT-reiche Sequenz 5'-AATTT.

dern nicht nur dieselben Erkennungsmerkmale für beide Enantiomere, sondern liefern auch einen eindeutigen Beweis dafür, daß die nichtkovalente Bindung an die AT-reichen Regionen die Wahl der DNA-Alkylierungsstellen bei den natürlichen und den nichtnatürlichen Enantiomeren bestimmt. Die trotz unter-

schiedlicher Positionen des Cyclopropanrings identischen DNA-Alkylierungs-Selektivitäten von (+)-**31**/(-)-**32** und (-)-**31**/(+)-**32** lassen darüber hinaus vermuten, daß die Positionierung nicht exakt sein muß; es genügt offenbar, wenn die Reaktanten einander erreichen können.

Tabelle 7. Sequenzübereinstimmung bei der DNA-Alkylierung durch die natürlichen und nichtnatürlichen Enantiomere der Duocarmycin-SA-Sandwichanaloga [a].

Substrat	Base [b] 5'	4	3	2	1	0	-1	-2	-3	-4	3'
<i>natürliche Enantiomere</i>											
(+)-CC-1065 (1)	A/T (56)	67	78	94	98	100	55	–	–	–	–
	Übereinstimmung	A/T > G/C	A/T > G/C	A/T	A/T	A	Pu ≥ Py	–	–	–	–
(+)-CDPI <sub>1</sub> -DSA-CDPI <sub>1</sub> ((+)-33)	A/T (56)	–	68	87	95	100	95	74	68	–	–
	Übereinstimmung	–	N	A/T > G/C	A/T	A	A/T	A/T > G/C	N	–	–
<i>nichtnatürliche Enantiomere</i>											
(-)-CDPI <sub>1</sub> -DSA-CDPI <sub>1</sub> ((-)-33)	A/T (56)	–	64	86	94	100	94	78	68	–	–
	Übereinstimmung	–	N	A/T > G/C	A/T	A	A/T	A/T > G/C	N	–	–
(-)-CC-1065 ( <i>ent</i> -1)	A/T (56)	–	–	–	88	100	93	82	73	56	–
	Übereinstimmung	–	–	–	A/T	A	A/T	A/T > G/C	A/T > G/C	N	–

[a] Die Zahlen unter den Positionen geben den Prozentsatz an, mit dem die jeweilige Base in dieser Position relativ zur Adenin-N3-Alkylierungsstelle auftritt. [b] In Klammern prozentualer Anteil in der untersuchten DNA.

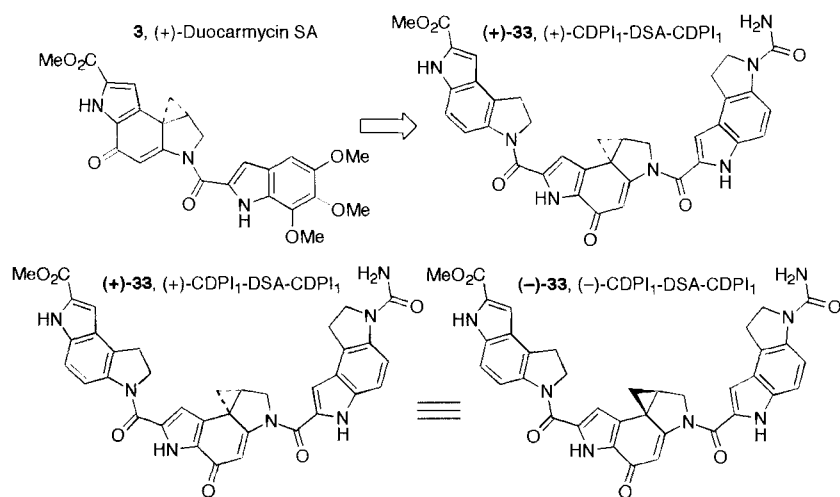


Abb. 25. Sandwichanaloga von Duocarmycin SA.

### 5.1.3. „Sandwich“analoga von Duocarmycin SA: eine Substratklasse mit von der absoluten Konfiguration unabhängiger DNA-Alkylierungs-Selektivität

Bei einer späteren eleganten Überprüfung dieser Beobachtungen sind durch Verknüpfung beider Enden der Duocarmycin-Alkylierungseinheit mit einem DNA-bindenden Strukturelement das natürliche und das nichtnatürliche Enantiomer von **33** hergestellt und untersucht worden (Abb. 25)<sup>[109]</sup>. In Einklang mit dem Modell der nichtkovalenten Bindung zeigen (+)- und (-)-**33** identische DNA-Alkylierungs-Selektivitäten, die sich entweder von denen der natürlichen oder von denen der nichtnatürlichen Enantiomere der verlängerten oder reversen Substrate **31** bzw. **32** unterscheiden (Tabelle 7).

## 6. Die Strukturen von Oligonucleotid-Substrat-Komplexen

Spektroskopische Untersuchungen von Komplexen zwischen den Substraten und bestimmten Stellen von Desoxyoligonucleotiden haben die Richtigkeit der Modelle bestätigt und dabei geholfen, Feinheiten in den Strukturen aufzudecken. Besonders wichtig war die Bestätigung der Bindungsorientierung der natürlichen und nichtnatürlichen Enantiomere in der kleinen Furche relativ zu dem zu alkylierenden Strang sowie die Versetzung der vom Substrat eingenommenen Bindungsstelle relativ zur

Alkylierungsstelle. Eine detaillierte NMR-spektroskopische Untersuchung des Komplexes zwischen (+)-Duocarmycin SA und dem Duplex d(GACTAATTGAC) · d(GTCAATTAGTC), der die Sequenz der Alkylierungsstelle hoher Affinität in w794-DNA enthält<sup>[110]</sup>, lieferte eine hochaufgelöste Struktur des kovalenten Komplexes in Lösung und bestätigte die Richtigkeit der ursprünglichen Modelle, in dem sie die Adenin-N3-Alkylierung und eine 3' → 5'-Bindung in der kleinen Furche über die 5'-ATTA-Stelle ergab (Abb. 26).

Auch ein Komplex aus (+)-CC-1065 und d(CGATTAGC) · d(GCTAATCG) wurde NMR-spektroskopisch untersucht<sup>[111]</sup>. Das Substrat ist kovalent an das N3-Atom des Adeninrests A6 gebunden und bindet in 3' → 5'-Richtung über fünf Basenpaare in der kleinen Furche. Ein Komplex aus (+)-CC-1065 und d(GGCGGAGTTAGG) · d(CCTAACTCCGCC) konnte ebenfalls charakterisiert werden<sup>[69, 112]</sup>. Diese Untersuchungen zeigten, daß der alkylierte Adeninrest in protonierter Form vorliegt, wobei sich die beiden Wasserstoffatome an der exocyclischen C6-Aminogruppe befinden<sup>[112]</sup>. Da keine Phosphatgruppe des Rückgrats so nahe liegt, daß sie die C4-Carbonylgruppe hätte protonieren können, wurde vermutet, daß ein Wassermolekül diese Protonierung durch eine Brücke zwischen dem phenolischen Proton von CPI und der Phosphatgruppe zwischen A16 und A17 vermitteln könnte. Ein sehr kleiner <sup>17</sup>O(H<sub>2</sub><sup>17</sup>O)-Isotopeneffekt auf die Breite des NMR-Signals die-

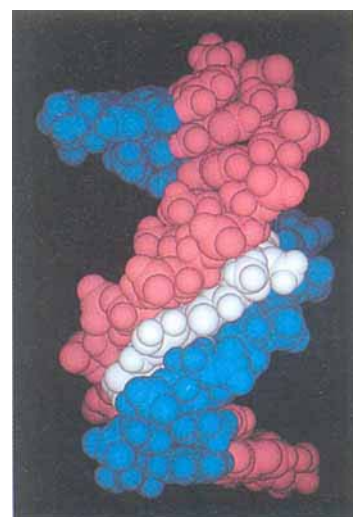


Abb. 26. Kalottenmodell des kovalenten Komplexes zwischen (+)-Duocarmycin SA und d(GACTAATTGAC) · d(GTCAATTAGTC). Diese Struktur in Lösung wurde durch Moleküldynamikrechnungen unter Verwendung von NMR-spektroskopisch bestimmten Abständen und Beschränkungen bei den Diederwinkeln erhalten [110].

ses phenolischen Protons wurde dazu verwendet, diese Hypothese<sup>[69]</sup> sowie die Vorstellung zu stützen, daß diese Wechselwirkung die molekulare Grundlage für die Sequenzselektivität von (+)-CC-1065 und seinen Analoga liefern könnte. Es stellte sich jedoch später heraus, daß die Ergebnisse der <sup>17</sup>O-Experimente nicht – wie zuvor vermutet<sup>[49]</sup> – einfach einem dem Anschein nach fest gebundenen Wassermolekül zugeschrieben werden können. Im Anschluß an die Adduktbildung krümmt sich der 12mer-Doppelstrang (17–22°), wobei der Schwerpunkt der Krümmung zwischen T8 und T9 liegt, was zu einer Verengung der kleinen Furche in diesem Bereich führt.

Des weiteren wurde ein Komplex aus (+)-CPI-CDPI<sub>2</sub> und d(CGCTTAAGCG)<sub>2</sub> untersucht<sup>[113]</sup>. Das NMR-Spektrum weist auf die Bildung eines Hauptaddukts an A7 hin, wobei die Substratbindung in Richtung auf das 5'-Ende des zugehörigen Strangs ausgerichtet ist.

Ein ortsspezifisch gebildetes kovalentes Addukt aus Duocarmycin A und einer intramolekularen Tripelhelix wurde ebenfalls untersucht<sup>[114]</sup>. Es zeigte sich, daß Duocarmycin A in diesem Komplex in der kleinen Furche gebunden ist und dort – analog zur Alkylierung von Duplex-DNA – einen bestimmten Adeninrest der 5'-AAA-3'-Sequenz alkyliert. Bei niedrigen Temperaturen und kleinen pH-Werten vertreibt das in der kleinen Furche gebundene Duocarmycin A den dritten Pyrimidinstrang aus der großen Furche der Tripelhelix nicht. Der pK<sub>a</sub>-Wert für die Protonierung der Cytidinreste des dritten Strangs in der großen Furche ist jedoch um 1.8 herabgesetzt.

## 7. Modifizierte Alkylierungseinheiten

Als die Unterschiede in der Bedeutung der Alkylierungseinheiten von 1–3 und in ihrem Beitrag zum Alkylierungsprofil deutlich wurden, wurden Untersuchungen mit modifizierten Alkylierungseinheiten in Angriff genommen, um das Problem direkt anzugehen. Man nahm an, daß Substrate mit stark modifizierter Alkylierungseinheit, die nicht über eine einfache Derivatisierung erhältlich sind, dazu dienen könnten, die an der funktionellen Reaktivität und der Regioselektivität beteiligten Struktureigenschaften sowie das Ausmaß, in dem bestimmte Strukturmerkmale die Alkylierungsselektivität oder -effizienz beeinflussen, zu definieren und die elementaren Zusammenhänge zwischen Struktur, funktioneller Reaktivität und biologischen Eigenschaften zu ergründen.

### 7.1. CI: kleinstes wirksames Pharmakophor der Alkylierungseinheit und gemeinsames Pharmakophor der Naturstoffe

Eine der ersten untersuchten Substratklassen enthielt die Stammalkylierungseinheit 1,2,7,7a-Tetrahydrocyclopropa[c]-indol-4-on (CI, Abb. 27). Wie erwartet, sind diese Substrate, außerordentlich reaktive Elektrophile. Trotz der starken Änderung der Struktur und der relativen Reaktivität der Alkylie-

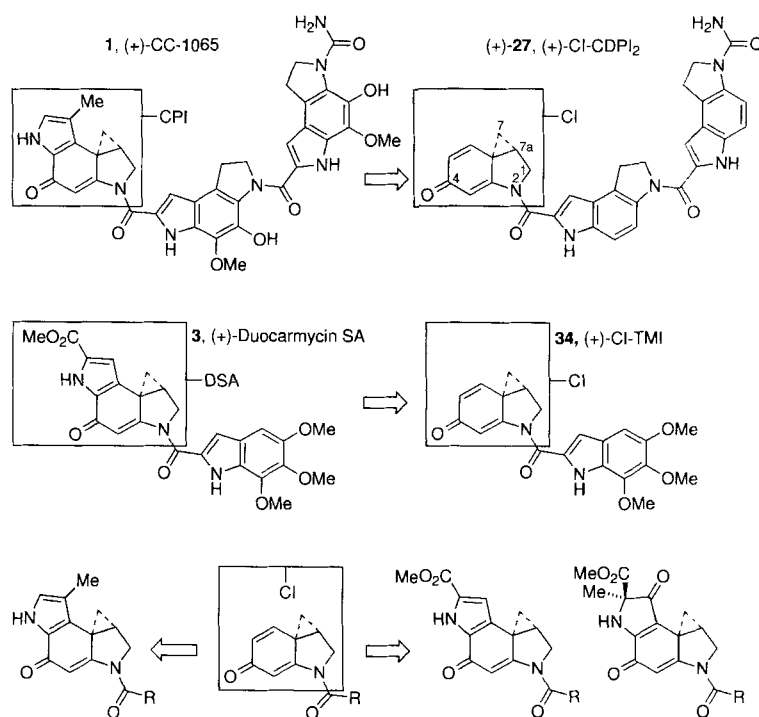


Abb. 27. CI: Kleinstes wirksames Pharmakophor der CC-1065- (oben rechts mit Angabe der für CI gültigen Atomnumerierung) und der Duocarmycin-Alkylierungseinheit (Mitte) und somit auch gemeinsames Pharmakophor von CC-1065 und den Duocarmycinen.

rungseinheit sind die Alkylierungsselektivitäten der Substrate (+)-27 und 34 denen der Naturstoffe 1 bzw. 2 und 3 auffallend ähnlich, und die Untersuchung dieser Substrate lieferte mehr Erkenntnisse hinsichtlich der relativen Bedeutung und Rolle der Alkylierungseinheit als erwartet<sup>[55, 56, 72, 115, 116]</sup>. Zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen wurde die Bedeutung der Alkylierungseinheit so hoch gespielt, daß bereits das einfache Entfernen der CPI-C7-Methylgruppe – geschweige denn erst das Entfernen des ganzen Pyrrolsegments – als nachteilig für die DNA-Alkylierungs-Selektivität angesehen wurde.

Es zeigte sich, daß die CI-Alkylierungseinheit das kleinste wirksame Pharmakophor der Alkylierungseinheiten der Naturstoffe darstellt und daß sie das gemeinsame Pharmakophor von CC-1065 und den Duocarmycinen ist. Man fand heraus, daß die außerordentlich reaktiven CI-Substrate dieselben Bindungsstellen alkylieren wie die entsprechenden CPI- oder Duocarmycin-Substrate, daß sie jedoch eine geringere Effizienz aufweisen und unter den verfügbaren Bindungsstellen weniger selektieren. Wichtig ist, daß trotz der 1000mal höheren Reaktivität keine zusätzlichen Adenin-N3-Alkylierungsstellen nachgewiesen werden konnten. Diese Beobachtung war für uns ein erstes Anzeichen dafür, daß die Art der Alkylierungsreaktion für die DNA-Alkylierungs-Selektivität weniger entscheidend ist, als von anderen Arbeitsgruppen<sup>[46]</sup> vermutet wurde. In Einklang mit ihrer Instabilität alkylieren die CI-Substrate DNA weniger effizient und zeigen eine deutlich geringere cytotoxische Wirksamkeit.

### 7.2. CBI: eine einfachere und bessere Alkylierungseinheit

In ähnlicher Weise erwies sich die Untersuchung der CBI-Substratklasse als wichtig und zeitlich passend<sup>[115–125]</sup>. Diese

Substratklasse enthält die Alkylierungseinheit 1,2,9,9a-Tetrahydrocyclopropa[*c*]benzo[*e*]indol-4-on (CBI), in der der Pyrrolring der Naturstoffe gegen einen Benzolring ausgetauscht wurde (Abb. 28). Die damit verbundene Abnahme der Ringspannung

sen könnte und daß die CPI-C7-Methylgruppe, die früher einmal für wichtig gehalten wurde, möglicherweise in Wirklichkeit die den CPI-Substraten innewohnenden Eigenschaften schwächt.

Bei der Untersuchung von CBI- und CI-Substraten entwickelte sich die Vorstellung, daß die cytotoxische Wirksamkeit und die funktionelle Stabilität in direkter Beziehung zueinander stehen könnten. Zum Zeitpunkt dieser Entdeckungen herrschte die Meinung vor, daß die entgegengesetzte direkte Beziehung zwischen funktioneller Reaktivität, nicht Stabilität, und cytotoxischer Wirksamkeit von Bedeutung sei<sup>[46, 159]</sup> und daß sich geringe und erst recht starke Veränderungen an der Alkylierungseinheit negativ und nicht positiv auf die DNA-Alkylierungs- und die biologischen Eigenschaften auswirken würden. Infolgedessen führten die Ergebnisse mit den CBI-Substraten eine Veränderung der Sichtweise auf diesem Gebiet herbei. Außerdem zeigte sich – und das war von größter Bedeutung –, daß mit Substraten, die einschneidende und vereinfachende Strukturänderungen in der Alkylierungseinheit enthalten, eine *In-vivo*-Antitumorwirkung<sup>[121, 166]</sup> beobachtet werden kann und daß man die Wirksamkeit von aus der Natur entnommenen Substraten verbessern kann, indem man ihre chemische Stabilität erhöht. Obwohl die Angriffsstellen für die DNA-Alkylierung nicht verändert werden, werden die Geschwindigkeit und die Effizienz der DNA-Alkylierung erhöht, und die inhärente DNA-Alkylierungs-Selektivität bezüglich der verfügbaren Angriffsstellen kann verbessert werden, indem man die funktionelle Stabilität des Substrats erhöht.

### 7.3. MCBI und CCBI: elektronische Einflüsse auf die funktionelle Reaktivität

Bei der weiteren Untersuchung der Strukturmerkmale, die die Reaktivität beeinflussen, sind kürzlich die substituierten CBI-Substrate MCBI 37<sup>[126]</sup> und CCBI 38<sup>[127]</sup> mit einem C7-Methoxy- bzw. -Cyanosubstituent in *para*-Stellung zum C4-Atom (Carbonyl-C) hergestellt worden (Abb. 29). Die bisherigen und noch andauernden Untersuchungen haben einen überraschend kleinen Einfluß des C7-Substituenten auf die funktionelle Reaktivität der Substrate ergeben. Diese Beobachtung wird in Abschnitt 8 genauer erörtert.

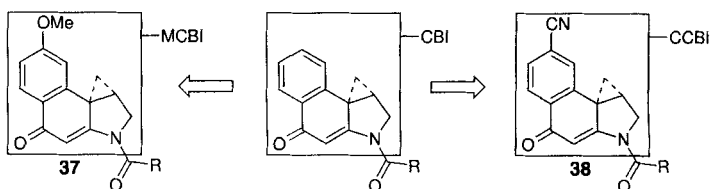


Abb. 29. MCBI und CCBI: Strukturelemente zur Untersuchung elektronischer Einflüsse auf die funktionelle Reaktivität.

### 7.4. CBQ: eine ungewöhnlich reaktive Alkylierungseinheit

Die ringerweiterte Alkylierungseinheit 2,3,10,10a-Tetrahydrocyclopropa[*d*]benzo[*f*]chinol-5-on (CBQ) ist synthetisiert und in Naturstoffanaloga eingebaut worden (Abb. 30)<sup>[128–130]</sup>. Die Untersuchung dieser Substrate offenbarte ein unerwartetes,

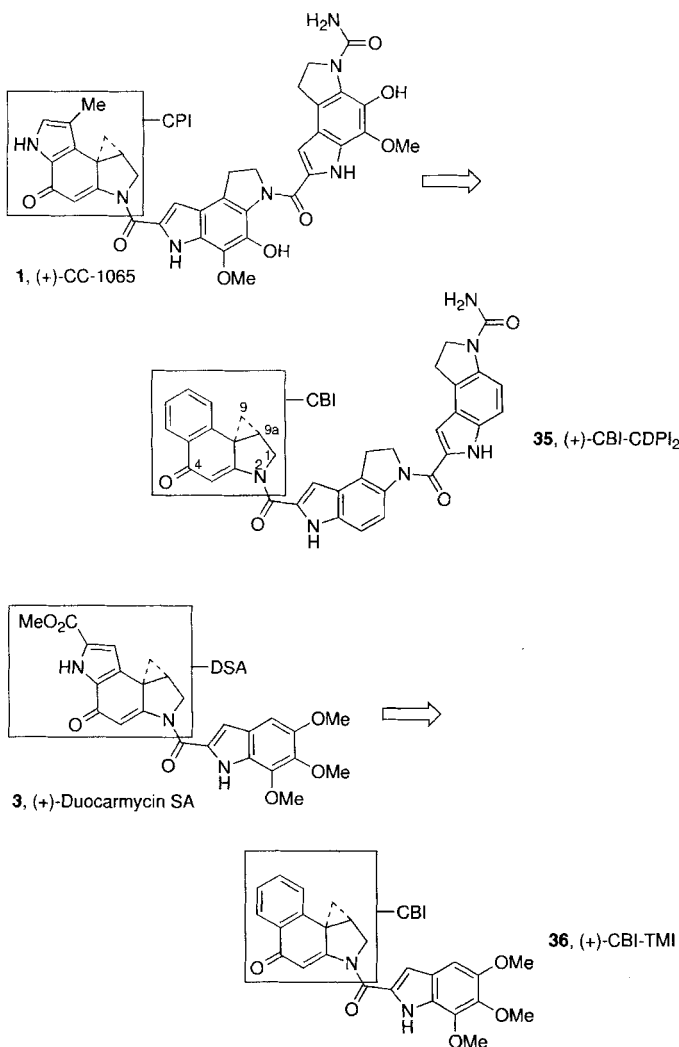


Abb. 28. CBI-Analoga von CC-1065 (oben) und Duocarmycin SA (unten). Bei 35 ist die für CBI gültige Atomnummerierung angegeben.

hatte eine – im Vergleich zur CPI-Alkylierungseinheit – herabgesetzte Reaktivität und erhöhte Stabilität ( $4 \times$ ) sowie eine erhöhte cytotoxische Wirksamkeit ( $4 \times$ ) zur Folge, ohne daß die Alkylierungsselektivität beeinflußt wurde. Die CBI-Substrate alkylieren dieselben Stellen wie die entsprechenden CPI- oder DSA-Substrate, und zwar mit einer Effizienz und relativen Selektivität, die mit ihrer Reaktivität in Einklang ist. Sie sind effizienter und hinsichtlich der verfügbaren Alkylierungsstellen selektiver als die entsprechenden CPI- und DA-Substrate und ähneln in ihrem Verhalten den DSA-Derivaten. Trotz der geringeren Reaktivität alkylieren sie DNA schneller als die entsprechenden CPI-Substrate<sup>[119, 120]</sup> und ähnlich schnell wie die entsprechenden DSA-Substrate<sup>[73]</sup>. Dies führte zu der Vermutung, daß das Ausmaß an sterischer Hinderung im Umfeld des CPI- oder DSA-C7-Zentrums sowohl die Reaktionsgeschwindigkeit als auch die relative Effizienz der DNA-Alkylierung beeinflus-



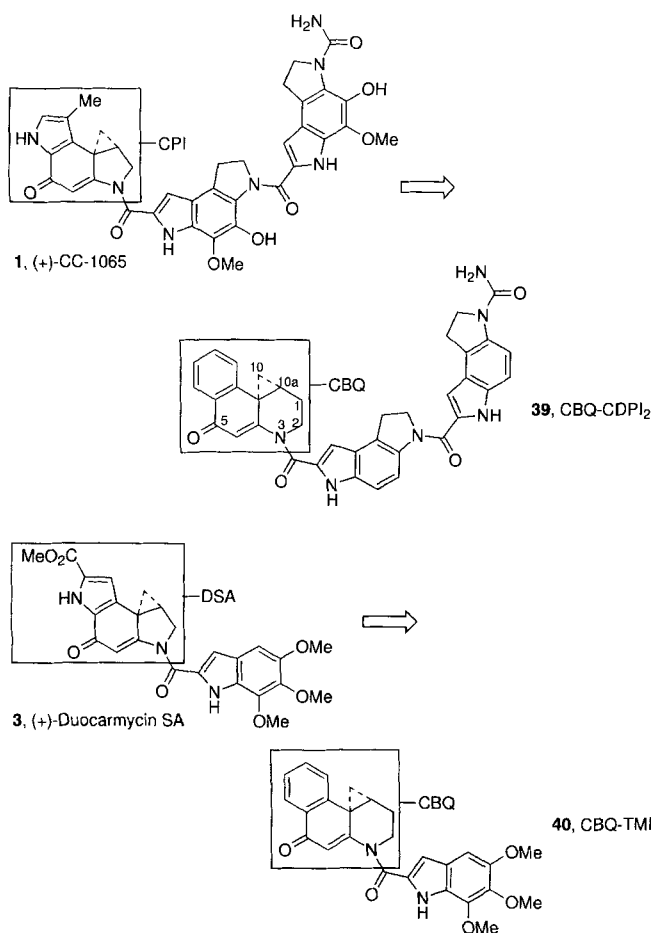


Abb. 30. CBQ-CDPI<sub>2</sub> **39** und CBQ-TMI **40**: ungewöhnlich reaktive Alkylierungseinheiten. Bei **39** ist die für CBQ gültige Atomnumerierung angegeben.

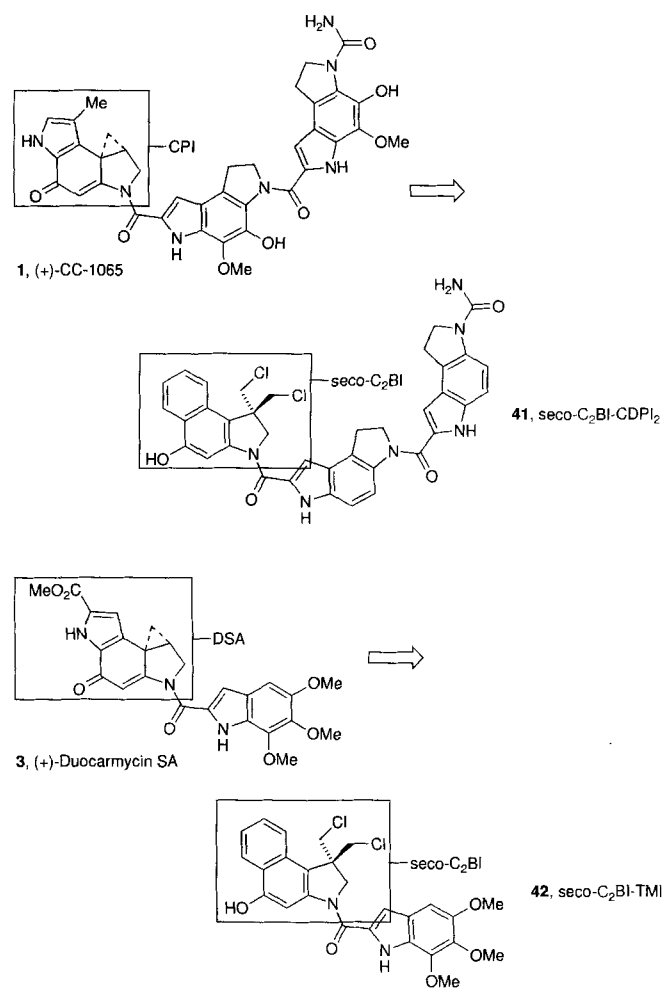


Abb. 31. **41** und **42**, achirale Vorstufen von C<sub>2</sub>BI-CDPI<sub>2</sub> bzw. C<sub>2</sub>BI-TMI, die zu DNA-Querverknüpfungen führen.

aber normales Maß an funktioneller Reaktivität und eine Reihe subtiler Strukturmerkmale, die die funktionelle Reaktivität<sup>[128, 129]</sup>, die Reaktionsregioselektivität<sup>[129]</sup>, den Mechanismus der säurekatalysierten Solvolyse und der nucleophilen Addition<sup>[129]</sup> beeinflussen, sowie eine Reihe subtiler Faktoren, die zur Regioselektivität der Adenin-N3-Alkylierung beitragen<sup>[130]</sup>. Diese Ergebnisse werden ebenfalls in Abschnitt 8 eingehend erörtert.

### 7.5. C<sub>2</sub>BI-CDPI<sub>2</sub> und C<sub>2</sub>BI-TMI: optimal konzipierte Adenin-verbrückende Substrate

Die Kernstruktur von C<sub>2</sub>BI-CDPI<sub>2</sub> und C<sub>2</sub>BI-TMI und ihren achiralen Vorstufen wurde von den CBI-Substraten übernommen, die außergewöhnlich stabil und synthetisch besser zugänglich sind als die Kernstrukturen der natürlichen Alkylierungseinheiten (Abb. 31)<sup>[131, 132]</sup>. Darüber hinaus bestand die Hoffnung, daß die acyclischen Substrate **41** und **42**, denen der Cyclopropanring fehlt, dieselben Eigenschaften an den Tag legen könnten wie C<sub>2</sub>BI-CDPI<sub>2</sub> bzw. C<sub>2</sub>BI-TMI, abgesehen davon, daß sie achiral sind. Letzteres hat nicht nur den Vorteil, daß keine Enantiomerentrennung oder asymmetrische Synthese erforderlich ist, sondern auch, daß bei biologischen Tests nicht das Verhalten von zwei Enantiomeren dokumentiert werden muß.

Darüber hinaus eröffnete die Fähigkeit von **41** und **42** zur Bisalkylierung die Möglichkeit für eine DNA-Querverknüpfung, wobei die beiden alkylierenden Gruppen unabhängig voneinander wie die individuellen Enantiomere wirken sollten. Wenn dies beispielsweise in der Sequenz d(ATTA) · d(TAAT) stattfindet, so erfolgt die Adenin-N3-Alkylierung einmal an der 5'-ATTA-3'-Bindungsstelle hoher Affinität, wobei das Substrat in 3'→5'-Richtung relativ zum alkylierten Strang über eine 3.5 Basenpaare umfassende AT-reiche Bindungsstelle gebunden ist, und einmal am komplementären DNA-Strang an der 3'-TAAT-5'-Bindungsstelle hoher Affinität, wobei das Substrat in entgegengesetzter 5'→3'-Richtung relativ zum alkylierten Strang über eine 3.5 Basenpaare umfassende AT-reiche Bindungsstelle gebunden ist; insgesamt führt dies zu einer Querverknüpfung (Abb. 32). In Einklang damit, daß die entgegengesetzte Bindungsorientierung und das versetzte Vorliegen der AT-reichen Bindungsstellen relativ zum alkylierten Adeninrest zu einer einzigen Bindungs- und Querverbindungsstelle führen, erwiesen sich **41** und **42** als effiziente Substrate für Querverknüpfungen<sup>[131, 132]</sup>. Abbildung 32 ist eine andere Darstellung der Alkylierung durch das natürliche und das nichtnatürliche Enantiomer eines Substrats, bei der sich die komplementären Strangreaktionen aus einer Bindungsorientierung ereignen.

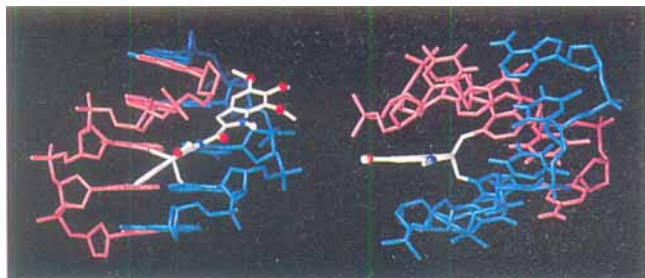


Abb. 32. Blick von vorne und aus der kleinen Furche auf das Produkt der Querverknüpfungsreaktion zwischen **42** und der 5'-(ATTAG) · 5'-(CTAAT)-Bindungsstelle hoher Affinität in w794-DNA. Für Einzelheiten siehe den Text.

Es sind noch weitere Querverknüpfungen ermöglichende Substrate entwickelt worden (Abb. 33)<sup>[133–142]</sup>, zu denen auch die auf der Struktur von CC-1065 basierende Verbindung **43** gehört, die durch das Zusammenfügen von zwei CPI-Bausteinen erhalten wurde.

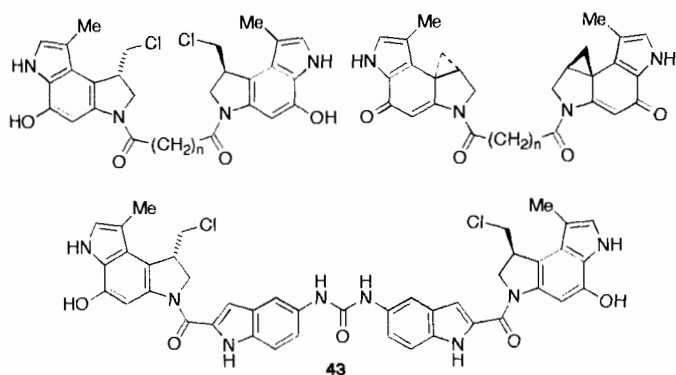


Abb. 33. Strukturen weiterer DNA-querverknüpfender Substrate.

## 7.6. Andere Modifikationen der Alkylierungseinheit

In Abbildung 34 ist eine Reihe von Substraten mit zusätzlichen Modifikationen an den Alkylierungseinheiten dargestellt. Dazu zählen Substrate mit veränderten Duocarmycin-A- und -B<sub>2</sub>-Alkylierungseinheiten<sup>[143]</sup>, Furan-Analoga von CC-1065<sup>[144]</sup> und Duocarmycin SA<sup>[143]</sup>, substituierte CI-Analoga<sup>[145]</sup>, ein vereinfachtes Cyclopropylderivat<sup>[146]</sup>, ein der CPI-Einheit verwandtes Gramin-Analogon<sup>[147]</sup>, das 9,9-Difluor-CBI-Derivat<sup>[148]</sup> sowie ein isomeres Cyclopropacyclohexadienon, das Strukturmerkmale von CC-1065 und den Mitomycinen vereint<sup>[149]</sup>.

## 8. Elementare Zusammenhänge zwischen Struktur, funktioneller Reaktivität und biologischen Eigenschaften

Neben der Totalsynthese der Naturstoffe CC-1065<sup>[177, 150–152]</sup>, Duocarmycin A **2**<sup>[153, 154]</sup> und Duocarmycin SA **3**<sup>[155–157]</sup> und einer beträchtlichen Zahl von Untersuchungen mit den authentischen Teilstrukturen der Naturstoffe<sup>[41, 50]</sup> und ihrer Analoga<sup>[158–162]</sup> haben sich Studien an synthetischen

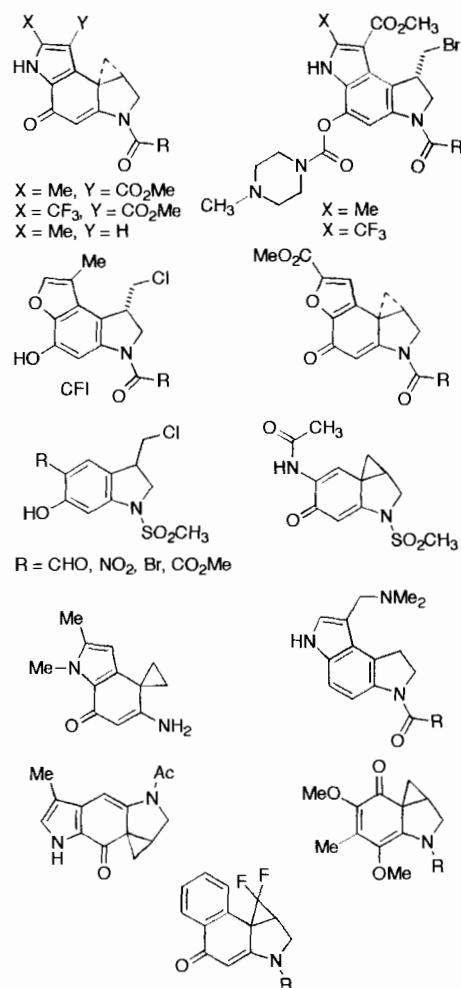


Abb. 34. Andere Modifikationen der Alkylierungseinheit von CC-1065 und den Duocarmycinen.

Substraten mit stark modifizierten Strukturen als aufschlußreich erwiesen, um die Zusammenhänge zwischen Struktur, funktioneller Reaktivität und biologischen Eigenschaften zu ergründen<sup>[34–38]</sup>.

## 8.1. Definition eines elementaren Zusammenhangs zwischen funktioneller Reaktivität und biologischer Aktivität

Der Vorschlag einer säurekatalysierten Aktivierung der DNA-Alkylierung erweckte die Hoffnung, daß eine direkte Beziehung zwischen der Reaktivität und der cytotoxischen Aktivität der Substrate bestehen könnte, und führte zu der Idee, daß die biologische Wirksamkeit durch Erhöhung der Elektrophilie verbessert werden könnte<sup>[159]</sup>. Mit den Substraten **44–51** durchgeführte Untersuchungen offenbarten jedoch eine genau entgegengesetzte Beziehung und führten zu dem Ergebnis, daß von den Substraten mit der größten Stabilität die stärkste cytotoxische Aktivität zu erwarten war (Abb. 35). Weiterhin wurde ein genau definierter direkter Zusammenhang zwischen Solvolysstabilität und biologischer Wirksamkeit (IC<sub>50</sub>, L1210) beobachtet, der sich sowohl für einfache als auch für vollständige Analoga der Naturstoffe als allgemeingültig erwies<sup>[118–121, 126, 129, 163, 166]</sup>.

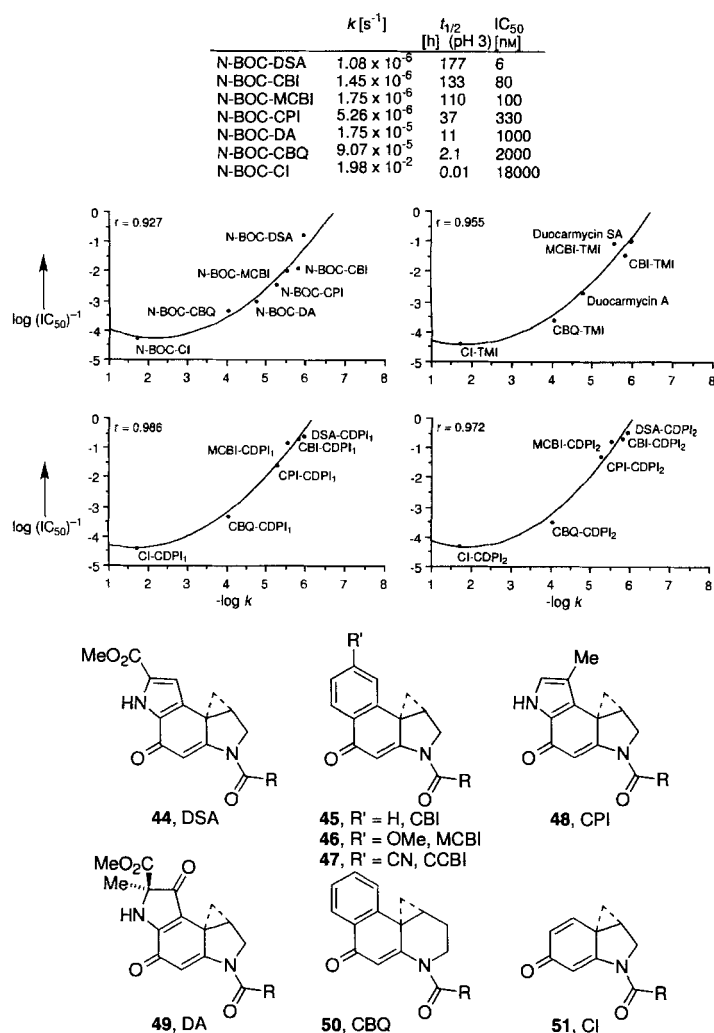


Abb. 35. Direkte Korrelation zwischen chemischer oder funktioneller Stabilität und cytotoxischer Wirksamkeit einiger Naturstoffanaloga. In den Formeln unten steht R für BOC, TMI, CDPI<sub>1</sub>, CDPI<sub>2</sub>. N-BOC-44 ist identisch mit 12. In der Graphik rechts oben und in den beiden unteren Graphiken ist die Einheit von  $IC_{50}$  pM, links oben ist sie nM.

## 8.2. Aufstellung und Bestätigung eines elementaren Zusammenhangs zwischen funktioneller Reaktivität und biologischer Aktivität

Die Untersuchung der Eigenschaften von 52–55<sup>[163]</sup>, einfachen Derivaten von CBI, brachte die Bestätigung für die direkte Beziehung zwischen Solvolysstabilität und cytotoxischer Wirksamkeit (Abb. 36): Es ergab sich im untersuchten Reaktivitätsbereich ein direkter, linearer Zusammenhang zwischen der cytotoxischen Wirksamkeit ( $L1210$ ,  $\log(1/IC_{50})$ ) und der Solvolysstabilität ( $-\log k$ , pH 3). Auf ähnliche Weise wurde ein linearer Zusammenhang zwischen den elektronenziehenden Eigenschaften des N2-Substituenten (Hammett- $\sigma_p$ -Konstante) und der Solvolysereaktivität ( $-\log k$ , pH 3) festgestellt, wobei die am stärksten elektronenziehenden Substituenten die stabilsten Substrate lieferten. Letztere Beziehung spiegelt den Einfluß des N2-Substituenten auf die Leichtigkeit der für die Katalyse der Solvolyse notwendigen Protonierung der C4-O-Gruppe wider: Bei stärker elektronenziehenden Substituenten ist die Solvolysengeschwindigkeit kleiner. Des weiteren ergab die

Auftragung von  $\sigma_p$  gegen  $\log k$  einen betragsmäßig bemerkenswert großen  $\rho$ -Wert von  $-3.0$ . Dieser stark negative  $\rho$ -Wert spricht für das Vorliegen einer starken vinylogenen Amidkonjugation und legt nahe, daß die Reaktivität möglicherweise erheblich durch die Natur des N2-Substituenten und seine Wechselwirkung mit der Cyclopropylcyclohexadienon-Einheit beeinflusst wird. Weniger offensichtlich, aber dafür um so elementarer war die Erkenntnis, daß zwischen der cytotoxischen Wirksamkeit ( $L1210$ ,  $\log(1/IC_{50})$ ) und den elektronenziehenden Eigenschaften des N2-Substituenten ( $\rho_p$ ) eine lineare Beziehung besteht, wobei die am stärksten elektronenziehenden Substituenten die wirksamsten Substrate liefern (Abb. 36).

Diese elementaren Zusammenhänge sollten sich als nützlich für das gezielte Design neuer Analoga erweisen. Es ist zu erwarten, daß unter Substraten, die ausreichend reaktiv sind, um Duplex-DNA effektiv zu alkylieren, die chemisch stabileren die biologisch wirksameren sind. Dies ist vermutlich auf ein effektiveres Heranführen der stabileren Substrate an ihre intrazellulären Zielmoleküle zurückzuführen.

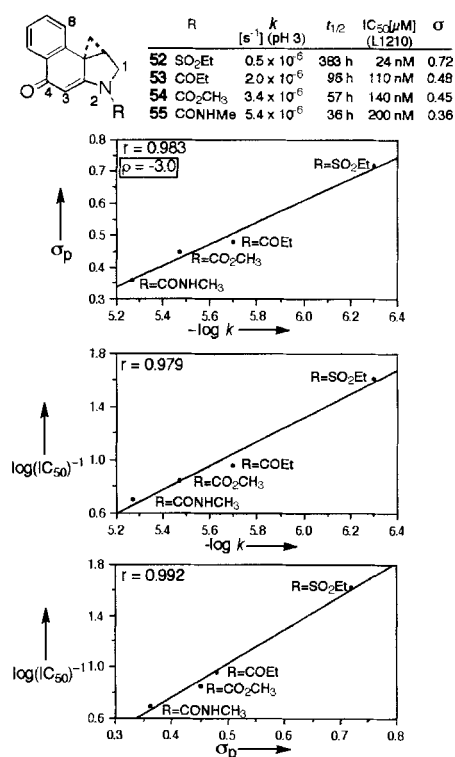


Abb. 36. Einfluß des N2-Substituenten auf die cytotoxische Wirksamkeit und die Solvolysengeschwindigkeit.

## 8.3. Substituierte CBI-Substrate: die Bedeutung elektronischer Effekte für die funktionelle Reaktivität und die Bestätigung des elementaren Zusammenhangs zwischen funktioneller Reaktivität und biologischer Aktivität

Um die zur funktionellen Reaktivität der Substrate 1–3 beizutragenden Strukturmerkmale zu ergründen, wurden die substituierten CBI-Substrate 46 und 47 (siehe Abb. 35) und ein vollständiger Satz den Naturstoffen analoger Verbindungen, in die diese modifizierten Alkylierungseinheiten eingebaut waren, synthetisiert<sup>[126, 127]</sup>. Anders als erwartet, hatte der in *para*-

Position zur C4-O-Gruppe angeordnete C7-Substituent nur einen geringen Einfluß auf die funktionelle Reaktivität. Unter Verwendung der säurekatalysierten Solvolyse als Maß für die relative Reaktivität stellte sich heraus, daß N-BOC-**46** nur unwesentlich (1.2- bis 1.05mal) reaktiver war als N-BOC-**45** und daß N-BOC-**47** bei pH 3 oder 2 weniger als doppelt so stabil war wie N-BOC-**45** (Abb. 37). Diese Studien lieferten eine eindeuti-

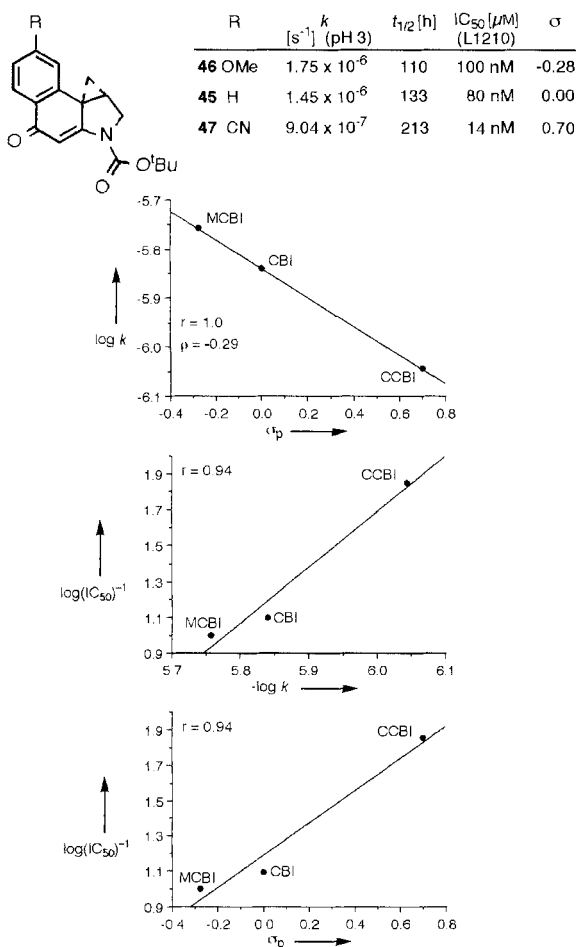


Abb. 37. Elektronische Effekte am Beispiel der substituierten CBI-Analoga N-BOC-**45**–N-BOC-**47**.

ge Bestätigung für die direkte Beziehung zwischen funktioneller Stabilität und cytotoxischer Wirksamkeit und führten zu dem Ergebnis, daß voraussagbare direkte Beziehungen zwischen den elektronischen Eigenschaften des C7-Substituenten ( $\sigma_p$ -Konstante) und der funktionellen Reaktivität ( $-\log k$ , pH 3), zwischen der cytotoxischen Wirksamkeit (L1210,  $\log(1/IC_{50})$ ) und der funktionellen Stabilität ( $-\log k$ , pH 3) und – elementar – zwischen der cytotoxischen Wirksamkeit (L1210,  $\log(1/IC_{50})$ ) und den elektronischen Eigenschaften des C7-Substituenten ( $\sigma_p$ ) bestehen; letztere in der Weise, daß der am stärksten elektronenziehende Substituent das wirksamste Substrat liefert (Abb. 37). Der äußerst geringe Einfluß des C7-Substituenten auf die funktionelle Reaktivität zeigte sich in dem ungewöhnlich kleinen  $\rho$ -Wert von  $-0.3$ .

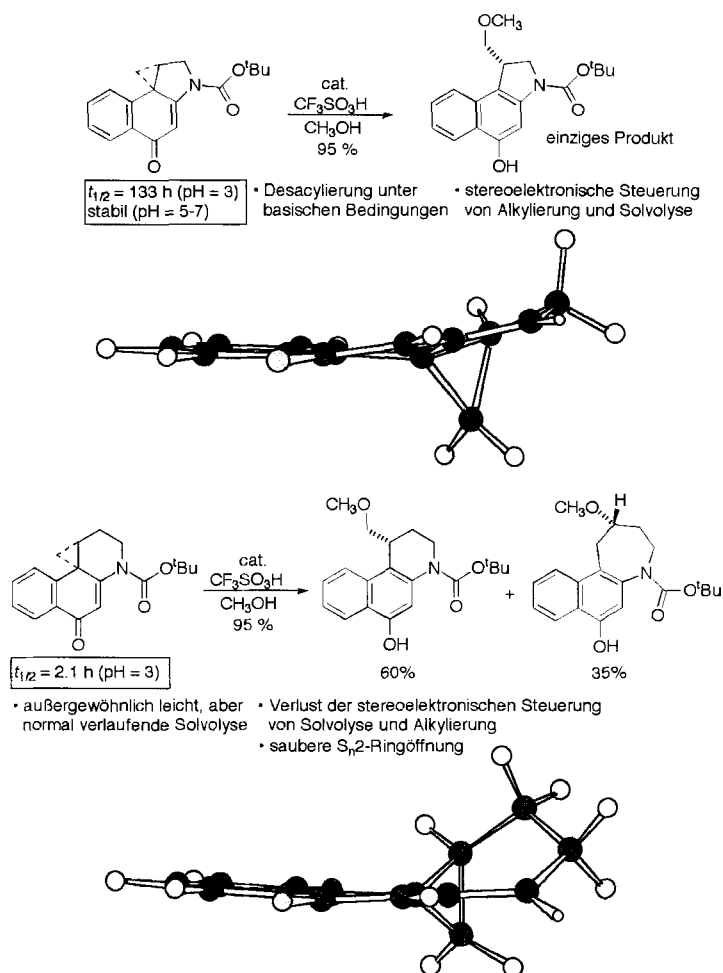
Dieser überraschend geringe Einfluß des Substituenten *para* zu C7 läßt stark vermuten, daß die Protonierung der C4-O-

Gruppe nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Solvolyse oder die säurekatalysierte nucleophile Addition ist und daß sich im Übergangszustand kaum eine positive Ladung entwickelt ( $\rho = -0.3$ ), und er stützt die Vorstellung, daß für die Cyclopropan-Ringöffnung die Gegenwart und Unterstützung eines Nucleophils erforderlich ist ( $S_N2$ -Mechanismus). Es besteht kein Zweifel, daß dieses Verhalten zur DNA-Alkylierungs-Selektivität beiträgt und der Erwartung entspricht, daß die Positionierung des Nucleophils (Adenin-N3) und nicht die C4-O-Protonierung geschwindigkeitsbestimmend ist. Dieser bemerkenswert geringe elektronische Einfluß auf die Solvolysengeschwindigkeit hatte keine Auswirkung auf die Regioselektivität der Solvolyse, und es wurde ausschließlich die stereoelektronisch gesteuerte nucleophile Addition an das am wenigsten substituierte Cyclopropan-Kohlenstoffatom beobachtet.

#### 8.4. Stereoelektronische Steuerung

In den Untersuchungen haben sich bisher zwei Besonderheiten bezüglich der Alkylierungseinheiten **44**–**51** als bedeutend herausgestellt. Die eine ist die stereoelektronisch gesteuerte, säurekatalysierte Öffnung des Cyclopropanrings, die die Addition eines Nucleophils an das am wenigsten substituierte Kohlenstoffatom vorschreibt. Die zweite ist die Geschwindigkeit der säurekatalysierten Solvolyse und der Nachweis einer direkten Beziehung zwischen Solvolysstabilität und cytotoxischer Wirksamkeit. Ein neuerer Vergleich der chemischen und strukturellen Eigenschaften von N-BOC-**50** und N-BOC-**45** bestätigte die stereoelektronische Steuerung der Solvolyse- und Alkylierungsreaktionen von **44**–**51** und offenbarte eine nicht erwartete, aber fundamental wichtige Stabilität der Duocarmycin- und CC-1065-Alkylierungseinheiten sowie den strukturellen Ursprung für diese Stabilität<sup>[128, 129]</sup>. Die Solvolysereaktivitäten der N-BOC-Derivate von **44**–**51** sind in Abbildung 35 zusammengefaßt. Das von **50** ist nicht nur 63mal reaktiver als das von **45**, sondern wird auch – anders als das von **45**, bei dem nur das am wenigsten substituierte Cyclopropan-Kohlenstoffatom angegriffen wird – nucleophil an C10 und C10a angegriffen (Schema 3)<sup>[129]</sup>.

Die röntgenographisch ermittelte Struktur von N-BOC-**50** lieferte die strukturellen Hintergründe für diesen Unterschied in der Solvolysereaktivität und -regioselektivität (Schema 3). Bei N-BOC-**45**<sup>[118, 128]</sup> steht das gekrümmte Orbital der Cyclopropanbindung, die zum am wenigsten substituierten Kohlenstoffatom geht, nahezu senkrecht zur Cyclohexadienonebene und überlappt folglich gut mit dem sich entwickelnden  $\pi$ -System des phenolischen Solvolyseprodukts (Abb. 38), während die Cyclopropanbindung zum tertiären Kohlenstoffatom nahezu in der Cyclohexadienonebene liegt, ihr Orbital also nahezu senkrecht zum  $\pi$ -System des Produkts steht. Somit erfolgt die Cyclopropan-Ringöffnung durch Addition eines Nucleophils an das am wenigsten substituierte Kohlenstoffatom, und die diese Additionselektivität verursachende stereoelektronische Steuerung setzt die eigentliche, elektronisch bedingte Präferenz für eine Ringöffnung unter Ringerweiterung außer Kraft. Bei N-BOC-**50** dagegen ist der Cyclopropanring in idealer Weise mit dem Cyclohexadienon- $\pi$ -System konjugiert, und die durch das Cyclohexadienon vorgegebene Ebene halbiert den Cyclopropan-



Schema 3. Vergleich der Solvolysereaktivitäten und röntgenographisch ermittelten Strukturen von N-BOC-45 (oben) und N-BOC-50 (unten).

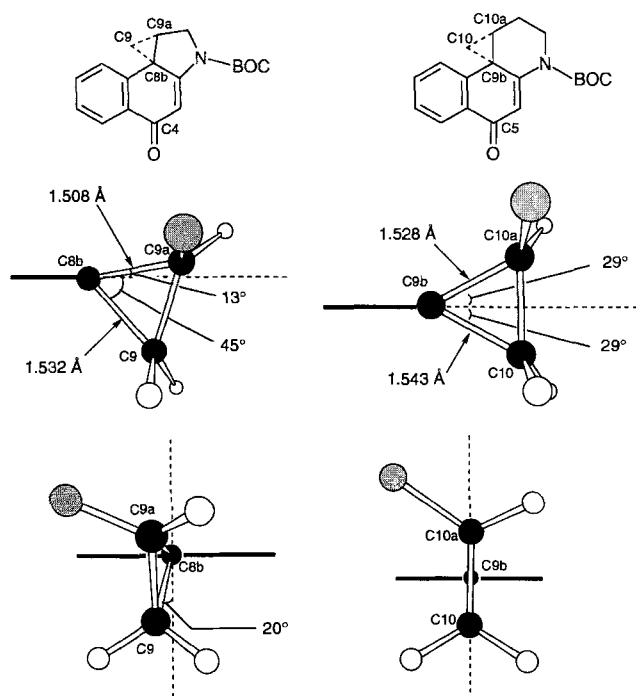


Abb. 38. Seiten- und Rückansichten der aktivierten Cyclopropanringe von N-BOC-45 und N-BOC-50, die die aus Röntgenstrukturanalysen gewonnenen Daten verdeutlichen und die ideale Überlappung und Ausrichtung des Cyclopropanrings von N-BOC-50 mit dem Cyclohexadienon- $\pi$ -System hervorheben.

ring exakt, so daß die Bindungen in Richtung des sekundären und des tertiären Cyclopropan-Kohlenstoffatoms in gleicher Weise auf das  $\pi$ -System ausgerichtet sind. Die beiden zur Verfügung stehenden Cyclopropanbindungen kommen somit gleichermaßen für eine Spaltung in Frage, und man beobachtet eine Addition an beide<sup>[129]</sup>. Daß das Ringerweiterungsprodukt in etwas geringerer Menge gebildet wird (siehe Schema 3), ist möglicherweise einer destabilisierenden Torsionsspannung zuzuschreiben, die mit dem nucleophilen Angriff auf das höher substituierte Zentrum einhergeht.

Im Gegensatz zu den CBI-Substraten, die regiospezifisch reagieren und unter einer Vielzahl von Reaktionsbedingungen mit Säurekatalyse ausschließlich ein Additionsprodukt liefern, bilden sowohl N-Acyl-CPI- als auch N-Acyl-DA-Substrate, einschließlich Duocarmycin A, in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen unterschiedliche Mengen des ungewöhnlichen Ringerweiterungs-Solvolyseprodukts. Bisher ist dieses Reaktionsverhalten noch nicht im Detail untersucht worden, und der strukturelle Ursprung der Ringerweiterungsnebenreaktion mit CPI oder DA ist noch nicht geklärt. Möglicherweise könnte es einen Zusammenhang geben mit der erhöhten Reaktivität und dem unterschiedlichen Maß an stereoelektronischer Ausrichtung, das sich aus einer leicht veränderten Cyclopropankonjugation ergibt. Der strukturelle Ursprung dieser Unterschiede kann zweifellos aus vergleichenden kristallographischen Untersuchungen der jeweiligen Alkylierungseinheiten abgeleitet werden, und diesbezügliche detaillierte Untersuchungen sind in Arbeit.

### 8.5. Der Ursprung einer nicht erwarteten, aber gewinnbringenden Stabilität der natürlichen Alkylierungseinheiten: das Ausmaß an Cyclopropankonjugation und -aktivierung

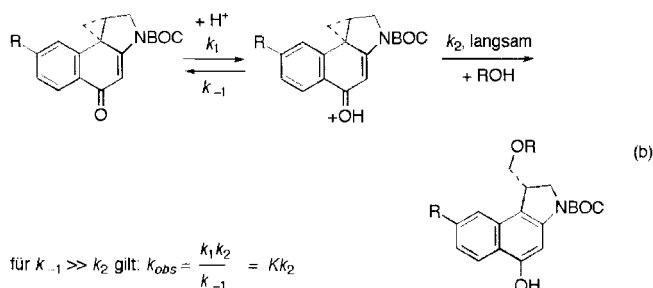
Die schnelle Solvolyse von N-BOC-50 war zwar zunächst überraschend, aber aus den Röntgenstrukturanalysen wurden wichtige Erkenntnisse über diese erhöhte Reaktivität gewonnen. Die C9b-C10a- und C9b-C10-Bindungen in N-BOC-50 sind mit 1.528 bzw. 1.543 Å länger als die entsprechenden Bindungen in N-BOC-45 (1.508 bzw. 1.532 Å), was die erhöhte Spaltungsreaktivität gut widerspiegelt<sup>[128]</sup> (siehe Abb. 38). Diese Verlängerung der Cyclopropanbindungen kann der vorbildlichen Konjugation oder  $\pi$ -Delokalisierung der C9b-C10a- und C9b-C10-Bindungen mit dem Cyclohexadienon- $\pi$ -System zugeschrieben werden. Zu dieser verbesserten Konjugation trägt die ideale geometrische Ausrichtung von C10, C10a, C9b, C5 und dem Carbonylsauerstoffatom bei. Im Falle von N-BOC-45 bewirkt die Ringspannung des angeknüpften fünfgliedrigen Rings, daß C9 und C9a in einem Winkel von 20° außerhalb der Ringebene angesiedelt sind, und verhindert eine ideale Ausrichtung und Überlappung der C8b-C9a- und C8b-C9-Bindung mit dem Cyclohexadienon- $\pi$ -System. Die bessere Cyclopropankonjugation mit dem Cyclohexadienon- $\pi$ -System führt bei N-BOC-50 zu den beobachteten größeren Bindungslängen und geringeren Bindungsstärken sowie zur höheren Solvolysereaktivität.

Es sind somit die geometrischen Spannungen des angeknüpften fünfgliedrigen Rings in den CC-1065- und Duocarmycin-

Alkylierungseinheiten, die die nucleophile Spaltung des Cyclopropanrings unter Addition an das am wenigsten substituierte Kohlenstoffatom steuern. Die nichtideale Ausrichtung und Überlappung von Cyclopropan- und Cyclohexadienon- $\pi$ -System bei den natürlichen Alkylierungseinheiten hat außerdem eine sich positiv auswirkende reduzierte Elektrophilie zur Folge. Die eigentliche Erkenntnis dieser Vergleichsstudien ist nicht die Solvolysereaktivität von N-BOC-**50**, sondern vielmehr die überraschende Stabilität der CBI-, DSA- und CPI-Alkylierungseinheiten. Obwohl die strukturellen Gegebenheiten intuitiv eine hohe Reaktivität vermuten lassen, sind letztere Substrate auf untypische Weise stabil. Diese ungewöhnliche Stabilität wird durch die Verknüpfung des Cyclopropanrings mit einem fünfgliedrigen Ring bewirkt, die den Cyclopropanring zu einer nichtidealen Ausrichtung und Überlappung mit dem Cyclohexadienon- $\pi$ -System zwingt.

### 8.6. Mechanismus der säurekatalysierten Solvolyse und nucleophilen Addition

Untersuchungen mit N-BOC-**50** führten auch zu einer eindeutigen Bestimmung des mechanistischen Verlaufs der säurekatalysierten Solvolyse. Sowohl das Racemat als auch das reine (+)-Enantiomer wurden einer säurekatalysierten Methanolyse unterworfen (0.1 Äquiv.  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $25^\circ\text{C}$ , 1 h, 95%). Das aus dem (+)-Enantiomer gebildete Ringerweiterungs-Solvolyseprodukt entstand unter vollständiger Inversion der Konfiguration des Reaktionszentrums, was auf eine  $\text{S}_{\text{N}}2$ -Ringöffnung hinweist<sup>[129]</sup>. Diese Beweisführung ist eindeutig und steht im Widerspruch zu den Schlußfolgerungen von Warpehski und Harper<sup>[107]</sup>, die das Auftreten eines freien Carbokations und einen  $\text{S}_{\text{N}}1$ -Mechanismus forderten, um die Bildung des Ringerweiterungsnebenprodukts bei der CPI-Solvolyse zu erklären. Diese und ähnliche Studien<sup>[127]</sup> mit CBI-Substraten ergaben außerdem eine Abhängigkeit erster Ordnung der säurekatalysierten nucleophilen Addition sowohl von der Säure- als auch von der Nucleophilkonzentration. Zusammengefasst belegen diese Untersuchungen, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt nicht die Protonierung der C4-O-Gruppe, sondern die nucleophile Addition an den aktivierten Cyclopropanring ist, der sich eine rasche und reversible Carbonylprotonierung anschließt [Gl. (b)].



Diese Untersuchungen gaben wichtige Hinweise auf den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der DNA-Alkylierung und damit auch auf den Ursprung der Sequenzselektivität bei

der DNA-Alkylierung. Obwohl die beiden CBQ-Cyclopropanbindungen gleichartig für eine Spaltung ausgerichtet sind, erfolgt die säurekatalysierte Cyclopropan-Ringöffnung dennoch mit einer leichten Präferenz für die normale Solvolyse gegenüber der Solvolyse unter Ringerweiterung. Letzterer Reaktionsweg wäre dann stark bevorzugt, wenn sich am reagierenden Cyclopropan-Kohlenstoffatom eine starke positive Ladung entwickeln würde, die beim höher substituierten Kohlenstoffatom als Carbokationenzentrum besser stabilisiert würde. Die Tatsache, daß dieser Reaktionsweg nicht bevorzugt eingeschlagen wird und daß die Reaktion am stärker substituierten Zentrum unter vollständiger Inversion der Konfiguration nach einem  $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus verläuft, stützt überdies den früheren kinetischen Nachweis, daß der langsame Reaktionsschritt nicht die Protonierung einer Carbonylgruppe, sondern der Angriff des Nucleophils ist, der bevorzugt an dem am wenigsten gehinderten Cyclopropan-Kohlenstoffatom stattfindet.

### 8.7. Zusätzliche feine Merkmale, die zur DNA-Alkylierungs-Regioselektivität beitragen

Bei der Untersuchung der DNA-Alkylierungs-Eigenschaften von CBQ-TMI **40** und verwandten Substraten stellte sich heraus, daß diese Substrate dieselben Stellen alkylieren wie die entsprechenden Enantiomere von Substraten, die DSA-, DA-, CPI-, CBI- oder CI-Alkylierungseinheiten enthalten<sup>[130]</sup>. In Übereinstimmung mit ihrer Reaktivität zeigen sie eine geringere Selektivität hinsichtlich der verfügbaren Alkylierungsstellen und alkylieren DNA weniger effizient. Es ist von Bedeutung, daß mit dem Substrat im Unterschuß ausschließlich Addukte, die durch Adenin-N3-Addition an das am wenigsten substituierte Cyclopropan-Kohlenstoffatom entstanden waren, nachgewiesen wurden. Das durch thermische Depurinierung erhaltene Adenin-N3-Addukt wurde isoliert, charakterisiert und als Produkt der Addition an das am wenigsten substituierte Cyclopropan-Kohlenstoffatom von **40** identifiziert. Da die Solvolyse der CBQ-Substrate nicht regioselektiv ist und sowohl die übliche Spaltung der äußeren als auch die unübliche Spaltung der inneren Cyclopropanbindung stattfindet, läßt sich vermuten, daß der eindeutige regiochemische Verlauf der charakteristischen Adenin-N3-Alkylierung nicht allein durch stereoelektronische Effekte begünstigt ist, sondern daß noch zusätzliche Merkmale dabei eine Rolle spielen. Dazu zählen die bevorzugte Bindungsorientierung, die die übliche Addition begünstigt (Nachbarschaftseffekte), destabilisierende Torsionsspannungen und sterische Wechselwirkungen, die mit der unüblichen Addition einhergehen (Abb. 39), sowie eine möglicherweise durch die Bindung induzierte Konformationsänderung in CBQ, die die stereoelektronische Bevorzugung der Adenin-N3-Addition dem am wenigsten substituierten Cyclopropan-Kohlenstoffatom auferlegt (Abb. 40). Von diesen Faktoren haben die die unübliche Adenin-N3-Addition begleitenden sterischen und Torsionswechselwirkungen wahrscheinlich die größte Bedeutung und könnten in ähnlicher Weise auch einen Beitrag zur Regioselektivität der DNA-Alkylierung durch **1–3** und verwandte Substrate leisten<sup>[130]</sup>.



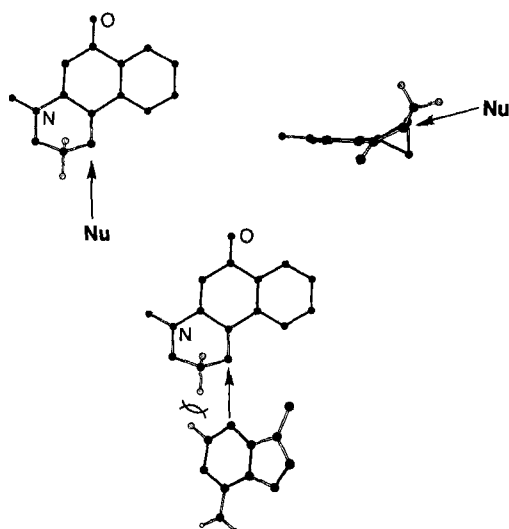


Abb. 39. Aufsicht und Seitenansicht der ungewöhnlichen nucleophilen Addition an das am höchsten substituierte Cyclopropan-Kohlenstoffatom von CBQ. Oben: Veranschaulichung der ekliptischen Wechselwirkung zwischen einem Nucleophil Nu und C1-H<sup>2</sup> und der daraus resultierenden Torsionsspannung. Unten: Die relative Orientierung der Reaktanten bei der Adenin-N3-Addition, abgeleitet von einem nicht-kovalenten Komplex zwischen DNA und CBQ-TMI [130], wenn sie in der kleinen Furche eingepfercht sind, demonstriert die zusätzliche destabilisierende Wechselwirkung zwischen Ad-C2-H und C1-H<sup>2</sup>. Die übrigen Wasserstoffatome und das Trime-thoxyindol-Strukturelement sind zur Vereinfachung weggelassen worden. Der Cyclopropanring ist teilweise verdeckt.

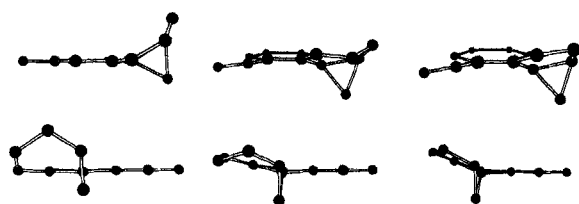


Abb. 40. Seiten- und Rückansichten der CBQ-Boot- (links, Röntgenstruktur-analyse [128, 129]) und CBQ-Halbsessel- (Mitte) sowie der CBI-Konformation (rechts, Röntgenstrukturanalyse [118]), die die relative Ausrichtung des Cyclopropanrings illustrieren. Wie im Fall von CBI würde die energiereichere Halbsessel-konformation von CBQ ( $\Delta E = 1.0 - 1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) eine stereoelektronische Steue-rung der Addition an das am wenigsten substituierte Cyclopropan-Kohlenstoff-atom zur Folge haben. Die Wasserstoffatome sind zur Vereinfachung weggelassen worden.

### 8.8. Experimenteller Nachweis der vinylogenen Amidstabilisierung: ein stabiles, isolierbares *para*-Chinomethid

Der signifikante Beitrag der vinylogenen Amidstabilisierung bei den Verbindungen **44–51** regte die Synthese und Charakterisierung des *para*-Chinomethids **56** und seiner stabilen Vorstufen an (Abb. 41)<sup>[164]</sup>. Im Gegensatz zu den *para*-Naphthochinomethiden, die für eine Isolierung, Charakterisierung oder Detektion viel zu instabil sind und nur als Reaktionszwischenstufen angenommen werden, konnte **56** isoliert (durch Chromatographie an Kieselgel!) und charakterisiert werden. Obwohl **56** noch immer äußerst reaktiv und wesentlich reaktiver als **44–51** ist, kann seine ungewöhnliche Stabilität der vinylogenen Amidstabilisierung zugeschrieben werden, die durch eine Aromatisierung verlorengeht.

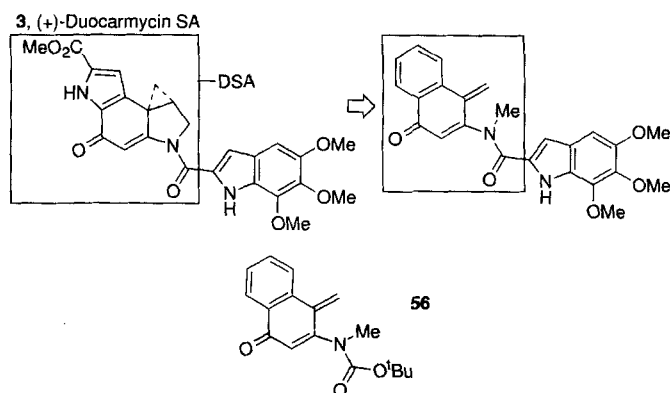


Abb. 41. **56**: ein durch vinylogene Amidstabilisierung isolierbar gewordenes *para*-Chinomethid. Für weitere Informationen zu **56** siehe Text.

## 8.9. Weitere Schlüsselmerkmale

Die Verbindungen **44–51** weisen noch eine Reihe weiterer einzigartiger Strukturmerkmale auf, die zu ihrer Stabilität beitragen. Die Stabilitätsabfolge **44–48** > **49** > **51** hängt damit zusammen, daß der Gewinn an Delokalisierungsenergie bei der Aromatisierung in einem System mit einem ankondensierten aromatischen Ring geringer ist<sup>[116, 156]</sup>, und die Abfolgen **44** > **48**, **47** > **45** und **49** > **51** können durch die in Konjugation stehende elektronenziehende Gruppe in **44**, **47** und **49** erklärt werden, die die für die Solvolyse und Alkylierung notwendige Protonierung der C4-O-Gruppe erschwert<sup>[126, 127, 156]</sup>. Die höhere Stabilität von **45** gegenüber **48** ist teilweise auf eine Verringerung der Spannung beim Austausch eines ankondensierten fünfgliedrigen gegen einen ankondensierten sechsgliedrigen aromatischen Ring zurückzuführen<sup>[118, 122]</sup>. Schließlich trägt auch die vinylogene Amidstabilisierung der Cyclohexadienonstruktur, die bei einer Aromatisierung verlorengeht, wesentlich zur Stabilität von **44–51** bei<sup>[164]</sup>.

## 8.10. Zusammenhang zwischen der Struktur der Alkylierungseinheit und der DNA-Alkylierungs-Selektivität

Es zeigte sich, daß Substrate, die eine natürliche (CPI, DSA oder DA) oder modifizierte Alkylierungseinheit (CI, CBI, CBQ, CFI) enthalten, dieselben DNA-Stellen alkylieren, wenn sie mit denselben DNA-bindenden Struktureinheiten verknüpft sind. Man beachte, daß durch strukturelle Abwandlungen der Alkylierungseinheiten weder neue oder ungewöhnliche Alkylierungsstellen noch Veränderungen in der Sequenzselektivität der DNA-Alkylierung entdeckt werden konnten. Bei solchen Sequenzstudien werden die Alkylierungen mit einem Überschuß an DNA durchgeführt, und folglich werden weder Nebenreaktionen (z.B. Guanin-N3-Alkylierung) noch andere unter energiereicheren Bedingungen mögliche Reaktionen beobachtet. Diese Selektivitäten, die experimentell ermittelt wurden und an anderen Stellen<sup>[56, 71, 105, 122, 130, 144]</sup> beschrieben sind, lassen sich für die DSA-, DA- oder CPI-Substrate auch aus den Daten in den Tabellen 1, 3 und 6 extrapolieren. Unterschiede zwischen den Substraten bestehen darin, daß die chemisch stabileren unter den verfügbaren Bindungsstellen stärker selektieren

(DSA  $\geq$  CBI  $>$  CPI  $>$  DA  $>$  CBQ  $>$  CI). Es ist weiterhin bemerkenswert, daß auch die Vorstufen, denen der Cyclopropanring fehlt (d. h. 4–7), dieselben Stellen alkylieren. Obwohl dies in den meisten Fällen darauf zurückgeführt werden kann, daß diese Substrate unter den Versuchsbedingungen zu den Cyclopropansubstraten cyclisieren, haben genaue Untersuchungen ergeben, daß dies nicht notwendigerweise erforderlich ist<sup>[55, 56, 104, 105]</sup>.

### 8.11. Beziehung zwischen funktioneller Reaktivität, DNA-Alkylierungs-Geschwindigkeit oder -Effizienz und biologischen Eigenschaften

Nach bisherigen Beobachtungen ist die relative Effizienz der DNA-Alkylierung eng mit der relativen cytotoxischen Wirksamkeit der Substrate verbunden. Es zeigte sich, daß ein Herabsetzen der Reaktivität der Alkylierungseinheit eine höhere Effizienz der DNA-Alkylierung zur Folge hat. Dies beruht vermutlich auf einem nichtproduktiven Verbrauch der reaktiven Substrate. Diese Annahme erhärtete sich in den ersten Untersuchungen mit Duocarmycin A<sup>[56]</sup> und konnte in neueren Arbeiten mit Duocarmycin A<sup>[61, 62]</sup> und CBQ-TMI<sup>[130]</sup> wieder bestätigt werden. In ähnlicher Weise gilt bei Substraten mit derselben Alkylierungseinheit, daß mit zunehmender Größe der DNA-bindenden Strukturelemente die relative Effizienz der DNA-Alkylierung bis zu einem Maximalwert ansteigt und dann gleich bleibt. Diese Beobachtung ist in Einklang mit der Erwartung, daß mit einer Zunahme der Stärke der nichtkovalenten Bindung in der kleinen Furche eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit und der Effizienz der DNA-Alkylierung einhergeht. Das Maximum der cytotoxischen Wirksamkeit wird etwa an derselben Stelle erreicht, an der auch die relativen Effizienzen der DNA-Alkylierung ihr Maximum erreichen, obwohl Substrate mit stark variierenden DNA-Alkylierungs-Geschwindigkeiten betrachtet wurden. Entgegen der Vermutung, daß eine direkte Beziehung zwischen der relativen cytotoxischen Wirksamkeit und der relativen Reaktionsgeschwindigkeit der DNA-

Alkylierung bestehen könnte<sup>[46]</sup>, sind wir somit zu dem Schluß gekommen, daß die cytotoxischen Wirksamkeiten in weit besserer Näherung den Tendenzen der relativen DNA-Alkylierungs-Effizienz folgen<sup>[71, 120]</sup>. Da die DNA-Alkylierungen an sich reversibel sind, ist es reizvoll anzunehmen, daß maximale Alkylierungseffizienz und cytotoxische Wirksamkeit nur dann erzielt werden, wenn die an sich reversible Adduktbildung durch eine ausreichend starke nichtkovalente Bindung vollständig stabilisiert wird. Es scheint, als ob sich dies in den neuen Untersuchungen mit den 7-MCBI-Derivaten bestätigen würde<sup>[126]</sup>.

Auch wenn sorgfältige Vergleiche mit den bisher durchgeführten Studien nur eingeschränkt möglich sind, ergibt sich doch eindeutig, daß die chemisch stabileren Substrate DNA nicht nur effizienter alkylieren, sondern dies auch schneller tun. Diese Beobachtung ist bei einer Säure- oder Lewis-Säure-katalysierten Reaktion intuitiv nicht einleuchtend und könnte eine Folge der begrenzten Zahl bisher untersuchter Substrate sein. Es zeigte sich beispielsweise, daß die reaktivsten der bisher eingehend untersuchten Substrate, nämlich die CBQ-Substrate, DNA langsamer alkylieren als die CPI-, CBI- und DSA-Substrate. Ähnlich alkylieren die CPI-Substrate DNA sowohl mit geringerer Effizienz als auch mit geringerer Geschwindigkeit als die CBI-Substrate, obwohl erstere viermal reaktiver sind (Abb. 42). Dagegen alkylieren die CBI-Substrate DNA mit einer nur geringfügig nied-

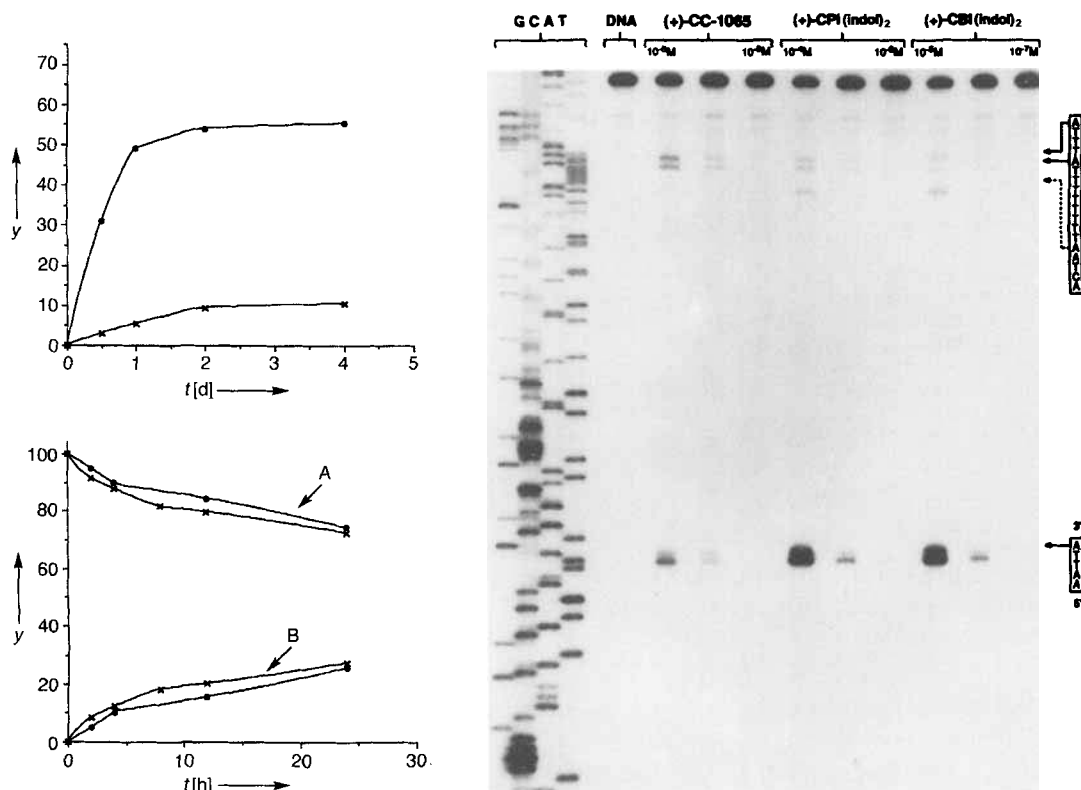


Abb. 42. Oben links: Auftragung der prozentualen integrierten optischen Dichte  $y$  gegen die Zeit, bestimmt durch Autoradiographie von 5'-<sup>32</sup>P-endmarkierter DNA und dazu verwendet, die relative Geschwindigkeit der Alkylierung von w794-DNA an der 5'-AAT-TA-Bindungsstelle hoher Affinität mit (+)-CBI (indol)<sub>2</sub> (●) und (+)-CPI (indol)<sub>2</sub> (x) zu ermitteln; 37 °C, 0–5 Tage,  $1 \times 10^{-5}$  M Substrat. Unten links: Auftragung der prozentualen integrierten optischen Dichte  $y$  gegen die Zeit, bestimmt durch Autoradiographie von 5'-<sup>32</sup>P-endmarkierter DNA und dazu verwendet, die relative Geschwindigkeit der Alkylierung von w794-DNA an der 5'-AAT-TA-Bindungsstelle hoher Affinität mit (+)-Duocarmycin SA 3 (x) und (+)-CBI-TMI 36 (●) zu ermitteln; 4 °C, 0–24 h,  $1 \times 10^{-6}$  M Substrat. A = nicht reagierte DNA, B = Alkylierung/Spaltung. Rechts: Analyse des durch 30minütiges Erhitzen auf 100 °C ausgelösten Strangbruchs bei doppelsträngiger DNA (SV40-DNA-Fragment, 144 Basenpaare, Nucleotid-Nr. 138–5238, Klon w794) nach 24stündiger Inkubation bei 4 °C sowie Entfernung des nicht gebundenen Substrats durch denaturierende PAGE (8%) und Autoradiographie. Spuren 1–4: Sanger-G, -C-, -A- und -T-Reaktionen; Spur 5: Vergleichs-DNA; Spuren 6–8: **1** ( $1 \times 10^{-6}$ – $1 \times 10^{-8}$  M); Spuren 9–11: (+)-CPI (indol)<sub>2</sub> ( $1 \times 10^{-4}$ – $1 \times 10^{-6}$  M); Spuren 12–14: (+)-CBI (indol)<sub>2</sub> ( $1 \times 10^{-5}$ – $1 \times 10^{-7}$  M).

rigeren Effizienz und Geschwindigkeit als die außergewöhnlich stabilen DSA-Derivate (Abb. 42). Das bedeutet, daß die chemisch stabilste der bisher untersuchten Substratklassen DNA mit der größten Geschwindigkeit alkyliert. Es handelt sich hierbei auch um die Substratklasse, die auf der inneren konkaven Seite der Alkylierungseinheit – insbesondere um die DSA-C7-Position – sterisch am wenigsten belastet ist. Es ist demnach denkbar, daß die eigentliche Geschwindigkeit der DNA-Alkylierung durch sterisch anspruchsvolle Gruppen um das C7-Zentrum verringert wird, und die bisher eingehend untersuchten Substrate folgen dieser Tendenz (DSA > CBI > CPI).

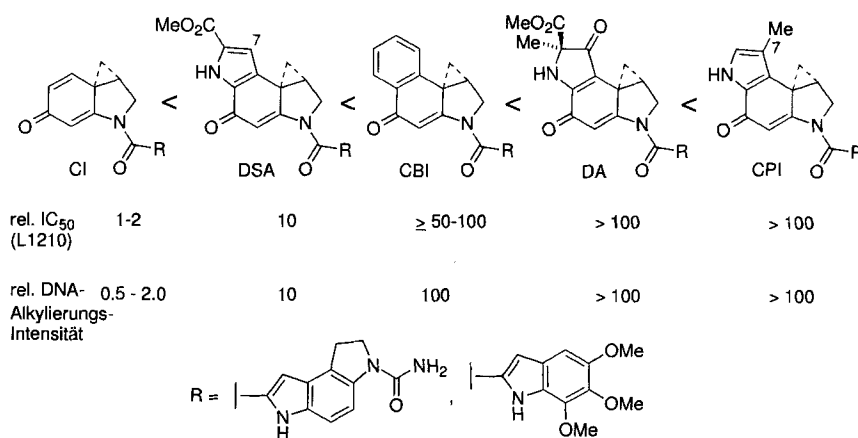


Abb. 43. Ursprung für die Unterschiede im Verhalten von Enantiomerenpaaren bei der DNA-Alkylierung: sterische Belastung um das DSA- und CPI-C7-Zentrum.

## 9. Struktureller Ursprung der Unterschiede zwischen den Enantiomeren: der Einfluß sterischer Wechselwirkungen an C7

Die Untersuchungen ließen eine reizvolle Erklärung für das manchmal verwirrende Verhalten (relative DNA-Alkylierungs-Effizienz, relative biologische Wirksamkeit) von Enantiomerenpaaren der Substrate möglich scheinen, das durch ein einziges Strukturmerkmal gesteuert sein könnte: den Grad an sterischer Hinderung um das CPI- oder DSA-C7-Zentrum der Alkylierungseinheit, einen Faktor, auf den die nichtnatürlichen Enantiomere besonders empfindlich reagieren. Die Unterschiede zwischen den Enantiomeren waren bei den einfachen Alkylierungseinheiten selbst (d. h. N-BOC-DSA **12**, -CI (N-BOC-**51**), -CPI **13** und -CBI (N-BOC-**45**)) leicht nachweisbar, bei den „dimeren“ Substraten (d. h. Duocarmycin SA, Duocarmycin A, CBI-CDPI<sub>1</sub>, CPI-CDPI<sub>1</sub> **15** und CPI-PDE-I<sub>1</sub> **14**; Tabelle 8, Abb. 43) am auffälligsten und mit den größeren „trimeren“ und „tetrameren“ Substraten (d. h. CC-1065, CPI-CDPI<sub>2</sub> **16**,

CBI-CDPI<sub>2</sub> und CPI-CDPI<sub>3</sub> **17**) etwas weniger auffällig<sup>[54, 73]</sup>. Im allgemeinen sind bei den CI- und Duocarmycin-SA-Enantiomerenpaaren, die an dieser Stelle der Alkylierungseinheit keine Substituenten oder sterisch anspruchsvolle Gruppen aufweisen, die Unterschiede in der biologischen Wirksamkeit und der relativen DNA-Alkylierungs-Effizienz geringer. Weiterhin sind die Unterschiede zwischen enantiomeren CI-Substraten, denen allen der Pyrrolring fehlt, üblicherweise kleiner als die Unterschiede, die mit Duocarmycin-SA-Substraten festgestellt wurden (DSA > CI). Dagegen zeigen die CPI-, CBI- und Duocarmycin-A-Substrate im allgemeinen stärker ausgeprägte Unterschiede innerhalb der Enantiomerenpaare (CPI > Duocarmycin A > CBI). Dies führt zu der Vermutung, daß das Verhalten des nichtnatürlichen Enantiomers von Duocarmycin SA und allen anderen bisher untersuchten Substraten auf eine deutliche sterische Wechselwirkung des C7-Zentrums mit der der Alkylierungsstelle benachbarten 5'-Base, die wegen der 5'→3'-Bindung des nichtnatürlichen Enantiomers notwendigerweise auftritt, zurückzuführen ist. Das 3'→5'-Bindungsmodell für das natürliche Enantiomer ist wegen einer weniger ausgeprägten, aber möglicherweise dennoch nicht unbedeutenden Empfindlichkeit gegenüber sterischer Belastung an derselben C7-Position begünstigt.

Übereinstimmend mit den bisherigen empirischen Beobachtungen und in Einklang mit Modellen für die intermediären Alkylierungsaddukte lassen die Untersuchungen darauf schließen, daß Substrate, die keine sterisch anspruchsvollen Gruppen um die von einem CPI- oder Duocarmycin-SA-C7-Substituenten eingenommene Position aufweisen, DNA vorhersagbar effektiver alkylieren, daß die nichtnatürlichen Enantiomere derartiger Substrate besonders empfindlich auf sterisch anspruchsvolle Gruppen an dieser Stelle reagieren und daß eine Verminderung dieser sterischen Belastung die Unterschiede im Verhalten der Enantiomere verringert. Die einzige Ausnahme von diesen Verallgemeinerungen sind die MCBI-Substrate, deren beide Enantiomere weniger unterschiedliche Eigenschaften aufweisen als die der CBI-Substrate<sup>[126]</sup>. Dies führte zu der Vermutung, daß die sterisch bedingten Unterschiede durch die Möglichkeit einer zusätzlichen Stabilisierung durch nichtkovalente Bindungen in der Alkylierungseinheit selbst reduziert oder überkompensiert werden können.

Tabelle 8. Vergleich der Substratenantiomere.

Substrat	Konfiguration	$IC_{50}$ , L1210 [ng mL <sup>-1</sup> ]	rel. $IC_{50}$ [a]	
(+)-CI-TMI	natürlich	10	1	0.5–2.0
(-)-CI-TMI	nichtnatürlich	10	1	
(+)-Duocarmycin SA	natürlich	0.006	1	10
(-)-Duocarmycin SA	nichtnatürlich	0.06	0.1	
(+)-CBI-TMI	natürlich	0.01	1	100
(-)-CBI-TMI	nichtnatürlich	0.9	0.01	
(+)-Duocarmycin A	natürlich	0.1	1	> 100
(-)-Duocarmycin A	nichtnatürlich	> 10	< 0.001	
(+)-CI-CDPI <sub>1</sub>	natürlich	10	1	0.5–2.0
(-)-CI-CDPI <sub>1</sub>	nichtnatürlich	20	0.5	
(+)-DSA-CDPI <sub>1</sub>	natürlich	0.002	1	10–100
(-)-DSA-CDPI <sub>1</sub>	nichtnatürlich	0.06	0.03	
(+)-CBI-CDPI <sub>1</sub>	natürlich	0.002	1	> 100
(-)-CBI-CDPI <sub>1</sub>	nichtnatürlich	> 2	< 0.001	
(+)-CPI-CDPI <sub>1</sub>	natürlich	0.02	1	> 100
(-)-CPI-CDPI <sub>1</sub>	nichtnatürlich	> 3	< 0.006	

[a] Relative Konzentrationen des nichtnatürlichen/natürlichen Enantiomers, die zum Nachweis der DNA-Alkylierung erforderlich sind.

## 10. Modifizierte DNA-bindende Struktureinheiten

Eines der ersten Strukturmerkmale der Substrate, dem man sich in Untersuchungen zuwandte, waren die DNA-bindenden Struktureinheiten, die über eine Amidbindung mit den natürlich vorkommenden Alkylierungseinheiten verknüpft sind. Dabei ergab sich, daß die hydrophoben rechtsseitigen Strukturelemente die Bindungsaffinität in der kleinen Furche der DNA vermitteln, die Selektivität für AT-reiche Regionen in der kleinen Furche festlegen, das kovalente Addukt stabilisieren, die Geschwindigkeit der DNA-Alkylierung erhöhen, zur Sequenzselektivität der DNA-Alkylierung beitragen und/oder diese dominieren<sup>[108, 109]</sup> und die physiochemischen Eigenschaften der natürlich vorkommenden Substrate beeinflussen. Viele dieser Punkte wurden im Zusammenhang mit den Schlüsselanaloga von CC-1065 und den Duocarmycinen in den Abschnitten 2–5 erörtert.

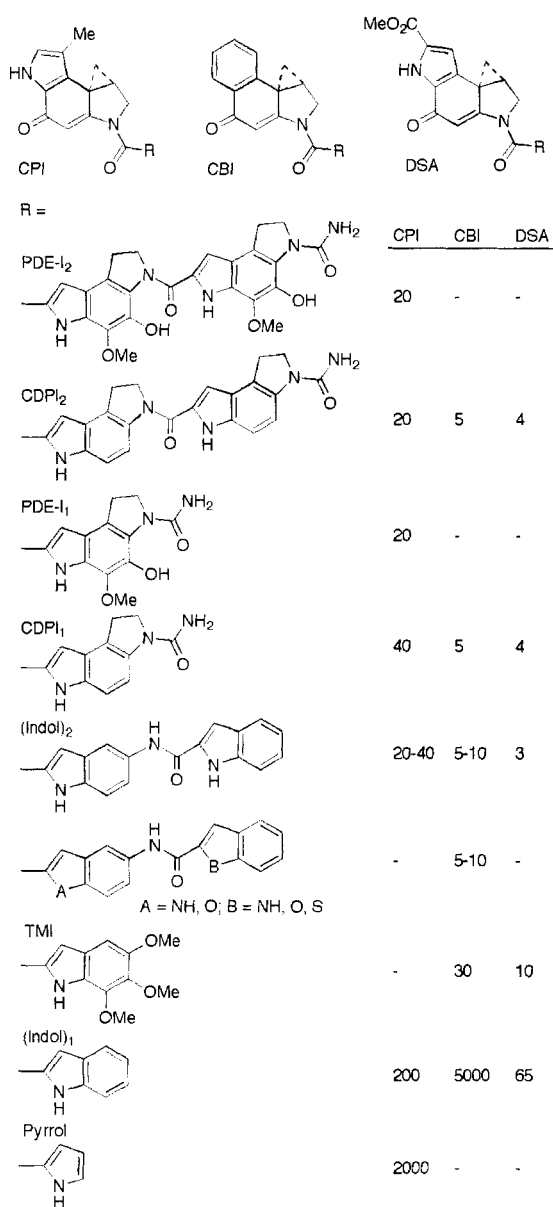


Abb. 44. Einfluß der DNA-bindenden Strukturelemente auf die Antitumoraktivität von CPl-, CBI- und DSA-Analoga. Die Zahlen rechts geben die  $IC_{50}$ -Werte (L1210) in  $\mu M$  an.

### 10.1. Systematische Untersuchung von Substrukturen der DNA-bindenden Struktureinheiten von CC-1065

In den ersten Untersuchungen wurden für Analoga von CC-1065 das Maß an Vereinfachung und die optimalen DNA-bindenden Struktureinheiten bestimmt, die die Wirkungsfähigkeit des Naturstoffs aufrechterhalten und dabei die In-vivo-Antitumoraktivität verbessern. Die PDE-I<sub>2</sub>-Struktureinheiten von CC-1065 konnten zu (Indol)<sub>2</sub> vereinfacht werden, wobei die cytotoxische Wirksamkeit vollständig erhalten blieb und die In-vivo-Antitumoraktivität signifikant verbessert wurde (Abb. 44)<sup>[158-162]</sup>. Weitergehende Vereinfachungen oder eine Verringerung der Zahl der DNA-bindenden Struktureinheiten (z.B. (Indol)<sub>1</sub>) hatten eine Verringerung der Fähigkeiten zur Folge, auch wenn die Verknüpfung mit dem Trimethoxyindol(TMI)-Strukturelement ein wirksames Substrat lieferte<sup>[165]</sup>. Dies macht deutlich, daß ein einzelnes, geeignet substituiertes DNA-bindendes Strukturelement (d. h. TMI, CDPI<sub>1</sub>) durchaus voll wirksame cytotoxische Wirkstoffe liefern kann. Ähnliche Untersuchungen mit CBI-Substraten haben dazu beigetragen, diese Erkenntnisse auszubauen (Abb. 44)<sup>[73, 117-127, 166]</sup>.

Man beachte, daß diese letzteren Substrate, die die vereinfachte Alkylierungseinheit CBI und die vereinfachten DNA-bindenden Strukturelemente (Indol)<sub>2</sub> (**57**, Abb. 45) oder TMI enthalten, gezielt entwickelte Analoga der Naturstoffe mit einer

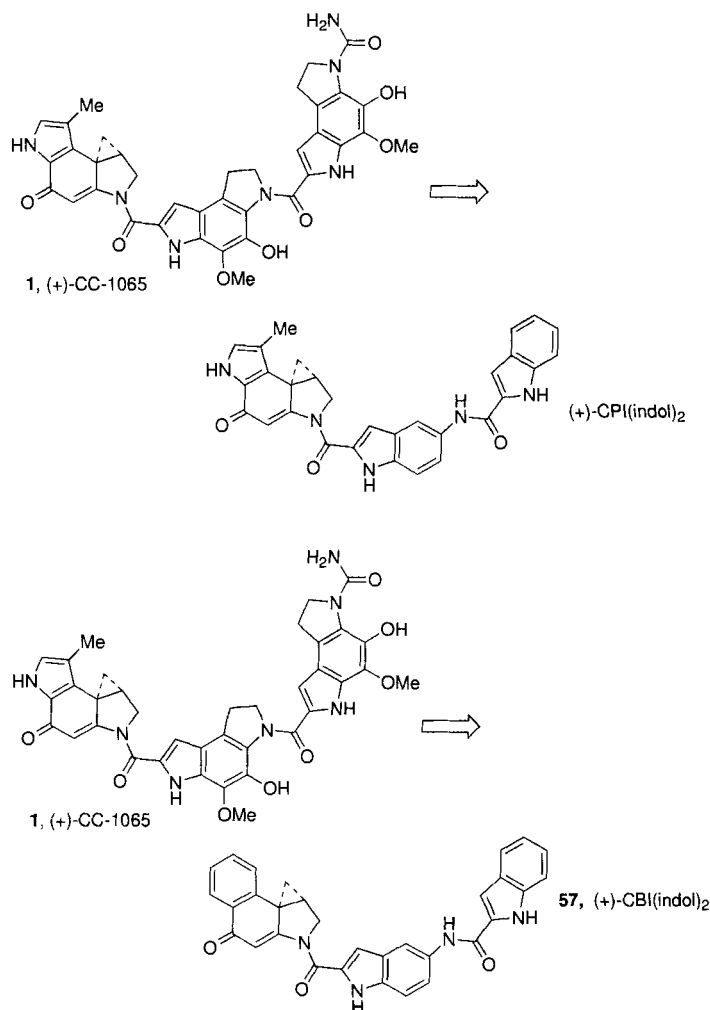


Abb. 45. (+)-CPI (indol)<sub>2</sub> und (+)-CBI (indol)<sub>2</sub>: wirksame Cytostatica.

wirksamen und effizienten Antitumoraktivität sind<sup>[73, 121, 166]</sup>. Demzufolge kann in diesem Teil der Struktur ein großes Maß an Veränderungen toleriert werden, um die biologischen und physiochemischen Eigenschaften der Substrate zu optimieren.

Wir haben die Hypothese entwickelt, daß nicht die kinetischen DNA-Alkylierungs-Geschwindigkeiten<sup>[46]</sup> für die unterschiedliche cytotoxische Wirksamkeit von Substraten mit einer gemeinsamen Alkylierungseinheit verantwortlich sind, sondern vielmehr die relative Effizienz der DNA-Alkylierung und die thermodynamische Stabilität der Addukte<sup>[38]</sup>. In Einklang mit dieser Hypothese erreichen die cytotoxischen Wirksamkeiten bei Substraten mit einer gemeinsamen Alkylierungseinheit ein Plateau, wenn eine ausreichende nichtkovalente Bindung für stabile Addukte sorgt. Überdies steht diese maximale Wirksamkeit in direkter Beziehung zur funktionellen Stabilität der Substrate, wobei die chemisch stabileren Substrate die größte Wirksamkeit aufweisen (CPI: 20  $\mu\text{M}$ , CBI: 5  $\mu\text{M}$ , DSA: 3–4  $\mu\text{M}$ ). Dies ist vermutlich die Folge davon, daß die chemisch stabileren Substrate ihre intrazellulären Zielmoleküle effektiver erreichen.

## 10.2. Systematische Untersuchung der Substruktur der DNA-bindenden Struktureinheit von Duocarmycin

In neueren Arbeiten haben wir uns mit der systematischen Untersuchung der Bedeutung der drei Methoxysubstituenten am DNA-bindenden Trimethoxyindolstrukturelement von Duocarmycin SA befaßt<sup>[109]</sup>. Die C6- und C7-Methoxysubstituenten, die an der äußeren Seite des DNA-Substrat-Komplexes liegen, tragen nur geringfügig oder gar nicht zur Verbesserung der cytotoxischen Wirksamkeit und der relativen Effizienz der Alkylierung bei (C6 > C7), während der C5-Methoxysubstituent, der tief in die kleine Furche eingebettet ist, diese Eigenschaften voll beeinflußt (Abb. 46). In der Tat erwies sich das

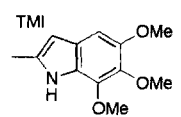
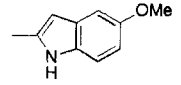
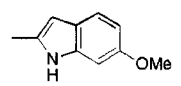
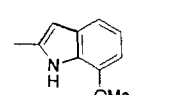
R =	Eff. <sub>rel.</sub>	IC <sub>50</sub> , L1210 [ $\mu\text{M}$ ]
	1.0	10
	1.0	12
	0.2	25
	0.1	60
(Indol) <sub>1</sub>	0.05	65

Abb. 46. Der Einfluß von Methoxysubstituenten auf die Wirkung von Duocarmycin-SA-Analoga. Eff.<sub>rel.</sub> = relative Effizienz der DNA-Alkylierung.

Substrat mit einem einzigen C5-Methoxysubstituenten als nicht unterscheidbar vom Naturstoff, was darauf hinweist, daß dieser Substituent allein für eine volle Entfaltung der Eigenschaften ausreichend ist. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen früherer ausführlicher Modelling-Studien an CC-1065<sup>[41]</sup> kann diese Beobachtung durch eine zusätzliche Stabilisierung durch nichtkovalente Bindung; ausgehend von dem in der kleinen Furche eingebetteten C5-Methoxysubstituenten, erklärt werden<sup>[82]</sup>.

Diese Untersuchungen lieferten weitere Schlüsselbeweise zur Stützung der Hypothese, daß die volle Stärke der cytotoxischen Wirksamkeit der Substrate durch die Verringerung der Reversibilität einer an sich reversiblen DNA-Alkylierung durch nichtkovalente Bindungen und nicht durch unterschiedliche relative Geschwindigkeiten der DNA-Alkylierung hervorgerufen wird<sup>[109]</sup>.

## 10.3. Stark modifizierte DNA-bindende Strukturelemente

Zwei interessante Veränderungen der DNA-bindenden Strukturelemente der Naturstoffe sind detailliert untersucht worden. Die erste beruhte auf der Entdeckung, daß elektropositive Substituenten auf der Außenseite der DNA-bindenden Strukturelemente die DNA-Bindungs-Affinität erheblich erhöhen, ohne die DNA-Bindungs-Selektivität zu beeinflussen, und daß sie zugleich die Wasserlöslichkeit verbessern. Dieser Effekt könnte auf eine räumlich gut abgestimmte, stabilisierende elektrostatische Wechselwirkung mit dem negativ geladenen DNA-Phosphatrückgrat zurückgeführt werden<sup>[83]</sup>. Diese Untersuchungen sind auf die Verbindungen 59–61 (Abb. 47) ausgedehnt worden,

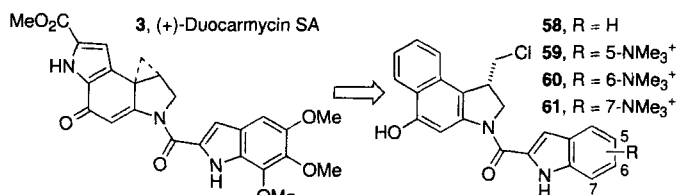


Abb. 47. 59–61, Ammoniumderivate von 58, als Analoga von 3.

die eine quartäre Ammoniumgruppe an einem der DNA-bindenden Indolstrukturelemente enthalten, die dieselbe starke elektrostatische Stabilisierung liefern kann<sup>[84]</sup>. Die wasserlöslichen Substrate 59–61 alkylieren DNA erwartungsgemäß mit derselben Effizienz wie 1 oder 3 und sind 100mal effektiver als die Verbindung 58, der die positiv geladene Gruppe fehlt.

Die zweite wichtige Veränderung basierte auf Beobachtungen von Dervan<sup>[12, 167]</sup> und Lown<sup>[168]</sup>, denen zufolge die Selektivität von Distamycin für die nichtkovalente Bindung an AT-reiche Regionen so verändert werden konnte, daß sie für ein GC-Basenpaar paßte, indem in das Rückgrat ein Stickstoffatom eingeführt wurde, das als Wasserstoffbrückenbindungs-Acceptor für eine Guanin-C2-Aminogruppe dienen kann<sup>[169]</sup>. Wir entwarfen und synthetisierten die Substrate 62 und 63<sup>[170]</sup>, die stark modifizierte DNA-bindende Strukturelemente mit einem Stickstoffatom aufweisen, das auf ihrer

inneren konkaven Seite, die in engem Kontakt mit dem Boden der kleinen Furche steht, als Wasserstoffbrückenbindungs-Acceptor (CDPBO, CDPBI) oder -Donor (CDPBI) dienen kann (Abb. 48). Die DNA-Alkylierungs-Selektivitäten von **62** und

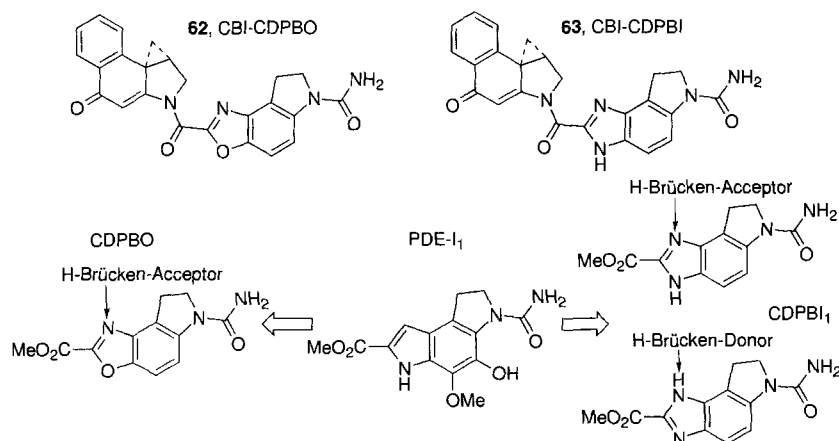


Abb. 48. CBI-CDPBO und CBI-CDPBI: Modellverbindungen mit Modifikationen in den DNA-bindenden Strukturelementen.

**63** erwiesen sich als identisch mit denen von (+)-CBI-CDP<sub>1</sub>; die Effizienz war jedoch deutlich vermindert (Faktor 100). Die Einführung des zusätzlichen Stickstoffatoms hatte somit eine deutliche und ungünstige Wirkung auf die relative Effizienz der DNA-Alkylierung, aber keinen sichtbaren Einfluß auf die DNA-Alkylierungs-Selektivität.

## 11. Biochemische Untersuchungen: Wirkmechanismus

### 11.1. Apoptose: Zusammenhang zwischen DNA-Alkylierung, cytotoxischer Aktivität und Antitumor-Eigenschaften

Der erste Schritt zur Ermittlung des Zusammenhangs zwischen DNA-Alkylierung und effektiver Antitumoraktivität waren Untersuchungen, die zeigten, daß in empfindlichen Tumor-Zellstämmen, wie L1210 und Molt-4, bei Substratkonzentrationen (100 µM), die unterhalb der Konzentrationen für einen typischen, bei nichtsensitiven Zellstämmen beobachteten Zelltod durch Nekrose liegen, ein apoptotischer Zelltod ausgelöst wird<sup>[51]</sup>. Unter Apoptose versteht man einen spezifischen Mechanismus des Zellsterbens, der sich von dem der Nekrose unterscheidet. In apoptotischen Zellen ereignen sich morphologische Veränderungen einschließlich einer charakteristischen Heterochromatin-Verdichtung, Abbau von Genom-DNA, Kernzerfall und Bündelung der Zellreste zu apoptotischen Körpern, die durch Makrophagen entfernt werden.

### 11.2. Auswirkungen auf den Zellzyklus

Die Hauptelemente des Zellzyklus sind Wachstum, DNA-Replikation, Mitose und Zellteilung. Der Zellzyklus ist in zwei Abschnitte – Interphase und Mitose (M) – unterteilt. Die S-Pha-

se (DNA-Synthese) liegt in der Mitte der Interphase, ihr geht die G<sub>1</sub>-Phase, die Lücke zwischen Mitose (M) und DNA-Synthese, voraus, und ihr folgt die G<sub>2</sub>-Phase, die Lücke zwischen Replikation und Mitose. Das Ausmaß, in dem ein Cytostatikum in diese Geschehnisse eingreift, hat große Bedeutung für seinen Wirkmechanismus. (+)-CC-1065 blockiert den Zellzyklus bei G<sub>2</sub> und M<sup>[49, 171–173]</sup>, beeinflusst aber die Übergänge von M nach G<sub>1</sub> und von G<sub>1</sub> nach S nicht. Bei niedrigen Substratkonzentrationen, die ausreichen, um den Zellzyklus bei G<sub>2</sub> und M zu stoppen, waren Zellen in der Lage, die S-Phase langsam zu durchlaufen, obwohl (+)-CC-1065 die DNA-Synthese hemmt. Analog hemmt Adozelesin **65** (siehe Abb. 49) den Zellzyklus bei G<sub>2</sub><sup>[174, 175]</sup>.

### 11.3. Auf DNA einwirkende Enzyme

Die Alkylierung von Duplex-DNA durch CC-1065 und ähnliche Substrate hemmt viele an der DNA angreifende Enzyme<sup>[176]</sup>, z.B. S1-Nuclease, die für die Verdauung einsträngiger DNA verantwortlich ist<sup>[88]</sup>, T4-Ligase<sup>[177]</sup> und Helicase<sup>[178–181]</sup>, und sie beendet die durch DNA-Polymerase katalysierte DNA-Synthese (Replikation) an den Stellen der Adduktbildung<sup>[182]</sup>. Das CC-1065-Adenin-N3-Addukt bewirkt eine deutliche Hemmung und liefert verstärkte DNA-Spaltungsmuster beim DNase-I- oder MPE-Fe<sup>II</sup>-Footprinting<sup>[183]</sup>. Versuche, einen Zusammenhang zwischen der Substratstruktur und dem Grad an mutagenen Effekten der Adenin-N3-Alkylierung<sup>[184–191]</sup> einerseits sowie dem Grad an Beständigkeit<sup>[192–194]</sup> andererseits herzustellen, sind bekannt geworden.

### 12. Verzögerte Toxizität

Eine schwerwiegende Einschränkung der Anwendung von mit (+)-CC-1065 **1** verwandten Wirkstoffen ist die charakteristische verzögerte Toxizität des Naturstoffs<sup>[52]</sup>. Bei der Untersuchung der Toxizität von **1** an Mäusen, die keinen Tumor hatten, wurde bei therapeutischen antineoplastischen Dosen eine ungewöhnliche Form von lethaler, verzögerter Hepatoxizität beobachtet. Bei intravenöser (iv) Verabreichung einer Einzeldosis von 12.5 µg pro kg traten mit 50 Tagen Verzögerung Todesfälle auf und bei ip-Verabreichung einer Einzeldosis von 10 µg pro kg mit 70 Tagen Verzögerung. Der LD<sub>50</sub>-Wert bei Mäusen wurde zu 9 µg pro kg für Einzeldosen und zu 0.3 µg pro kg und Tag bei einer Verabreichung von fünf Dosen pro Tag bestimmt. Diese verzögerten Todesfälle gingen mit drastischen Veränderungen in der Morphologie der Lebermitochondrien einher. Eine Vorbehandlung der Tiere mit Substraten, die den Cytochrom-P-450-Metabolismus auslösen, als Vorbeugung gegen die Toxizität von **1** war ohne Erfolg. Es fällt auf, daß das nichtnatürliche Enantiomer von **1**, das in vitro genauso wirksam und in vivo ebenso effizient ist, diese Eigenschaft nicht hat, was darauf schließen läßt, daß diese Eigenschaft nicht mit der Struktur an sich zusam-



menhängt oder eine notwendige Folge des für die Antitumoraktivität verantwortlichen Wirkmechanismus ist. Auch zeigen die meisten, jedoch nicht alle Analoga von **1** diese verzögerte Toxizität ebenso wenig wie die bisher untersuchten Duocarmycine und ihre Analoga. Über den Ursprung dieses ungewöhnlichen Verhaltens ist viel spekuliert worden<sup>[47, 97, 176]</sup>. Eine der interessanteren Spekulationen ist die Annahme, daß die verzögerte Toxizität mit dem Grad der Reversibilität der DNA-Alkylierung zusammenhängt und demzufolge mit dem Maß an Stabilisierung des Addukts durch nichtkovalente Bindungen<sup>[37, 58]</sup>. Substrate, deren absolute Konfiguration (Addukte der natürlichen Enantiomere sind stabiler als die der nichtnatürlichen) und deren Ausmaß an nichtkovalenter Bindung die Alkylierung irreversibel gestalten, könnten zu dieser verzögerten Toxizität neigen, und es wird angenommen, daß solche Verbindungen als Substrate optimal sind, die zwar stabile, aber nicht irreversibel entstehende Addukte bilden. Unabhängig davon, ob dies die verzögerte Toxizität tatsächlich beeinflußt, legt diese Hypothese nahe, daß es von Vorteil sein könnte, diejenigen chemisch stabilsten Alkylierungseinheiten, die mit dem höchsten Maß an Reversibilität assoziiert sind und deren nichtdiskriminierende Alkylierungsreaktivität herabgesetzt ist, zu verwenden und mit einem DNA-bindenden Strukturelement zu verknüpfen, das die Bildung eines stabilen, jedoch nicht irreversibel entstehenden Addukts ermöglicht.

### 13. Kandidaten für klinische Tests

Vier Substrate, die zu **1** analog sind und entweder die authentische CPI-Alkylierungseinheit oder eine seco-Vorstufe enthalten, sind als Kandidaten für klinische Tests vorgeschlagen worden (Abb. 49)<sup>[195, 196]</sup>. Die ersten beiden, **64** (U-71,184) und **65** (Adozelesin), stammen aus der ersten Untersuchungsphase über Analoga von **1**, in der systematische Modifizierungen, Vereinfachungen und eine Optimierung der DNA-bindenden Strukturelemente durchgeführt wurden<sup>[197–199]</sup>. Carzelesin **66** ist eine Wirkstoffvorstufe, die bei der Carbamathydrolyse ( $t_{1/2} = 18–52$  min in Plasma;  $t_{1/2} = 40$  min in Zellkulturen) das freie Phenol liefert, das sofort zum entsprechenden, cyclopropanhaltigen Substrat cyclisiert<sup>[200]</sup>. Bizelesin **43** (siehe Abb. 33) ist ein DNA-querverknüpfendes Substrat, das die Vorstufen von zwei CPI-Alkylierungseinheiten enthält und etwa 20- bis 30mal wirksamer ist als **1** ( $IC_{50}(L1210) = 1$  pM gegenüber 20 pM)<sup>[201]</sup>.

In Japan ist aus der Substratklasse der Duocarmycine KW-2189 **67** für klinische Tests ausgewählt worden<sup>[202–205]</sup>. Bei dieser Verbindung handelt es sich um ein halbsynthetisches Duocarmycin-B<sub>2</sub>-Derivat mit verbesserter Antitumoraktivität, Wasserlöslichkeit und Stabilität.

Mit Substanz aus unserem Labor erstmals hergestellte, eine spaltbare Disulfidbrücke aufweisende Konjugate einer Vorstufe von (+)-CBI(indol)<sub>2</sub> (siehe Abb. 45) mit humanen Erscheinungsformen der Antikörper (mAbs) anti-B4 und N901, die gegen die tumorassoziierten Antigene CD19 bzw. CD56 gerichtet sind, erwiesen sich als äußerst wirksam und Antigen-selektiv bei der Vernichtung von Zielzellen in Kulturen<sup>[206]</sup>. Das anti-B4-Disulfid-Konjugat mit (+)-CBI(indol)<sub>2</sub> zeigte an einem aggressiven, in vivo metastatischen humanen B-Zellen-Lymphom

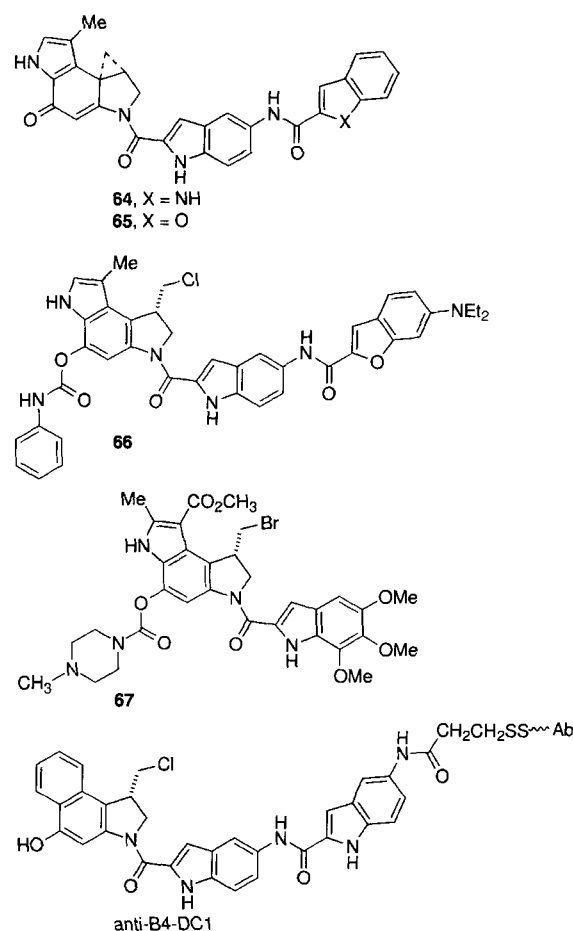


Abb. 49. Kandidaten für klinische Tests.

Antitumorwirksamkeit und führte zur Heilung von Tieren mit großen Tumoren. Das Konjugat erwies sich als erheblich wirksamer als Doxorubicin, Cyclophosphamid, Etoposid oder Vincristin in maximal erlaubter Dosis. Es zeigte sich, daß die tumorselektive Ausrichtung der von **1** und den Duocarmycinen abgeleiteten cytotoxischen Substrate durch reversible Verknüpfung mit tumorgerichteten Antikörpern die den Substraten innewohnende Selektivität verbesserte. Wegen der möglicherweise geringen Freisetzung der Antikörper-gebundenen Substrate, die durch die Zahl der an der Zelloberfläche vorhandenen passenden Antigene begrenzt ist, fordert eine derartige Vorgehensweise eine außerordentlich hohe Wirksamkeit des gebundenen cytotoxischen Wirkstoffs. Nur eine geringe Zahl von Wirkstoffen, zu denen **1–3** und ihre synthetischen Analoga zählen, weist die notwendige Wirksamkeit auf.

### 14. Zusammenfassung und Ausblick

In bemerkenswert kurzer Zeit ist es gelungen, für diese neue Klasse von Cytostatica/Antibiotica die DNA-Alkylierungseigenschaften und die Ursache für die sequenzselektive Erkennung und Alkylierung von DNA zu definieren. Es handelt sich sicherlich um die bisher am besten verstandene und am sorgfältigsten untersuchte Klasse von sequenzselektiven DNA-Alkylierungsmitteln. Die wichtigsten Aspekte im Hinblick auf die Poly-

nucleotiderkennung und die funktionelle Reaktivität der Substrate sowie ihre Anwendungsmöglichkeiten sind detailliert beschrieben worden. Nichtsdestotrotz sind einige grundlegende Probleme noch ungelöst, zu denen eine Einigung über den Ursprung der DNA-Alkylierungs-Selektivität, die relative Bedeutung von DNA-Alkylierungs-Geschwindigkeit oder -Effizienz und thermodynamischer Stabilität der Addukte, der Ursprung der charakteristischen, aber ungewöhnlichen verzögerten Toxizität von 1, das Ausmaß und der Ursprung der Katalyse der DNA-Alkylierung und der Zusammenhang zwischen DNA-Alkylierung und selektiver antineoplastischer Aktivität zählen. Es fällt auf, daß der Schlüssel zum derzeitigen Verständnis der Eigenschaften der Naturstoffe nicht in erster Linie durch intensive Studien an den Naturstoffen selbst, sondern über das Design und die Bewertung von synthetischen Teilstrukturen und Substraten mit stark veränderten Strukturen einschließlich ihrer nichtnatürlichen Enantiomere gefunden wurde. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, sollte man sich darum bemühen, Spekulationen über den Ursprung von Naturstoffeigenschaften durch Versuche mit geschickt gewählten synthetischen Substraten zu beweisen. Einige derartige Substrate haben sich außerdem als sehr viel wirksamer erwiesen als die Naturstoffe, woraus sich ersehen läßt, daß die interessierenden Eigenschaften durch gut begründete, gezielte Strukturänderungen verbessert werden können. Die Tatsache, daß derartige Strukturänderungen das Analogon oftmals zugleich vereinfachen, führt zu der Vermutung, daß in dieser Stoffklasse letztlich ein synthetisch entwickeltes Substrat und nicht einer der natürlichen Wirkstoffe klinische Bedeutung erlangen wird. Die elementaren Prinzipien, die in den bisherigen Untersuchungen erkannt wurden, könnten ohne Zweifel den Grundstein für derartige Entwicklungen legen.

## Abkürzungen

DSA:	Duocarmycin-SA-Alkylierungseinheit
DA:	Duocarmycin-A-Alkylierungseinheit
CPI:	1,2,8,8a-Tetrahydro-7-methylcyclopropa[c]pyrrolo[3,2-e]indol-4-on
CBI:	1,2,9,9a-Tetrahydrocyclopropa[c]benzo[e]indol-4-on
MCBI:	1,2,9,9a-Tetrahydro-7-methoxycyclopropa[c]benzo[e]indol-4-on
CCBI:	1,2,9,9a-Tetrahydro-7-cyancyclopropa[c]benzo[e]indol-4-on
CI:	1,2,7,7a-Tetrahydrocyclopropa[1,2-c]indol-4-on
CBQ:	2,3,10,10a-Tetrahydro-1H-cyclopropa[d]benzo[f]-chinol-5-on
C <sub>2</sub> BI:	9a-(Chlormethyl)-1,2,9,9a-tetrahydrocyclopropa[c]benzo[e]indol-4-on
CDPI:	3-Carbamoyl-1,2-dihydro-3H-pyrrolo[3,2-e]indol-7-carboxylat
TMI:	5,6,7-Trimethoxyindol-2-carboxylat
CDPBO:	3-Carbamoyl-1,2-dihydro-3H-pyrrolo[3,2-e]benzoxazol-7-carboxylat
CDPBI:	3-Carbamoyl-1,2-dihydro-3H-pyrrolo[3,2-e]benzimidazol-7-carboxylat
TACDPI:	5-Trimethylammonio-3-carbamoyl-1,2-dihydro-3H-pyrrolo[3,2-e]indol-7-carboxylat
ACDPI:	5-Amino-3-carbamoyl-1,2-dihydro-3H-pyrrolo[3,2-e]indol-7-carboxylat

IC<sub>50</sub>: erforderliche Substratkonzentration, um das Wachstum des behandelten Zellstamms (L1210) in einem Versuch über 72 h um 50% zu hemmen.

Eingegangen am 30. Mai 1995 [A 116]

Übersetzt von Dr. Sabine Töteberg-Kaulen, Boffzen

- [1] *Molecular Basis of Specificity in Nucleic Acid-Drug Interactions* (Hrsg.: B. Pullman, J. Jortner), Kluwer, Dordrecht, 1990.
- [2] *Nucleic Acid Targeted Drug Design* (Hrsg.: C. L. Propst, T. J. Perun), Marcel Dekker, New York, NY, 1992.
- [3] *Molecular Aspects of Anticancer Drug-DNA Interactions, Vol. 1* (Hrsg.: S. Neidle, M. Waring), CRC, Boca Raton, FL, 1993.
- [4] *Molecular Aspects of Anticancer Drug-DNA Interactions, Vol. 2* (Hrsg.: S. Neidle, M. Waring), CRC, Boca Raton, FL, 1994.
- [5] D. S. Johnson, D. L. Boger in *Comprehensive Supramolecular Chemistry, Vol. 4* (Hrsg.: J.-M. Lehn), Pergamon, New York, NY, 1996, im Druck.
- [6] *DNA Adducts: Identification and Biological Significance* (Hrsg.: K. Hemminki, A. Dipple, D. E. G. Shuker, F. F. Kadlubar, D. Segerbäck, H. Bartsch), Oxford University Press, New York, 1994.
- [7] A. M. Maxam, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977, 74, 560–564; A. M. Maxam, W. Gilbert, *Methods Enzymol.* 1980, 65, 499–560.
- [8] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977, 74, 5463–5467.
- [9] B. J. B. Ambrose, R. C. Pless, *Methods Enzymol.* 1987, 152, 522–538.
- [10] W. M. Barnes, *Methods Enzymol.* 1987, 152, 538–556.
- [11] J. C. Dabrowiak, A. A. Stankus, J. Goodisman in Lit. [2], S. 93–149.
- [12] P. B. Dervan, *Science* 1986, 232, 464–471.
- [13] J. W. Low in *Molecular Aspects of Anticancer Drug Action* (Hrsg.: S. Neidle, M. J. Waring), VCH, Weinheim, 1983, S. 283–314.
- [14] R. E. Dickerson in *Structure and Methods: DNA and RNA, Vol. 3* (Hrsg.: R. H. Sarma, M. H. Sarma), Adenine, Schenectady, NY, 1990, S. 1–38.
- [15] O. Kennard, W. N. Hunter, *Angew. Chem.* 1991, 103, 1280–1304; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1991, 30, 1254–1277.
- [16] J. Feigon, V. Sklenar, E. Wang, D. E. Gilbert, R. F. Macaya, P. Schultze, *Methods Enzymol.* 1992, 211, 235–253.
- [17] M. S. Searle, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 1993, 25, 403–480.
- [18] C. E. Bugg, S. E. Ealick, *Crystallographic and Modeling Methods in Molecular Design*, Springer, New York, 1990.
- [19] S. N. Rao in Lit. [2], S. 65–91.
- [20] L. J. Hanka, A. Dietz, S. A. Gerpheide, S. L. Kuentzel, D. G. Martin, *J. Antibiot.* 1978, 31, 1211–1217.
- [21] D. G. Martin, C. G. Chidester, D. J. Duchamp, S. A. Mizesak, *J. Antibiot.* 1980, 33, 902–903.
- [22] D. G. Martin, C. Biles, S. A. Gerpheide, L. J. Hanka, W. C. Krueger, J. P. McGovern, S. A. Mizesak, G. L. Neil, J. C. Stewart, J. Visser, *J. Antibiot.* 1981, 34, 1119–1125.
- [23] C. G. Chidester, W. C. Krueger, S. A. Mizesak, D. J. Duchamp, D. G. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* 1981, 103, 7629–7635.
- [24] I. Takahashi, K. Takahashi, M. Ichimura, M. Morimoto, K. Asano, I. Kawamoto, F. Tomita, H. Nakano, *J. Antibiot.* 1988, 41, 1915–1917.
- [25] T. Yasuzawa, T. Iida, K. Muroi, M. Ichimura, K. Takahashi, H. Sano, *Chem. Pharm. Bull.* 1988, 36, 3728–3731.
- [26] M. Ichimura, K. Muroi, K. Asano, I. Kawamoto, F. Tomita, M. Morimoto, H. Nakano, *J. Antibiot.* 1988, 41, 1285–1288.
- [27] K. Ohba, H. Watabe, T. Sasaki, Y. Takeuchi, Y. Kodama, T. Nakazawa, H. Yamamoto, T. Shomura, M. Sezaki, S. Kondo, *J. Antibiot.* 1988, 41, 1515–1519.
- [28] T. Ogawa, M. Ichimura, S. Katsumata, M. Morimoto, K. Takahashi, *J. Antibiot.* 1989, 42, 1299–1301.
- [29] S. Ishii, M. Nagasawa, Y. Kariya, H. Yamamoto, S. Inouye, S. Kondo, *J. Antibiot.* 1989, 42, 1713–1717.
- [30] M. Ichimura, T. Ogawa, K. Takahashi, E. Kobayashi, I. Kawamoto, T. Yasuzawa, I. Takahashi, H. Nakano, *J. Antibiot.* 1990, 43, 1037–1038.
- [31] T. Yasuzawa, Y. Saitoh, M. Ichimura, I. Takahashi, H. Sano, *J. Antibiot.* 1991, 44, 445–447.
- [32] M. Ichimura, T. Ogawa, S. Katsumata, K. Takahashi, I. Takahashi, H. Nakano, *J. Antibiot.* 1991, 44, 1045–1053.
- [33] T. Yasuzawa, K. Muroi, M. Ichimura, I. Takahashi, T. Ogawa, K. Takahashi, H. Sano, Y. Saitoh, *Chem. Pharm. Bull.* 1995, 43, 378–391; M. Ichimura, T. Ogawa, K. Takahashi, A. Mihara, I. Takahashi, H. Nakano, *Oncol. Res.* 1993, 5, 165–171.
- [34] D. L. Boger, D. S. Johnson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92, 3642–3649.
- [35] D. L. Boger, *Acc. Chem. Res.* 1995, 28, 20–29.
- [36] D. L. Boger, *Chemtracts: Org. Chem.* 1991, 4, 329–349.
- [37] D. L. Boger in *Proc. Robert A. Welch Found. Conf. Chem. Res.* 1991, 35, 137–179.
- [38] D. L. Boger, *Adv. Heterocycl. Nat. Prod. Synth.* 1992, 2, 1–188.
- [39] D. L. Boger, *Pure Appl. Chem.* 1993, 65, 1123–1132.

- [40] D. L. Boger, *Pure Appl. Chem.* **1994**, *66*, 837–844.
- [41] R. S. Coleman, D. L. Boger, *Stud. Nat. Prod. Chem.* **1989**, *3*, 301–383.
- [42] D. L. Boger in *Heterocycles in Bioorganic Chemistry* (Hrsg.: J. Bergman, H. C. van der Plas, M. Simonyi), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1991**, S. 103–129.
- [43] M. A. Warpehoski, *Adv. DNA Sequence Specific Agents* **1992**, *1*, 217–245.
- [44] M. A. Warpehoski, *Drugs Fut.* **1991**, *16*, 131–141.
- [45] M. A. Warpehoski, J. P. McGovern, M. A. Mitchell, L. H. Hurley in *Molecular Basis of Specificity in Nucleic Acid Drug Interactions* (Hrsg.: B. Pullman, J. Jortner), Kluwer, Dordrecht, **1990**, S. 531–550.
- [46] M. A. Warpehoski, L. H. Hurley, *Chem. Res. Toxicol.* **1988**, *1*, 315–333.
- [47] L. H. Hurley, P. H. Draves in *Lit.* [3], S. 89–133.
- [48] L. H. Hurley, D. R. Needham-VanDevanter, *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*, 230–237.
- [49] V. L. Reynolds, J. P. McGovern, L. H. Hurley, *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 319–334.
- [50] P. A. Aristoff, *Adv. Med. Chem.* **1993**, *2*, 67–110.
- [51] D. L. Boger, D. S. Johnson, W. Wrasidlo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 631–636.
- [52] J. P. McGovern, G. L. Clarke, E. A. Pratt, T. F. DeKoning, *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 63–70.
- [53] D. L. Boger, D. S. Johnson, W. Yun, C. M. Tarby, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, *2*, 115–135.
- [54] D. L. Boger, D. S. Johnson, W. Yun, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1635–1656.
- [55] D. L. Boger, T. Ishizaki, H. Zarrinmayeh, P. A. Kitos, O. Suntornwat, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4499–4502.
- [56] D. L. Boger, T. Ishizaki, H. Zarrinmayeh, S. A. Munk, P. A. Kitos, O. Suntornwat, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8961–8971.
- [57] D. L. Boger, T. Ishizaki, H. Zarrinmayeh, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6645–6649.
- [58] D. L. Boger, W. Yun, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9872–9873.
- [59] D. L. Boger, W. Yun, S. Terashima, Y. Fukuda, K. Nakatani, P. A. Kitos, Q. Jin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 759–765.
- [60] H. Sugiyama, M. Hosoda, I. Saito, A. Asai, H. Saito, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 7197–7200.
- [61] A. Asai, S. Nagamura, H. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4171–4177.
- [62] H. Sugiyama, K. Ohmori, K. L. Chan, M. Hosoda, A. Asai, H. Saito, I. Saito, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2179–2182.
- [63] K. Yamamoto, H. Sugiyama, S. Kawanishi, *Biochemistry* **1993**, *32*, 1059–1066.
- [64] L. H. Hurley, V. L. Reynolds, D. H. Swenson, G. L. Petzold, T. A. Scahill, *Science* **1984**, *226*, 843–844.
- [65] D. R. Needham-VanDevanter, L. H. Hurley, V. L. Reynolds, N. Y. Theriault, W. C. Krueger, W. Wierenga, *Nucl. Acids Res.* **1984**, *12*, 6159–6168.
- [66] V. L. Reynolds, I. J. Molinoux, D. J. Kaplan, D. H. Swenson, L. H. Hurley, *Biochemistry* **1985**, *24*, 6228–6237.
- [67] L. H. Hurley, C.-S. Lee, J. P. McGovern, M. A. Warpehoski, M. A. Mitchell, R. C. Kelly, P. A. Aristoff, *Biochemistry* **1988**, *27*, 3886–3892.
- [68] L. H. Hurley, M. A. Warpehoski, C.-S. Lee, J. P. McGovern, T. A. Scahill, R. C. Kelly, M. A. Mitchell, N. A. Wicnienki, I. Gebhard, P. D. Johnson, V. S. Bradford, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4633–4649.
- [69] C. H. Lin, J. M. Beale, L. H. Hurley, *Biochemistry* **1991**, *30*, 3597–3602.
- [70] M. A. Warpehoski, D. E. Harper, M. A. Mitchell, T. J. Monroe, *Biochemistry* **1992**, *31*, 2502–2508.
- [71] D. L. Boger, R. S. Coleman, B. J. Invergo, S. M. Sakya, T. Ishizaki, S. A. Munk, H. Zarrinmayeh, P. A. Kitos, S. C. Thompson, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4623–4632.
- [72] D. L. Boger, S. A. Munk, H. Zarrinmayeh, T. Ishizaki, J. Haught, M. Bina, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2661–2682.
- [73] D. L. Boger, W. Yun, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7996–8006.
- [74] T. J. Zsido, J. M. Woyanowski, R. M. Baker, L. S. Gawron, T. A. Beerman, *Biochemistry* **1991**, *30*, 3733–3738.
- [75] K. L. Weiland, T. P. Dooley, *Biochemistry* **1991**, *30*, 7559–7565.
- [76] M. M. McHugh, J. M. Woyanowski, M. A. Mitchell, L. S. Gawron, K. L. Weiland, T. A. Beerman, *Biochemistry* **1994**, *33*, 9158–9168.
- [77] D. L. Boger, R. S. Coleman, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1321–1323, 4796–4807; D. L. Boger, R. S. Coleman, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 695–698.
- [78] In Übereinstimmung mit dieser Hypothese ist der induzierte Circular dichroismus bei der Bindung und Alkylierung von DNA durch (+)-CC-1065 sehr viel größer als bei der durch (+)-16, was auf eine stärkere Konformationsänderung bei der Bindung von CC-1065 hinweist. Dieser größere induzierte Circular dichroismus bei der Verwendung von CC-1065 wurde in früheren Studien [79] fälschlich einer höheren Bindungs- und Alkylierungseffizienz zugeschrieben.
- [79] M. A. Warpehoski, V. S. Bradford, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 131–134.
- [80] D. L. Boger, L. R. Cerbone, D. Yohannes, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5163–5166.
- [81] D. L. Boger, R. S. Coleman, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 2240–2245; D. L. Boger, R. S. Coleman, B. J. Invergo, *ibid.* **1987**, *52*, 1521–1530.
- [82] D. L. Boger, B. J. Invergo, R. S. Coleman, H. Zarrinmayeh, P. A. Kitos, S. C. Thompson, T. Leong, L. W. McLaughlin, *Chem. Biol. Interact.* **1990**, *73*, 29–52.
- [83] D. L. Boger, S. M. Sakya, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1277–1284.
- [84] D. L. Boger, W. Yun, N. Han, D. S. Johnson, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 611–621.
- [85] D. L. Boger, J. Zhou, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3018–3024.
- [86] D. L. Boger, J. Zhou, H. Cai, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 859–868.
- [87] L. H. Li, D. H. Swenson, S. L. F. Schpok, S. L. Kuentzel, B. D. Dayton, W. C. Krueger, *Cancer Res.* **1982**, *42*, 999–1004.
- [88] D. H. Swenson, L. H. Li, L. H. Hurley, J. S. Rokem, G. L. Petzold, B. D. Dayton, T. L. Wallace, A. H. Lin, W. C. Krueger, *Cancer Res.* **1982**, *42*, 2821–2828.
- [89] W. C. Krueger, L. H. Li, A. Moscovitz, M. D. Prairie, G. L. Petzold, D. H. Swenson, *Biopolymers* **1985**, *24*, 1549–1572.
- [90] W. C. Krueger, D. J. Duchamp, L. H. Li, A. Moscovitz, G. L. Petzold, M. D. Prairie, D. H. Swenson, *Chem. Biol. Interact.* **1986**, *59*, 55–72.
- [91] W. C. Krueger, M. D. Prairie, *Chem. Biol. Interact.* **1987**, *62*, 281–295.
- [92] N. Y. Theriault, W. C. Krueger, M. D. Prairie, *Chem. Biol. Interact.* **1988**, *65*, 187–201.
- [93] D. H. Swenson, G. L. Petzold, M. G. Williams, L. H. Li, M. D. Prairie, W. C. Krueger, *Chem. Biol. Interact.* **1988**, *67*, 199–213.
- [94] B. C. Moy, M. D. Prairie, W. C. Krueger, B. K. Bhuyan, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 1983–1988.
- [95] W. C. Krueger, M. D. Prairie, *Chem. Biol. Interact.* **1991**, *79*, 137–149.
- [96] W. C. Krueger, N. T. Hatzenbuehler, M. D. Prairie, M. H. Shea, *Chem. Biol. Interact.* **1991**, *79*, 265–286.
- [97] W. C. Krueger, M. D. Prairie, *Chem. Biol. Interact.* **1992**, *82*, 31–46.
- [98] C. H. Lin, D. Sun, L. H. Hurley, *Chem. Res. Toxicol.* **1991**, *4*, 21–26.
- [99] C.-S. Lee, D. Sun, R. Kizu, L. H. Hurley, *Chem. Res. Toxicol.* **1991**, *4*, 203–213.
- [100] C. H. Lin, G. C. Hill, L. H. Hurley, *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 167–182.
- [101] Z.-M. Ding, R. M. Harshey, L. H. Hurley, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 4281–4287.
- [102] D. Sun, C. H. Lin, L. H. Hurley, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4487–4495.
- [103] A. S. Thompson, D. Sun, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2371–2372.
- [104] D. L. Boger, S. A. Munk, H. Zarrinmayeh, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3980–3983.
- [105] D. L. Boger, H. Zarrinmayeh, S. A. Munk, P. A. Kitos, O. Suntornwat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 1431–1435.
- [106] M. A. Warpehoski, D. E. Harper, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7573–7580.
- [107] M. A. Warpehoski, D. E. Harper, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2951–2952.
- [108] D. L. Boger, D. S. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1443–1444.
- [109] D. L. Boger, D. Hertzog, B. Bollinger, D. S. Johnson, H. Cai, unveröffentlichte Ergebnisse; D. L. Boger, D. Hertzog, B. Bollinger, P. Mésini, H. Cai, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [110] P. S. Eis, J. Rydzewski, J. Smith, D. A. Case, D. L. Boger, W. J. Chazin, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [111] T. A. Scahill, R. M. Jensen, D. H. Swenson, N. T. Hatzenbuehler, G. L. Petzold, W. Wierenga, N. D. Brahme, *Biochemistry* **1990**, *29*, 2852–2860.
- [112] C. H. Lin, L. H. Hurley, *Biochemistry* **1990**, *29*, 9503–9507.
- [113] R. Powers, D. G. Gorenstein, *Biochemistry* **1990**, *29*, 9994–10008.
- [114] C. H. Lin, D. J. Patel, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10658–10660; *J. Mol. Biol.* **1995**, *248*, 162–179.
- [115] D. L. Boger, R. J. Wysocki, Jr., *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1238–1240.
- [116] D. L. Boger, R. J. Wysocki, Jr., T. Ishizaki, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5230–5240.
- [117] D. L. Boger, T. Ishizaki, R. J. Wysocki, Jr., S. A. Munk, P. A. Kitos, O. Suntornwat, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6461–6463.
- [118] D. L. Boger, T. Ishizaki, P. A. Kitos, O. Suntornwat, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5823–5832.
- [119] D. L. Boger, T. Ishizaki, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 793–796.
- [120] D. L. Boger, S. A. Munk, T. Ishizaki, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2779–2780.
- [121] D. L. Boger, T. Ishizaki, S. M. Sakya, S. A. Munk, P. A. Kitos, Q. Jin, J. M. Besterman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, *1*, 115–120.
- [122] D. L. Boger, S. A. Munk, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5487–5496.
- [123] D. L. Boger, W. Yun, B. R. Teegarden, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2873–2876.
- [124] D. L. Boger, J. A. McKie, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1271–1275.
- [125] P. A. Aristoff, P. D. Johnson, D. Sun, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1956–1963; P. A. Aristoff, P. D. Johnson, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6234–6239; K. J. Drost, M. P. Cava, *ibid.* **1991**, *56*, 2240–2244.
- [126] D. L. Boger, J. A. McKie, H. Cai, B. Cacciari, P. G. Baraldi, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1710–1729.
- [127] D. L. Boger, N. Han, C. M. Tarby, C. W. Boyce, H. Cai, Q. Jin, P. A. Kitos, *J. Org. Chem.*, im Druck; D. L. Boger, J. A. McKie, N. Han, C. M. Tarby, H. W. Riggs, P. A. Kitos, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 659–664.
- [128] D. L. Boger, P. Mésini, C. M. Tarby, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6461–6462.
- [129] D. L. Boger, P. Mésini, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11335–11348.
- [130] D. L. Boger, P. Mésini, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11647–11655.
- [131] D. L. Boger, M. S. S. Palanki, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9318–9327.
- [132] D. L. Boger, D. S. Johnson, M. S. S. Palanki, P. A. Kitos, J. Chang, P. D. well, *Bioorg. Med. Chem.* **1993**, *1*, 27–38.

- [133] M. A. Mitchell, P. D. Johnson, M. G. Williams, P. A. Aristoff, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6428–6429.
- [134] M. A. Mitchell, R. C. Kelly, N. A. Wicnienski, N. T. Hatzenbuehler, M. G. Williams, G. L. Petzold, J. L. Slightom, D. R. Siemieniak, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8994–8995.
- [135] C.-S. Lee, N. W. Gibson, *Cancer Res.* **1991**, *51*, 6586–6591.
- [136] C.-S. Lee, N. W. Gibson, *Biochemistry* **1993**, *32*, 2592–2600.
- [137] C.-S. Lee, N. W. Gibson, *Biochemistry* **1993**, *32*, 9108–9114.
- [138] C.-S. Lee, G. P. Pfeifer, N. W. Gibson, *Biochemistry* **1994**, *33*, 6024–6030.
- [139] Z.-M. Ding, L. H. Hurley, *Anti Cancer Drug Res.* **1991**, *6*, 427–452.
- [140] D. Sun, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5925–5933.
- [141] F. C. Seaman, L. Hurley, *Biochemistry* **1993**, *32*, 12577–12585.
- [142] D. Sun, H.-J. Park, L. H. Hurley, *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, *6*, 889–894.
- [143] a) K. Okabe, M. Takahashi, H. Muratake, M. Natsume in Lit. [143c], S. 64; b) Y. Fukuda, K. Fuluta, Y. Ohmori, S. Terashima, Lit. [143c], S. 266; c) *Abstr. Pap. 115th Annu. Meet. Pharm. Soc. Jpn. (Sendai)* **1995**.
- [144] F. Mohamadi, M. M. Spees, G. S. Staten, P. Marder, J. K. Kipka, D. A. Johnson, D. L. Boger, H. Zarrinmayeh, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 232–239.
- [145] R. J. Sundberg, E. W. Baxter, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 2687–2690; R. J. Sundberg, T. Nishiguchi, *ibid.* **1983**, *24*, 4773–4776; R. J. Sundberg, E. W. Baxter, W. J. Pitts, R. Ahmed-Schofield, T. Nishiguchi, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5097–5107; R. J. Sundberg, W. J. Pitts, *ibid.* **1991**, *56*, 3048–3054; K. J. Droost, R. J. Jones, M. P. Cava, *ibid.* **1989**, *54*, 5985–5988; J. H. Tidwell, S. L. Buchwald, *ibid.* **1992**, *57*, 6380–6382; L. F. Tietze, T. Grote, *Chem. Ber.* **1993**, *126*, 2733–2737; T. Sakamoto, Y. Kondo, M. Uchiyama, H. Yamanaka, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 1941–1942; Y. Wang, R. Gupta, L. Huang, J. W. Lown, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 4172–4182; Y. Wang, J. W. Lown, *J. Heterocycl. Chem.* **1993**, *36*, 1399–1410.
- [146] T. A. Bryson, G. A. Roth, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 2167–2170.
- [147] S. Rajeswari, A. A. Adesomoku, M. P. Cava, *Heterocycles* **1989**, *26*, 557–564.
- [148] D. L. Boger, T. J. Jenkins, *J. Am. Chem. Soc.*, eingereicht.
- [149] D. L. Boger, R. M. Garbaccio, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [150] R. C. Kelly, I. Gebhard, N. Wicnienski, P. A. Aristoff, P. D. Johnson, D. G. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6837–6838; W. Wierenga, *ibid.* **1981**, *103*, 5621–5623.
- [151] P. Magnus, T. Gallagher, J. Schultz, Y.-S. Or, T. P. Ananthanarayan, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2706–2711.
- [152] R. E. Bolton, C. J. Moody, M. Pass, C. W. Rees, G. Tojo, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1988**, 2491–2499.
- [153] Y. Fukuda, Y. Itoh, K. Nakatani, S. Terashima, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 2793–2808, 2809–2820.
- [154] D. Boger, T. Nishi, J. A. McKie, T. Ogiku, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2301–2302.
- [155] D. L. Boger, K. Machiya, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10056–10058.
- [156] D. L. Boger, K. Machiya, D. L. Hertzog, P. A. Kitos, D. Holmes, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9025–9036; Übersicht: D. L. Boger in *Advances in Nitrogen Heterocycles, Vol. 1* (Hrsg.: C. J. Moody), JAI, Greenwich, CT, **1995**, S. 229–247.
- [157] H. Muratake, I. Abe, M. Natsume, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2573–2576; *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 67–79; H. Muratake, N. Matsumura, M. Notsume, *ibid.* **1995**, *43*, 1064–1066.
- [158] W. Wierenga, B. K. Bhuyan, R. C. Kelly, W. C. Krueger, L. H. Li, J. P. McGovren, D. H. Swenson, M. A. Warpehoski, *Adv. Enzyme Regul.* **1986**, *25*, 141–155.
- [159] M. A. Warpehoski, I. Gebhard, R. C. Kelly, W. C. Krueger, L. H. Li, J. P. McGovren, M. D. Prairie, N. Wicnienski, W. Wierenga, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 590–603.
- [160] M. A. Warpehoski, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4103–4106.
- [161] L. H. Li, T. L. Wallace, T. F. DeKoning, M. A. Warpehoski, R. C. Kelly, M. D. Prairie, W. C. Krueger, *Invest. New Drugs* **1987**, *5*, 329–337.
- [162] L. H. Li, R. C. Kelly, M. A. Warpehoski, J. P. McGovren, I. Gebhard, T. F. DeKoning, *Invest. New Drugs* **1991**, *9*, 137–148.
- [163] D. L. Boger, W. Yun, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5523–5524.
- [164] D. L. Boger, T. Nishi, B. R. Teegarden, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4943–4949.
- [165] M. A. Mitchell, K. L. Weiland, P. A. Aristoff, P. D. Johnson, T. P. Dooley, *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, *6*, 421–424.
- [166] D. L. Boger, W. Yun, N. Han, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1429–1453.
- [167] W. S. Wade, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 1574–1575.
- [168] J. W. Lown, *Chemtracts: Org. Chem.* **1993**, *6*, 205–237.
- [169] M. Lee, A. L. Rhodes, M. D. Wyatt, S. Forrow, J. A. Hartley, *Biochemistry* **1993**, *32*, 4237–4245.
- [170] D. L. Boger, W. Yun, H. Cai, N. Han, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 761–775.
- [171] B. K. Bhuyan, K. A. Newell, S. L. Crampton, D. D. Von Hoff, *Cancer Res.* **1982**, *42*, 3532–3537.
- [172] B. K. Bhuyan, S. L. Crampton, E. G. Adams, *Cancer Res.* **1983**, *43*, 4227–4232.
- [173] E. G. Adams, G. J. Badiner, B. K. Bhuyan, *Cancer Res.* **1988**, *48*, 109–116.
- [174] B. K. Bhuyan, K. S. Smith, E. G. Adams, G. L. Petzold, J. P. McGovren, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 5687–5692.
- [175] H. N. Nguyen, B.-U. Sevin, H. Averette, J. Perras, R. Ramos, D. Donato, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1992**, *118*, 515–522.
- [176] L. H. Hurley, D. Sun in *Perspectives in Medicinal Chemistry* (Hrsg.: B. Testa, E. Kyburg, W. Fuhrer, R. Giger), VCH, New York, **1993**, S. 299–313.
- [177] D. Sun, L. H. Hurley, *Anti Cancer Drug Des.* **1992**, *7*, 15–36.
- [178] D. Sun, L. H. Hurley, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1773–1782.
- [179] J. P. Maine, D. Sun, L. H. Hurley, T. Kodadek, *Biochemistry* **1992**, *31*, 3968–3975.
- [180] H. Naegeli, L. Bardwell, E. C. Friedberg, *Biochemistry* **1993**, *32*, 613–621.
- [181] P. Houston, T. Kodadek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 5471–5474.
- [182] D. Sun, L. H. Hurley, *Biochemistry* **1992**, *31*, 2822–2829.
- [183] D. R. Needham-VanDevanter, L. H. Hurley, *Biochemistry* **1986**, *25*, 8430–8436; L. H. Hurley, D. R. Needham-VanDevanter, C.-S. Lee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 6412–6416.
- [184] M. K. Jacobson, D. Twehous, L. H. Hurley, *Biochemistry* **1986**, *25*, 5929–5932.
- [185] M.-S. Tang, C.-S. Lee, R. Doisy, L. Ross, D. R. Needham-VanDevanter, L. H. Hurley, *Biochemistry* **1988**, *27*, 893–901.
- [186] C. P. Selby, A. Sancar, *Biochemistry* **1988**, *27*, 7184–7188.
- [187] M.-S. Tang, M. Qian, A. Pao, *Biochemistry* **1994**, *33*, 2726–2732.
- [188] P. R. Harbach, R. J. Trzos, J. H. Mazurek, D. M. Zimmer, G. L. Petzold, B. K. Bhuyan, *Mutagenesis* **1986**, *1*, 407–410.
- [189] P. R. Harbach, D. M. Zimmer, J. H. Mazurek, B. K. Bhuyan, *Cancer Res.* **1988**, *48*, 32–36.
- [190] T. J. Monroe, M. A. Mitchell, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 5690–5696.
- [191] L. Imperatori, G. Damia, P. Taverna, E. Garattini, L. Citti, L. Boldrini, M. D'Incalci, *Carcinogenesis* **1994**, *15*, 533–537.
- [192] B. C. Moy, G. L. Petzold, G. J. Badiner, R. C. Kelly, P. A. Aristoff, E. G. Adams, L. H. Li, B. K. Bhuyan, *Cancer Res.* **1990**, *50*, 2485–2492.
- [193] T. J. Zsido, T. A. Beerman, R. L. Meegan, J. M. Woynarowski, R. M. Baker, *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43*, 1817–1822.
- [194] B. K. Bhuyan, K. S. Smith, R. C. Kelly, E. G. Adams, I. Abraham, K. E. Sampson, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 1354–1359.
- [195] W. Wierenga, *Drugs Fut.* **1991**, *16*, 741–750.
- [196] R. D. Hightower, B.-U. Sevin, J. Perras, H. Nguyen, R. Angioli, M. Untch, H. Averette, *Cancer Invest.* **1993**, *11*, 276–282.
- [197] R. D. Hightower, B.-U. Sevin, J. P. Perras, M. Untch, R. Angioli, R. Ramos, H. Averette, *Gynecol. Oncol.* **1992**, *47*, 186–190.
- [198] S. Côté, R. L. Mompalmer, *Anti Cancer Drugs* **1993**, *4*, 327–333.
- [199] G. F. Fleming, M. J. Ratain, S. M. O'Brien, R. L. Schilsky, P. C. Hoffman, J. M. Richards, N. J. Vogelzang, D. A. Kasunic, R. H. Earhart, *J. Natl. Cancer Inst.* **1994**, *86*, 368–372.
- [200] L. H. Li, T. F. DeKoning, R. C. Kelly, W. C. Krueger, J. P. McGovren, G. E. Padbury, G. L. Petzold, T. L. Wallace, R. J. Ouding, M. D. Prairie, I. Gebhard, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 4904–4913.
- [201] D. L. Walker, J. M. Reid, M. M. Ames, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1994**, *34*, 317–322.
- [202] K. Gomi, E. Kobayashi, K. Miyoshi, T. Ashizawa, A. Okamoto, T. Ogawa, S. Katsumata, A. Mihara, M. Okabe, T. Hirata, *Jpn. J. Cancer Res.* **1992**, *83*, 113–120.
- [203] A. Okamoto, M. Okabe, K. Gomi, *Jpn. J. Cancer Res.* **1993**, *84*, 93–98.
- [204] E. Kobayashi, A. Okamoto, M. Asada, M. Okabe, S. Nagamura, A. Asai, H. Saito, K. Gomi, T. Hirata, *Cancer Res.* **1994**, *54*, 2404–2410.
- [205] H. Ogasawara, K. Nishio, Y. Takeda, T. Ohmori, N. Kubota, Y. Funayama, T. Ohira, Y. Kuraishi, Y. Isogai, N. Saijo, *Jpn. J. Cancer Res.* **1994**, *85*, 418–425.
- [206] R. V. J. Chari, K. A. Jackel, L. A. Bourret, S. J. Derr, B. M. Tadayoni, K. M. Mattocks, S. A. Shah, C. Liu, W. A. Blattler, V. S. Goldmacher, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 4079–4085.