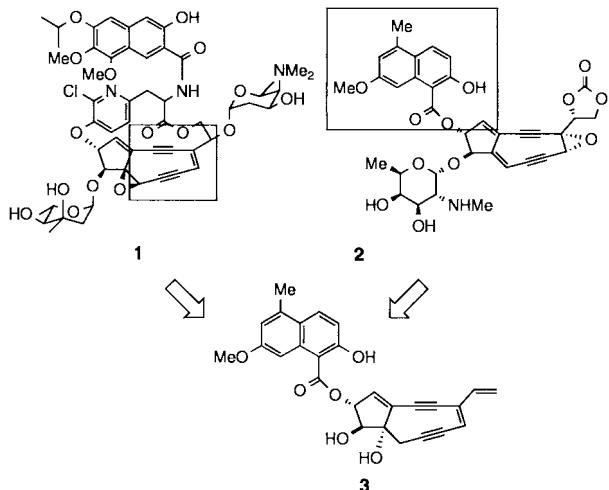


Synthese eines neungliedrigen, maskierten Endiin-Analogons mit DNA-intercalierender und DNA-spaltender Aktivität**

Takashi Takahashi,* Hiroshi Tanaka, Haruo Yamada, Takuyuki Matsumoto und Yukio Sugiura

Kedarcidin (KD)^[1] und Neocarzinostatin (NCS)^[2] gehören zu einer neuen Klasse hochwirksamer Antitumor-Chromoproteine, deren biologische Wirkung auf der DNA-spaltenden Aktivität ihrer labilen Neunring-Chromophore KD-Chr **1** und NCS-Chr **2** durch Bildung intermedierer Diradikale beruht. Wir haben über einen einfachen Zugang zu neungliedrigen, maskierten Endiinen als Analoga von **1**^[3] und **2**^[4] durch transanulare [2,3]-Wittig-Umlagerung berichtet. Außerdem gibt es eine Reihe von Versuchen, die DNA-Spaltungsaktivität dadurch zu verbessern, daß in Hybridmolekülen eine DNA-spaltende und eine DNA-bindende Gruppe zusammengeführt werden.^[5] Die Basen-^[6] und die Sequenzspezifität^[7] bei der DNA-Spaltung durch **2** wurden auf die spezifische Intercalation des Naphthoësäurerestes zurückgeführt. Bei der Cycloaromatisierung von NCS-Chr sollte allerdings durch die intramolekulare 1,5-Wasserstoffatomübertragung die Effizienz der Doppelstrangspaltung vermindert werden, indem eines der Diradikal-Intermediate abgefangen wird.^[8] So sollte durch Kombination der neungliedrigen Endiineinheit von KD-Chr mit der DNA-intercalierenden Gruppe von NCS-Chr eine neue, künstliche DNA-spaltende Verbindung entstehen, die hohe Spaltungsaktivität mit Basen- und Sequenzspezifität verbindet. Hier berichten wir über die Synthese und die DNA-spaltende Aktivität der Hybridverbindung **3**, die einen DNA-spaltenden Rest wie den in KD-Chr und die intercalierende Gruppe von NCS-Chr enthält (Schema 1). Das maskierte Endiin-Analogon **7** wurde als mögliche Vorstufe des KD-Chr-Analogons **3** entworfen. Phthalsäure dient als geeigneter „Trigger“, um die Stabilität von **7b** zu kon-



Schema 1. Entwurf des hybriden Endiin-Analogons **3**.

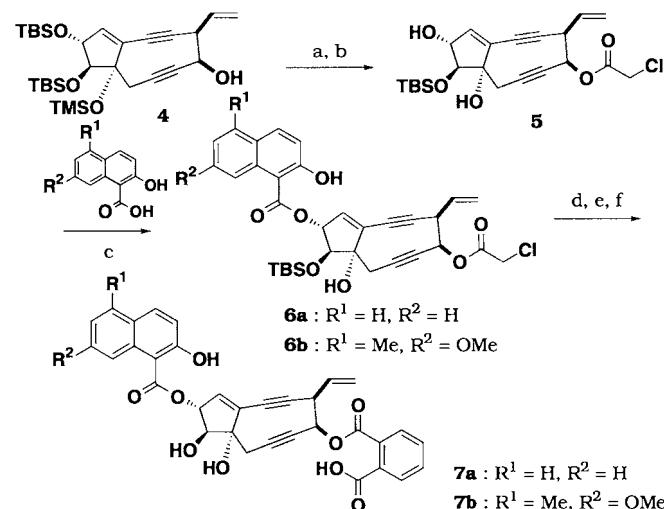
[*] Prof. Dr. T. Takahashi, H. Tanaka, Dr. H. Yamada
Department of Chemical Engineering, Tokyo Institute of Technology
Meguro, Tokyo 152 (Japan)
Telefax: Int. + 3/5734-2884

T. Matsumoto, Prof. Dr. Y. Sugiura
Institute for Chemical Research, Kyoto University
Uji, Kyoto 611 (Japan)

[**] Diese Arbeit wurde vom japanischen Ministerium für Erziehung, Wissenschaft und Kultur gefördert (Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Area, Nr. 06240104).

trollieren und das neungliedrige Endiin **3** freizusetzen. Aus diesem entsteht dann im Verlauf der DNA-Spaltung das aktive Diradikal.^[9]

Die beiden neungliedrigen, maskierten Endiine **7a** und **7b** wurden aus dem Diin **4** in sechs Stufen synthetisiert (Schema 2). Dazu wurde der Propargylalkohol durch Veresterung



Schema 2. Synthese von **7a** und **7b**. a) Chloracetylchlorid, Pyridin, CH_2Cl_2 ; b) wäbr. HF/Acetonitril (5/95), 0°C , 76% bezogen auf **4**; c) 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid, CH_2Cl_2 , 78%; d) wäbr. NH_3 , MeOH , 0°C ; e) Phthalsäureanhydrid, Pyridin, DMAP, CH_2Cl_2 ; f) wäbr. HF/Acetonitril (5/95), Raumtemperatur, **7a**: 16% bezogen auf **6a**; **7b**: 24% bezogen auf **5**.

mit Chloracetylchlorid bei 0°C geschützt. Die selektive Abspaltung der Trimethylsilyl(TMS)-Gruppe und der *tert*-Butyldimethylsilyl(TBS)-Gruppe von der tertiären OH-Gruppe mit wäßrigem HF in Acetonitril führte zum Diol **5** in 76% Gesamtausbeute. Zunächst wurde die Modellverbindung **7a** synthetisiert. Das Diol **5** wurde dazu mit 2-Hydroxy-1-naphthoësäure und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid zum Ester **6a** in 78% Ausbeute umgesetzt. Durch selektive Abspaltung der Chloracetylgruppe mit wäßrigem NH_3 in Methanol und Reaktion des entstehenden Alkohols mit Phthalsäureanhydrid in Gegenwart von 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) entstand der Diester. Die Abspaltung der TBS-Gruppe mit wäßrigem HF in Acetonitril lieferte das gewünschte Hybridanalagon **7a**^[10] in 16% Ausbeute bezogen auf **6a**. Das NCS-KD-Hybrid **7b** wurde analog hergestellt. Mit 2-Hydroxy-7-methoxy-5-methylnaphthoësäure (hergestellt aus 5-Methyl-1,3-cyclohexadien nach Hirama^[11]) wurde **5** zum Naphthoat **6b** umgesetzt, aus dem **7b**^[12] in 24% Ausbeute bezogen auf **5** erhalten wurde.

Die DNA-Spaltungsaktivität der Hybride **7a**, **7b** und **8** (das Triol ohne den Naphthoësäurerest)^[9] wurde unter den in Abbildung 1 gezeigten Bedingungen untersucht. Superhelicale pBR322-DNA wurde mit **7a** und **7b** in unterschiedlichen Konzentrationen (10–100 μM) in 10proz. Methanol in 20 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan(Tris)-HCl-Puffer (pH 7.5) bei 37°C 18 h ohne ein Thiol inkubiert. In Abbildung 2 ist das Agarose-Gelelektrophoresemuster der DNA gezeigt, die mit **7a** gespalten wurde. Aus den Versuchsergebnissen läßt sich eindeutig schließen, daß durch die Einführung einer DNA-intercalierenden Gruppe (wie Naphthoësäure) die DNA-spaltende Aktivität der Verbindungen **7a** und **7b** gegenüber dem Triol **8** etwa auf das Zehnfache gesteigert werden konnte. **7a** und **7b** verursachten Doppelstrangspaltungen (Form III: lineare DNA) selbst bei 10 bzw. 20 μM . Die DNA-spaltende Aktivität der

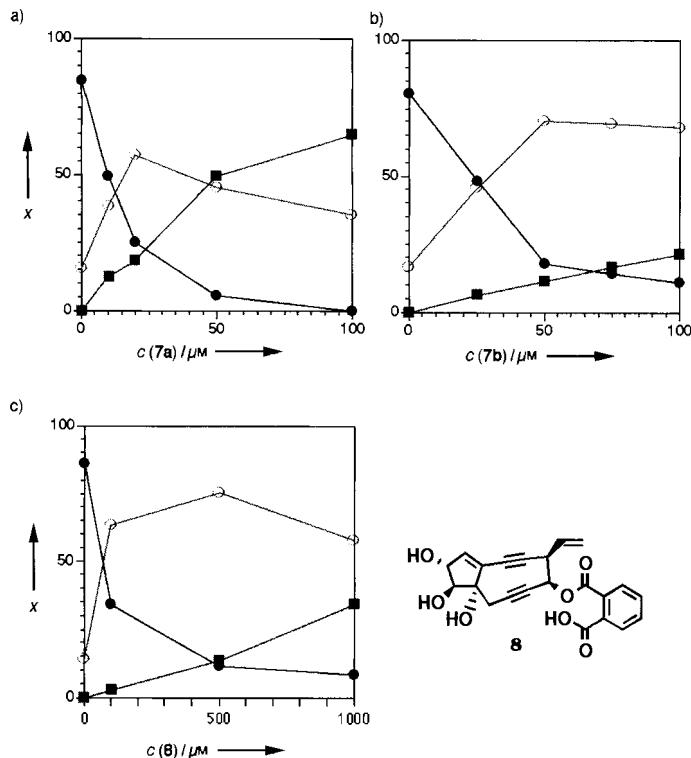


Abb. 1. Prozentuale Anteile x der topologischen Formen von pBR322-DNA der Formen I (Superhelix (●)), II (ringförmige DNA mit gebrochenem Einzelstrang (○)) und III (lineare DNA (■)) nach Behandlung mit 7a, 7b und 8 (a–c) in unterschiedlichen Konzentrationen. Reaktionsbedingungen: 10proz. MeOH, 20 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7.5), 37°C.

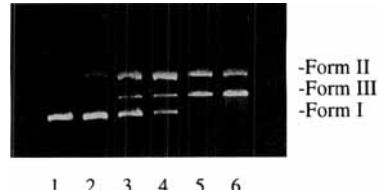


Abb. 2. Konzentrationsabhängigkeit der DNA-spaltenden Aktivität von 7a: Bandenmuster einer Agarosegelektrophorese der gespaltenen DNA. Spur 1: intakte DNA; Spur 2: Kontrolle; Spur 3–6: DNA nach Spaltung mit 10, 20, 50 bzw. 100 μM 7a.

Hybride 7a und 7b liegt erheblich höher als die bekannter^[5] Endiin-Analoga. Untersuchungen zur DNA-Spaltung von 3'-markierten pBR 322-Fragmenten mit 7a und 7b ergaben jedoch keine Hinweise auf eine mögliche Sequenzspezifität.

Ein Modell des Hybrid-DNA-Komplexes wurde nach Schreiber^[13] mit dem Programm MacroModel^[14] erstellt. Das nach der Aktivierung entstehende Diradikal-Hybrid 9 wurde dabei manuell zwischen die Basen A4 und A5 eines zehn Basenpaare langen DNA-Doppelstranges (poly(dA-dT)) intercaliert. Die entstehende Struktur wurde mit dem AMBER*(united atom)-Kraftfeld optimiert (Abb. 3). Danach kann das Hybrid-Analogon 3 wahrscheinlich die notwendige Konformation einnehmen, um die Doppelstrangspaltung der DNA zu erleichtern. Das C3-Radikal nähert sich dem C4'-Wasserstoffatom von A6 bis auf 3.1 Å, und das C6-Radikal ist vom C4'-Wasserstoffatom von T4 nur 3.8 Å entfernt.

Uns ist also der Entwurf und die Synthese neungliedriger KD-Analoga mit Naphthoësäureresten als intercalierenden Gruppen gelungen. Die biologischen Eigenschaften dieser Analoga machen sie zur Leitstruktur für die weitere Entwicklung

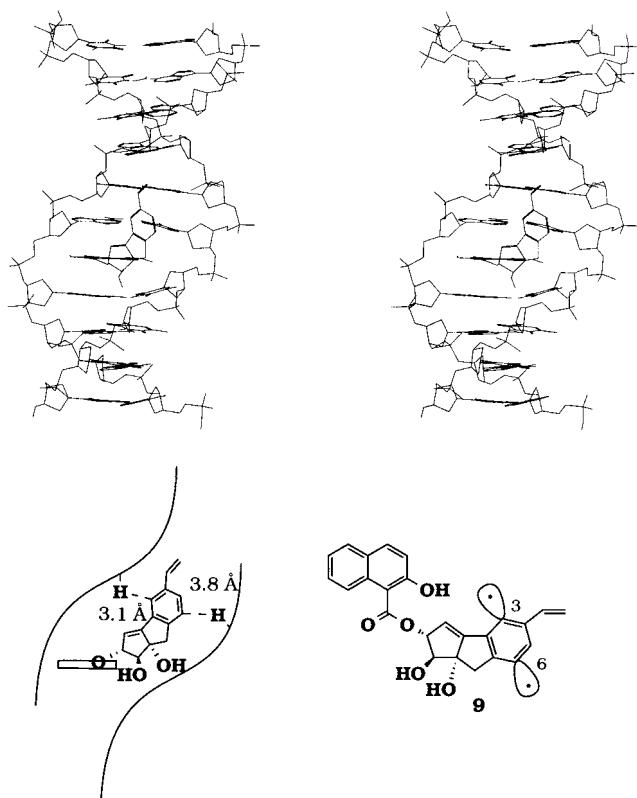


Abb. 3. Oben: Durch Kraftfeldrechnungen erhaltene Stereodarstellung des Komplexes aus der Diradikal-Hybridverbindung 9 und der DNA. Unten: Schematische Darstellung von 9 zwischen den DNA-Strängen (der Naphthoësäurerest ist hier als Rechteck dargestellt) und die Struktur von 9.

DNA-spaltender Verbindungen. Die Einführung einer DNA-Erkennungsstelle zur Verbesserung der Basen- und Sequenzspezifität der Verbindungen wird gegenwärtig untersucht.

Eingegangen am 19. März 1997 [Z10048]

Stichworte: DNA-Spaltung · Endiine · Naphthoësäuren · Molecular Modeling

- [1] a) K. S. Lam, G. A. Hesler, D. R. Gustavson, A. R. Crosswell, J. M. Veitch, S. Forenza, K. Tomita, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 472–478; b) S. J. Hofstead, J. A. Matson, A. R. Malacko, H. Marquardt, *ibid.* **1992**, *45*, 1250–1254; c) J. E. Leet, D. R. Schroeder, S. J. Hofstead, J. Golik, K. L. Colson, S. Huang, S. E. Klohr, T. W. Doyle, J. A. Matson, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7946–7948; d) J. E. Leet, D. R. Schroeder, D. R. Langley, K. L. Colson, S. Huang, S. E. Klohr, M. S. Lee, J. Golik, S. J. Hofstead, T. W. Doyle, J. A. Matson, *ibid.* **1993**, *115*, 8432–8443; e) N. Zein, K. L. Colson, J. E. Leet, D. R. Schroeder, W. Solomon, T. W. Doyle, A. M. Casazza, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 2822–2826.
- [2] a) Y. Koide, F. Ishii, K. Hasuda, Y. Koyama, K. Edo, S. Katamine, F. Kitame, N. Ishida, *J. Antibiot.* **1980**, *33*, 342–346; b) M. A. Napaier, B. Holmquist, D. J. Strydom, I. H. Goldberg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1979**, *89*, 635–642; c) K. Edo, M. Mizugaki, Y. Koide, H. Seto, K. Furihata, N. Otake, N. Ishida, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 331–334; d) A. G. Myers, *ibid.* **1987**, *28*, 4493–4496; e) A. G. Myers, P. J. Proteau, T. M. Handel, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7212–7214; f) A. G. Myers, P. J. Proteau, *ibid.* **1989**, *111*, 1146–1148.
- [3] T. Doi, T. Takahashi, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3465–3467.
- [4] T. Takahashi, H. Tanaka, Y. Hirai, T. Doi, H. Yamada, T. Shiraki, Y. Sugiura, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1719–1722; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1657–1659.
- [5] a) M. Hirama, T. Gomibuti, K. Fujiwara, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9851–9853; b) K. C. Nicolaou, E. P. Schreiner, Y. Iwabuchi, T. Suzuki, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 317–319; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 340–342; c) D. L. Boger, J. Zhou, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3018–3024; d) M. Tokuda, K. Fujiwara, T. Gomibuti, M. Hirama, M. Uesugi, Y. Sugiura, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 669–672; e) F. Semmelhack, J. J. Gallapher, W.-D. Ding, G. Krishnamurthy, R. Babine, G. A. Ellerstad, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4357–

- 4359; f) M. D. Wittman, J. F. Kandow, R. D. Langeley, D. M. Wyas, W. C. Rose, W. Solomon, N. Zein, *Biochem. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 1049–1052; g) K. Toshima, T. Ohta, A. Ohashi, T. Nakamura, M. Nakata, K. Tatsuta, S. Matsumura, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4822–4831; h) A. G. Myers, M. Hammond, Y. Wu, J.-N. Xiang, P. M. Harrington, E. Y. Kuo, *ibid.* **1996**, *118*, 10006–10007.
- [6] a) M. Takesita, L. S. Kappen, A. P. Grollman, M. Eisenberg, I. H. Goldberg, *Biochemistry* **1981**, *20*, 7599–7606; b) H. Sugiyama, H. Kawabata, T. Fujiwara, Y. Dannoue, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5252–5257; c) S. M. Meschwitz, I. H. Goldberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 3047–3051; d) B. L. Franc, L. Worth, Jr., D. F. Christner, J. W. Kozarich, J. Stubbe, L. S. Kappen, I. H. Goldberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2271–2275.
- [7] a) S. H. Lee, I. H. Goldberg, *Biochemistry* **1989**, *28*, 1019–1026; b) A. Galat, I. H. Goldberg, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 2093–2099; c) Übersichtsartikel über Neocarcinostatin: I. H. Goldberg, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 193–197.
- [8] a) P. A. Wender, M. J. Tebbe, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 1419–1434; b) K. Toshima, K. Yanagawa, K. Ohta, T. Kano, M. Nagatara, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 1573–1577; c) S. Kawata, T. Oishi, M. Hirama, *ibid.* **1994**, *35*, 4595–4599.
- [9] T. Takahashi, H. Tanaka, H. Yamada, T. Matsumoto, Y. Sugiura, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1946–1949; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1835–1837.
- [10] 7a: $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3): δ = 8.68 (d, 1 H, J = 8.9 Hz, Ph), 7.94 (d, 1 H, J = 8.9 Hz, Ph), 7.80–7.67 (m, 3 H, Ph), 7.61–7.52 (m, 3 H, Ph), 7.39 (ddd, 1 H, J = 6.9, 6.9, 1.3 Hz, Ph), 7.17 (d, 1 H, J = 8.9 Hz, Ph), 6.14 (d, 1 H, J = 2.0 Hz, C12-H), 5.74–5.62 (m, 1 H, C11-H), 5.53, (br. d, 1 H, J = 5.0 Hz, C5-H), 5.39 (ddd, 1 H, J = 16.8, 1.3, 1.3 Hz, Vinyl), 5.18 (ddd, 1 H, J = 9.9, 1.3, 1.3 Hz, Vinyl), 4.52 (d, 1 H, J = 3.6 Hz, C10-H), 4.07 (br. d, 1 H, J = 5.3, 5.0 Hz, C4-H), 3.00 (d, 1 H, J = 18.1 Hz, C8-H), 2.73 (dd, 1 H, J = 18.1, 1.0 Hz, C8-H); $^{13}\text{C-NMR}$ (67.8 MHz, CDCl_3): δ = 169.7, 167.3, 164.5, 137.5, 134.1, 132.1, 131.7, 131.6, 131.1, 130.8, 129.4, 129.1, 129.0, 128.6, 127.9, 125.1, 123.9, 119.8, 119.2, 104.1, 100.2, 98.6, 94.6, 86.8, 86.3, 83.8, 83.4, 69.5, 45.9, 27.7; IR (CHCl_3): $\tilde{\nu}$ = 3414, 2924, 2210, 1722, 1640, 1463, 1283, 1240, 1138, 947, 831 cm^{-1} ; FAB-MS: m/z : 563 [M^+ – H].
- [11] a) K. Takahashi, T. Suzuki, M. Hirama, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4603–4604; b) K. Takahashi, T. Tanaka, T. Suzuki, M. Hirama, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 1327–1340.
- [12] 7b: $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, CDCl_3): δ = 8.01 (br. d, 1 H, J = 8.9 Hz, Ph), 7.89 (d, 1 H, J = 2.3 Hz, Ph), 7.81–7.77 (m, 1 H, Ph), 7.67–7.64 (m, 1 H, Ph), 7.56 (ddd, 1 H, J = 7.6, 7.6, 1.7 Hz, Ph), 7.51 (ddd, 1 H, J = 7.6, 7.6, 1.7 Hz, Ph), 7.00 (d, 1 H, J = 8.9 Hz, Ph), 6.86 (br. d, 1 H, J = 2.3 Hz, Ph), 6.08 (d, 1 H, J = 2.3 Hz, C12-H), 5.68 (dd, 1 H, J = 3.6, 2.3 Hz, C11-H), 5.67 (ddd, 1 H, J = 16.8, 9.9, 5.9 Hz, Vinyl), 5.53 (br. d, 1 H, J = 5.3 Hz, C5-H), 5.39 (br. d, 1 H, J = 16.8 Hz, Vinyl), 5.18 (br. d, 1 H, J = 9.9 Hz, Vinyl), 4.52 (d, 1 H, J = 3.6 Hz, C10-H), 4.40 (br. dd, 1 H, J = 5.9, 5.3 Hz, C4-H), 3.84 (s, 1 H, OMe), 2.98 (br. d, 1 H, J = 17.8 Hz, C8-H), 2.72 (dd, 1 H, J = 17.8, 1.3 Hz, C8-H), 2.56 (s, 1 H, Me); $^{13}\text{C-NMR}$ (67.8 MHz, CDCl_3): δ = 172.1, 169.2, 167.2, 164.0, 159.5, 136.9, 134.6, 134.0, 133.0, 132.2, 131.8, 131.2, 130.6, 130.1, 129.4, 129.2, 127.9, 123.1, 119.8, 116.6, 115.8, 104.3, 103.8, 100.4, 94.8, 87.1, 86.0, 83.7, 83.6, 83.3, 69.5, 55.2, 46.1, 27.4, 20.0; IR (CDCl_3): $\tilde{\nu}$ = 3410, 2924, 1724, 1634, 1614, 1464, 1412, 1376, 1283, 1174, 1150, 1119, 991, 955 cm^{-1} ; FAB-MS: m/z : 607 [M^+ – H], 631 [M^+ + Na].
- [13] D. Elbaum, S. L. Schreiber, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 309–314.
- [14] F. Mohamadi, N. G. J. Richards, W. C. Guida, R. Liskamp, M. Lipton, C. Caufield, G. Chang, T. Hendrickson, W. C. Still, *J. Comput. Chem.* **1990**, *11*, 440–467.

Imidazol-2-yliden: Herstellung des Carbens und seines Dikations durch Neutralisations-Reionisations- und „Charge-stripping“-Massenspektrometrie**

Graham A. McGibbon, Christoph Heinemann, David J. Lavorato und Helmut Schwarz*

Professor Zvi Rappoport zum 60. Geburtstag gewidmet

Zahlreiche einfache Moleküle wurden häufig und sorgfältig quantenchemisch untersucht und scheinen uns daher vertraut, obgleich sie bis heute nicht experimentell nachweisbar sind. Eines der bekanntesten Beispiele ist $\text{O}=\text{C}=\text{C}=\text{O}$.^[1] Ein aktuelles Beispiel ist Imidazol-2-yliden **1**, von dem sich eine Reihe von Verbindungen ableiten, die in Substanz stabil sind.^[2] Zwar werden Imidazolylidene seit mehr als drei Jahrzehnten untersucht,^[3] doch ist das theoretische Interesse an **1** erst kürzlich gestiegen.^[4] Während sich rechnerische Untersuchungen auf **1** konzentriert haben, sind bis heute sämtliche in der kondensierten Phase nachgewiesenen Aminocarbene^[2, 4d–f, 5] und ähnliche Verbindungen^[4d, 6] an den Stickstoffatomen substituiert. Unsubstituierte Aminocarbene wurden bisher nur in der Gasphase festgestellt,^[7] so wurden die acyclischen Carbene $(\text{H}_2\text{N})_2\text{C}$: und $\text{H}_2\text{N}(\text{HO})\text{C}$: sowie die heterocyclischen Tautomere von Oxazol, Pyridin und Thiazol mit der Neutralisations-Reionisations-Massenspektrometrie (NRMS) hergestellt und charakterisiert.^[8] Da die Experimente durchweg in der hochverdünnten Gasphase durchgeführt werden, bietet sich diese Technik idealerweise zur Identifizierung jener Verbindungen an, die zwar einer intermolekularen Isomerisierung, nicht aber unimolekularen Umlagerungen unterliegen. Dieser Ansatz sollte einen Weg zu **1** und Imidazol-4-yliden **2** bereiten; beide sind durch eine 1,2-Wasserstoffwanderung mit Imidazol **3** verknüpft. Gemäß früherer Rechnungen sollte eine substantielle Barriere sowohl für die Tautomerisierung von **1** zu **3** als auch für die Umlagerung der entsprechenden Radikalkationen vorliegen.^[4h, 9] Ebenso leitet sich aus unseren hybriden Hartree-Fock/Dichtefunktionaltheorie-Rechnungen (Becke3LYP/631G**)^[10] eine Barriere von 36 kcal mol^{-1} für die exotherme (50 kcal mol^{-1}) Isomerisierung **2** \rightarrow **3** ab, und die offenbar isoenergetischen Ionen **2** $^{+}$ und **3** $^{+}$ werden durch eine Barriere von 56 kcal mol^{-1} getrennt.^[11] Aus diesen Daten kann geschlossen werden, daß **1** und **2** möglicherweise mit NRMS hergestellt und charakterisiert werden können, vorausgesetzt, es sind geeignete Vorläufer verfügbar (Schema 1).

[*] Prof. Dr. H. Schwarz, Dr. G. A. McGibbon,^[+]
Dr. C. Heinemann^[+]

Institut für Organische Chemie der Technischen Universität
Straße des 17. Juni 135, D-10623 Berlin
Telefax: Int. + 30/314-21102

Dr. D. J. Lavorato
Department of Chemistry, McMaster University
1228 Main St. W.
Hamilton, ON, L8S 4M1 (Kanada)

[+] Neue Adresse: Barringer Research Ltd.
1730 Aimco Boulevard
Mississauga, ON, L4W 1V1 (Kanada)

[**] Neue Adresse: Hoechst AG
D-65926 Frankfurt am Main

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. G. A. M. dankt der NSERC, Kanada, für ein Postdoktorandenstipendium und dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für ein Forschungsstipendium. Prof. J. K. Terlouw (McMaster University) und Dr. D. Schröder (TUB) danken wir für die technische Unterstützung.