

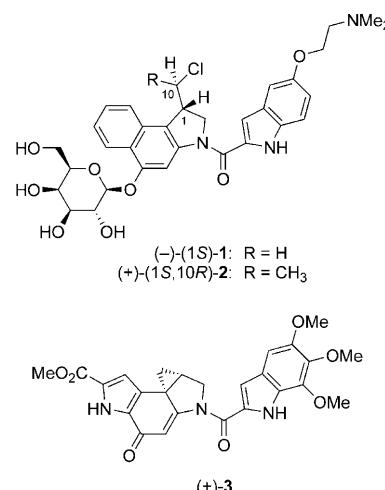
Glycosidische Prodrugs hochpotenter difunktioneller Duocarmycin-Derivate für eine selektive Tumortherapie**

Lutz F. Tietze,* J. Marian von Hof, Michael Müller, Birgit Krewer und Ingrid Schuberth

Professor Horst Kunz zum 70. Geburtstag gewidmet

Die Entwicklung selektiver Chemotherapeutika zur Krebsbehandlung ist ein wichtiges aktuelles Gebiet der medizinischen Forschung. Ein Ansatz zur Reduktion der häufig Dosislimitierenden Nebenwirkungen der verfügbaren Zytostatika ist die Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy (ADEPT),^[1,2] bei der in einem binären Ansatz ein Konjugat aus einem tumorspezifischen Antikörper und einem Enzym in Kombination mit einem wenig toxischen Prodrug eingesetzt wird. Durch das Enzym im Konjugat wird das Prodrug selektiv im Tumorgewebe unter Bildung einer stark zytotoxischen Verbindung gespalten. Die Vorteile des ADEPT-Ansatzes gegenüber der Verwendung von Konjugaten aus Antikörpern und Toxinen bestehen in der weit besseren Eindiffusion der gebildeten niedermolekularen Wirkstoffe in den malignen Tumor, der Abtötung auch solcher Krebszellen, an die der Antikörper nicht bindet, und dem enzymatischen Ansatz, der mit einer vergleichsweise geringen Menge des Antikörpers auskommt. Ein Problem der bisherigen für ADEPT entwickelten Prodrugs war, dass ihre Toxizität häufig nur unwesentlich geringer war als jene der daraus gebildeten Wirkstoffe (QIC_{50} -Wert; $QIC_{50} = IC_{50}$ des Prodrugs/ IC_{50} des Prodrugs in Gegenwart des Enzyms). Darüber hinaus war oft die Wirksamkeit des gebildeten Wirkstoffs nicht ausreichend. Wir haben daher als Minimalanforderungen einen QIC_{50} -Wert von > 1000 und einen IC_{50} -Wert des gebildeten Wirkstoffs von < 10 nm vorgeschlagen.^[3]

Kürzlich ist uns mit den Verbindungen $(-)-(1S)\text{-1}$ und $(+)-(1S,10R)\text{-2}$ ausgehend von Secoanaloga des natürlichen zytostatischen Antibiotikums Duocarmycin SA ((+)-3,^[4] Schema 1) die Entwicklung von Prodrugs gelungen, die mit QIC_{50} -Werten von 3500 bzw. 4800 und IC_{50} -Werten der ge-



Schema 1. Glycosidische Prodrugs $(-)-(1S)\text{-1}$ und $(+)-(1S,10R)\text{-2}$, abgeleitet von dem natürlichen zytostatischen Antibiotikum Duocarmycin SA ((+)-3).

bildeten Wirkstoffe von 16 bzw. 750 pm den genannten Vorgaben bisher am besten gerecht wurden.^[5,6]

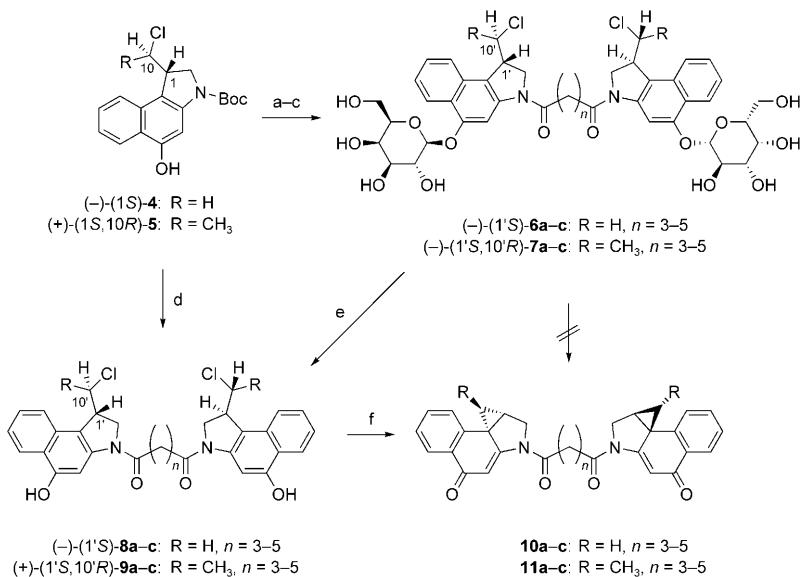
Hier beschreiben wir neue Prodrugs und die daraus gebildeten Wirkstoffe, die mit QIC_{50} -Werten von bis nahezu 1 000 000 und IC_{50} -Werten der gebildeten Wirkstoffe von bis zu etwa 100 fm alle bisherigen Ergebnisse weit in den Schatten stellen.^[3,5–7] Die neuen Verbindungen enthalten die gleichen Pharmakophore wie $(-)-(1S)\text{-1}$ und $(+)-(1S,10R)\text{-2}$, von denen hier allerdings jeweils zwei über eine Dicarbonsäure miteinander verknüpft sind. Die Länge der verwendeten Dicarbonsäure hat dabei einen erheblichen Einfluss auf die biologische Aktivität der Prodrugs und der daraus gebildeten Wirkstoffe.^[8]

Die Herstellung der neuen Glycoside $(-)-(1'S)\text{-6a–c}$ ($n = 3\text{–}5$) und $(-)-(1'S,10'R)\text{-7a–c}$ ($n = 3\text{–}5$) erfolgte ausgehend von den enantiomerenreinen *N*-Boc-geschützten Secoverbindungen $(-)-(1S)\text{-4}$ ^[6,9] bzw. $(+)-(1S,10R)\text{-5}$ ^[5,10] durch Glycosidierung nach der Trichloracetimidat-Methode,^[11] anschließende $BF_3\text{-OEt}_2$ -vermittelte *tert*-Butyloxycarbonyl-(Boc)-Entschützung und Kupplung der gebildeten sekundären Amine mit den entsprechenden Dicarbonsäurechloriden (Schema 2). Solvolytische Abspaltung der Acetylshutzgruppen nach Zemplén und Pacsu lieferte schließlich die Galactoside $(-)-(1'S)\text{-6a–c}$ ($n = 3\text{–}5$) und $(-)-(1'S,10'R)\text{-7a–c}$ ($n = 3\text{–}5$) in Ausbeuten von 27–55 % über drei Stufen.^[12] Die entsprechenden Secodrugs $(-)-(1'S)\text{-8a,c}$ ($n = 3$ und 5) und $(+)-(1'S,10'R)\text{-9a–c}$ ($n = 3\text{–}5$) wurden aus $(-)-(1S)\text{-4}$ bzw.

[*] Prof. Dr. L. F. Tietze, Dr. J. M. von Hof, Dipl.-Chem. M. Müller, Dr. B. Krewer, Dr. I. Schuberth
Institut für Organische und Biomolekulare Chemie
Georg-August-Universität Göttingen
Tammannstraße 2, 37077 Göttingen (Deutschland)
Fax: (+49) 551-39-9476
E-Mail: ltietze@gwdg.de

[**] Die Untersuchungen wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. B.K. dankt der Deutsche Telekom Stiftung für ein Promotionsstipendium. Dr. Felix Major wird für die Synthese einer Vorstufe von $(-)-(1S)\text{-4}$ und $(+)-(1S,10R)\text{-5}$ sowie Dr. Holm Frauendorf für die Unterstützung bei der Durchführung der ESI-FTICR-MS-Experimente gedankt.

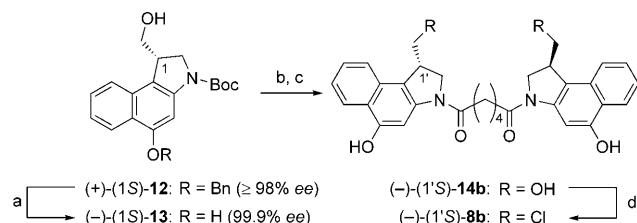
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201002502> zu finden.



Schema 2. Synthese der Prodrugs (a–c) und Secodrugs (d; nicht für $(-)-(1'S)-8\text{b}$) sowie enzymatische Aktivierung der Prodrugs zu den Wirkstoffen (e, f): a) α -Trichloracetimidat der D-Galactose, $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ (0.5 Äquiv.), CH_2Cl_2 , MS (4\AA), -10°C , 3.5 h, dann $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ (3.0 Äquiv.), RT, 5.5 h; b) $\text{ClCO}(\text{CH}_2)_n\text{COCl}$ ($n = 3-5$), NEt_3 , DMF, RT, 20 h, danach präparative HPLC: Kromasil 100 C18 ($250 \times 20\text{ mm}$, 7 μm), A = H_2O , B = MeOH, Gradient (A/B) = 30:70 → 0:100 in 6.5 min; c) NaOMe/MeOH , RT, 2 h, dann präparative HPLC: Kromasil 100 C18 ($250 \times 20\text{ mm}$, 7 μm), A = H_2O , B = MeOH, Gradient(A/B) = 70:30 → 0:100 in 15 min; d) 4 N HCl/EtOAc , RT, 3 h, dann $\text{ClCO}(\text{CH}_2)_n\text{COCl}$ ($n = 3-5$), Pyridin, DMF, RT, 20 h, dann präparative HPLC: Kromasil 100 C18 ($250 \times 20\text{ mm}$, 7 μm), A = H_2O , B = MeOH, Gradient(A/B) = 30:70 → 0:100 in 6.5 min; e) Glycosidspaltung der Prodrugs zu den Secodrugs durch β -D-Galactosidase; f) In-situ-Winstein-Cyclisierung der Secodrugs zu den Wirkstoffen unter physiologischen Bedingungen. DMF = *N,N*-Dimethylformamid.

$(+)-(1S,10R)-5$ durch Abspaltung der Boc-Schutzgruppe und Umsetzung mit den entsprechenden Dicarbonsäurechloriden in 65–80 % Ausbeute erhalten. Die Herstellung des Secodrugs $(-)-(1'S)-8\text{b}$ ($n = 4$) gelang auf diesem Weg überraschenderweise weder in akzeptablen Ausbeuten noch in Reinform.

Für $(-)-(1'S)-8\text{b}$ wurde daher eine alternative Syntheseroute ausgehend von $(+)-(1S)-12$,^[6,13] einer Vorstufe von $(-)-(1S)-4$, entwickelt (Schema 3). Zunächst erfolgte in einer Transferhydrierung die Abspaltung der Benzylgruppe unter Bildung des Diols $(-)-(1S)-13$,^[13] das nach Abspalten der Boc-Schutzgruppe mit Adipoylsäurechlorid gekuppelt wurde.



Schema 3. Alternative Syntheseroute zu $(-)-(1'S)-8\text{b}$: a) $\text{Pd/C}/\text{NH}_4\text{HCO}_3$, THF, RT, 4.5 h, dann Kristallisation aus *n*-Hexan/EtOAc, 61%; b) 4 N HCl/EtOAc , RT, 100 min, dann $\text{ClCO}(\text{CH}_2)_4\text{COCl}$, Pyridin, DMF, RT, 19 h; c) NaOMe/MeOH , DMF, RT, 4 h, 65 % über zwei Stufen; d) PPh_3 -Harz, DMF/CCl_4 (10:1), RT, 7.5 h, dann Kristallisation aus $\text{DMF}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 19 %. $\text{Bn} = \text{Benzyl}$.

Dabei wurde ein Gemisch aus $(-)-(1'S)-14\text{b}$ und unterschiedlich acylierten Produkten erhalten, das jedoch durch Solvolyse in Gegenwart katalytischer Mengen NaOMe in MeOH vollständig in das gewünschte Diamid $(-)-(1'S)-14\text{b}$ überführt werden konnte. Im letzten Schritt wurde durch eine Appel-Reaktion aus $(-)-(1'S)-14\text{b}$ das gewünschte Chlorid $(-)-(1'S)-8\text{b}$ gebildet, das durch anschließende Kristallisation (*N,N*-Dimethylformamid/Dichlormethan) in reiner Form in einer Gesamtausbeute von 8 % über vier Stufen ausgehend von $(+)-(1S)-12$ erhalten wurde.

Die Bestimmung der In-vitro-Zytotoxizität der neuen Verbindungen erfolgte durch einen an den HTCTFA(Human Tumor Colony Forming Ability)-Test angelehnten Klonogenitätstest an humanen Bronchialkarzinomzellen der Linie A549, der die Proliferationsfähigkeit einzelner Zellen widerspiegelt. Die Untersuchungen (Tabelle 1) lieferten für die Prodrugs $(-)-(1'S)-6\text{a-c}$ und $(-)-(1S,10'R)-7\text{a-c}$ in Gegenwart von β -D-Galactosidase praktisch identische Zytotoxizitäten wie für die entsprechenden Secodrugs $(-)-(1'S)-8\text{a-c}$ und $(+)-(1S,10'R)-9\text{a-c}$. Die damit nachgewiesene reversible Detoxifizierung bildet die Grundvoraussetzung für einen Einsatz im Rahmen des ADEPT-Konzepts. In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen zeigten die Secodrugs, welche die pharmakophore *anti*-Methylseco-CBI-Einheit enthalten $((+)-(1'S,10'R)-9\text{a-c})$, eine weniger ausgeprägte Zytotoxizität

als die analogen Verbindungen, die über eine Seco-CBI-Einheit verfügen $((-)-(1'S)-8\text{a-c})$.^[5,6] Zudem nimmt die Zytotoxizität der Secodrugs innerhalb dieser zwei homologen Reihen jeweils in der Reihenfolge $n = 3 > 5 > 4$ ab. Hervorzuheben ist das Prodrug $(-)-(1'S)-6\text{a}$ ($n = 3$), das einen QIC_{50} -Wert von 970 000 und in Gegenwart von β -D-Galactosidase eine zytotoxische Aktivität im femtomolaren Bereich ($\text{IC}_{50} = 0.15 \text{ pm}$) aufweist.

Die Secodrugs werden unter physiologischen Bedingungen *in situ* in die entsprechenden Wirkstoffe **10a–c** und **11a–c** (Schema 2) mit einer Spirocyclopropyl-Gruppe wie in $(+)-(1S)-3$ überführt. Wir hatten durch Massenspektrometrie an Oligonukleotiden und CD-Spektroskopie an lebenden Zellen unter Verwendung der aus $(-)-(1S)-1$ und $(+)-(1S,10R)-2$ generierten Secodrugs sowie verwandter Verbindungen zeigen können, dass sich die resultierenden Wirkstoffe sehr schnell in die kleine Furche der DNA einlagern und anschließend langsamer sequenzspezifisch einen Adeninrest alkylieren.^[14] Die zytotoxische Aktivität von den aus $(-)-(1S)-1$ und $(+)-(1S,10R)-2$ freigesetzten Wirkstoffen ist daher vermutlich auf eine Stabilisierung des Doppelstranges der DNA zurückzuführen, wobei die Alkylierung eine Fixierung der Moleküle in der kleinen Furche bewirkt. Für die vergleichsweise hohe Zytotoxizität der neuen Secodrugs $(-)-(1'S)-8\text{a-c}$ und $(+)-(1S,10'R)-9\text{a-c}$ sowie von anderen vergleichbaren difunktionellen Wirkstoffen und Hybridestruktu-

Tabelle 1: Gesamtausbeuten und Ergebnisse des HTCFA-Assays zur Untersuchung der Zytotoxizität der neuen Prodrugs und Secodrugs gegenüber humanen Bronchialkarzinomzellen (A549).^[a]

Verbindung	R	n	Ausb. [%] ^[b]	β-D-Galactosidase ^[c]	IC ₅₀ [pM]	QIC ₅₀
(−)-(1'S)-6a	H	3	51	—	1.46×10^5	9.7×10^5
(−)-(1'S)-6a	H	3		+	0.15	
(−)-(1'S)-8a	H	3	76	—	0.11	
(−)-(1'S)-6b	H	4	44	—	1.29×10^5	2.2×10^4
(−)-(1'S)-6b	H	4		+	5.8	
(−)-(1'S)-8b	H	4	< 6 (^[d] 8)	—	9.0	
(−)-(1'S)-6c	H	5	55	—	1.80×10^5	1.4×10^5
(−)-(1'S)-6c	H	5		+	1.3	
(−)-(1'S)-8c	H	5	65	—	1.0	
(−)-(1'S,10'R)-7a	CH ₃	3	30	—	3.26×10^5	2.2×10^3
(−)-(1'S,10'R)-7a	CH ₃	3		+	1.5×10^2	
(+)-(1'S,10'R)-9a	CH ₃	3	80	—	1.6×10^2	
(−)-(1'S,10'R)-7b	CH ₃	4	27	—	5.3×10^6	1.9×10^3
(−)-(1'S,10'R)-7b	CH ₃	4		+	2.86×10^3	
(+)-(1'S,10'R)-9b	CH ₃	4	76	—	3.14×10^3	
(−)-(1'S,10'R)-7c	CH ₃	5	35	—	3.83×10^7	1.5×10^5
(−)-(1'S,10'R)-7c	CH ₃	5		+	2.6×10^2	
(+)-(1'S,10'R)-9c	CH ₃	5	79	—	1.7×10^2	

[a] Die Inkubation der Zellen (A549) mit den entsprechenden Substanzen erfolgte für 24 h bei 37°C; nach anschließender Kultivierung für 12 d wurde die relative Klonbildungsrate im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt. Die Experimente wurden als Replikate (mindestens drei) von Duplikaten durchgeführt. β-D-Galactosidase: *Escherichia coli*, 4 U mL⁻¹ [b] Jeweilige Gesamtausbeute bezogen auf (−)-(1S)-4 oder (+)-(1S,10R)-5. [c] Zugabe von β-D-Galactosidase. [d] Gesamtausbeute bezogen auf (+)-(1S)-12.

ren^[8,15–17] könnte dagegen die Bildung von DNA-Intra- oder DNA-Interstrangvernetzungen (Inter- oder Intrastrand Crosslinks, ICLs) ohne eine Einlagerung in die kleine Furche der DNA verantwortlich gemacht werden,^[18] da diese Substanzen keine DNA bindende Einheit für eine nichtkovalente Wechselwirkung mit der DNA wie Duocarmycin SA ((+)-3) und die aus (−)-(1S)-1 und (+)-(1S,10R)-2 generierten zytotoxischen Wirkstoffe aufweisen.

Zur Abschätzung der Reaktivität der neuen difunktionalen Secodrugs gegen doppelsträngige DNA sowie zur Untersuchung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen wurden daher die Verbindungen (−)-(1'S)-8a (n=3), (−)-(1'S)-8c (n=5) und (+)-(1'S,10'R)-9a–c (n=3–5) zusammen mit verschiedenen doppelsträngigen Oligodesoxynucleotiden in wässriger Lösung (1 % DMSO) 24 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit hochauflösender Elektrospray-Ionisation-Fourier-Transform-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie (ESI-FTICR-MS) analysiert.^[14] Die ESI-FTICR-MS-Experimente zeigten bei keiner der untersuchten Verbindungen eine signifikante Bildung von ICLs. Auch eine Analyse mithilfe von Circular dichroismus lieferte keinen Hinweis auf eine charakteristische Wechselwirkung der Wirkstoffe mit den Oligodesoxynucleotiden.^[14b] Es ist daher unwahrscheinlich, dass eine Alkylierung und Vernetzung von doppelsträngiger DNA für die hohe Zytotoxizität dieser neuen Verbindungen verantwortlich ist.

Die glycosidischen Prodrugs (−)-(1'S)-6a–c (n=3–5) und (−)-(1'S,10'R)-7a–c (n=3–5), die aus über Dicarbonsäuren miteinander verknüpften Secoanaloga der pharmakophoren Einheit von Duocarmycin SA ((+)-3) aufgebaut sind, eignen sich ausgezeichnet für den Einsatz im Rahmen des ADEPT-Konzeptes. Hervorzuheben ist dabei (−)-(1'S)-6a (n=3), das

mit einem QIC₅₀-Wert von nahezu 1 000 000 und einem IC₅₀-Wert des zugrunde liegenden Wirkstoffs von 0.11–0.15 pM alle bisher bekannten Verbindungen weit übertrifft. Beachtenswert ist weiter, dass die biologische Aktivität der Verbindungen mit großer Wahrscheinlichkeit nicht wie erwartet auf DNA-Intra- oder DNA-Interstrangvernetzungen zurückzuführen ist. Die Ursache der hohen Zytotoxizität ist vermutlich ein anderer, bisher nicht beschriebener Wirkmechanismus.

Eingegangen am 27. April 2010
Online veröffentlicht am 26. August 2010

Stichwörter: ADEPT · Duocarmycine · Glycoside · Prodrugs · Tumortherapeutika

- [1] K. D. Bagshawe, *Br. J. Cancer* **1987**, *56*, 531–532.
- [2] Übersichten: a) L. F. Tietze, B. Krewer, *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *74*, 205–211; b) K. D. Bagshawe, *Curr. Drug Targets* **2009**, *10*, 152–157; c) K. D. Bagshawe, *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2006**, *6*, 1421–1431; d) W. A. Denny, *Cancer Invest.* **2004**, *22*, 604–619; e) L. F. Tietze, T. Feuerstein, *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 2155–2175; f) L. F. Tietze, T. Feuerstein, *Aust. J. Chem.* **2003**, *56*, 841–854; g) M. Jung, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2001**, *1*, 399–407; h) G. Xu, H. L. McLeod, *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 3314–3324.
- [3] L. F. Tietze, T. Herzig, T. Feuerstein, I. Schuberth, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1634–1645.
- [4] a) D. L. Boger, D. S. Johnson, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1542–1580; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1438–1474; b) M. Ichimura, T. Ogawa, S. Katsumata, K.-I. Takahashi, I. Takahashi, H. Nakano, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 1045–1053; c) M. Ichimura, T. Ogawa, K.-I. Takahashi, E. Kobayashi, I. Kawamoto, T. Yasuzawa, I. Takahashi, H. Nakano, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1037–1038.
- [5] a) L. F. Tietze, F. Major, I. Schuberth, D. A. Spiegel, B. Krewer, K. Maksimenka, G. Bringmann, J. Magull, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 4396–4409; b) L. F. Tietze, F. Major, I. Schuberth, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6724–6727; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6574–6577.
- [6] L. F. Tietze, J. M. von Hof, B. Krewer, M. Müller, F. Major, H. J. Schuster, I. Schuberth, F. Alves, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 1946–1955.
- [7] a) H. J. Schuster, B. Krewer, J. M. von Hof, K. Schmuck, I. Schuberth, F. Alves, L. F. Tietze, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1833–1842; b) L. F. Tietze, H. J. Schuster, B. Krewer, I. Schuberth, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 537–543; c) L. F. Tietze, T. Feuerstein, A. Fecher, F. Haunert, O. Pankin, U. Borchers, I. Schuberth, F. Alves, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 785–787; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 759–761.

- [8] a) S. K. Sharma, G. Jia, J. W. Lown, *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **2001**, *1*, 27–45; b) G. Jia, J. W. Lown, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1607–1617; c) G. Jia, H. Iida, J. W. Lown, *Heterocycl. Commun.* **1999**, *5*, 497–502; d) M. A. Mitchell, P. D. Johnson, M. G. Williams, P. A. Aristoff, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6428–6429.
- [9] a) W. Jin, J. D. Trzupek, T. J. Rayl, M. A. Broward, G. A. Vielhauer, S. J. Weir, I. Hwang, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15391–15397, zit. Lit.; b) 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.
- [10] L. F. Tietze, H. J. Schuster, S. M. Hampel, S. Rühl, R. Pföh, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 895–901.
- [11] a) W. Dullenkopf, J. C. Castro-Palomino, L. Manzoni, R. R. Schmidt, *Carbohydr. Res.* **1996**, *296*, 135–147; b) R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 213–236; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 212–235.
- [12] G. Zemplén, E. Pacsu, *Ber. Dtsch. Chem. Ges. A* **1929**, *62*, 1613–1614.
- [13] D. B. Kastrinsky, D. L. Boger, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2284–2289.
- [14] a) L. F. Tietze, B. Krewer, J. M. von Hof, H. Frauendorf, I. Schuberth, *Toxins* **2009**, *1*, 134–150; b) L. F. Tietze, B. Krewer, F. Major, I. Schuberth, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13031–13036; c) L. F. Tietze, B. Krewer, H. Frauendorf, *Eur. J. Mass Spectrom.* **2009**, *15*, 661–672; d) L. F. Tietze, B. Krewer, H. Frauendorf, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 437–448; e) L. F. Tietze, B. Krewer, H. Frauendorf, F. Major, I. Schuberth, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6720–6724; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6570–6574.
- [15] a) G. H. Schwartz, A. Patnaik, L. A. Hammond, J. Rizzo, K. Berg, D. D. Von Hoff, E. K. Rowinsky, *Ann. Oncol.* **2003**, *14*, 775–782; b) M. A. Mitchell, R. C. Kelly, N. A. Wienielski, N. T. Hatzenbuhler, M. G. Williams, G. L. Petzold, J. L. Slightom, D. R. Siemieniak, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8994–8995.
- [16] a) P. W. Howard, Z. Chen, S. J. Gregson, L. A. Masterson, A. C. Tibergien, N. Cooper, M. Fang, M. J. Coffils, S. Klee, J. A. Hartley, D. E. Thurston, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6463–6466; b) K. M. Rahman, A. S. Thompson, C. H. James, M. Narayanaswamy, D. E. Thurston, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13756–13766; c) A. C. Tibergien, D. A. Evans, K. Kiakos, C. R. H. Martin, J. A. Hartley, D. E. Thurston, P. W. Howard, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2073–2077; d) G. P. Wilkinson, J. P. Taylor, S. Shnyder, P. Cooper, P. W. Howard, D. E. Thurston, T. C. Jenkins, P. M. Loadman, *Invest. New Drugs* **2004**, *22*, 231–240; e) S. C. Wilson, P. W. Howard, S. M. Forrow, J. A. Hartley, L. J. Adams, T. C. Jenkins, L. R. Kelland, D. E. Thurston, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4028–4041.
- [17] a) B. Purnell, A. Sato, A. O'Kelley, C. Price, K. Summerville, S. Hudson, C. O'Hare, K. Kiakos, T. Asao, M. Lee, J. A. Hartley, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5677–5681; b) M. Tercel, S. M. Stribbling, H. Sheppard, B. G. Siim, K. Wu, S. M. Pullen, K. J. Botting, W. R. Wilson, W. A. Denny, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2132–2151; c) Q. Zhou, W. Duan, D. Simmons, Y. Shayo, M. A. Raymond, R. T. Dorr, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4865–4866.
- [18] S. R. Rajski, R. M. Williams, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2723–2795.