

Experimentelles

Pferdeherz-Cyt-c und -CcP wurden durch Mischen (30 min) einer Proteinlösung ($c = 10 \text{ mg mL}^{-1}$) mit einem Überschuß an DTSSP (10 mM Lösung in 100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6.3) immobilisiert. Alternativ wurde eine Lösung von Na_2HPO_4 (10 mmol dm^{-3} in Dimethylsulfoxid, 1:5 mit H_2O verdünnt) verwendet. Eine Goldelektrode ($A = 0.031 \text{ cm}^2$, mit Aluminiumoxid der Korngröße 0.05 μm poliert, mit 25% H_2O_2 in H_2SO_4 behandelt und in Wasser 15 min mit Ultraschall beschallt) wurde in der Enzymlösung ca. 12 h bei 4 °C inkubiert. Alle elektrochemischen Messungen wurden mit einem BAS-CV-37-Potentiostat durchgeführt und entweder analog oder digital aufgezeichnet. Die Gleichstromcyclovoltammetrie wurde in verschlossenen Zwei-Kammer-Elektrolysezellen mit einem Arbeitsvolumen von 500 μL durchgeführt.

Die elektrochemischen Messungen wurden in Natriumphosphatpuffer durchgeführt (0.1 mol dm^{-3} , pH 6.3, zur Entfernung von Sauerstoff wurde die Lösung vor der Messung 15 min mit Stickstoff durchspült). Die Lösung wurde während des Experiments in einer Stickstoffatmosphäre gehandhabt. Ebenso wurden alle Vorratslösungen vor der Einschleusung in die elektrochemische Zelle auf die gleiche Weise behandelt. Die Abwesenheit von Sauerstoff in den Lösungen wurde mit einer unmodifizierten Goldelektrode, die auf einer Spannung von -300 mV vs. Ag/AgCl gehalten wurde, überprüft. Kontrollexperimente, in denen die Häm-Redoxzentren der Proteine durch Inkubation der Elektrode in 4.0 M Guanidin \times HCl (pH 6.0, ca. 12 h, Waschen) entfernt wurden, wurden für beide Elektroden durchgeführt. Die Ergebnisse für Cyt c sind in Abbildung 1 gezeigt (siehe Legende zu Abb. 1).

Eingegangen am 28. April,
veränderte Fassung am 14. August 1995 [Z 7939]

Stichworte: Bioelektrochemie • Cytochrom-c-Peroxidase • Elektronentransport • Immobilisierte Elektroden

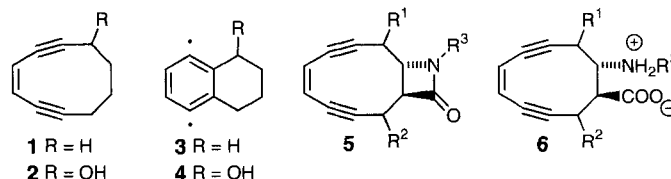
- [1] H. Ebato, J. N. Herron, W. Müller, Y. O. Kahata, H. Ringsdorf, P. Suci, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 1064–1067; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 1087–1090.
- [2] D. J. Pritchard, H. Morgan, J. M. Cooper, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 84–86; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 91–93.
- [3] D. Altshuh, M. C. Dubs, E. Weiss, G. Zederlutz, M. H. V. Vanregenmortel, *Biochemistry* **1992**, 31, 6298–6304.
- [4] L. C. Clark, C. Lyons, *Ann. NY Acad. Sci.* **1962**, 102, 29–45.
- [5] I. Willner, N. Lapidot, A. Riklin, R. Kasher, E. Zahavy, E. Katz, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 1428–1441.
- [6] J. M. Cooper, K. Greenough, C. J. McNeil, *J. Electroanal. Chem.* **1993**, 347, 267–275.
- [7] M. Collinson, E. F. Bowden, M. J. Tarlov, *Langmuir* **1992**, 8, 1247–1250.
- [8] E. Cheung, K. Taylor, J. A. Kornblatt, A. M. English, G. McLendon, A. Miller, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 1330–1333.
- [9] E. Laviron, *J. Electroanal. Chem.* **1979**, 101, 19–28.
- [10] J. Wilshire, D. T. Sawyer, *Acc. Chem. Res.* **1979**, 12, 105–110.
- [11] W. L. Purcell, J. E. Erman, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 7033–7037.
- [12] D. C. Rees, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 3082–3085.
- [13] F. A. Armstrong, A. M. Lannon, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 7211–7212.
- [14] M. Lion-Dagan, E. Katz, I. Willner, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2741.
- [15] S. Bagby, P. D. Barker, L. H. Guo, H. A. O. Hill, *Biochemistry* **1990**, 29, 3213–3219.
- [16] A. F. Corin, R. A. Hake, G. McLendon, J. T. Hazzard, G. Tollin, *Biochemistry* **1993**, 32, 2756–2762.

Lactendiine: eine neue Klasse von chemisch aktivierbaren cyclischen Endiinen**

Luca Banfi und Giuseppe Guanti*

Nachdem vor kurzem die starke Antitumor-Aktivität von natürlich vorkommenden cyclischen Endiinen entdeckt worden ist, sind derzeit etliche Bemühungen auf das Design und die Synthese von analogen Verbindungen gerichtet, die nach dem gleichen Prinzip wirken, deren Molekülstrukturen aber weniger komplex sind^[1]. Idealerweise sind solche Mimetica an sich inaktiv und werden chemisch aktiviert, indem ein Strukturelement, das die Endiineinheit in einer stabilen Form blockiert, kontrolliert entfernt und so die DNA-schädigende Form freigesetzt wird. Darüber hinaus sollten diese Verbindungen zur Steigerung von Selektivität und Wirksamkeit über geeignete Ankergruppen verfügen, über die DNA-bindende Agentien gebunden werden können^[1 c, 2].

In diesem Zusammenhang untersuchten wir eine neue Klasse von synthetischen Endiinen, die sich durch einen an ein zehngliedriges cyclisches Endiin *trans*-anellierten β -Lactamring auszeichnen (**5**) und die wir „Lactendiine“ nennen. Diese sind Analoga der bekannten Stammverbindungen **1**^[3] und **2**^[4], die bei 37 °C mit mäßiger Geschwindigkeit in einer Bergman-Cycloaromatisierung zu den hochreaktiven Aryl-Diradikalen **3** bzw. **4** reagieren. Wir

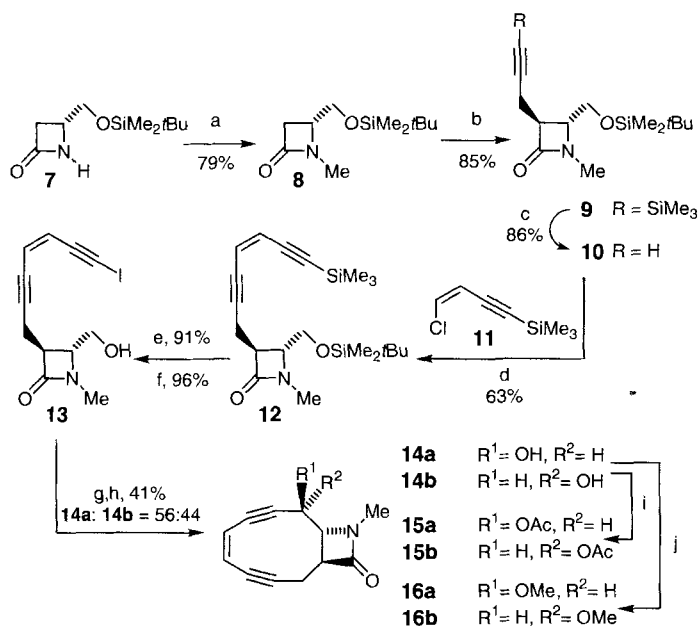


gingen davon aus, daß Lactendiine hinsichtlich einer Cycloaromatisierung vollkommen stabil sind und daß ihre Hydrolyseprodukte **6** reaktiver als die Stammverbindungen **1** und **2** sein sollten. Die erste Annahme beruhte zum einen auf den Arbeiten von Nicolaou, Bergman et al.^[5], die nachgewiesen haben, daß zehngliedrige, an Dioxolanone *trans*-anellierte Endiine nicht reaktiv sind, und zum anderen auf Molekülmechanik(MM)-Rechnungen^[6], nach denen das aromatische Cyclisierungsprodukt stark gespannt sein muß. Die zweite Annahme war weniger offensichtlich; die MM-Rechnungen^[6] deuteten auf eine sehr kurze Lebensdauer von **6** bei 37 °C. Daher könnte eine In-vivo-Öffnung des β -Lactamrings als Auslöser für die Überführung des möglichen Endiin-Produkts **5** in die wirksamen Spezies **6** sein. Weitere Vorteile der Verbindungen **5** bestehen in ihrer einfachen Struktur, weshalb ihre Totalsynthese leichter erreichbar sein sollte, und in der Möglichkeit, über die Substituenten R^1 , R^2 und R^3 DNA-bindende Agentien anzuknüpfen.

Um unsere Annahmen zu überprüfen, haben wir nun die ersten Verbindungen dieser Klasse hergestellt. Die eingeschlagene Syntheseroute (Schema 1) beginnt mit dem 2-Azetidinon **7**, das nach bekannten Verfahren^[7] in sechs Stufen aus D,L-Asparaginsäure zugänglich ist^[8]. Nach Schützen der Stickstofffunktion^[9]

[*] Prof. G. Guanti, Dr. L. Banfi
Istituto di Chimica Organica e CNR
Centro di Studio per la Chimica dei Composti Cicloalifatici ed Aromatici
corso Europa 26, I-16132 Genova (Italia)
Telefax: Int. +10/3 53 82 18

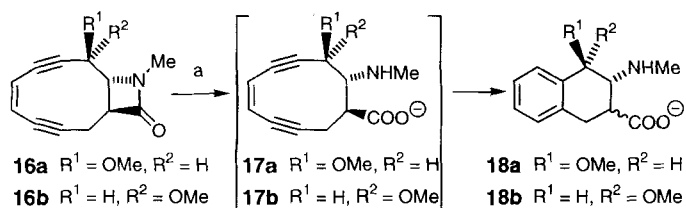
[**] Wir danken Herrn Andrea Basso für wertvolle Zusammenarbeit. Diese Arbeit wurde vom Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) und vom Ministero per l'Università e la Ricerca Scientifica e Tecnologica (MURST) gefördert.



Schema 1. a) $n\text{Bu}_4\text{NBr}$, MeI, KOH, THF, 0°C ; b) LDA, dann $\text{BrCH}_2\text{C}\equiv\text{CSiMe}_3$; c) AgNO_3 , NaCN, EtOH/ H_2O ; d) CuI, $[(\text{PhCN})_2\text{PdCl}_2]$, Piperidin/THF; e) AgNO_3 , NIS, DMF; f) HF, H_2O , CH_3CN , $-20 \rightarrow 0^\circ\text{C}$; g) $(\text{COCl})_2$, DMSO, Et_3N , CH_2Cl_2 , -78°C ; h) CrCl_2 , NiCl_2 , THF; i) Ac_2O , Pyridin/ CH_2Cl_2 (**15a**: 76%, **15b**: 66%); j) NaH, MeI, DMF (**16a**: 85%, **16b**: 76%).

wurde die Seitenkette an der 3-Position durch Kondensation des Lithiumenolats von **8** mit 3-Brom-1-(trimethylsilyl)propin eingeführt. Diese Reaktion verlief vollständig stereoselektiv und lieferte ausschließlich das gewünschte *trans*-Produkt **9**. Nachdem die Trimethylsilylgruppe selektiv entfernt worden war^[10], gelang der Aufbau der Endiineinheit durch Castro-Stephens-Kupplung mit dem Chlorenin **11**^[11]. Allerdings verlief die Umsetzung unter den Standardbedingungen mit $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$ als Katalysator langsam und lieferte **12** nur in mäßigen Ausbeuten von 25–30%. Mit $[(\text{PhCN})_2\text{PdCl}_2]$ in THF/Piperidin, entsprechend einer Vorschrift von Alami und Linstrumelle^[12], konnte die Ausbeute an **12** deutlich verbessert werden. Durch Eintopfreaktion von **12** mit *N*-Iodsuccinimid (NIS) zum entsprechenden Iodacetylen nach der Methode von Isobe et al.^[13] und Entschützen der primären Alkoholfunktion wurde **13** erhalten. Dessen Oxidation und anschließende Nozaki-Cyclisierung^[6, 14] lieferten eine Mischung aus den diastereomeren Alkoholen **14a** und **14b** in befriedigender Ausbeute (41%, 13% Gesamtausbeute bezogen auf **7**), die problemlos durch Chromatographie an Kieselgel getrennt werden konnten.

Diese Alkohole sind sowohl in Lösung als auch lösungsmittelfrei außerordentlich stabil^[15] und wurden glatt in die entsprechenden Acetyl- und Methyl-Derivate **15a, b** bzw. **16a, b** überführt (Tabelle 1). Mehrstündiges Erhitzen der Methylether **16a, b** auf 100°C in Gegenwart von 1,4-Cyclohexadien führte zu keiner Reaktion. Dagegen wurde **16a** mit 1 *N* NaOH in MeOH in Gegenwart von 1,4-Cyclohexadien in 2 h vollständig zum cycloaromatisierten Produkt **18a** umgesetzt (Schema 2). Dieses fiel als



Schema 2. a) 1–1.5 *N* NaOH/abs. MeOH, 1,4-Cyclohexadien, 50°C , 2–5 h.

Tabelle 1. Physikalische Daten von **16a, b** und **18a, b**.

16a: $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , 25°C , TMS): $\delta = 2.66$ (dd, $^2J(\text{H}, \text{H}) = 17.9$ Hz, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 12.2$ Hz, 1 H, $\text{CHHC}\equiv$), 2.88 (dd, $^2J(\text{H}, \text{H}) = 17.9$ Hz, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 3.9$ Hz, 1 H, $\text{CHHC}\equiv$), 2.92 (s, 3 H, CH_3N), 3.24–3.38 (m, 1 H, $\text{CHC}=\text{O}$), 3.46 (s, 3 H, CH_3O), 3.73 (dd, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 2.3$, 9.1 Hz, 1 H, CHN), 4.25 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 9.1$ Hz, 1 H, CHOMe), 5.91 (s, 2 H, $\text{CH}=\text{CH}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3 , 25°C , TMS): $\delta = 19.50$ ($\text{CH}_2\text{C}\equiv$), 28.90 (CH_3N), 54.93, 56.87, 63.76, 64.19 (CH und OCH_3), 83.93, 88.30, 95.18, 100.00 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 122.20, 124.57 ($\text{C}=\text{C}$), 167.45 ($\text{C}=\text{O}$); MS (70 eV): m/z (%): 215 (29) [M^+], 200 (76) [$M^+ - \text{CH}_3$], 184 (14.6), 172 (21.9), 156 (43), 144 (25.5), 143 (32.5), 129 (21.2), 128 (17.6), 115 (66), 105 (100), 63 (39), 42 (82); IR (CHCl_3): $\tilde{\nu} = 2200$ (schwach), 1747 cm^{-1} .

16b: $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3 , 25°C , TMS): $\delta = 2.59$ (dd, $^2J(\text{H}, \text{H}) = 17.9$ Hz, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 13.1$ Hz, 1 H, $\text{CHHC}\equiv$), 2.81 (s, 3 H, CH_3N), 2.89 (ddd, $^2J(\text{H}, \text{H}) = 17.9$ Hz, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 3.8$ Hz, $^5J(\text{H}, \text{H}) = 1.7$ Hz, 1 H, $\text{CHHC}\equiv$), 3.46 (s, 3 H, CH_3O), 3.64–3.80 (m, 2 H, $\text{CHC}=\text{O}$ und CHN), 4.37 (t, $^3J(\text{H}, \text{H})$, $^5J(\text{H}, \text{H}) = 1.8$ Hz, 1 H, CHOCH_3), 5.96, 5.89 (br., AB-System, $^2J(\text{H}, \text{H}) = 9.7$ Hz, 2 H, $\text{CH}=\text{CH}$); $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3 , 25°C , TMS): $\delta = 19.36$ ($\text{CH}_2\text{C}\equiv$), 26.60 (CH_3N), 52.19, 57.20, 63.25, 67.72 (CH und OCH_3), 83.58, 87.28, 95.66, 100.79 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 122.02, 126.26 ($\text{C}=\text{C}$), 167.82 ($\text{C}=\text{O}$); MS (70 eV): m/z (%): 215 (42) [M^+], 200 (100) [$M^+ - \text{CH}_3$], 184 (15.7), 172 (24), 156 (45), 144 (31), 143 (32), 129 (22.5), 128 (19.4), 115 (67), 105 (94), 63 (40), 42 (83); IR (CHCl_3): $\tilde{\nu} = 2240$, 1750 cm^{-1} .

18a: $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CD_3OD , NaOD, 25°C , TMS): $\delta = 2.42$ und 2.49 (s, 3 H, CH_3N), 2.80–3.40 (m, 4 H, CH_2Ar , CHCOO , CHN), 3.23 und 3.49 (s, 3 H, CH_3O), 4.23 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 2.6$ Hz, 1/2 H, CHOMe), 4.41 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 5.8$ Hz, 1/2 H, CHOMe), 7.10–7.25 (m, 3 H, arom.), 7.25–7.35 (m, 1 H, arom.).

18b: $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CD_3OD , NaOD, 25°C , TMS): $\delta = 2.44$ und 2.49 (s, 3 H, CH_3N), 2.70–3.60 (m, 4 H, CH_2Ar , CHCOO , CHN), 3.33 und 3.38 (s, 3 H, CH_3O), 4.36 (br. s, 2/3 H, CHOMe) 4.43 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 4.0$ Hz, 1/3 H, CHOMe), 7.05–7.30 (m, 4 H, arom.).

Gemisch aus zwei Diastereomeren an (Tabelle 1), vermutlich wegen einer Epimerisierung zur Carboxylatgruppe am α -ständigen Kohlenstoffatom^[16]. $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch konnten im Verlauf der Reaktion keine Signale beobachtet werden, die sich den als Zwischenstufe gebildeten Endiin-Aminosäuren **17a, b** zuordnen lassen. In Einklang mit den theoretischen Vorhersagen scheint die Cycloaromatisierung somit unmittelbar nach Öffnung des β -Lactams stattzufinden^[17]. Das Diastereomer **16b** reagiert unter denselben Bedingungen wie **18b** (Tabelle 1)^[18].

Wie wir zeigen konnten, sollten Lactendiine als Endiin-Prodrugs verwendet werden können. Zwar dürfte die Hydrolyse der inaktiven β -Lactame **14–16** in vivo schwieriger sein, doch sollten durch Synthesevarianten reaktivere Analoga **5** zugänglich sein, bei denen die Öffnung der Azetidinoneinheit durch geeignete aktivierende Gruppen R^3 erleichtert wird.

Eingegangen am 16. Juni 1995 [Z 8109]

Stichworte: Azetidinone · Antitumormittel · Cycloaromatisierungen · Endiine

- [1] Übersichtsartikel: a) M. E. Maier, *Synlett* **1995**, 13–26; b) L. Banfi in *Seminars in Organic Synthesis* (Hrsg.: B. Danieli), S.C.I. Rom, **1994**, S. 253–277; c) K. C. Nicolaou, W.-M. Dai, S.-C. Tsay, V. A. Estevez, W. Wrasidlo, *Science* **1992**, 256, 1172–1178; d) K. C. Nicolaou, A. L. Smith, E. W. Yue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 5881–5888; e) K. C. Nicolaou, A. L. Smith, *Acc. Chem. Res.* **1992**, 25, 497–503.
- [2] M. F. Semmelhack, J. J. Gallagher, W. D. Ding, G. Krishnamurthy, R. Babine, G. A. Ellestad, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 4357–4359.
- [3] Bei 37°C beträgt die Halbwertszeit 18 h: K. C. Nicolaou, G. Zuccarello, Y. Ogawa, E. J. Schweiger, T. Kumazawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 4866–4868.
- [4] Für das Acetyl-Derivat von **2** beträgt die Halbwertszeit bei 37°C 18 h: C. Crévisy, J.-M. Beau, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 3171–3174; siehe auch Lit. [2].
- [5] K. C. Nicolaou, E. J. Sorensen, R. Discordia, C.-K. Hwang, R. E. Minto, K. N. Bharucha, R. G. Bergman, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 1094–1096; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 1044–1046.
- [6] Wir haben den vereinfachten Ansatz nach Maier [1a] benutzt, der auf der Berechnung der Differenz der Spannungsenergien E_a von Endprodukt (dem

hydrierten Diradikal) und Substrat beruht. Mit dem Programm Chem3D Plus (CSC, Cambridge, MA) haben wir für **14a**, **b**–**16a**, **b** um 15–17 kcal mol⁻¹ höhere ΔE_s -Werte berechnet als für die Modellverbindungen **1** und **2**. Dagegen waren die für **6** (R¹ = OH, OMe, OAc) berechneten ΔE_s -Werte um etwa 2–4 kcal mol⁻¹ niedriger als die von **1** und **2**. (Die ΔE_s -Werte der all-*trans*-Isomere waren stets niedriger.)

- [7] a) Y. Takahashi, H. Yamashita, S. Kobayashi, M. Ohno, *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 2732–2742; b) Y. Takahashi, H. Yamashita, T. Izawa, S. Kobayashi, M. Ohno, *ibid.* **1986**, *34*, 3020–3024.
 [8] Alle in dieser Arbeit eingesetzten Verbindungen waren racemisch. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist in den Schemata stets nur ein Enantiomer wiedergegeben.
 [9] D. Reuschling, H. Pietsch, A. Linkies, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 615–618.
 [10] H. M. Schmidt, J. F. Arens, *Rec. Trav. Chim. Pays Bas* **1967**, *86*, 1138–1142.
 [11] D. Chemin, G. Linstrumelle, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 5335–5344.
 [12] M. Alami, G. Linstrumelle, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 6109–6112.
 [13] T. Nishikawa, S. Shibuya, S. Hosokawa, M. Isobe, *Synlett* **1994**, 485–486.
 [14] T. Brandstetter, M. E. Maier, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 1435–1448, zit. Lit.

- [15] Der Alkohol **2** ist bei Raumtemperatur und lösungsmittelfrei auch bei –20 °C nicht stabil, sondern geht außer der Cycloaromatisierung einige Nebenreaktionen ein (vgl. Lit. [4]).
 [16] Diese Epimerisierung findet erst nach Öffnung des β -Lactams statt, denn NMR-spektroskopisch und dünnschichtchromatographisch wurden keine Hinweise auf das *cis*- β -Lactam erhalten. Darüber hinaus ändert sich das Verhältnis der beiden Epimere mit der Zeit bis zu einem Endwert von etwa 1:1.
 [17] Zum Vergleich: $t_{1/2}$ (**1**) = 3.6 h (50 °C) [3]. Die Ursache der im Vergleich zu **1** oder **2** höheren Reaktivität von **17a**, **b** liegt vermutlich darin, daß die sterischen Wechselwirkungen zwischen der Carboxylat- und der NHMe-Gruppe im cyclischen Endiin (Diederwinkel ca. 25°) ungünstiger sind als in den Tetrahydronaphthalinen **18** (Diederwinkel ca. 50°). Snyder hat berechnet, daß sich durch Einführen von zwei zueinander *trans*-ständigen Methylgruppen an C8 und C9 von **1** die Aktivierungsenergie der Cycloaromatisierung um etwa 1.1 kcal mol⁻¹ verringern sollte: J. P. Snyder, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5367–5369.
 [18] In diesem Fall verlief die Öffnung des β -Lactams allerdings langsamer und war mit 1.5 N NaOH in MeOH erst nach 5 h vollständig. Das Verhältnis der beiden Epimere von **18b** (zunächst ca. 1:3) wird dabei vollständig umgekehrt (ca. 3:1 gegen Ende der Reaktion).

VCH Weinheim, New York

Akademie Verlag

Ernst & Sohn

ACADEMY GROUP LTD

Verlag Helvetica Chimica Acta

SIEMENS, Publicis MCD Verlag

Chemical Concepts

VCH Software

VCH PUBLISHING GROUP

Information available on Internet

www.vchgroup.de