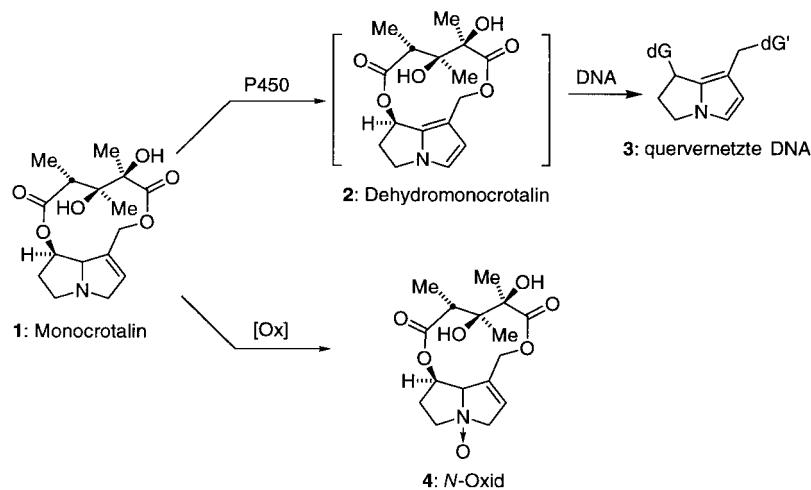


# Reduktive Aktivierung eines Hydroxylamin-Hemiacetal-Derivats von Dehydro-monocrotalin: das erste reduktiv aktivierbare Pyrrolizidinalkaloid, das DNA-Stränge quervernetzen kann\*\*

Jetze J. Tepe und Robert M. Williams\*

Pyrrolizidinalkaloide (PAs) wie Monocrotalin **1** sind potente Hepatotoxine und Carcinogene, die bereits in vielen artenreichen Pflanzenfamilien gefunden und isoliert wurden (Schema 1).<sup>[1, 2]</sup> Wegen ihrer Strukturvielfalt und weltweiten



Schema 1. Das Pyrrolizidinalkaloid Monocrotalin **1** und die Derivate **2–4**.

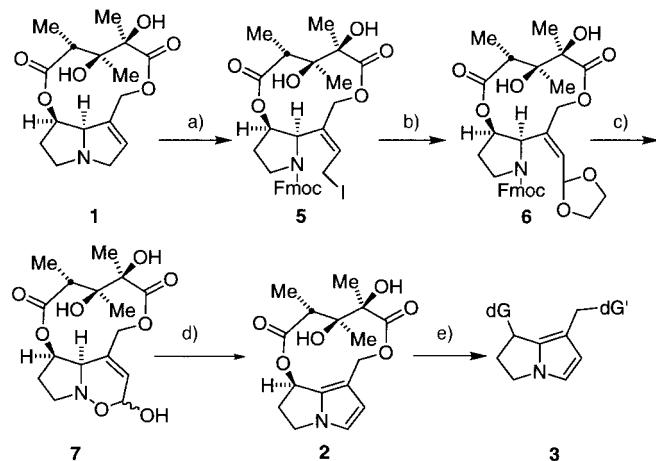
Verbreitung sind die PAs eine ernste Bedrohung für die Gesundheit von Menschen und Nutztieren.<sup>[2, 3]</sup> Die biologisch aktiven Metabolite dieser Naturstoffe sind die entsprechenden Dehydropyrrolizidine, z. B. Dehydromonocrotalin **2**, die nach Zweielektronenoxidation des 4-Azabicyclo[3.3.0]octan-Ringsystems durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen in der Leber entstehen.<sup>[4, 5]</sup> Die Reaktion dieses Metaboliten mit DNA-Basen führt unter Bildung des Addukts **3** zur Quervernetzung der DNA-Stränge, worauf größtenteils die Cytoxizität dieser Alkaloide beruht.<sup>[6, 7]</sup> Die Entgiftung der PAs erfolgt durch alternative N-Oxidation (→**4**) mit Flavinhaltigen oder Cytochrom-P450-Monooxygenasen.<sup>[4]</sup>

Im oxidierten Pyrrolizidinring der Alkaloide liegt unter Einbeziehung des freien Elektronenpaares am Pyrrol-N-Atom ein konjugiertes System vor, das zu einer elektrophilen Aktivierung von C7 und C9 führt. Dadurch wird der

nucleophile Angriff durch die exocyclische Aminogruppe von Desoxyguanosin-Resten der 5'-CpG-3'-Abschnitte in der kleinen Furche der DNA ermöglicht.<sup>[8, 9]</sup>

Wegen der Eigenschaft, zu DNA-DNA- und DNA-Protein-Quervernetzungen<sup>[10]</sup> zu führen, sind die Dehydropyrrolizidinalkaloide als potentielle Antitumormittel interessant. Bisher wurde jedoch die klinische Anwendung durch ihre akute Hepatotoxizität verhindert, die darauf zurückzuführen ist, daß der reaktive DNA-vernetzende Metabolit durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen in den Leberzellen erzeugt und freigesetzt wird, die dadurch besonders den toxischen Wirkungen dieser Spezies ausgesetzt sind. Da die unerwünschten Eigenschaften dieser Substanzen vor allem auf deren oxidativer Bildung beruhen, sollte es möglich sein, durch eine andere Aktivierungsmethode den pharmakologischen Nutzen der PAs zu steigern. Aufgrund des erfolgreichen klinischen Einsatzes einer Reihe wichtiger, reduktiv aktivierbarer DNA-Vernetzungsreagentien wie Mitomycin C, FR900482 und verwandter Verbindungen nahmen wir an, daß eine reduktive Aktivierung der PAs nicht nur das pharmakologische Profil verbessern würde, sondern auch eine ähnliche Tumorselektivität induzieren könnte, wie sie viele Hypoxie-Agentien aufweisen.<sup>[11, 12]</sup> Als Teil eines Forschungsprogramms, das die Entwicklung und Untersuchung chemischer und biochemischer Methoden zur Aktivierung von klinisch wichtigen Antitumormitteln zum Ziel hatte,<sup>[13]</sup> beschreiben wir hier die Synthese und DNA-Vernetzungsfähigkeit des ersten reduktiv aktivierbaren Pyrrolizidinalkaloids, einer Vorstufe von Dehydromonocrotalin.

Die Synthese des Dehydromonocrotalinderivats **7** ist in Schema 2 wiedergegeben. Die Umsetzung von käuflichem Mo-



Schema 2. Synthese von **7**, dessen Reduktion zu **2** und die anschließende Umsetzung mit DNA. a) FmocCl, KI, Raumtemperatur, MeCN, 10 h, 30%; b) 1)  $\text{AgBF}_4$ , DMSO,  $\text{Et}_3\text{N}$ , Raumtemperatur, 95%; 2)  $\text{TMSCl}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ , 95%; c) 1) 50proz. Piperidin,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 96%; 2) *m*-CPBA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 61%; 3) 1proz. HCl (aq.), THF, Raumtemperatur, 70%; d)  $\text{Fe}^{II}/\text{EDTA}$ ,  $-2\text{H}_2\text{O}$ ; e) DNA. – FmocCl = Fluoren-9-ylmethylchlorformiat, TMS = Trimethylsilyl, *m*-CPBA = 3-Chlorperbenzoësäure, EDTA = Ethyldiamintetraessigsäure.

[\*] Prof. Dr. R. M. Williams, J. J. Tepe  
Department of Chemistry  
Colorado State University  
Fort Collins, CO 80523 (USA)  
Fax: (+1) 970-491-5610  
E-mail: rmw@chem.colostate.edu

[\*\*] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (Grant CA51875) gefördert. Wir danken Teri Lansdell und Paul Sebahar für ihre Hilfe bei den DNA-Vernetzungsexperimenten und den HPLC-Untersuchungen. Prof. Frank R. Stermitz danken wir für eine verbesserte Methode zur Herstellung von Dehydromonocrotalin.

nocrotalin **1**<sup>[14]</sup> mit Fluoren-9-ylmethylchlorformiat (FmocCl) in Gegenwart von KI in Acetonitril lieferte unter Ringöffnung das Allyliodid **5**.<sup>[15]</sup> Dessen Oxidation mit DMSO und AgBF<sub>4</sub> lieferte in 95 % Ausbeute den ungesättigten Aldehyd, der anschließend in das Ethylenglycolacetal **6** überführt wurde. Nach der Abspaltung der Fmoc-Gruppe am N-Atom mit Piperidin (50proz. Lösung in THF) wurde das erhaltene freie Amin mit *meta*-Chlorperbenzoësäure in dem Zweiphasensystem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/wässrige gesättigte NaHCO<sub>3</sub>-Lösung oxidiert. Durch die anschließende Spaltung der Acetalgruppierung mit 1proz. HCl wurde das Hydroxylamin-Hemiacetal **7** erhalten.

Analog der eingehend untersuchten Aktivierung von FR900482 und verwandten Verbindungen wurde **7** mit *in situ* gebildetem Fe<sup>II</sup>/EDTA reduziert.<sup>[8, 16]</sup> Mittels HPLC (Umkehrphase, C-18 YMC ODS-A, Acetonitril/Wasser (30/70), 1.0 mL min<sup>-1</sup>) wurde die Reaktion von **7** (10 µL, 10 mM in DMSO, UV:  $\lambda_{\text{max}} = 212$  nm, Retentionszeit: 3.8 min) zu Dehydromonocrotalin **2** (UV:  $\lambda_{\text{max}} = 232$  nm, Retentionszeit: 11.2 min) nach der Zugabe von Fe<sup>II</sup>/EDTA (20 mM, pH 8) verfolgt.

Die Ergebnisse der DNA-Vernetzungsexperimente mit **7** sind in Abbildung 1 gezeigt. Die Fähigkeit von **7**, DNA-Stränge zu vernetzen, wurde unter Verwendung von linearer



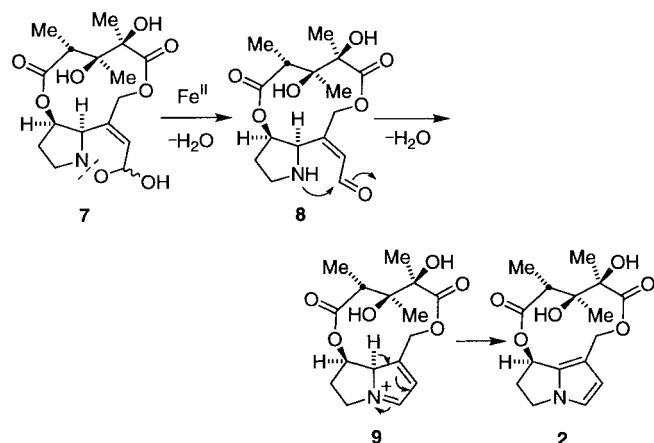
Abbildung 1. Untersuchung der DNA-Strangvernetzung durch das Reduktionsprodukt von **7** unter Verwendung von linearer Plasmid-DNA mittels denaturierender alkalischer Agarosegel-Elektrophorese. Bedingungen: Spur 1: 0.5 µg Lambda-HindIII (Standard zur Bestimmung der relativen Molekülmasse); Spur 2: 0.5 µg pBR322 (Kontrolle); Spur 3: 0.5 µg pBR322 + 10 µM **2** (Kontrolle); Spur 4: 0.5 µg pBR322 + 1.0 mM FR900482 (Kontrolle); Spur 5: 0.5 µg pBR322 + 1.0 mM FR900482 + 100 µM Fe<sup>II</sup>/EDTA; Spur 6: 0.5 µg pBR322 + 1.0 mM **7** (Kontrolle); Spur 7: 0.5 µg pBR322 + 1.0 mM **7** + 100 µM Fe<sup>II</sup>/EDTA; Spur 8: 0.5 µg pBR322 + 0.5 mM **7** + 100 µM Fe<sup>II</sup>/EDTA; Spur 9: 0.5 µg pBR322 + 100 µM **7** + 100 µM Fe<sup>II</sup>/EDTA; Spur 10: 0.5 µg pBR322 + 10 µM **7** + 100 µM Fe<sup>II</sup>/EDTA. ss-DNA = Einzelstrang-DNA.

Plasmid-DNA durch Elektrophorese in einem denaturierenden alkalischen Agarosegel nach Cech untersucht.<sup>[17]</sup> Dazu wurde die ringförmige Doppelstrang-DNA des Plasmids pBR322 mit der Restriktionsendonuklease EcoRI in lineare DNA überführt, deren Menge UV-spektroskopisch bei 260 nm, wie von Borer beschrieben,<sup>[18]</sup> bestimmt wurde. Die Verbindung **7** (Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen wurden aus einer 10 mM Stammlösung hergestellt, die durch Auflösen von 4.2 mg **7** in 1.2 mL DMSO bereitgestellt wurde) und 0.5 µg der linearen pBR322-DNA wurden 12 h bei 37 °C mit einer Fe<sup>II</sup>/EDTA-Lösung inkubiert (siehe Legende zu Abbildung 1; Endvolumen der Reaktionslösung: 10 µL). Die Fe<sup>II</sup>/EDTA-Lösung wurde durch Zugabe einer äquimolaren Menge von FeSO<sub>4</sub> zu einer Lösung von EDTA (pH 8) hergestellt. Das Reaktionsgemisch wurde elektrophoretisch (50 V, 3 h, 95 mA, 3 W) in einem denaturierenden 1.2proz. alkalischen Agarosegel aufgetrennt.<sup>[17]</sup> Die Anfärbung des Gels erfolgte mit 200 µL einer Ethidiumbromid-Lösung

(10 mg/mL) (100 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) bei pH 7.5, 15 min). Nach dem Entfärben (50 mM NH<sub>4</sub>OAc + 10 mM 2-Sulfanylethanol, 1 h) wurde das Gel im UV-Durchlicht abgebildet. Lambda-HindIII wurde als Standard bei der Bestimmung der relativen Molekülmasse verwendet (Spur 1).

Kontrollreaktionen wurden mit **2** (10 µM, Spur 3) und dem bekannten, reduktiv aktivierbaren Antitumor-Antibiotikum FR900482 durchgeführt (1.0 mM, Spur 4; Zugabe von Fe<sup>II</sup>/EDTA-Lösung, Spur 5).<sup>[8, 16]</sup> Die gelelektrophoretischen Auf trennungen in Abbildung 1 zeigen, daß **7** in Konzentrationen von 100 µM oder höher durch 100 µM Fe<sup>II</sup>/EDTA deutlich aktiviert wird und unter diesen Bedingungen zur Quervernetzung der DNA-Stränge führt (Spur 7–9).

Der Mechanismus der Aktivierung von **7** entspricht höchstwahrscheinlich dem, der bei der Aktivierung von Verbindungen des Typs FR900482 nachgewiesen wurde: Eine Zweielektronenreduktion von **7** führt unter Spaltung der N-O-Bindung zur freien sekundären Aminogruppe in **8**, die unter Ringschluß mit der ebenfalls neu entstandenen Aldehydgruppe zu **9** reagiert (Schema 3). Die abschließende Abspaltung eines Protons liefert das hochreaktive Dehydropyrrolizidin **2**.<sup>[19, 20]</sup>



Schema 3. Mechanismus der reduktiven Aktivierung von **7** unter Bildung von **2**.

Diese ersten Untersuchungen deuten darauf hin, daß sich die Hydroxylamin-Hemiacetal-Gruppierung bei der reduktiven Aktivierung von Vorstufen DNA-reaktiver Alkaloiddeivate als sehr nützlich erweist. Da bekanntermaßen die einzigen bekannten Antitumor-Antibiotika mit Hydroxylamin-Hemiketal-Gruppierung, FR900482 und verwandte Verbindungen, *in vitro* reduktiv durch Fe<sup>II</sup>-Salze in DNA-vernetzende Agentien überführt werden können und die *in vivo*-Aktivierung dieser Substanzen ebenfalls nach diesem Mechanismus der reduktiven Aktivierung verläuft,<sup>[8, 19, 20]</sup> ist davon auszugehen, daß die Reduktion der Hydroxylamin-Hemiacetal-Gruppierung auch bei anderen Prodrugs als Aktivierungsmethode zur Anwendung kommen wird. Außerdem können diese Vorstufen eine Grundlage für die Planung und Synthese einer breiten Palette von Dehydropyrrolizidinalkaloid-Prodrugs für die klinische Prüfung bieten.

Eingegangen am 3. Mai 1999 [Z 13363]  
International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3501–3503

**Stichwörter:** Alkaloide · DNA-Strukturen · Monocrotalin · Wirkstoff-Forschung

- [1] A. R. Mattocks, *Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids*, Academic Press, London, **1986**.
- [2] L. W. Smith, C. C. J. Culvenor, *J. Nat. Prod.* **1981**, *44*, 129.
- [3] „Human Health Implications of Pyrrolizidine Alkaloids and Herbs Containing Them“: R. J. Huxtable in *Toxicants of Plant Origin, Vol I: Alkaloids* (Hrsg.: P. R. Cheeke), CRC Press, Boca Raton, FL, **1989**, S. 41–86.
- [4] a) C. L. Miranda, W. Chung, R. E. Reed, X. Zhao, M. C. Henderson, J.-L. Wang, D. E. Williams, D. R. Buhler, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *178*, 546; b) D. E. Williams, R. E. Reed, B. Kedzierski, G. A. Dannan, F. P. Guengerich, D. R. Buhler, *Drug Metab. Dispos.* **1989**, *17*, 58.
- [5] C. L. Miranda, R. E. Reed, F. P. Guengerich, D. R. Buhler, *Carcinogenesis* **1991**, *12*, 515.
- [6] H. Niwa, T. Ogawa, O. Okamoto, K. Yamada, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 927.
- [7] Ausgezeichnete Übersichtsartikel über die Quervernetzung von DNA-Strängen unter biologischen Aspekten: a) K. W. Kohn in *Topics in Structural & Molecular Biology: 3) Molecular Aspects of Anti-Cancer Drug Action* (Hrsg.: S. Neidle, M. Waring), VCH, Weinheim, **1994**, S. 315; b) P. D. Lawley, *BioEssays* **1995**, *17*, 561; c) D. J. Paustenbach, B. L. Finley, S. Kacew, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1996**, *211*, 211; d) M. Gniazdowski, C. Cera, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 619; e) J. R. Hincks, H. Y. Kim, H. J. Segall, R. J. Molyneaux, F. R. Stermitz, R. A. Coulombe, Jr., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1991**, *111*, 90.
- [8] S. R. Rajski, R. M. Williams, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2723.
- [9] a) M. F. Weidner, S. T. Sigurdsson, P. B. Hopkins, *Biochemistry* **1990**, *29*, 9225; b) J. Woo, S. T. Sigurdsson, P. B. Hopkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3407.
- [10] a) H.-Y. Kim, F. R. Stermitz, R. A. Coulombe, Jr., *Carcinogenesis* **1995**, *16*, 2691; b) R. A. Coulombe, G. L. Drew, F. R. Stermitz, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1999**, *154*, 198.
- [11] J. M. Brown, A. Kooning, *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 178.
- [12] „Hypoxia-Selective Cytotoxins“: W. A. Denny in *Cancer Chemotherapeutic Agents* (Hrsg.: W. O. Foye), ACS Press, Washington, D.C., **1995**, Kap. 14, S. 483–500.
- [13] a) J. J. Tepe, R. M. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2951; b) S. B. Rollins, R. M. Williams, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4033.
- [14] Monocrotalin wurde bei Aldrich Chemical Co. erworben.
- [15] J. H. Cooley, E. J. Evain, *Synthesis* **1989**, 1. Die Verbindung **5** und ihr Regioisomer wurden als 1:2-Gemisch erhalten.<sup>[13a]</sup>
- [16] M. M. Paz, P. B. Hopkins, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 343.
- [17] T. R. Cech, *Biochemistry* **1981**, *20*, 1431.
- [18] P. N. Borer, *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, CRC Press, Boca Raton, FL, **1975**.
- [19] M. M. Paz, P. B. Hopkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5999.
- [20] a) R. M. Williams, S. R. Rajski, S. B. Rollins, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 127; b) S. R. Rajski, Dissertation, Colorado State University, **1997**.

## Erste katalytische asymmetrische Nitro-Mannich-Reaktion mit einem neuen Heterodimetallkomplex als Katalysator\*\*

Ken-ichi Yamada, Simon J. Harwood, Harald Gröger und Masakatsu Shibasaki\*

Die katalytische enantioselektive nucleophile Addition an Imine stellt auf dem Gebiet der Organischen Chemie immer noch eine Herausforderung dar. Zwar wurden zur Addition von Kohlenstoffnucleophilen an Carbonylverbindungen zahlreiche effiziente katalytische asymmetrische Verfahren entwickelt,<sup>[1]</sup> doch sind nur wenige Beispiele für Imine bekannt. Beachtenswerte und bedeutende Entwicklungen auf diesem Gebiet wurden hauptsächlich mit metallorganischen Reagenzien,<sup>[2,3]</sup> Silylketenacetalen<sup>[4]</sup> oder Allylstannanen<sup>[5]</sup> als Nucleophilen erreicht, und vor kurzem wurde über katalytische asymmetrische Strecker-Reaktionen berichtet.<sup>[6]</sup> Die katalytische asymmetrische Addition von Nitroalkanen an Imine, die wir als katalytische asymmetrische Nitro-Mannich-Reaktion bezeichnen, liefert chirale  $\beta$ -Nitroamine. Diese vielseitigen Verbindungen können problemlos in nützliche chirale Bausteine wie  $\alpha$ -Aminosäuren und 1,2-Diamine umgewandelt werden. Nach unserem Wissen ist bisher keine katalytische asymmetrische Nitro-Mannich-Reaktion bekannt.<sup>[7]</sup> Wir berichten hier über das erste Beispiel für eine derartige Reaktion.

Zunächst untersuchten wir diese Reaktion mit asymmetrischen Heterodimetallkomplexen, die sowohl eine Brønsted-Base- als auch eine Lewis-Säure-Funktionalität aufweisen. Diese Komplexe wurden in unserem Labor entwickelt und erwiesen sich für viele Arten asymmetrischer Reaktionen einschließlich katalytischer asymmetrischer Nitroaldolreaktionen als hocheffiziente Katalysatoren.<sup>[8]</sup> Daher schien es uns möglich, eine katalytische asymmetrische Nitro-Mannich-Reaktion entwickeln zu können. Unerwarteterweise erhielten wir bei Verwendung von üblichen Iminen wie *N*-Benzyliminen nur unbefriedigende Ergebnisse.<sup>[9]</sup> Bei früheren Arbeiten hatten wir allerdings festgestellt, daß  $P=O$ -Doppelbindungen das Zentralmetall eines Heterodimetallkomplexes koordinieren können,<sup>[10]</sup> und dies legte nahe, daß *N*-Phosphinylimine **1** besser geeignete Substrate für die anvisierte Reaktion sind. Die Synthese von Imin **1** nach bekannten Verfahren<sup>[11]</sup> erwies sich als unzureichend und veranlaßte uns, ein modifiziertes Verfahren zur Iminherstellung zu entwickeln.<sup>[12]</sup>

Beim Screening von Katalysatoren erwies sich der Komplex  $[YbK_3(\text{binaphthoxid})_3]$  (YbPB) als der beste Heterodimetallkatalysator für die Reaktion.<sup>[13]</sup> Beispielsweise wurde das Nitroamin **2a** durch Addition von Nitromethan an das Imin

[\*] Prof. Dr. M. Shibasaki, K.-i. Yamada, Dr. S. J. Harwood, Dr. H. Gröger  
Graduate School of Pharmaceutical Sciences  
The University of Tokyo  
Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033 (Japan)  
Fax: (+81) 3-5684-5206  
E-mail: mshibasa@mol.f.u-tokyo.ac.jp

[\*\*] H.G. und S.J.H. danken der Japanese Science and Technology Corporation (JST) bzw. der Japanese Society for the Promotion of Science (JSPS) für Postdoc-Stipendien.