

**Design, Synthese und biologische Evaluierung von
Pyrrolcarboxamiden mit Nucleobasen- oder tricyclischer Aromaten-
Funktion**

Dissertation zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

vorgelegt von
Christoph Matthias Keuser
geboren in Mainz

Dekan: Prof. Dr. R. Zentel

Tag der mündlichen Prüfung: 7.1.2005

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazie der Johannes Gutenberg - Universität Mainz auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. U. Pindur.

Herrn Prof. Dr. U. Pindur möchte ich an dieser Stelle für die Themenstellung, die zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen und Ratschläge, sowie die jederzeit gewährte Förderung und Unterstützung dieser Arbeit danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau U. Pister für die über einjährige praktische Mithilfe beim synthetischen Teil meiner Arbeit, bei Herrn Dr. D. Schollmeyer für die Hilfestellungen bei den Kristallisationsversuchen, bei Herrn H. Kolshorn für die Spezialmessungen von NMR-Spektren und nicht zuletzt bei Herrn Dr. Thomas „The Greatest“ Lemster für die moralische, fachliche und computertechnische Unterstützung über die komplette Dauer der Arbeit und das Korrekturlesen. Desweiteren danke ich Herrn Dr. C. Peifer, Frau S. Dieler und Frau S. Maehrlein für die Aufnahme der Massenspektren, Frau Dr. M. Jansen, Herrn Dr. A. Luxenburger, Herrn Dr. W. Kiefer, Herrn Dr. H. Ulbrich und Herrn Dr. C. Hotzel für zahlreiche fachliche Ratschläge und Frau I. Schoettle für die Anfertigung der Skizze der Sublimationsapparatur.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau W. Zeller, die mit ihrer herzlichen Art und tatkräftiger Unterstützung dazu beigetragen hat, mir die Promotionszeit so angenehm wie möglich zu machen.

Desweiteren danke ich Herrn Prof. Dr. C. Bailly, Frau Dr. A. Lansiaux und Frau M.-H. David vom Laboratory of Pharmacology, INSERM in Lille, Frankreich, für die Durchführung der biochemischen und biophysikalischen Assays und den umfangreichen Informationsaustausch per Email.

Zu guter letzt möchte ich auch meinen (z.T. ehemaligen) Arbeitskreiskollegen (Dr. J. Stratmann, Dr. A. Aygün, Dr. F. Mehrabani und K. Benzschawel), den Mitarbeitern des Instituts für Pharmazie sowie allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben danken.

Abkürzungen

AM1	Austin Model 1 (quantenchemischer Parametersatz)
BEC	Biological Evaluation Comitee
BOC	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
CDI	<i>N,N'</i> -Carbonyl-di-imidazol
CDMC	(Chloromethylen)dimethylammoniumchlorid
CT-DNA	Kalbthymus-DNA
ΔH_{f0}	Standardbildungsenthalpie
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ds	double strand
EA	Ethylacetat
EI-MS	Electron impact mass spectroscopy
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
FD-MS	Field desorption mass spectroscopy
GABA	γ -Aminobuttersäure
GI ₅₀	molare Konzentration einer Verbindung, die zu einer 50 %igen Zellwachstumshemmung führt
Hmbc	Heteronuclear multiple-bond correlation
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
Hp	Hydroxypyrrrol
Hünigs Base	Diisopropyl-ethylamin
IR	Infrarot-(Spektroskopie)
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
MeOH	Methanol
MEP	Molekulares elektrostatisches Potential
MG_MID	Mean Graph Midpoint

NCI	National Cancer Institute (Bethesda, MD, USA)
NMR	Nuclear magnetic resonance
NOE	Nuclear Overhauser Effect
PDB	Protein Datenbank
PE	Petrolether
PGp	P-Glycoprotein
PNA	Peptide Nucleic Acid
Py	Pyrrrol(carboxamid)
RT	Raumtemperatur
SC	Säulenchromatographie
SDS	Sodium dodecylsulfat
THF	Tetrahydrofuran
T _m	Schmelztemperatur der DNA
TOPO	Topoisomerase

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Struktur der DNA	1
1.2 Minor-Groove-Binder	3
1.3 Weiterentwicklungen der Naturstoffe Netropsin und Distamycin A	8
1.4 Peptide Nucleic Acids (PNAs)	16
1.5 Zielsetzung	20
2. Auswahlkriterien für Substituenten bei der Syntheseplanung der Pyrrolcarboxamide	23
2.1 C-terminale Seitenfunktion	23
2.2 Linker	24
2.3 N-terminale Funktionen	26
2.3.1 Nucleobasen	26
2.3.2 Interkalatoren und Photosensibilisatoren	26
3. Synthese und Strukturaufklärung der Pyrrolcarboxamide	26
3.1 Synthese der Pyrrolcarboxamide	26
3.2 Strukturaufklärung der Pyrrolcarboxamide	28
4. Synthese und Strukturaufklärung der Nucleobasen-alkancarbonsäuren	31
4.1 Darstellung der Uracil- und Thyminalkancarbonsäuren	31
4.1.1 Synthese der Uracilessigsäure	31
4.1.2 Synthese der Uracil- und Thyminbuttersäure	31
4.1.2.1 Strukturaufklärung von Thyminbuttersäureethylester	32

4.1.3	Synthese der Uracil- und Thyminpropionsäure	34
4.2	Besonderheiten bei der Synthese von Adenin- alkancarbonsäuren	34
4.2.1	Einführen der Anisoyl-Schutzgruppe	35
4.2.2	Abspaltung der Schutzgruppe	37
4.2.3	Löslichkeitsvermittlung durch Pyridiniumchlorid	38
4.2.4	Darstellung der Adeninalkancarbonsäuren	38
4.2.4.1	Strukturaufklärung der beiden Regioisomeren von Adeninbuttersäureethylester	39
5.	Darstellung von Pyrrolcarboxamiden mit Nucleobasenalkancarbonsäuren als N-terminaler Funktion	46
5.1	Auswahl des geeigneten Kupplungsverfahrens	46
5.1.1	Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 1-Hydroxy- benzotriazol (HOBt) als Reagenzien	46
5.1.2	1-Methyl-2-chlor-pyridiniumiodid (Methode nach Mukaiyama)	48
5.1.3	Chlorameisensäureethylester	49
5.2	Darstellung der Carboxamide	50
5.2.1	Amid-Kupplung der Thymin- und Uracil- alkancarbonsäuren	50
5.2.2	Amid-Kupplung der Adeninalkancarbonsäuren	50
6.	Zellbiologische Zytotoxizitäts-Studien und bio- physikalische, biochemische Untersuchungen an der DNA	52
6.1	Zellbiologische NCI-Testungen und deren Ergebnisse	52
6.2	Beschreibung der verwendeten biophysikalischen und biochemischen Verfahren	55
6.2.1	Thermische Denaturierung/Bestimmung der Schmelztemperatur der DNA (ΔT_m -Wert)	55

6.2.2	DNA-Relaxations-Assay/Topoisomerase-Hemmtest	55
6.2.3	Circulardichroismus (CD)	58
6.2.4	UV-Absorptionsspektroskopie	59
6.3	Ergebnisse der biophysikalischen und biochemischen Verfahren	60
6.4	Interpretation der Ergebnisse	61
7.	Versuche zur Darstellung von Acridon-, Acridin-, Iminostilben- und (Nitro-)Naphthalimid- N-terminal gekoppelten Pyrrolcarboxamiden	63
7.1	Acridon	64
7.1.1	Darstellung der Acridoncarbonsäuren	65
7.2	Acridin	66
7.2.1	Darstellung der Acridinpropionsäure	69
7.3	Iminostilben	70
7.3.1	Darstellung der Iminostilbenbuttersäure	71
7.4	(Nitro-)Naphthalimid	72
7.4.1	Darstellung des 5-Nitronaphthalimids	74
7.4.2	Darstellung der (5-Nitro-)Naphthalimidbuttersäure	74
7.4.3	Strukturaufklärung des Naphthalimidbuttersäure- ethylesters (76)	75
7.4.4	Strukturaufklärung des 5-Nitronaphthalimid- buttersäureethylesters (78)	77
7.5	Darstellung der Combilexine	79
8.	Zellbiologische Zytotoxizitäts-Studien und bio- physikalische, biochemische Untersuchungen an der DNA	81
8.1	Zellbiologische NCI-Testungen und deren Ergebnisse	81
8.2	Beschreibung der verwendeten biophysikalischen und biochemischen Verfahren (s. 6.2)	84

8.3	Ergebnisse der biophysikalischen und biochemischen Verfahren	84
8.4	Interpretation der Ergebnisse	86
9.	Darstellung von Anthrachinon- und Acridin-gekoppelten Pyrrolcarboxamiden und weitere Syntheseveruche	89
9.1	Anthrachinon	89
9.1.1	Darstellung der Anthrachinonsulfonamid- und carbonsäureamid-gekoppelten Pyrrolcarboxamide mit GABA bzw. β -Alanin als Linker	91
9.2	Acridin - weitere Versuchsstrategien	94
9.3	Weitere Syntheseveruche	95
9.3.1	Synthese von 2-Chlor-, 2-Brom- und 2-Nitroacridon	96
10.	Zellbiologische Zytotoxizitäts-Studien und biophysikalische, biochemische Untersuchungen an der DNA	98
10.1	Zellbiologische NCI-Testungen und deren Ergebnisse	98
10.2	Beschreibung der verwendeten biophysikalischen und biochemischen Verfahren (s. 6.2)	100
10.3	Ergebnisse der biophysikalischen und biochemischen Verfahren	100
10.4	Interpretation der Ergebnisse	101
10.5	Testung von ausgewählten Verbindungen auf antibiotische und antimykotische Aktivität	102
11.	Molecular Modelling Studien auf der Basis von semiempirischen Berechnungen; Vergleich der Ergebnisse ausgewählter Verbindungen mit den experimentellen Datensätzen	103

11.1	Berechnung der Konformation der ausgewählten Moleküle	103
11.2	Vergleich von Konformation, molekularem elektrostatischen Potential und LUMO der ausgewählten Moleküle mit den zellbiologischen und biophysikalischen, biochemischen Daten	110
11.3	Bilanz der SPARTAN-Berechnungen	112
12.	Versuche der Kristallisation von ausgewählten Verbindungen für mögliche Röntgenstrukturanalysen	115
12.1	Verdunstungsmethode	115
12.2	Sublimation	116
12.3	„Hanging-Drop“-Methode	117
13.	Zusammenfassung und Ausblick	118
14.	Experimenteller Teil	123
14.1	Allgemeine Angaben	123
14.2	Synthesevorschriften	125
14.2.1	2,2,2-Trichloro-1-(1-methyl-1 <i>H</i> -2-pyrrolyl)-1-ethanon (13)	125
14.2.2	2,2,2-Trichloro-1-(1-methyl-4-nitro-1 <i>H</i> -2-pyrrolyl)-1-ethanon (14)	125
14.2.3	<i>N</i> 2-[3-(dimethylamino)propyl]-1-methyl-4-nitro-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (15)	126
14.2.4	<i>N</i> 2-[5-({[3-(dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]-1-methyl-4-nitro-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (16)	126
14.2.5	<i>N</i> 2-[5-({[3-(dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]-1-methyl-4-([(1-methyl-4-nitro-1 <i>H</i> -pyrrolyl)carbonyl]-amino)1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (16a)	127

14.2.6.1	2-{6-[Di(4-methoxybenzoyl)amino]-9 <i>H</i> -9-purinyl} essigsäure (19)	127
14.2.6.2	<i>N</i> 2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]-4-{{(2-(6-[4-methoxybenzoyl]amino)-9 <i>H</i> -9-purinyl)acetyl)amino]-1-methyl-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (21)	128
14.2.6.3	<i>N</i> 2-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-[(2-{6-[4-methoxybenzoyl]amino]-9 <i>H</i> -9-purinyl)acetyl)amino]-1-methyl-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (20)	129
14.2.6.4	<i>N</i> 2-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-{{(2-(6-amino-9 <i>H</i> -9-purinyl)acetyl)amino]-1-methyl-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (22)	130
14.2.7	3-(5-Methyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl) propionsäureethylester (27)	131
14.2.8	4-(5-Methyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl) buttersäureethylester (31)	132
14.2.9	2-(2,4-Dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)essigsäure (17)	133
14.2.10	3-(2,4-Dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl) propionsäureethylester (26)	134
14.2.11	4-(2,4-Dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl) buttersäureethylester (30)	135
14.2.12	3-(6-Amino-9 <i>H</i> -9-purinyl)propionsäureethylester (34)	135
14.2.13	4-(6-Amino-9 <i>H</i> -9-purinyl)buttersäureethylester (24)	136
14.2.14	Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Darstellung der Nucleobasenalkancarbonsäuren durch Hydrolyse ihrer Ester	137
14.2.14.1	3-(5-Methyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl) propionsäure (29)	137
14.2.14.2	4-(5-Methyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl) buttersäure (33)	138
14.2.14.3	3-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl) propionsäure (28)	138

14.2.14.4	4-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl) buttersäure (32)	139
14.2.14.5	3-(6-Amino-9 <i>H</i> -9-purinyl)propionsäure (35)	140
14.2.14.6	4-(6-Amino-9 <i>H</i> -9-purinyl)buttersäure (36)	140
14.2.15	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der Pyrrolcarboxamide mit Thymin- und Uracilalkancarbonsäuren als Strukturelementen	141
14.2.15.1	<i>N</i> 2-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-methyl-4-{{2-(5-methyl- 2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)acetyl]amino}- 1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (38)	141
14.2.15.2	<i>N</i> 2-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-methyl-4-{{3-(5-methyl- 2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)propanoyl] amino}-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (41)	142
14.2.15.3	<i>N</i> 2-[5-({3-(Dimethylamino)propyl]amino)carbonyl]-1- methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]-1-methyl-4-{{3-(5-methyl-2,4-dioxo- 1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)propanoyl]amino}-1 <i>H</i> -2- pyrrol-carboxamid (42)	143
14.2.15.4	<i>N</i> 2-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-methyl-4-{{4-(5-methyl- 2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)butanoyl] amino}-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (45)	144
14.2.15.5	<i>N</i> 2-[5-({3-(Dimethylamino)propyl]amino)carbonyl]-1- methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]-1-methyl-4-{{4-(5-methyl-2,4-dioxo- 1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)butanoyl]amino}-1 <i>H</i> -2- pyrrol-carboxamid (46)	145
14.2.15.6	<i>N</i> 2-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-methyl-4-{{2-(2,4-dioxo- 1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)acetyl]amino}-1 <i>H</i> -2-pyrrol- carboxamid (37)	146
14.2.15.7	<i>N</i> 2-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-methyl-4-{{3-(2,4-dioxo- 1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)propanoyl]amino}-1 <i>H</i> -2- pyrrol-carboxamid (39)	147
14.2.15.8	<i>N</i> 2-[5-({3-(Dimethylamino)propyl]amino)carbonyl]-1- methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]-1-methyl-4-{{3-(2,4-dioxo-1,2,3,4- tetrahydro-1-pyrimidinyl)propanoyl]amino}-1 <i>H</i> -2-pyrrol- carboxamid (40)	148

14.2.15.9	<i>N</i> 2-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-methyl-4-[[4-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)butanoyl]amino]-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (43)	149
14.2.15.10	<i>N</i> 2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]-1-methyl-4-[[4-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)butanoyl]amino]-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (44)	150
14.2.16	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der Pyrrolcarboxamide mit Adeninalkancarbonsäuren als Strukturelementen	151
14.2.16.1	<i>N</i> 2-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-[[3-(6-amino-9 <i>H</i> -9-purinyll)propanoyl]amino]-1-methyl-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (47)	151
14.2.16.2	<i>N</i> 2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]-4-[[3-(6-amino-9 <i>H</i> -9-purinyll)propanoyl]amino]-1-methyl-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (48)	152
14.2.16.3	<i>N</i> 2-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-[[4-(6-amino-9 <i>H</i> -9-purinyll)butanoyl]amino]-1-methyl-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (49)	153
14.2.16.4	<i>N</i> 2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]-4-[[4-(6-amino-9 <i>H</i> -9-purinyll)butanoyl]amino]-1-methyl-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (50)	154
14.2.17	2-(9-Oxo-9,10-dihydro-10-acridinyl)essigsäureethylester (51)	155
14.2.18	2-(9-Oxo-9,10-dihydro-10-acridinyl)essigsäure (52)	156
14.2.19	3-(9-Oxo-9,10-dihydro-10-acridinyl)propionsäure-ethylester (53)	157
14.2.20	4-(9-Oxo-9,10-dihydro-10-acridinyl)buttersäureethylester (55)	158
14.2.21	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der Acridonpropion und -buttersäure durch Hydrolyse ihrer Ester	158
14.2.21.1	3-(9-Oxo-9,10-dihydro-10-acridinyl)propionsäure (54)	159
14.2.21.2	4-(9-Oxo-9,10-dihydro-10-acridinyl)buttersäure (56)	159

14.2.22	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der Pyrrolcarboxamide mit Acridonalkancarbonsäuren als Strukturelementen	160
14.2.22.1	<i>N</i> 2-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-methyl-4-{{2-(9-oxo-9,10- dihydro-10-acridinyl)acetyl]amino}-1 <i>H</i> -2-pyrrol- carboxamid (79)	160
14.2.22.2	<i>N</i> 2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1- methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]-1-methyl-4-{{2-(9-oxo-9,10-dihydro- 10-acridinyl)acetyl]amino}-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (80)	161
14.2.22.3	<i>N</i> 2-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-methyl-4-{{3-(9-oxo-9,10- dihydro-10-acridinyl)propanoyl]amino}-1 <i>H</i> -2-pyrrol- carboxamid (81)	162
14.2.22.4	<i>N</i> 2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1- methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]-1-methyl-4-{{3-(9-oxo-9,10-dihydro- 10-acridinyl)propanoyl]amino}-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (82)	163
14.2.22.5	<i>N</i> 2-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-methyl-4-{{4-(9-oxo-9,10- dihydro-10-acridinyl)butanoyl]amino}-1 <i>H</i> -2-pyrrol- carboxamid (83)	164
14.2.22.6	<i>N</i> 2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1- methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]-1-methyl-4-{{4-(9-oxo-9,10-dihydro- 10-acridinyl)butanoyl]amino}-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (84)	165
14.2.23	3-(9-Acridinyl)propionsäure (64)	167
14.2.24	4-(5 <i>H</i> -Dibenzo[<i>b,f</i>]azepin-5-yl)buttersäure (66)	168
14.2.25	<i>N</i> 2-[5-({[3-(dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1- methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]-4-{{4-(5 <i>H</i> -dibenzo[<i>b,f</i>]azepin-5- yl)butanoyl]amino}-1-methyl-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (85)	169
14.2.26	4-(1,3-Dioxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benzo[<i>d,e</i>]isochinolin-2- yl)buttersäureethylester (76)	170
14.2.27	4-(1,3-Dioxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benzo[<i>d,e</i>]isochinolin-2- yl)buttersäure (78)	171

14.2.28	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der Pyrrolcarboxamide mit Naphthalimidbuttersäure als Strukturelement	171
14.2.28.1	<i>N</i> 2-[3-(Dimethylamino)propyl]4-[[4-(1,3-dioxo-2,3-dihydro- 1 <i>H</i> -benzo[<i>d,e</i>]isochinolin-2-yl)butanoyl]amino]-1-methyl- 1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (86)	172
14.2.28.2	<i>N</i> 2-[5-([3-(Dimethylamino)propyl]amino)carbonyl]-1- methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]-4-[[4-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> - benzo[<i>d,e</i>]isochinolin-2-yl)butanoyl]amino]-1-methyl- 1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (87)	173
14.2.29	5-Nitro-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benzo[<i>d,e</i>]isochinolin-1,3-dion (74)	174
14.2.30	4-(5-Nitro-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benzo[<i>d,e</i>]isochinolin- 2-yl)buttersäureethylester (75)	174
14.2.31	4-(5-Nitro-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -benzo[<i>d,e</i>]isochinolin- 2-yl)buttersäure (77)	175
14.2.32	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der Pyrrolcarboxamide mit 5-Nitro-naphthalimidbuttersäure als Strukturelement	176
14.2.32.1	<i>N</i> 2-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-[[4-(5-nitro-1,3-dioxo-2,3- dihydro-1 <i>H</i> -benzo[<i>d,e</i>]isochinolin-2-yl)butanoyl]amino]-1- methyl-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (88)	176
14.2.32.2	<i>N</i> 2-[5-([3-(Dimethylamino)propyl]amino)carbonyl]-1- methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]-4-[[4-(5-nitro-1,3-dioxo-2,3-dihydro- 1 <i>H</i> -benzo[<i>d,e</i>]isochinolin-2-yl)butanoyl]amino]-1- methyl-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (89)	178
14.2.33	9,10-Dioxo-9,10-dihydro-2-anthracensulfonsäurechlorid (100c)	179
14.2.34	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der mit BOC- geschützten GABA- und β -Alanin-funktionalisierten Monopyrrol- und Bispyrrol-carboxamide	179
14.2.34.1	<i>tert.</i> -Butyl <i>N</i> -(4-[[5-([3-(dimethylamino)propyl]amino) carbonyl]-1-methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]amino]-4-oxobutyl) carbammat (101a)	179

14.2.34.2	<i>tert.</i> -Butyl <i>N</i> -(4-([5-([3-(dimethylamino)propyl]amino)carbonyl]-1-methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]amino)carbonyl)-1-methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]amino)-4-oxobutyl)carbamat (103a)	180
14.2.34.3	<i>tert.</i> -Butyl <i>N</i> -(3-([5-([3-(dimethylamino)propyl]amino)carbonyl]-1-methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]amino)-3-oxopropyl)carbamat (100a)	181
14.2.34.4	<i>tert.</i> -Butyl <i>N</i> -(3-([5-([3-(dimethylamino)propyl]amino)carbonyl]-1-methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]amino)carbonyl)-1-methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]amino)-3-oxopropyl)carbamat (102a)	182
14.2.35	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Abspaltung der BOC-Schutzgruppe bei den Verbindungen 100a-103a	183
14.2.35.1	<i>N</i> 2-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-[(4-amino-butanoyl)amino]-1-methyl-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (101b)	183
14.2.35.2	<i>N</i> 2-[5-([3-(Dimethylamino)propyl]amino)carbonyl]-1-methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]-4-[(4-aminobutanoyl)amino]-1-methyl-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (103b)	184
14.2.35.3	<i>N</i> 2-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-[(3-amino-propanoyl)amino]-1-methyl-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (100b)	184
14.2.35.4	<i>N</i> 2-[5-([3-(Dimethylamino)propyl]amino)carbonyl]-1-methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]-4-[(3-aminopropanoyl)amino]-1-methyl-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (102b)	185
14.2.36	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Kupplung von 100c mit den Verbindungen 100b-103b	185
14.2.36.1	<i>N</i> 2-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-[(4-[(9,10-dioxo-9,10-dihydro-2-anthracenyl)sulfonyl]amino)butanoyl)amino]-1-methyl-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (101)	186
14.2.36.2	<i>N</i> 2-[5-([3-(Dimethylamino)propyl]amino)carbonyl]-1-methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]-4-[(4-[(9,10-dioxo-9,10-dihydro-2-anthracenyl)sulfonyl]amino)butanoyl)amino]-1-methyl-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (103)	187
14.2.36.3	<i>N</i> 2-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-[(3-[(9,10-dioxo-9,10-dihydro-2-anthracenyl)sulfonyl]amino)propanoyl]amino]-1-methyl-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (100)	188

14.2.36.4	<i>N</i> 2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]-4-[(3-{{(9,10-dioxo-9,10-dihydro-2-anthracenyl)sulfonyl]amino}propanoyl)amino]-1-methyl-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (102)	189
14.2.37	9,10-Dioxo-9,10-dihydro-2-anthracencarbonsäurechlorid (104a)	190
14.2.38	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Kupplung von 104a mit den Verbindungen 100b und 101b	191
14.2.38.1	<i>N</i> 2-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-[(4-{{(9,10-dioxo-9,10-dihydro-2-anthracenyl)carbonyl]amino}butanoyl)amino]-1-methyl-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (105)	191
14.2.38.2	<i>N</i> 2-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-[(3-{{(9,10-dioxo-9,10-dihydro-2-anthracenyl)carbonyl]amino}propanoyl)amino]-1-methyl-1 <i>H</i> -2-pyrrol-carboxamid (104)	192
14.2.39	Acridin-9-carbonsäurechlorid (106a)	193
14.2.40	Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Kupplung von 106a mit den Verbindungen 100b und 102b	193
14.2.40.1	<i>N</i> 9-(3-{{[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]amino}-3-oxopropyl)-9-acridin carboxamid (106)	194
14.2.40.2	<i>N</i> 9-(3-{{[5-({[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1 <i>H</i> -3-pyrrolyl]amino}-3-oxopropyl)-9-acridincarboxamid (107)	195
	Literaturverzeichnis	196
	Lebenslauf	199
	Formeltafel	200

1 Einleitung

Krebs ist zusammen mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigste Todesursache in Industrienationen. Alleine in Deutschland gibt es jährlich 350.000 - 400.000 Neuerkrankungen ^[1]. Die Entstehung beruht darauf, dass es durch Umwelteinflüsse (ionisierende Strahlung, Chemikalien, Ernährung, Tumoviren, etc.), unter Umständen verbunden mit vererbten genetischen Defekten zur Modifikation und anschließenden Mutation von Proto-Onkogenen zu Onkogenen bzw. zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen kommt, was zu einer ungehemmten Teilung von Zellen führt.

Aufgrund der genetischen Krankheitsursache steht bei der Pharmakotherapie neben zahlreichen anderen Targets wie z.B. im Tumor vermehrt gebildeten Proteinen (z.B. Topoisomerasen) folglich der direkte Angriff an der DNA im Vordergrund. Bei den heute in der Klinik eingesetzten DNA-bindenden Arzneistoffen lässt allerdings die Selektivität des Angriffs noch sehr zu wünschen übrig, was aufgrund der Schädigung gesunden Gewebes mit einer hohen Toxizität und damit starken Nebenwirkungen einhergeht. Die selektive Hemmung der Transkription defekter Gene und damit die Kontrolle der Genexpression durch sequenzspezifischen Angriff an der DNA ist deshalb ein attraktives und innovatives Forschungsgebiet geworden.

1.1 Struktur der DNA

Die DNA ist einer der bestuntersuchten Rezeptoren für Arzneistoffe überhaupt. Sie besteht aus 2 rechtshändigen antiparallel verlaufenden helikalen Ketten, die eine Doppelhelix bilden. Jede Kette besteht aus einem Rückgrat aus Desoxyribosen, die am 3'-und 5'-Ende über Phosphodiestergruppen miteinander verknüpft sind. Am Zuckeranteil sind N-glykosidisch Purin- (Adenin, Guanin) und Pyrimidin- (Thymin, Cytosin) Basen gebunden. Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin paaren sich jeweils über 2 bzw. 3 Wasserstoffbrückenbindungen und sind für den energetischen Zusammenhalt der beiden Ketten verantwortlich ^[2]. Neben der hier beschriebenen und in Abbildung 1.1 (S. 2) dargestellten physiologisch relevantesten Konformation der DNA, der B-DNA, gibt es auch noch A- und Z-DNA, die aber beim Angriff von Zytostatika in der Zelle keine Bedeutung haben.

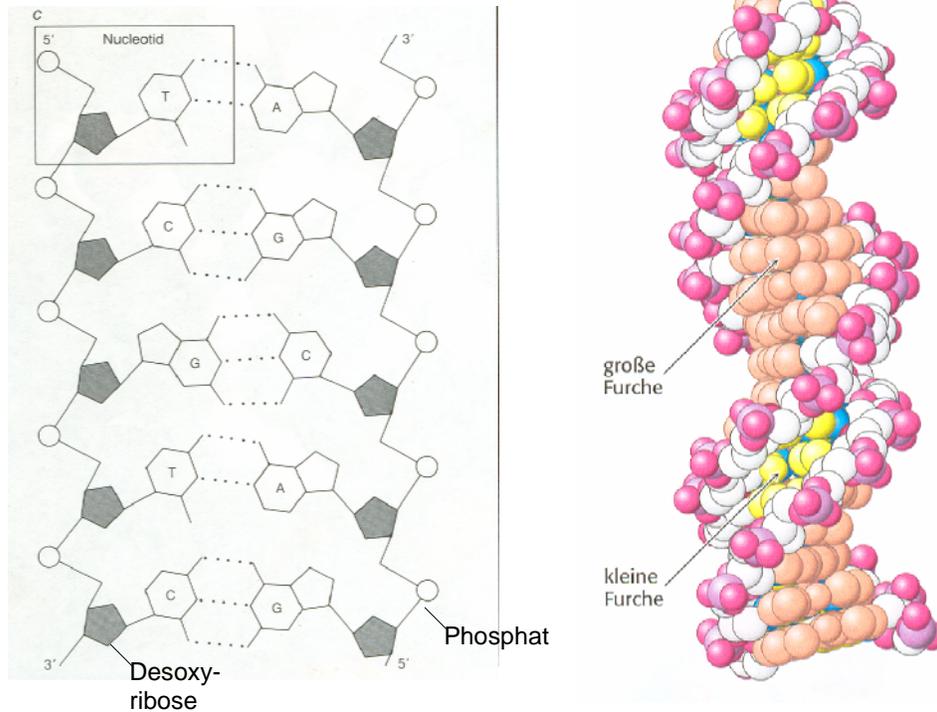


Abb. 1.1: Schematischer molekularer Aufbau der B-DNA (links) und Kalottenmodell der Doppelhelix (rechts; die große Furche ist orange, die kleine gelb dargestellt; die Kohlenstoffatome im Molekülrückgrat sind weiß).

Für die natürlichen Funktionen der DNA unverzichtbar ist die in der Abbildung 1.1 zu erkennende große Rinne/Furche (Major Groove). An dieser greifen Transkriptionsfaktoren, Promotionsrepressoren und Kontrollproteine an, um die Übersetzung der genetischen Information in Proteine zu regulieren.

Die Bindung an die kleine Rinne/Furche (Minor Groove) ist hingegen neben Interkalation (Einlagerung eines planaren polycyclischen aromatischen Chromophors zwischen übereinanderliegende [= gestapelte] Basenpaare durch Charge-Transfer-Wechselwirkungen^[3]; intercalare = dazwischenschieben) und Alkylierung (kovalente Bindung eines Moleküls an die DNA-Basen) der dritte und wichtigste Bindungstyp für sogenannte „small molecules“ an der DNA.

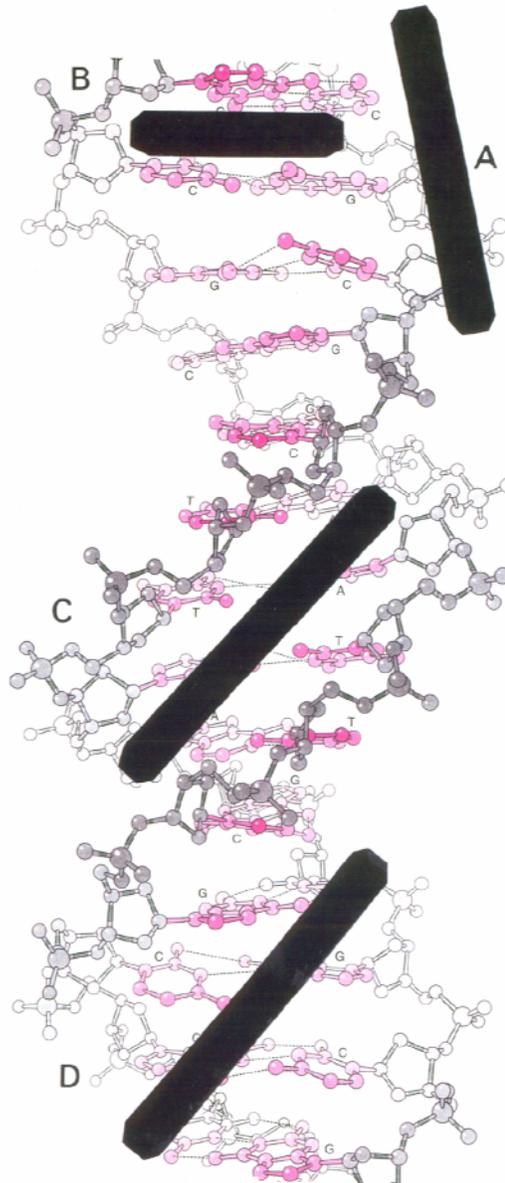


Abb. 1.2: Die Abbildung zeigt die verschiedenen Bindungsarten von Wirkstoffen an die B-DNA:
 A: unspezifische Bindung von außen; B: Interkalation; C: Minor-Groove-Binding; D: Major Groove Binding ^[4].

1.2 Minor-Groove-Binder

Die Minor-Groove-Binder sind eine strukturell heterogene Gruppe von Molekülen, die sich über nicht-kovalente Wechselwirkungen an die kleine Rinne der DNA anlagern. Allen ist gemein, dass sie eine isohelicale Konformation annehmen, die sich der Krümmung der kleinen Rinne anpasst, um in vielen Fällen sequenzspezifisch an ihr Target binden zu können.

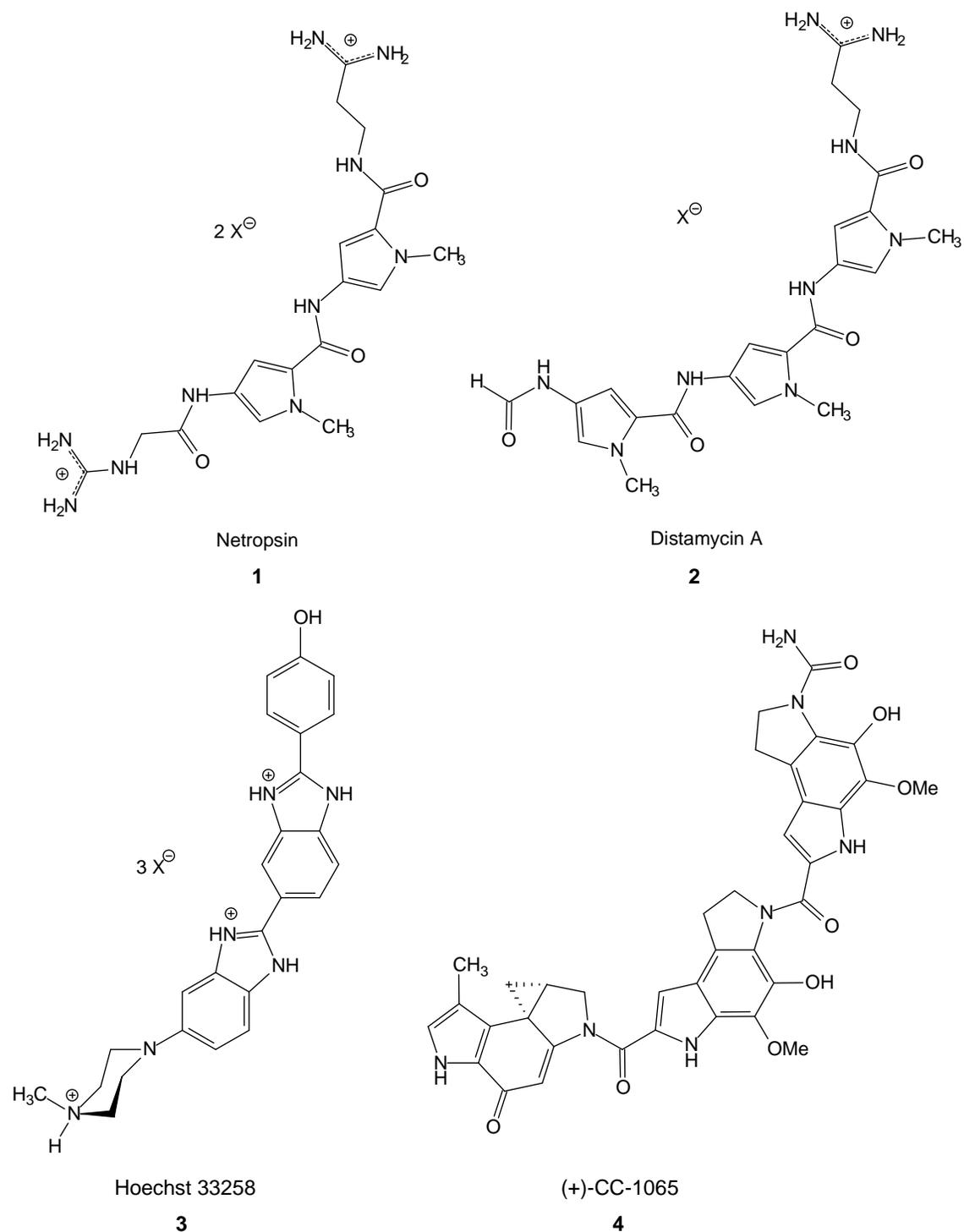


Abb. 1.3: natürlich vorkommende Minor-Groove-Binder ^[2]

Die schwach antitumoral und antiviral wirksamen Naturstoffe der Oligopyrrolcarboxamidreihe Netropsin **1** und Distamycin A **2** (aus *Streptomyces netropsis* (1959) bzw. *distallicus* (1964) isoliert) waren die ersten entdeckten Minor-

Groove-Binder, die selektiv an Adenin-Thymin (AT)-reiche Regionen der DNA binden ^[5]. Heute weiß man, dass dies bei den meisten Minor Groove Bindern der Fall ist. Die Gründe hierfür sind, dass zum einen AT-reiche Regionen der DNA räumlich enger sind, was eine stärkere Fixierung des Liganden ermöglicht, und zum anderen in der kleinen Rinne am N-3 des Adenins das elektrostatische Potential einen negativen Ladungsschwerpunkt aufweist, wodurch es zu einer guten elektrostatischen Interaktion mit dem biskationischen Netropsin bzw. mit den auf der konkaven Seite im allgemeinen elektronenarmen Minor-Groove Bindern kommt ^[6]. Außerdem zeichnen sich Guanin-Cytosin (GC)-reiche Regionen durch eine geringere konformative Flexibilität aus, was sehr passgenaue Moleküle erfordert ^[7]. Hierbei muss insbesondere die Aminogruppe an C-2 des Guanins beachtet werden, die für eine sterische Behinderung zahlreicher Liganden verantwortlich ist.

Abbildung 1.4 zeigt die Konformation der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Leitstruktur Netropsin **1** in der Bindegeometrie im Vergleich zu der von Netropsin alleine. Beim gebundenen Netropsin (**A**) ist infolge des induced-fit-Effektes eine stärkere Streckung erkennbar, um die oben erwähnte isohelicale Konformation anzunehmen. Energetisch unterscheiden sich die beiden Konformationen allerdings nur geringfügig ($\Delta_{Hf0} = 29.932$ kcal/mol und 27.88 kcal/mol; nach SPARTAN-AM1-Rechnung ^[8]).

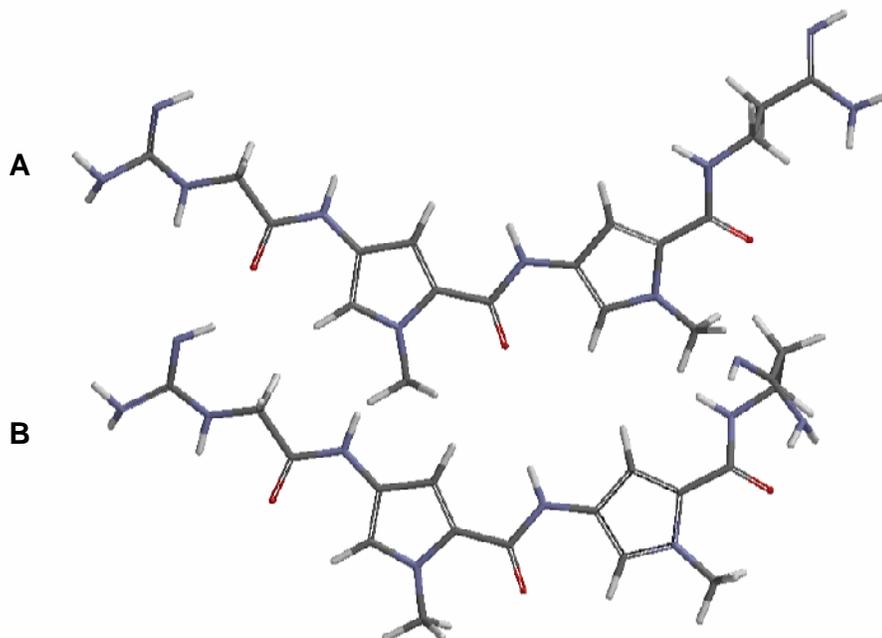


Abb. 1.4: A Kristallstruktur von Netropsin **1** in der Bindegeometrie (hier alleine abgebildet; ursprünglich gebunden an Sequenz 5'-CGCGAATTCGCG-3') ^[9]

B Kristallstruktur von Netropsin ohne DNA ^[10].

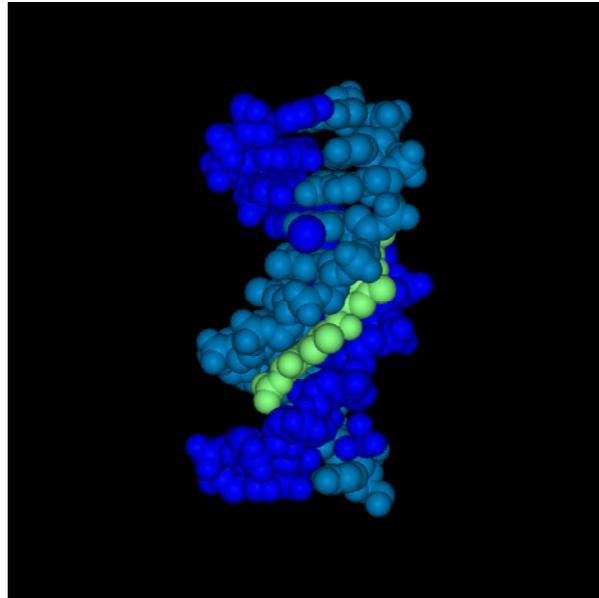


Abb. 1.5: Kristallstruktur von Netropsin gebunden an 5'-CGCGAATTCGCG-3' (Darstellung als Kalottenmodell). Netropsin ist hier grün gefärbt.

Der Bindungsprozess kann in 2 Stufen unterteilt werden:

1. hydrophober Transfer des Netropsins in die Rinne unter Freisetzung von Wasser und Gegenionen
2. Ausbildung molekularer Wechselwirkungen

Während elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen die Stabilität des Komplexes gewährleisten und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Thymin-O-2/Adenin-N-3 und Amid-NH-Gruppen des Netropsins für die Positionierung des Moleküls sorgen, sind *van der Waals*-Kräfte zwischen den Methylen- oder Pyrrol-CH-Gruppen des Netropsins und den Adenin-C-2-Atomen verantwortlich für die Sequenzspezifität der Bindung ^[4,11,12] (s. Abbildung 1.7, S. 7).

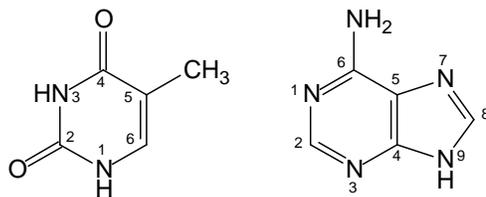


Abb. 1.6: Zählweise bei den DNA-Basen Thymin und Adenin.

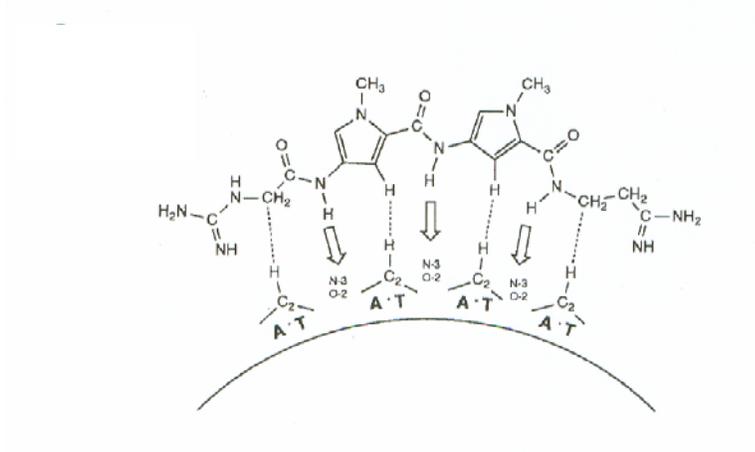


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der van der Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Netropsin und Poly-dAT-DNA ^[11]. Netropsin bindet an die kleine Rinne an eine Sequenz von 4 Basenpaaren.

1.3 Weiterentwicklungen der Naturstoffe Netropsin und Distamycin A

In den letzten 2 Jahrzehnten gab es zahlreiche Bemühungen, durch synthetische Abwandlung der Naturstoffe Netropsin/Distamycin A eine Erhöhung der antitumoralen Aktivität und der Sequenzselektivität zu erreichen. Dabei wurden primär 2 Ziele verfolgt:

1. die Entwicklung von zytotoxischen Wirkstoffen mit relativ geringem Molekulargewicht (z.B. Combilexine)
2. das Design von supramolekularen Verbindungen als Werkzeuge für die Molekularbiologie (z.B. Hairpins)

Zu 1:

Als **Combilexine** (von lat. legere = lesen) bezeichnet man sequenzspezifisch bindende Minor-Groove Binder, die mit einem Interkalator verknüpft sind und deshalb einen dualen Bindungsmodus an der DNA zeigen ^[11]. Pioniere auf dem Gebiet der Synthese solcher Moleküle waren Krivtsova ^[13] und Dervan ^[12]. Ersterer verknüpfte, basierend auf dem natürlichen Combilexin Actinomycin D **5** (s. Abbildung 1.8, S. 9), 1-3 N-Methylpyrrol-Einheiten mit den Positionen 1 und 9 des Interkalators Phenoxazon und nannte die Produkte Distactins.

Dervan modifizierte diese Moleküle wie z.B. das dimere Hybridsystem **6** (s. Abbildung 1.9, S. 9) durch Einfügen eines Glycin-Linkers und zeigte mittels DNA-Affinity-Cleaving-Assay einen selektiven Angriff an der Sequenz 5'-TATAGGTTAA-3'. Da Interkalatoren in der Regel in GC-reichen Regionen binden, weil hier die kleine Rinne zum einen elektronenreicher und zum anderen weiter und damit die Möglichkeit des Einschlebens zwischen die Basen größer ist ^[14], legt dieses Ergebnis eine zentrale Interkalation des Phenoxazons mit flankierendem Minor-Groove-Binding der beiden Distamycin-Anteile nahe ^[12].

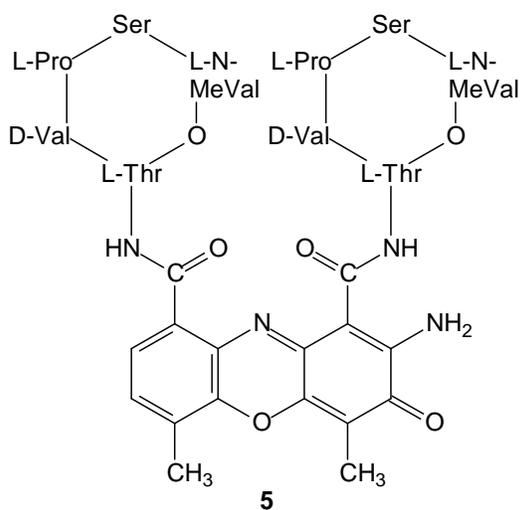


Abb. 1.8: Actinomycin D; Phenoxazon-Ring interkaliert in die DNA, die beiden cyclischen Pentapeptidketten binden oberhalb und unterhalb in der kleinen Rinne.

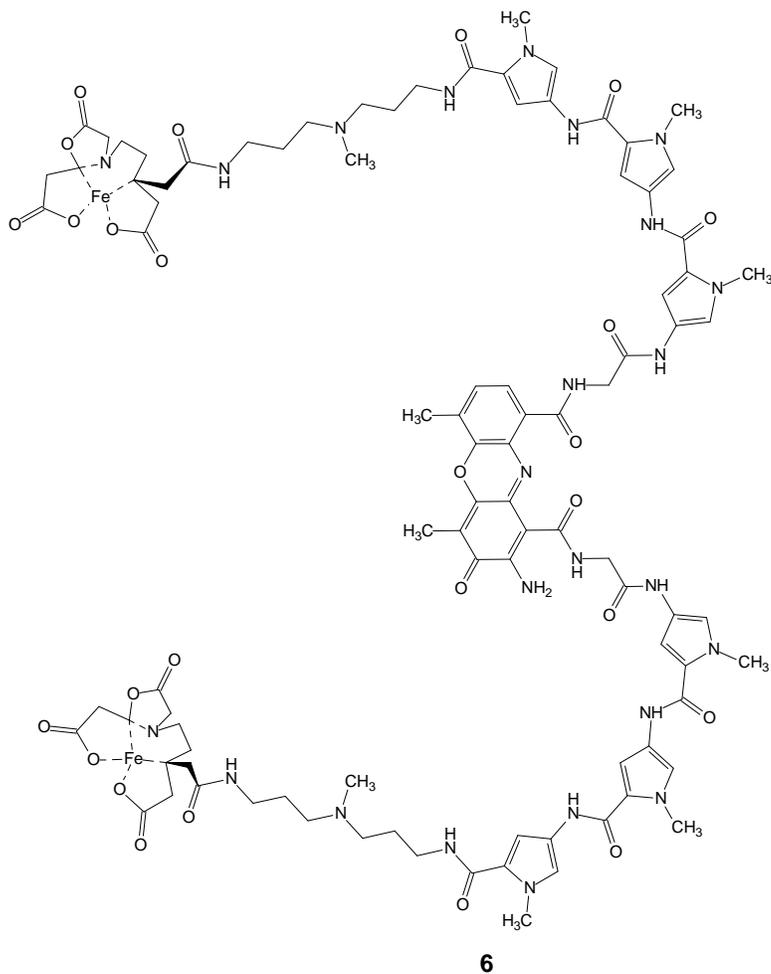


Abb. 1.9: Ein von Dervan synthetisiertes modifiziertes Distactin. Der zentrale Interkalator Phenoxazon wird flankiert von 2 Oligopyrrolketten, die in der Minor Groove binden. Die Eisenchelate-Komplexe verstärken die DNA-Schädigung über Sauerstoff-Radikal-Bildung.

Diese grundlegenden Arbeiten führten zur Synthese der verschiedensten Combilexine durch mehrere Arbeitsgruppen. Einige Beispiele zeigt Abbildung 1.10.

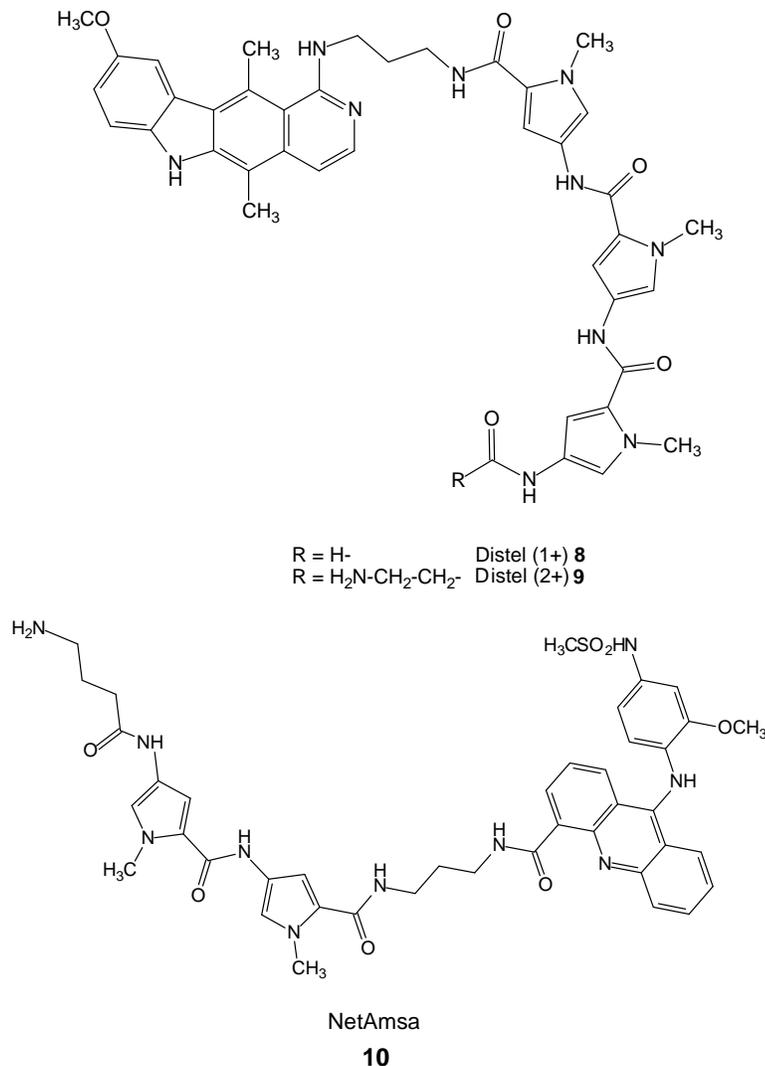


Abb. 1.10: Beispiele für synthetische Combilexine ^[11].

Die Antitumoraktivität der Combilexine ist aber nicht alleine auf die Interaktion mit der DNA zurückzuführen. Vielmehr konnte bei den meisten Verbindungen eine Inhibition der Topoisomerase I nachgewiesen werden ^[15-17]. Dieses Enzym relaxiert die DNA durch Einzelstrangbrüche, um Replikation oder Transkription zu ermöglichen. Durch Hemmung der Religation der durchtrennten Stränge (*TOPO-Poisons*) kommt es zum Absterben der Zelle ^[16]. Sogenannte *TOPO-Suppressors*, die nur den Angriff der Enzyme an der DNA hemmen, zeigten dagegen keinen klinischen Effekt ^[18].

Neben Interkalatoren wurden Netropsin- und Distamycin A-Analoga auch an Alkylantien, photosensitive Gruppen, Metall-Komplexe und Ene-diyne-Antibiotika gekuppelt ^[11] (allgemeine Bezeichnung für solche Verbindungen: „Hybridmoleküle“). Das Ziel war auch in diesen Fällen die Erhöhung der Selektivität und damit Senkung der Toxizität von bekannten zytotoxischen Verbindungen.

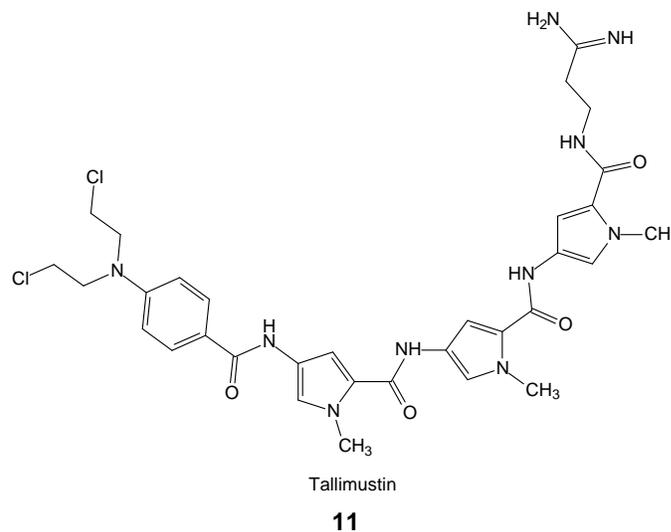


Abb. 1.11: Hybridmolekül aus Distamycin A und einem N-Lost-Derivat

Zu 2:

Um Werkzeuge für die Molekularbiologie zu erhalten, war man bestrebt Moleküle zu entwickeln, die nicht nur wie Netropsin oder die meisten Combilexine selektiv an AT-reiche Regionen der DNA binden, sondern tatsächlich zwischen allen 4 Basen differenzieren können. Die Bezeichnung **Lexitropsin** wurde in diesem Zusammenhang das erste Mal von Dickerson verwendet ^[19] (ebenfalls von lat. legere = lesen; „eine Sequenz lesen durch sequenzspezifisches Binden in der Minor-Groove“). Er war es auch der postulierte, dass durch Austausch eines Pyrrolrings durch einen Heterocyclus mit zusätzlichem Wasserstoffbrücken-Akzeptor eine Verschiebung der Bindungsaffinität in Richtung GC möglich sei. Lown bestätigte diese Vermutung durch Synthese von Imidazol-haltigen Verbindungen ^[20]. Wie Abbildung 1.12 (S. 12) zeigt, kann die sterische Hinderung durch die Guanin-NH₂-Gruppe in der Rinne mittels Austausch der CH-Funktion am Pyrrolring gegen N unter Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung umgangen werden.

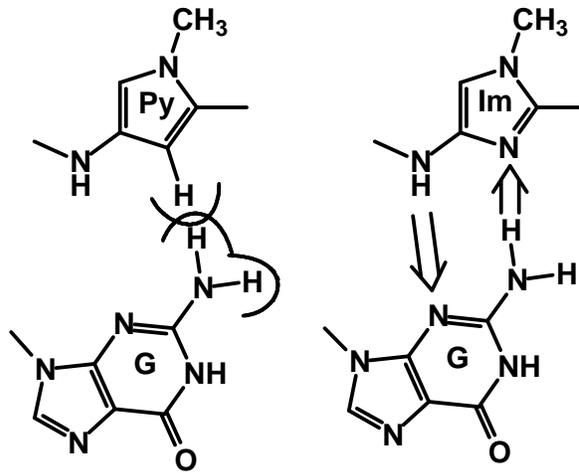


Abb. 1.12: Durch Austausch von Pyrrol gegen Imidazol wird die sterische Hinderung der Guanin-NH₂-Gruppe durch den Energiegewinn einer zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung überkompensiert.

Das Erreichen einer GC-Präferenz war auch insofern für die Entwicklung von zytotoxischen Substanzen interessant, als GC-reiche Sequenzen v.a. in Genen, die mit der Zellproliferation assoziiert sind (inclusive Onkogenen), vorkommen ^[14].

Der nächste Meilenstein war die Entdeckung von Wemmer ^[21], dass Distamycin mit kurzen Oligonucleotiden Komplexe im Verhältnis 2:1 bildet, wobei die beiden Distamycin-Moleküle antiparallel orientiert sind (s. Abbildung 1.13).

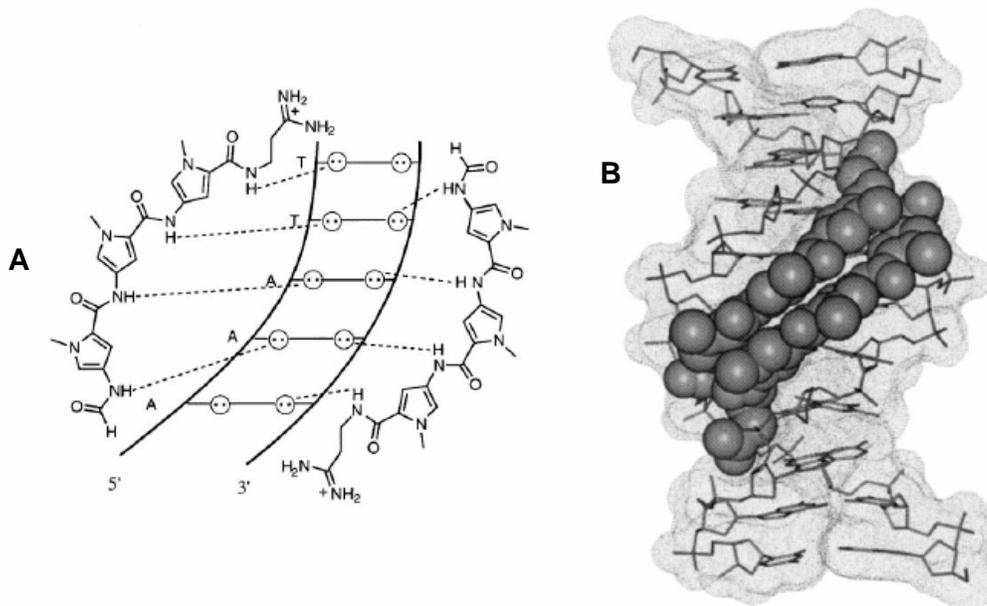


Abb. 1.13: Durch NMR-Spektroskopie ermittelte Struktur des 2:1 Distamycin-DNA-Komplexes. **A:** schematische Interaktionspositionen; **B:** van der Waals – Modell ^[22]

Dervan synthetisierte daraufhin eine große Anzahl sogenannter **Hairpin-** (Haarnadel) Moleküle; 2 Oligoamidketten wurden über einen Linker derart miteinander verknüpft, dass die sichelförmige DNA-Bindekonformation der singulären Trispyrrolcarboxamide voll erhalten blieb ^[14,19,22-26]. Durch den aus der synthetischen Fixierung bedingten geringeren Verlust an Freiheitsgraden bei der Targetbindung kommt es durch verminderten Entropieverlust zu einem Anstieg der Bindungsaffinität.

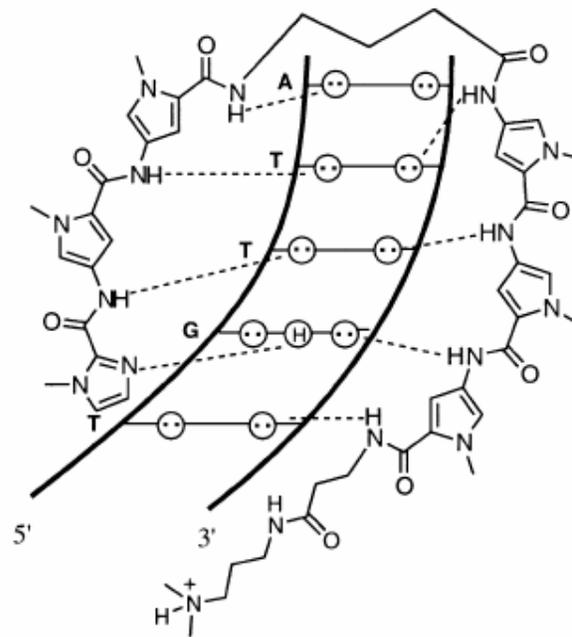


Abb. 1.14: Hairpin-Bindemodell; das Amino- und Carboxy-Ende des antiparallelen Dimers ist über GABA miteinander verknüpft ^[22].

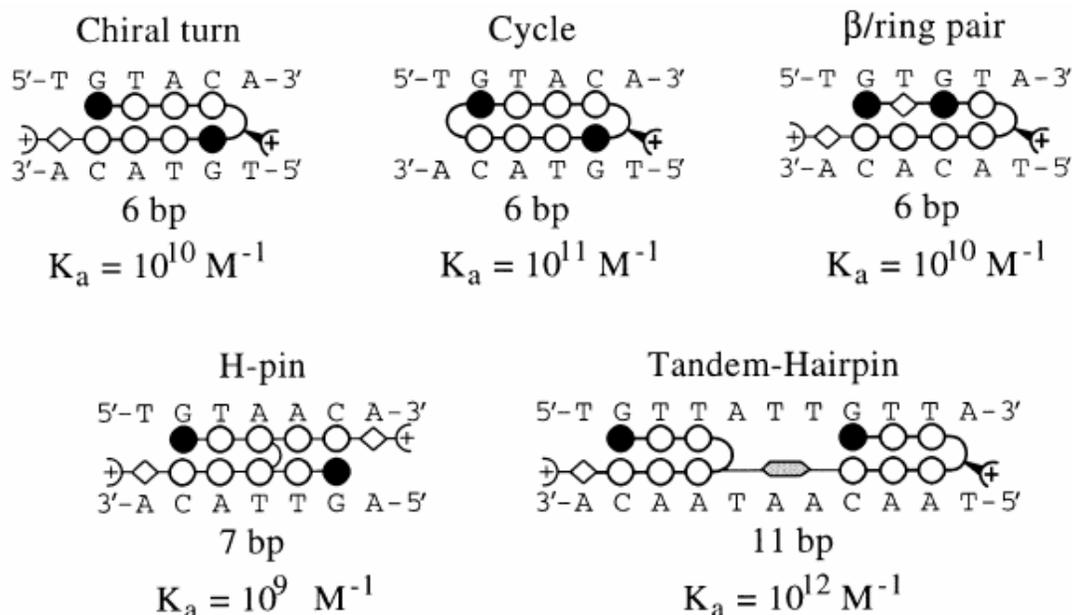


Abb. 1.15: verschiedene Hairpin-Typen ^[22]. K_a = Bindestandarte, Affinitätskonstante; bp = base pairs

Bahnbrechend war die Entdeckung, dass die Verwendung von 3-Hydroxypyrrrol-derivaten als Strukturelement eine Differenzierung zwischen AT und TA ermöglicht [23]. Hydroxypyrrrol bindet nämlich bevorzugt an Thymin, da dieses im Vergleich zu Adenin eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung ausbilden kann.

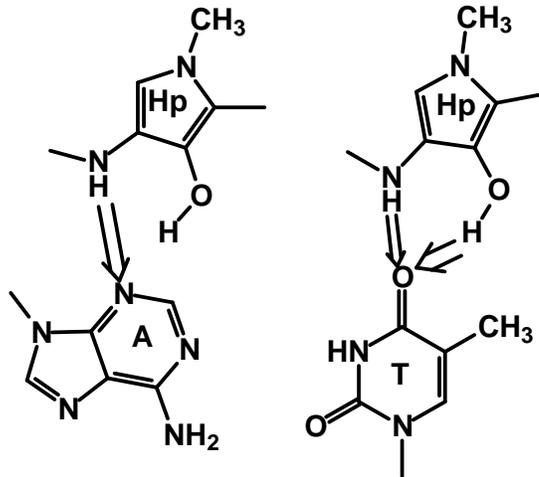


Abb. 1.16: Thymin-O-2 ist in der Lage, zwei Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, wohingegen Adenin-N-3 nur ein freies Elektronenpaar besitzt. Eine Bindung an Cytosin, welches ebenfalls ein Sauerstoff-Atom mit zwei freien Valenzen enthält, ist dagegen aufgrund der sterischen Hinderung durch die Aminogruppe des mit Cytosin gepaarten Guanins nicht möglich.

Darüberhinaus füllt die Hydroxygruppe die durch das benachbarte Adenin bedingte „Lücke“ in der *van-der-Waals*-Oberfläche perfekt aus; mit Thymin als „Nachbar“ wäre es erneut zu einer sterischen Hinderung gekommen.

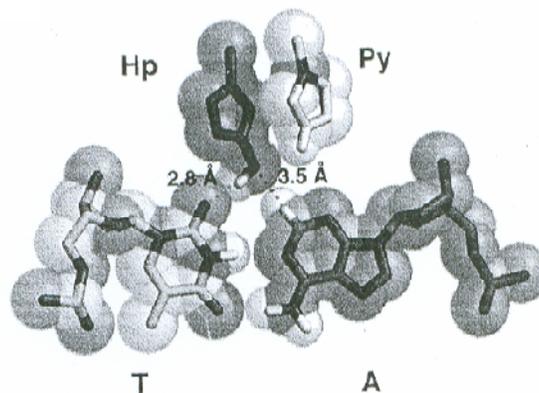


Abb. 1.17: Das Modell der Hp/Py-Interaktion mit dem TA-Basenpaar zeigt die exakte Ausfüllung der durch Adenin-C2 geformte Lücke durch Hp-OH [23].

Durch die Verwendung der drei Heterocycle Pyrrrol, Hydroxypyrrrol und Imidazol in unterschiedlichen Kombinationen kann somit eine Differenzierung zwischen allen 4 DNA-Basen erreicht werden.

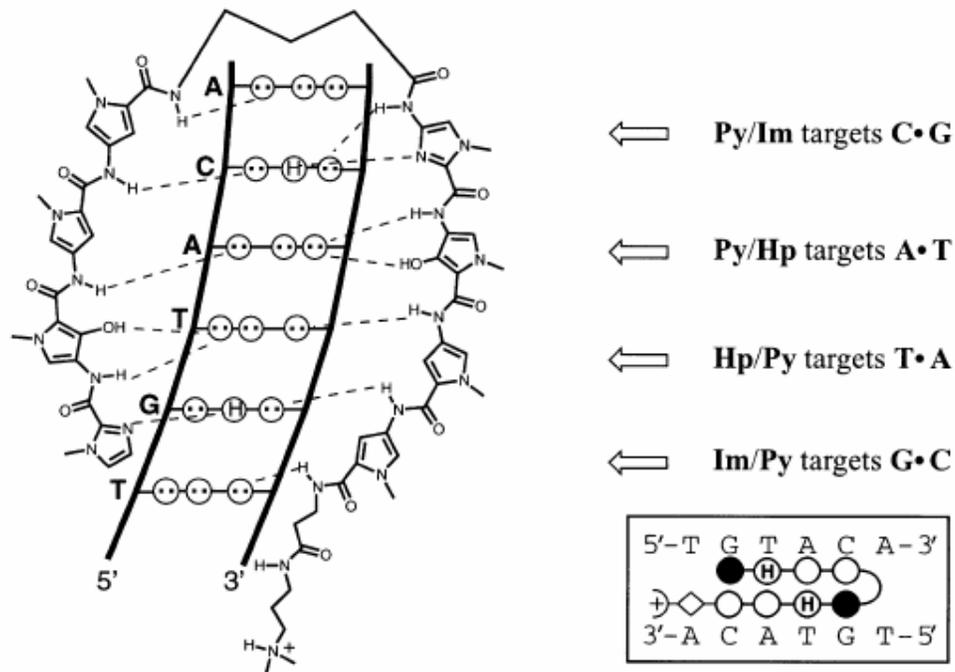


Abb. 1.18: Molekulare Erkennung der kleinen Rinne der DNA durch die Heterocyclen Pyrrrol, Hydroxypyrrrol und Imidazol.

In den letzten Jahren gab es zahlreiche Bemühungen mit dieser Art von Molekülen, selektiv Transkriptionsfaktor- oder andere Schlüsselgene auszuschalten. Die Erfolge in Zellkulturen können aber nicht über die Probleme der Übertragbarkeit auf in vivo-Verhältnisse wie Transport in die Zellen, Schutz der DNA durch Assoziation mit Histonen oder enzymatischen Abbau hinwegtäuschen ^[19,22,27].

1.4 Peptide Nucleic Acids (PNAs)

Ein weiterer interessanter Ansatz, sequenzspezifisch an der DNA anzugreifen, ist die erstmals von Nielsen 1991 beschriebene Entwicklung von **Polyamid** oder **Peptide Nucleic Acids (PNAs)** ^[28]. Bei diesen handelt es sich um DNA-Mimetika, bei denen das Zucker-Phosphat-Rückgrat durch eine N-(2-Aminoethyl)glycin-Polyamidstruktur ersetzt wurde.

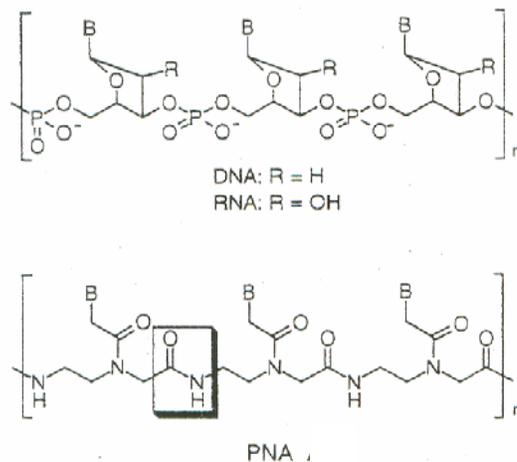


Abb. 1.19: Grundstruktur von DNA, RNA und PNA. B = Nucleobase.

Trotz der drastischen strukturellen Änderung binden die PNAs mit größerer Affinität an die DNA als natürliche Oligonucleotide, unter Ausbildung einer Watson-Crick-Doppelhelix ^[29]. Bei der Bindung an ds(= double strand)DNA kommt es aufgrund der hohen Stabilität des PNA-DNA-Hybrids häufig zu einer Strangverdrängung. Für (DNA-)Homopyrimidine wurde ferner gezeigt, dass sie an dsDNA unter Ausbildung von Watson-Crick-Hoogsteen-Triplex-Strukturen, eventuell auch durch „Stranginvasion“ unter Ausbildung von (PNA)₂/DNA-Komplexen binden können, während bei PNAs, die alle 4 Basen enthalten, keine Tripelhelices möglich sind ^[29-32] (s. Abbildung 1.20, S. 17).

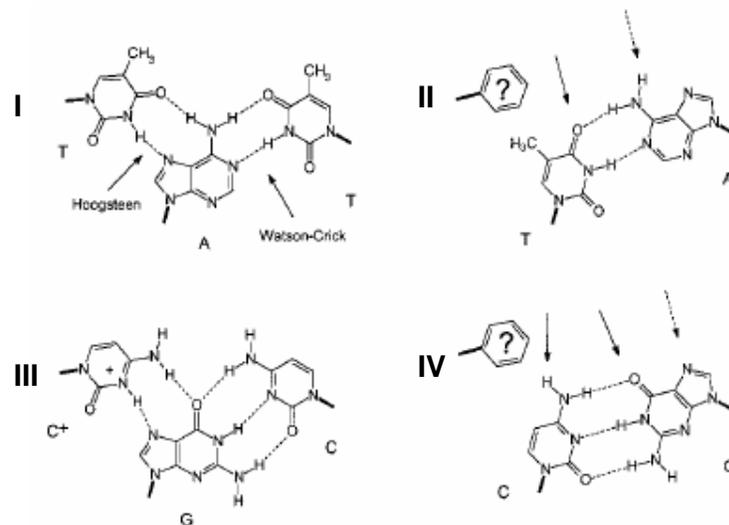


Abb. 1.20: Modellinteraktion mit PNA-Teilstrukturen; nur Purine sind in der Lage, Hoogsteen-Basenpaarungen einzugehen. Deshalb kommt es nur bei Homopurin/-pyrimidin-Strängen (**I,III**) zur Ausbildung von tripelhelicalen Strukturen ^[32].

PNAs sind des weiteren resistent gegenüber Proteinasen und DNAsen ^[31] und im Gegensatz zu DNA relativ säurestabil ^[29].

Um eine Weiterentwicklung dieser innovativen Moleküle handelt es sich bei den DNA-PNA-Chimären (s. Abbildung 1.21, S. 18) ^[29,31]. Diese aus DNA- und PNA-Strukturelementen gemischten Verbindungen haben neben der hervorragenden Bindung zahlreiche Vorteile gegenüber den reinen PNAs.

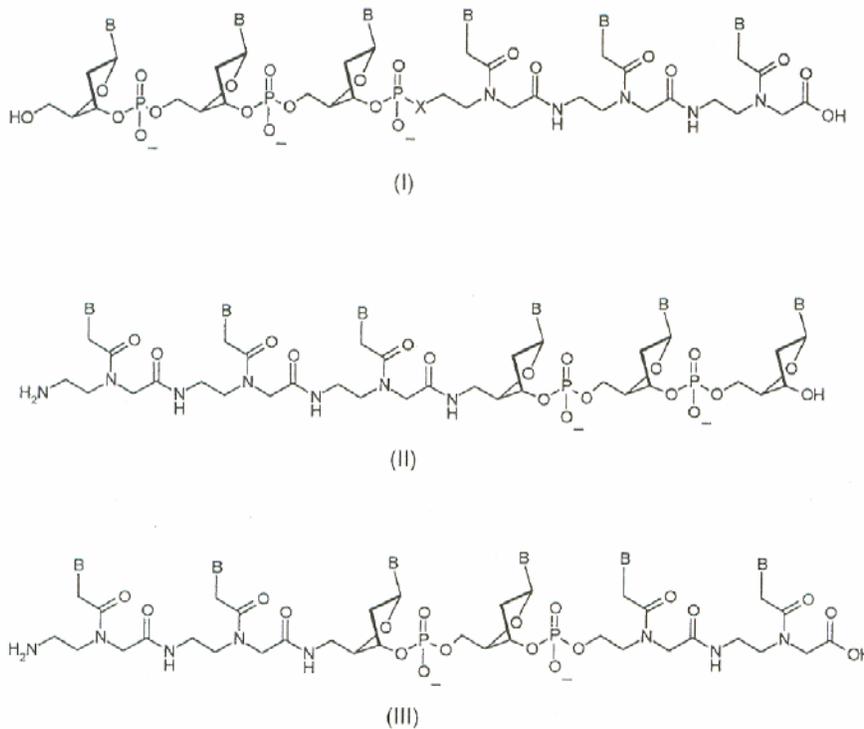


Abb. 1.21: PNA/DNA-Chimäre: (I) 5'-DNA-(Linker)-PNA-(pseudo-3'), X = NH oder O; (II) (pseudo-5')-PNA-(Linker)-DNA-3'; (III) (pseudo-5')-PNA-(Linker)-DNA-(Linker)-PNA-(pseudo-3'); B = Nucleobasen [29]

Neben der Erhöhung der Wasserlöslichkeit aufgrund der Poly-Anionenstruktur, was eine erhöhte Verfügbarkeit in Zellen zur Folge hat, und der im Vergleich zu PNAs fehlenden Tendenz zur Selbstaggregation, sind v.a. biologische Funktionen wie die Primer-Funktion für DNA-Polymerasen und die RNase H-Stimulierung bei der Verwendung als Antisense-Oligomere zu nennen [29]. Im Vergleich zu dsDNA zeigen sie eine gewisse Resistenz gegenüber Nucleasen, was ihre Stabilität in Serum und zellulären Extrakten mit der von PNAs vergleichbar macht [31].

Potentielle Anwendungsmöglichkeiten von PNAs und PNA-DNA-Chimären ergeben sich aus ihren Eigenschaften. Es gibt zahlreiche Studien zur Inhibition der Translation (Antisense-Strategie), zur Modulierung von Transkription und Replikation (Antigen-Strategie) sowie zu Wechselwirkungen mit Ribonucleoproteinen, wie z.B. Telomerasen (Enzyminhibitor-Strategie). Während PNAs v.a. in zellfreien Systemen zu vielversprechenden Ergebnissen führten, zeigen die Chimären aufgrund ihrer

aufgeführten verbesserten physikalischen und biologischen Eigenschaften bereits in Zellkulturen Aktivität ^[29,31-33].

Als weiteres Einsatzgebiet der PNAs und PNA-DNA-Chimären ist die molekularbiologische Diagnostik, z.B. das Screening von Genmutationen, zu nennen ^[29].

1.5 Zielsetzung

Als Zusammenfassung der einleitenden und den bisherigen Wissensstand beschreibenden Kapitel kann man sagen, dass es zur Zeit drei bedeutende Forschungsgebiete gibt, die sich mit sequenzspezifischer Bindung synthetischer Moleküle an der DNA beschäftigen:

1. Minor-Groove bindende Hybridmoleküle, bestehend aus einem Netropsin/Distamycin A- analogen Grundgerüst gekoppelt an ebenfalls zytotoxisch aktive Substanzen, wie z.B. Interkalatoren (>Combilexine), Alkylantien, etc.
2. Supramolekulare Polyamide, die sequenzspezifisch bestimmte Abschnitte der kleinen Rinne „lesen“ können (Lexitropsine), wobei hier die aufgrund ihrer haarnadelartigen Form „Hairpins“ genannten Moleküle die größte Bedeutung haben
3. Die natürliche Oligonucleotide imitierenden PNAs, die über Watson-Crick- oder Hoogsteen-Basenpaarungen in physiologische Vorgänge von Nucleinsäuren wie Replikation, Transkription oder Translation eingreifen können, und sich damit als therapeutische (z.B. Antisense-Therapie) oder diagnostische (z.B. Aufklärung von Genmutationen) Werkzeuge anbieten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, von Netropsin/Distamycin A abgeleitete DNA-bindende und/oder zytotoxische Mono-, Bis- bzw. Oligopyrrolcarboxamide zu synthetisieren, die am N-terminalen Ende über Linker unterschiedlicher Länge mit einem Heterocyclus verknüpft sind. Das C-terminale Ende war durch die vororientierenden Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Arbeiten von Hotzel ^[34] vorgegeben: eine *N,N*-Dimethyl-1,3-diaminopropan-Seitenkette, die die Amidinstrukturen der beiden Leitsubstanzen nachahmt und aufgrund ihrer bei physiologischem pH-Wert positiven Ladung eine elektrostatische Affinität für die elektronenreiche kleine Rinne begünstigt.

In Bezug auf den N-terminalen Heterocyclus sollten zwei funktionell verschiedene Vertreter eingeführt und damit zwei Richtungen eingeschlagen werden:

1. Zunächst war, basierend auf Nielsens PNA-Ansatz, die Verwendung von Nucleobasen geplant, um die Sequenzspezifität der Bindung des Pyrrolcarboxamidgrundgerüsts weiter zu erhöhen. Es wurde dabei vermutet,

- dass durch Ausbildung von Hoogsteen-Basenpaarungen die durch den Oligopyrrolteil verursachte Störung des DNA-Metabolismus weiter verstärkt würde. Aufgrund der AT-Selektivität von Oligopyrrolcarboxamiden war die Verwendung der DNA-Basen Adenin und Thymin und der zu Adenin komplementären RNA-Base Uracil geplant. Durch N-Alkylierung sollten Nucleobasenalkancarbonsäuren unterschiedlicher Seitenkettenlänge dargestellt werden, die anschließend über optimierte literaturbekannte Kupplungsverfahren zu den potentiellen Lexitropsinen aufgebaut werden sollten. Hierbei sollte die Seitenkettenlänge, die eine optimale Passform an der DNA begünstigt, ermittelt werden; interessant war auch zu erfahren, ob bei den verschiedenen Heterocyclen jeweils unterschiedliche Linkern zur optimalen Bindekonformation des Zielmoleküls führten.
2. Im 2. Teil der Arbeit sollten klassische Combilexine synthetisiert und getestet werden. Als Heterocyclen sollten folglich Interkalatoren dienen, die über Linker verschiedener Länge ebenfalls an das von Netropsin/Distamycin A abgeleitete Grundgerüst geknüpft werden sollten.

Im Vergleich zu vielen literaturbekannten Lexitropsinen und Combilexinen sollte das Molekulargewicht der Testsubstanzen möglichst gering gehalten werden, um eine gute Permeabilität durch biologische Membranen zu gewährleisten (s. Lipinskis „Rule of Five“). Es waren daher Zielmoleküle von maximal 3 Pyrrolringen mit Nucleobasen oder relativ einfachen Interkalatoren geplant.

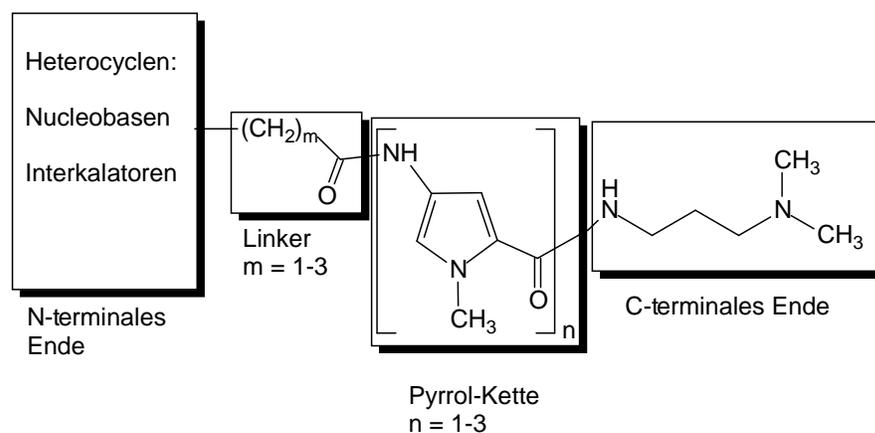


Abb. 1.22: Grundstruktur der geplanten Verbindungen

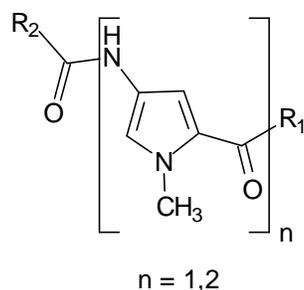
3. Nach den jeweiligen Stoffklassen geordnet sollten dann an den Zielmolekülen Zytotoxizitäts-Studien (NCI, Bethesda, MD, USA) und in einem externen Forschungslabor (Laboratory of Pharmacology, INSERM, Lille, Frankreich) spezielle biophysikalische bzw. biochemische DNA-Bindestudien und Topoisomerase-Inhibitor-Aktivitätstests durchgeführt werden. Aus diesen Daten könnten weiterführende bzw. neue Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufgestellt werden.
4. Zur Rationalisierung der experimentellen Daten aus den biologischen/biophysikalischen Evaluierungen sollten dann an den Molekülen vororientierende Molecular Modelling-Studien auf der Basis semiempirischer quantenchemischer Rechnungen durchgeführt werden. Eventuell sollten die Rechnungen dann auch Hinweise zum Aufbau von Struktur-Wirkungs-Beziehungen und damit verbunden auch Hinweise auf zukünftige Strukturoptimierungen liefern.

2. Auswahlkriterien für Substituenten bei der Syntheseplanung der Pyrrolcarboxamide

In diesem Abschnitt sollen die Eigenschaften, NMR-spektroskopischen Charakteristika sowie die mechanistischen Hintergründe der einzelnen Strukturelemente der geplanten synthetischen Pyrrolcarboxamide diskutiert werden. Als Grundstruktur diente analog zur Dissertation Hotzel ^[34] bzw. zur Leitstruktur Netropsin die 1-Methyl-2-carbonyl-4-amino-mono- bzw. -bispyrrolcarboxamid-Einheit (s. Tabelle 2.1). Auf die Synthese von Trispyrrol-Derivaten, abgeleitet vom Naturstoff Distamycin A, wurde noch verzichtet. Es sollte in der Arbeit zunächst die Aktivität der „kleineren“ Moleküle überprüft und nur potentiell wirkungsrelevante Heterocyclen an die sehr aufwendig herzustellenden Trispyrrol-Derivate gekoppelt werden.

2.1 C-terminale Seitenfunktion

Zielsetzung der Dissertation Hotzel ^[34] war in erster Linie die Untersuchung der Einflüsse verschiedener C-terminaler Funktionen auf Antitumoraktivität und DNA-Bindung. Dabei wurde der Einfluß von Methylester-, Carbonsäure-, *N,N*-Dimethyl-1,3-diaminopropan- und Aminopropionitril-Gruppen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit an DNA und Tumorzell-Linien untersucht.



getestete C-terminale Substituenten

R₁ = -OCH₃

R₁ = -OH

R₁ = -HN(CH₂)₃N(CH₃)₂

R₁ = -HN(CH₂)₂CN

Tab. 2.1: 1-Methyl-2-carbonyl-4-amino-mono- bzw. -bispyrrolcarboxamid-Grundeinheit und C-terminale Substituenten ^[34].

Hotzel kam zu dem Ergebnis, dass Verbindungen mit der Methylesterfunktion sich beim NCI-Screening als besonders zytotoxisch erweisen, wogegen Testsubstanzen mit *N,N*-Dimethyl-1,3-diaminopropan-Seitenkette eine stärkere DNA-Bindung aufweisen, was durch ΔT_m -Messungen (s. S. 55) gezeigt wurde ^[34]. Letzteres Resultat lässt sich damit begründen, dass diese Funktion, die die ebenfalls basische Amidin-Gruppe des Minor-Groove-Binders Netropsin **1** imitiert, unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegt und dadurch gut mit der elektronenreichen kleinen Rinne interagieren kann.

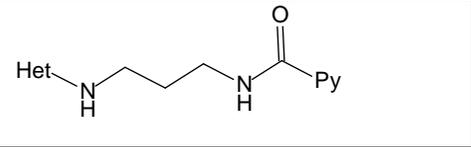
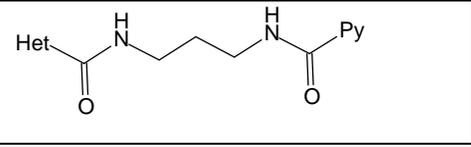
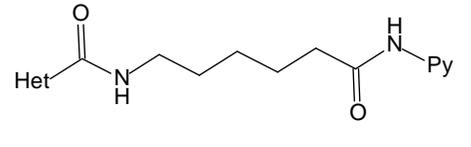
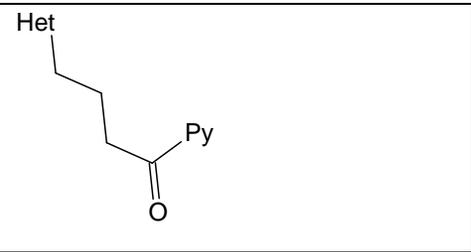
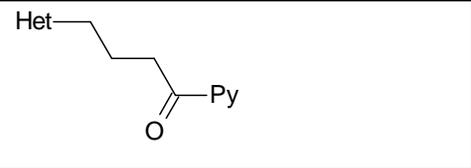
Da eine gute DNA-Bindung für die im Rahmen dieser Arbeit geplanten Verbindungen essentiell ist, sollte ausschließlich die *N,N*-Dimethyl-1,3-diaminopropan-Seitengruppe als C-terminale Funktion dienen; Variationen sollten nur am N-terminalen Teil durchgeführt werden (s. Abbildung 1.22, S. 21).

2.2 Linker

Eine große Bedeutung im Hinblick auf die Aktivität der geplanten Hybridmoleküle hat die Wahl eines geeigneten Linkers, der den Pyrrolcarboxamid-Teil mit dem N-terminalen Heterocyclus bzw. Triheterocyclus verbindet. Die Flexibilität und Länge eines Linkers sind sehr wahrscheinlich von entscheidender Bedeutung für die Einstellung der optimalen (d.h. möglichst dehnungsfreien) Anpassungsgeometrie an der DNA und damit für die biologische Wirkung des Ligand-DNA-Komplexes.

Bailly et al. stellte am Beispiel des Combilexins NetAmsa **10** (S. 10) eine besonders gute Bindung eines Butanoyl-Linkers fest ^[7,14]. Eine ähnliche Prognose gab eine australische Forschergruppe ab, die ebenfalls ein Acridinderivat über Linker verschiedener Länge an Netropsin **1** bzw. Distamycin A **2** koppelte. Konstruktions-Modellierungen am Kalottenmodell zeigten hier eine optimale Passform mit GABA als Linker ^[35]. Auch Untersuchungen einer italienischen Arbeitsgruppe zeigten eine deutliche Zunahme der Zytotoxizität durch Einbau einer Trimethylenkette in Tallimustin **11** (S. 11), was ebenfalls auf die bessere Interaktion mit der DNA aufgrund der erhöhten Flexibilität des Linkers zurückgeführt wurde.

Eine Übersicht über Linker bekannter zytotoxischer Hybridmoleküle zeigt Tabelle 2.2 (S. 25).

Linker	Name	Atome der Kette	Literatur
	Distel (1+) Distel (2+)	6	[11]
	NetAmsa	7	[11]
	R-132	9	[52]
	Acridin- Netropsin	4	[35]
	MEN 10710	4	[36]

Tab. 2.2: Verschiedene in der Literatur aufgeführte Linker am N-terminalen Ende; Het = Heterocyclus, Py = Pyrrolcarboxamid

Trotz der Existenz einiger Vertreter dieses Verbindungssystems fehlt jedoch nach wie vor eine systematische Untersuchung der Korrelation von Linkerlänge mit Antitumoraktivität bzw. DNA-Bindung, wenn man eine größere Anzahl verschiedener Hybridmoleküle vergleicht. Interessant, v.a. in Hinblick auf die Synthesen zu bestimmten geplanten Combilexinen, ist hierbei, ob es eine Linker-Minimallänge gibt, bei der noch eine Interkalation stattfinden kann.

Dies sollte ein zentrales Ziel der vorliegenden Arbeit sein, wobei es anhand obiger Beispiele und in Hinblick auf den präparativen Aufwand sinnvoll erschien, die Länge auf 4 Atome zu beschränken. Die Verknüpfung mit dem Aminopyrrolcarboxamid-Baustein sollte über eine amidische Bindung erfolgen. Die Art der kovalenten Bindung an den Heterocyclus sollte in Abhängigkeit von dessen funktionellen Gruppen gewählt werden.

2.3 N-terminale Funktionen

2.3.1 Nucleobasen

Der erste Teil der Arbeit bestand darin, Nucleobasen-gekoppelte Pyrrolcarboxamide zu synthetisieren und zu evaluieren. Als Vorbilder sind die Arbeiten von Nielsen ^[28,30,32,33] und Dervan ^[22-27] zu nennen, die mit Peptide-Nucleic-Acids (PNAs) bzw. Hairpins sequenzspezifisch an der DNA bindende Moleküle synthetisierten. Im Vergleich zu diesen supramolekularen bzw. polymeren Verbindungen sollte aber der „small-molecule“-Bereich nicht verlassen werden, um neben einer sequenzspezifischen Bindung auch möglichst eine gute Zellmembranpermeation zu erreichen.

Da die Leitstrukturen Netropsin **1** und Distamycin A **2** - bzw. Oligopyrrolcarboxamide im Allgemeinen - in der Regel an AT-/TA-reiche Sequenzen binden ^[22], fiel die Wahl auf die zueinander komplementären DNA-Basen Adenin und Thymin bzw. auf die zu Adenin komplementäre RNA-Base Uracil.

2.3.2 Interkalatoren und Photosensibilisatoren

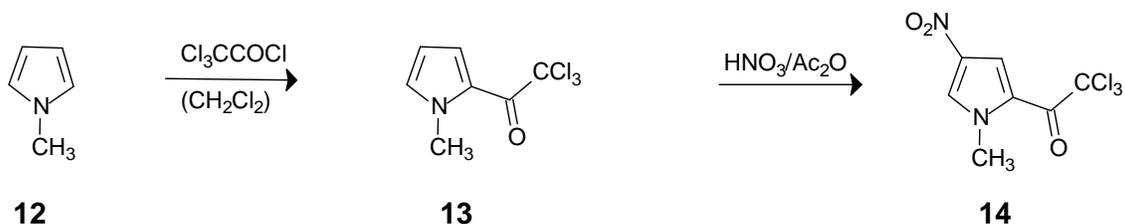
Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden Acridon, Acridin, und (Nitro-)Naphthalimid als Interkalatoren und Anthrachinon als Interkalator und Photosensibilisator ausgewählt. Eine Ausnahmestellung nimmt das ebenfalls verwendete, jedoch nicht völlig planare Iminostilben ein. Näheres zu den aufgeführten Heterocyclen s. Kapitel 7 (S. 63ff) bzw. zum Anthrachinon s. Kapitel 9 (S. 89ff).

3. Synthese und Strukturaufklärung der Pyrrolcarboxamide

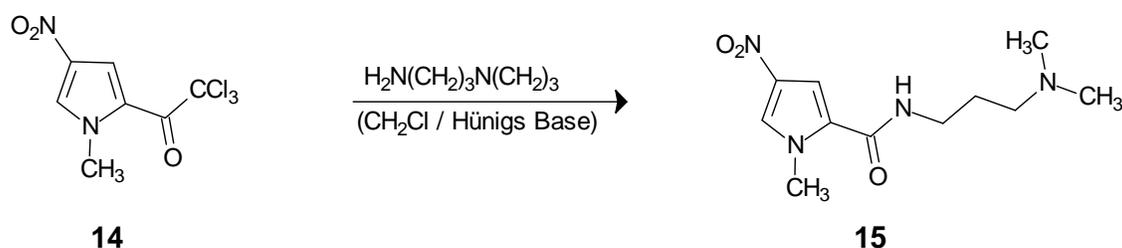
3.1 Synthese der Pyrrolcarboxamide

Zum Aufbau des Pyrrolcarboxamidgerüsts mit C-terminaler *N,N*-Dimethyl-1,3-diaminopropan-Funktion wurde ein von Nishiwaki und Shibuya ^[37] entwickeltes und von Hotzel ^[34,38] optimiertes Syntheseverfahren verwendet. *N*-Methylpyrrol **12** wurde in 2-Position mit Trichloressigsäurechlorid in CH₂Cl₂ acetyliert und anschließend in 4-

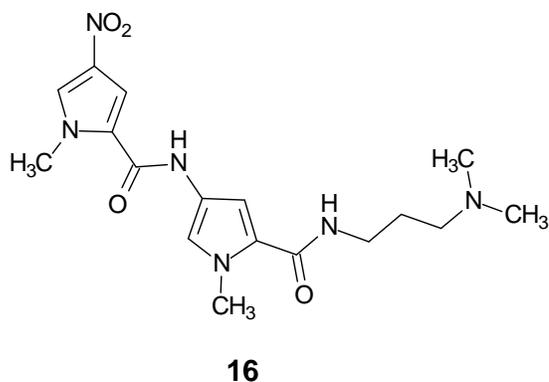
Position mit $\text{Ac}_2\text{O}/\text{HNO}_3$ (65%) bei -40°C regioselektiv nitriert, wobei **14** entstand. Bei letzterem Schritt kommt es intermediär zur Bildung von Acetylnitrat, welches das eigentlich nitrierende Agens ist.



Weitere Umsetzung mit *N,N*-Dimethyl-1,3-diaminopropan in CH_2Cl_2 unter Zusatz von *Hünigs* Base (*N,N*-Diisopropylethylamin) führte zum Carbonsäureamid **15**.



Zum Aufbau des Bispyrrols **16** wurde **15** mit Palladium(10%)/Aktivkohle unter Wasserstoffatmosphäre in Dioxan reduziert, der Katalysator abfiltriert und die Lösung des entstandenen Amins ohne weitere Aufarbeitung zu einer Lösung von **14** in DMF gegeben.



3.2 Strukturaufklärung der Pyrrolcarboxamide

Hotzel hatte die Konstitution von Verbindung **16** mittels verschiedener NMR-Experimente bewiesen ^[34]. Allerdings fehlte der eindeutige Beweis der trans-(Z)-Konfiguration der die beiden Pyrrol-Ringe verbindenden Amid-Gruppe bzw. die exakte Konformation des Nitro-Pyrrol-Ringes in Lösung. Zur Aufklärung dieser Problematik wurde der Kern Overhauser Effekt (NOE: Nuclear Overhauser Effect) mittels NOE-Differenzanalyse genutzt. Zuerst wurde in H-5 eingestrahlt. Durch den NOE kam es zu einer Intensivierung der Signale von H-3 und N-CH₃, nicht aber von N'-CH₃ oder H-3', womit die cis-(E)-Amid-Stellung ausgeschlossen werden konnte (s. Abbildung 3.1 und Abbildung 3.4, S. 30). Um zu überprüfen welche Konformation der Nitropyrrol-Ring zum benachbarten Hetaren aufweist, wurde zusätzlich in das Amid-H zwischen den Pyrrolbausteinen eingestrahlt. Da neben H-5 und H-3 auch H-3' eine Signalintensivierung zeigte, konnten sowohl Amid-Konfiguration als auch Konformation der Pyrrolringe zueinander eindeutig bewiesen werden (s. Abbildung 3.2, S. 29 und Abbildung 3.5, S. 30). Die Ergebnisse decken sich in der Tat mit der durch Röntgenkristallographie ermittelten 3D-Struktur des Netropsins ^[10].

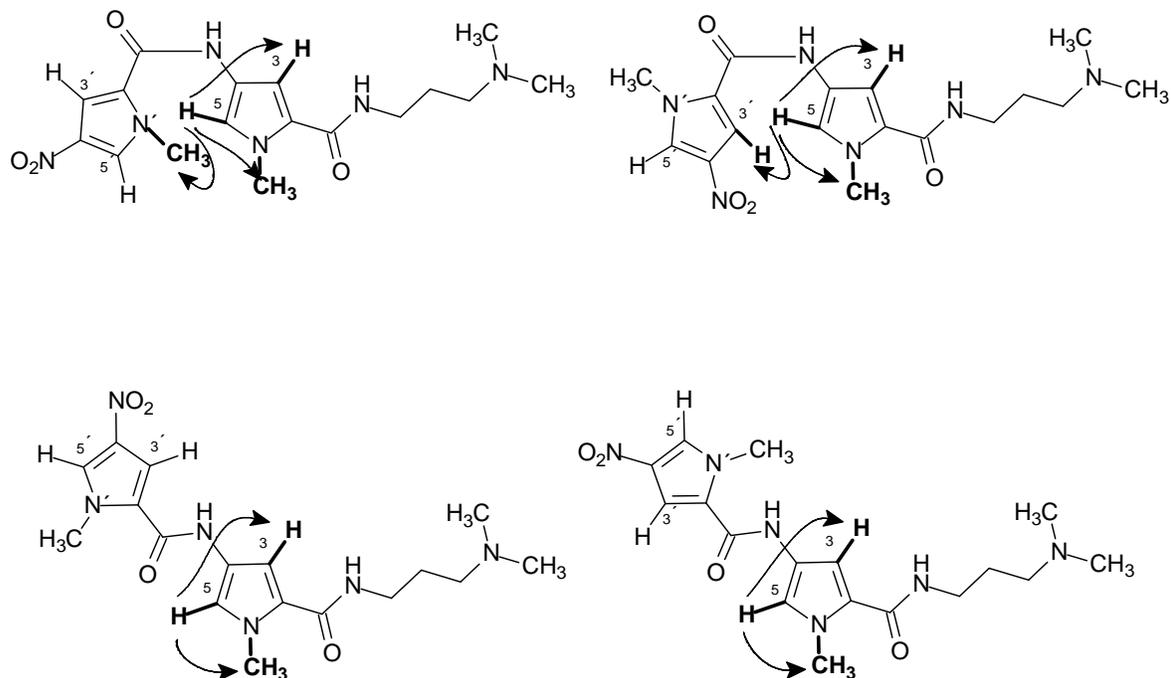


Abb.3.1: Oben die beiden Amid-cisoiden, darunter die beiden transoiden Konformationen. Da es beim Einstrahlen in H-5 nur zu einer Signalintensivierung von H-3 und N-CH₃ kommt, können die Amid-cisoiden Konformationen ausgeschlossen werden, da hier (wie durch die Pfeile angedeutet) mit jeweils einem zusätzlichen NOE-Signal zu rechnen wäre.

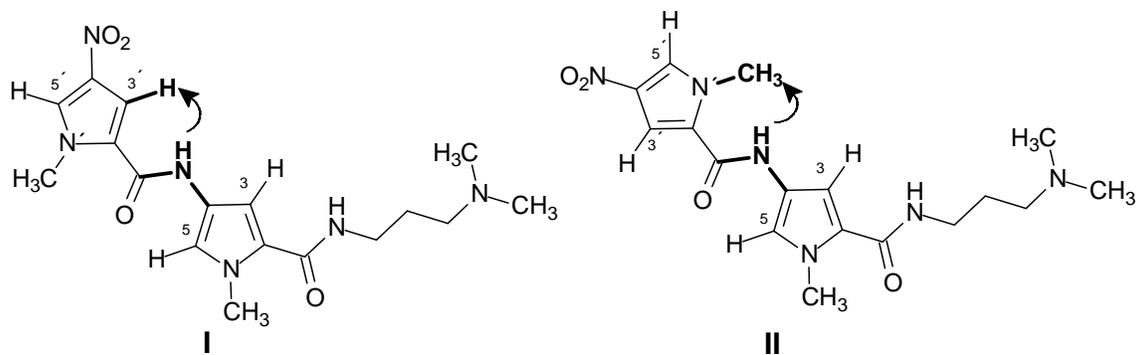


Abb.3.2: Da es nach Einstrahlen in das zentrale NH zu einer Signalintensivierung von H-3', nicht aber von N'-CH₃ kommt, kann man bei der Konformation I davon ausgehen, dass diese im Gleichgewicht überwiegt. Population II sollte im Rahmen der NMR-Nachweisgrenze unterrepräsentiert sein.

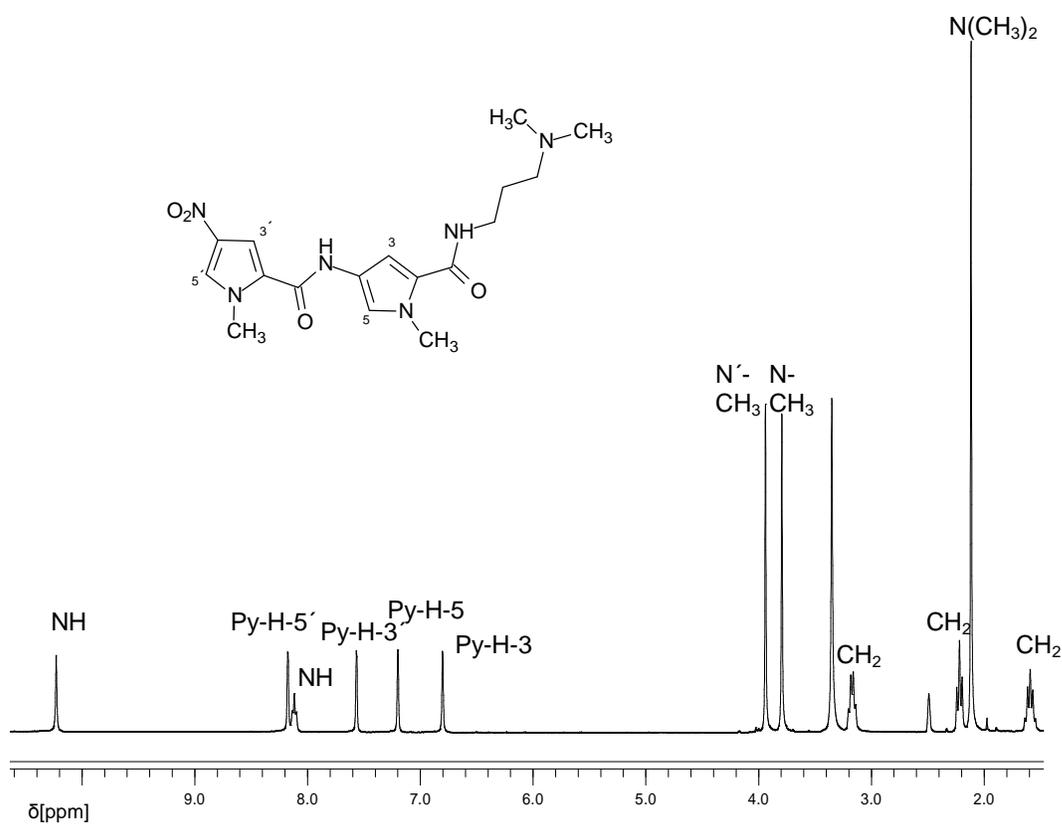


Abb. 3.3: ¹H-NMR-Spektrum von **16**. Lösungsmittel: DMSO-d⁶.

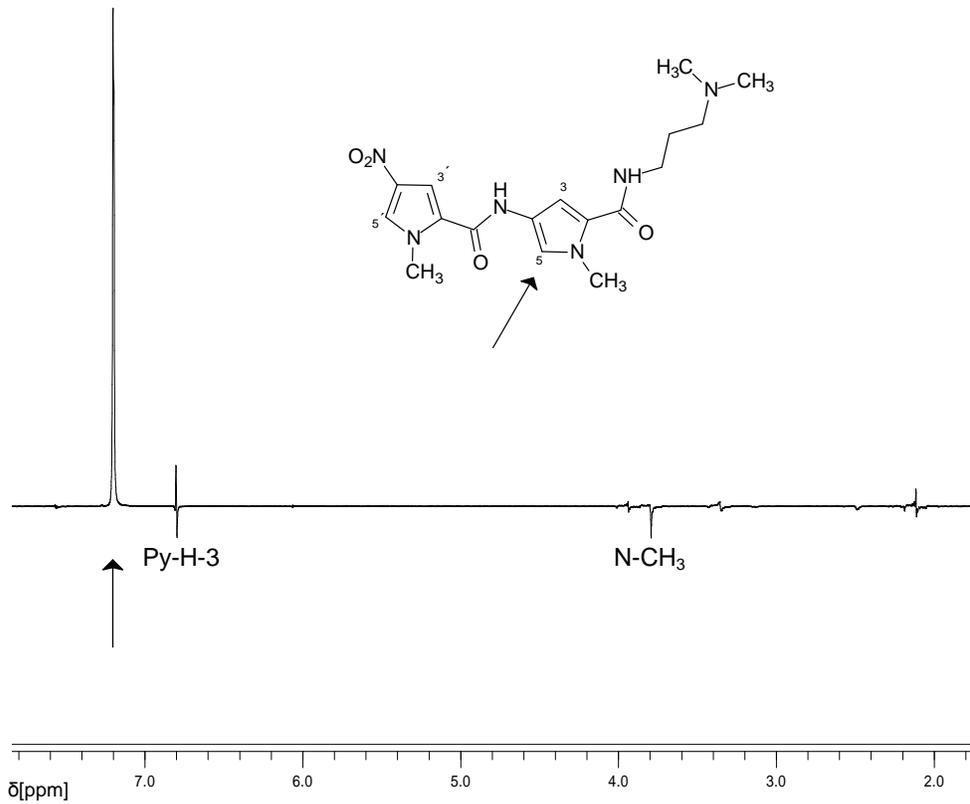


Abb. 3.4: Einstrahllexperiment auf Py-H-5. Signalintensivierung bei N-CH₃ und Py-H-3. Lösungsmittel: DMSO-d⁶.

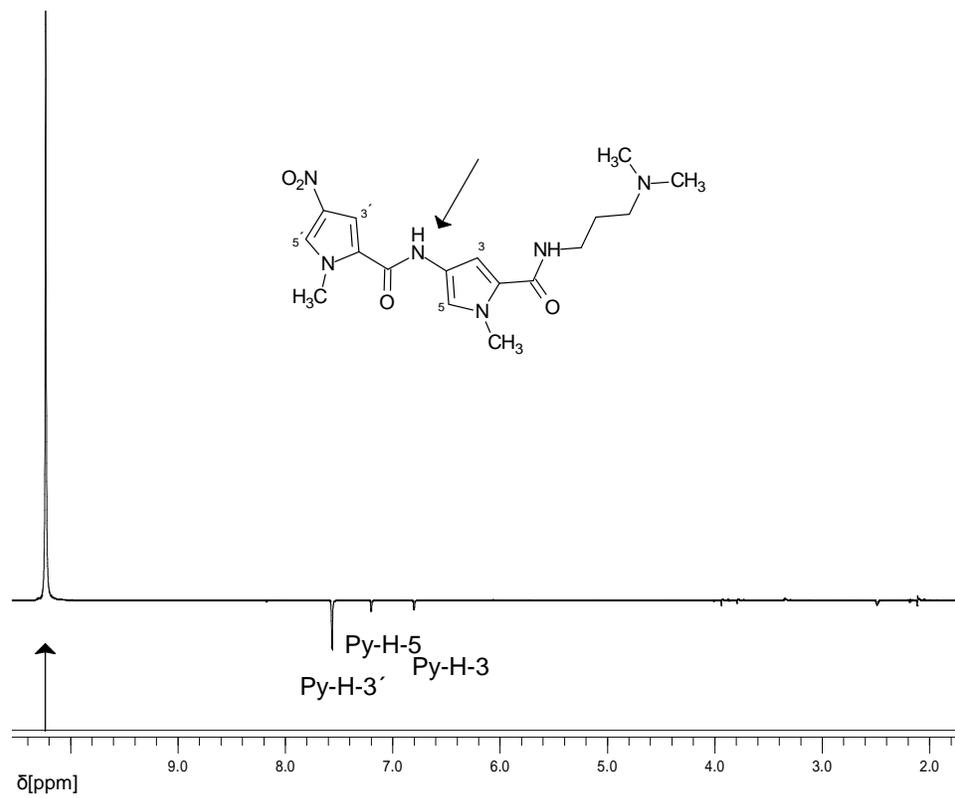


Abb. 3.5: Einstrahllexperiment auf das zentrale Amid-H zwischen den Pyrrolbausteinen. Signalintensivierung bei Py-H-3', Py-H-5 und Py-H-3. Lösungsmittel: DMSO-d⁶.

4. Synthese und Strukturaufklärung der Nucleobasen-alkancarbonsäuren

4.1 Darstellung der Uracil- und Thyminalkancarbonsäuren

4.1.1 Synthese der Uracilessigsäure

Die Uracilessigsäure **17** wurde nach dem Verfahren von Wheeler und Liddle ^[39] dargestellt. Hierbei wurde zu einer wässrigen Lösung von Uracil neben dem 2-fach molaren Überschuss an KOH ein 1,5-facher Überschuss an Chloressigsäure gegeben und die Mischung refluxiert. Nach wenigen Minuten kam es aufgrund der Säurezugabe und einer damit verbundenen Protonierung des primär gebildeten Uracilanions zu einem milchigen Niederschlag, welcher aber durch weitere Zugabe einiger Tropfen KOH-Lösung wieder verschwand. Es fand eine S_N2-Reaktion am α-C-Atom der Chloressigsäure mit Uracil-N-1 als Nucleophil statt, welches aufgrund der sterischen Abschirmung des N-3 durch die benachbarten Carbonylgruppen trotz der geringeren NH-Acidität an Position 1 begünstigt war. Die Fällung des Produktes durch Zugabe von 1M HCl beendete die Reaktion.

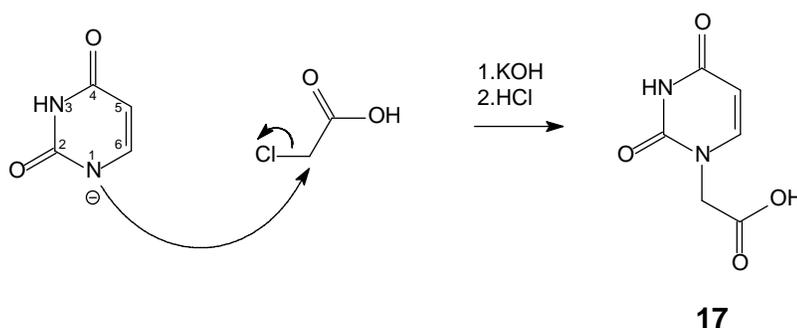


Abb. 4.1: Darstellung von Uracilessigsäure.

4.1.2 Synthese der Uracil- und Thyminbuttersäure

Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit der 4-Halogenbuttersäuren im Vergleich zu 2-Chloressigsäure und der zumeist schwierigen Isolierung von Carbonsäuren im Allgemeinen, wurden bei der Synthese der Uracil- und Thyminbuttersäure jeweils zunächst die Ethylester hergestellt. Hierbei wurde der Heterocyclus mit Natriumhydrid in DMF deprotoniert und nach einer Stunde 4-

Brombuttersäureethylester und eine Spatelspitze Tetrabutylammoniumjodid hinzugefügt. Letzteres führte durch eine Finkelstein-Reaktion beim 4-Brombuttersäureester zum Austausch des Broms gegen Jod. Jodid ist bekanntlich die bessere Abgangsgruppe, wodurch der nucleophile Angriff des Heterocyclus erleichtert wird. Die Isolierung der Pyrimidinbuttersäureethylester erfolgte mittels Säulenchromatographie. Hierbei wurden auch in etwa äquimolarer Menge wie die monosubstituierten Hauptprodukte die *N*-1,*N*-3-bisalkylierten Derivate gewonnen. Die Hydrolyse wurde wieder mit 2M NaOH durchgeführt, anschließende Neutralisation erfolgte mit 1M HCl (s. Tabelle 4.1, S. 45).

4.1.2.1 Strukturaufklärung von Thyminbuttersäureethylester

Es sollte mittels NMR-Analytik der Beweis für die *N*-1-Alkylierung am Thymin erbracht werden. Dafür wurde zunächst ein ¹H-NMR-Spektrum aufgenommen. Die Zuordnung der einzelnen Signale kann man Abbildung 4.3 (S. 33) entnehmen. Interessant ist hierbei v.a. die Buttersäure-Seitenkette. Die mittlere Methylengruppe verursacht ein Quintett, das eigentlich ein doppeltes Triplet ist, da die Kopplung durch jeweils eine Methylengruppe erzeugt wird. Die benachbarten Gruppen führen zum Auftreten von 2 Triplets. Da wegen der zu geringen Auflösung des Messgerätes keine ⁴J-Kopplungen zu erkennen sind, kann man das System in erster Näherung als Spektrum 1.Ordnung interpretieren. Genau genommen handelt es sich hierbei um ein AA'BB'XX'-System, da die flankierenden Gruppen (Thymin-NH und CO) verschieden sind. Aufgrund der freien Drehbarkeit der einzelnen Methylengruppen und der im zeitlichen Mittel nicht mehr zu differenzierenden Kopplungskonstanten der jeweiligen chemisch äquivalenten Kerne, kann man aber von einem scheinbaren A₂B₂X₂-System sprechen.

Um die *N*-1-Alkylierung eindeutig zu beweisen, wurde erneut ein NOE-Experiment durchgeführt. Bei einer Einstrahlung in Thymin-H-6 sollte es bei dem vermuteten Regioisomer aufgrund des räumlichen Abstandes von < 3 Å zu einer Signalintensivierung der H-Atom-Kerne mindestens einer Methylengruppe der Seitenkette kommen. Wie in Abbildung 4.4 (S. 34) zu erkennen, wurde diese Vermutung bestätigt. Neben der Thymin-CH₃-Gruppe zeigten auch die H-Atome an der α zum Heterocyclus stehenden Methylengruppe ein NOE-Signal.

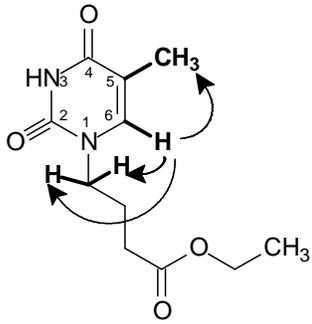


Abb. 4.2: NOE durch Einstrahlen in Thymin-H-6

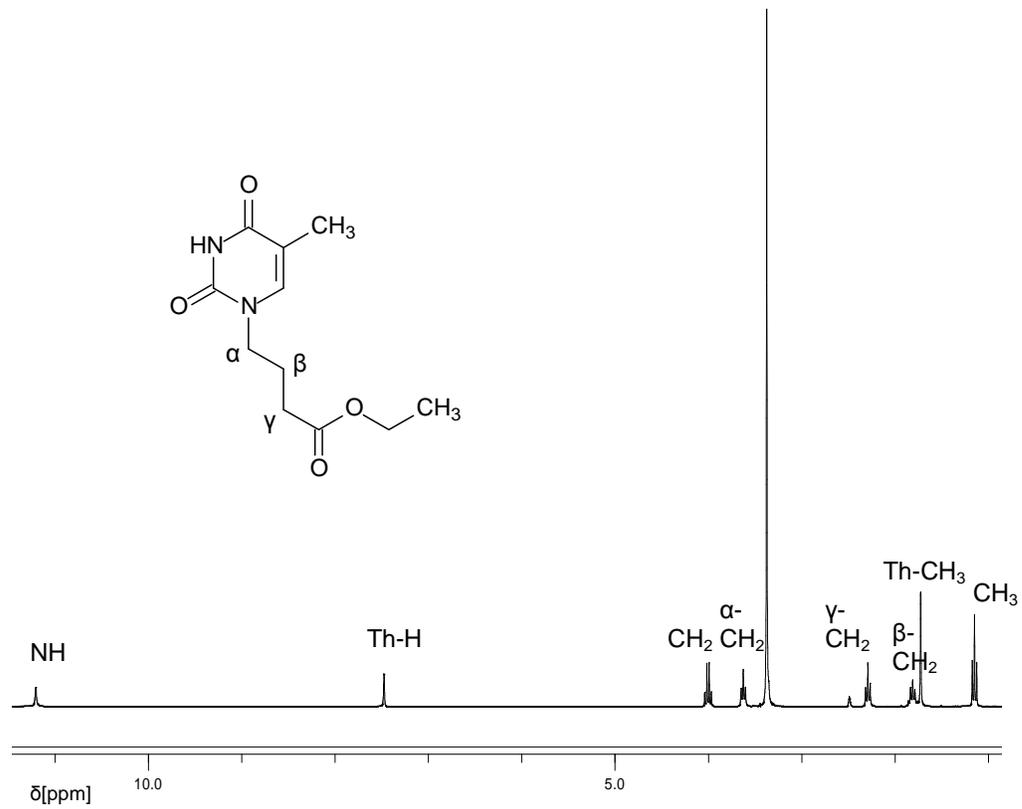


Abb. 4.3: ¹H-NMR-Spektrum von 1-Thyminbuttersäureethylester. Lösungsmittel: DMSO-d⁶.

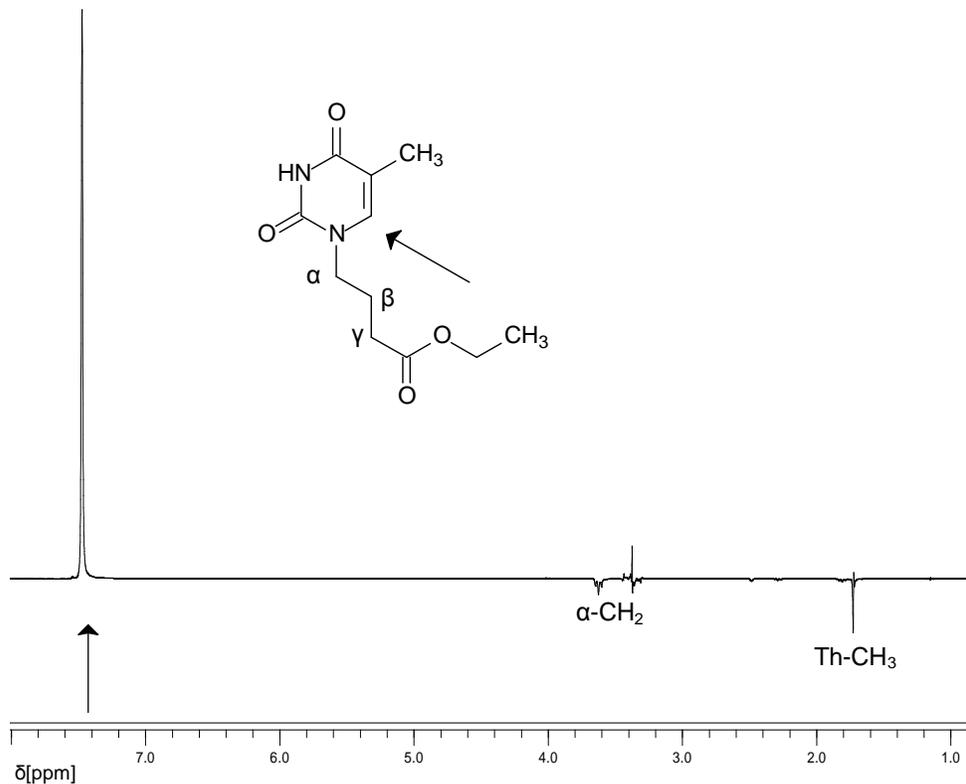


Abb.4.4: Einstrahlexperiment in Th-H. Signalintensivierung bei α -CH₂ und Th-CH₃. Lösungsmittel: DMSO-d⁶.

4.1.3 Synthese der Uracil- und Thyminpropionsäure

Auch hier wurden zunächst die Ethylester hergestellt und anschließend hydrolysiert. Als Base wurde in diesem Fall aber K₂CO₃ verwendet (s. Tabelle 4.1, S. 45).

4.2 Besonderheiten bei der Synthese von Adeninalkancarbonsäuren

Als nächstes sollten die Adeninalkancarbonsäuren dargestellt werden. Dies konnte prinzipiell analog zur Synthese der Pyrimidinalkancarbonsäuren erfolgen. Allerdings waren an dieser Stelle zwei grundsätzliche Probleme zu beachten. Zum einen bestand bei der folgenden Amidbildung (s. Kapitel 5, S. 46) die Gefahr der Selbstkondensation; die freie Aminogruppe am Purin konnte theoretisch mit der Aminogruppe des Oligopyrrolcarboxamid-Bausteins um die Carbonsäurefunktion eines Nachbarmoleküls konkurrieren. Außerdem war die nach Hydrolyse des

käuflichen Adeninessigsäureethylesters entstehende freie Säure in allen gängigen organischen Lösungsmitteln unlöslich, was vermutlich auf die zwitterionische Struktur (s. Abbildung 4.5), die im Gleichgewicht mit der ungeladenen Form überwiegt, zurückzuführen ist. Abbildung 4.5 zeigt die vermutete Protonierung an N-1, da hier nach quantenchemischer AM1-Rechnung der Nicht-Betain-Form das HOMO mit dem höchsten Koeffizienten vorliegt.

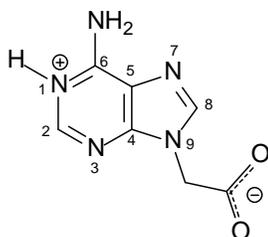


Abb. 4.5: Zwitterionische Struktur der Adeninessigsäure.

4.2.1 Einführen der Anisoyl-Schutzgruppe

Die beiden genannten Probleme sollten durch Anfügen einer Schutzgruppe an die Amino-Gruppe in Position 6 des Adeninessigsäureesters umgangen werden. Als Reagenz wurde Anisoylchlorid verwendet ^[40]. Nach anschließender Hydrolyse der Estergruppe des Zwischenproduktes mit 2M NaOH entstand das Salz der gewünschten Säure. Jedoch erwies sich diese ebenso wie die N-ungeschützte Adeninessigsäure als unlöslich in den gängigen organischen Lösungsmitteln. Daraufhin wurde die Synthese in modifizierter Form durchgeführt: es wurde die doppelte Menge an Anisoylchlorid eingesetzt und die spätere Esterhydrolyse lediglich mit 1M NaOH durchgeführt. Dadurch wurde das bisanisoylierte Derivat **19** erhalten, welches in [40] schon als Nebenprodukt erwähnt, später aber durch Hydrolyse zerstört wurde. Dieses Derivat war löslich in DMF. Die Ursache hierfür ist vermutlich die verringerte Basizität des gesamten Heterocyclus durch den Elektronenzug der beiden aromatischen Schutzgruppen. Adenin-Derivat **19** konnte mittels DCC (s. Kapitel 5.1.1, S. 46) mit den zum freien Amin reduzierten (Pd/C(10%)/H₂) Nitro-mono- und -bis-pyrrol-Derivaten zu den entsprechenden Amiden gekuppelt werden. Hierbei wurde jeweils eine der beiden Schutzgruppen abgespalten, so dass nur noch die mono-anisoylierten Produkte **20** und **21** identifiziert werden konnten.

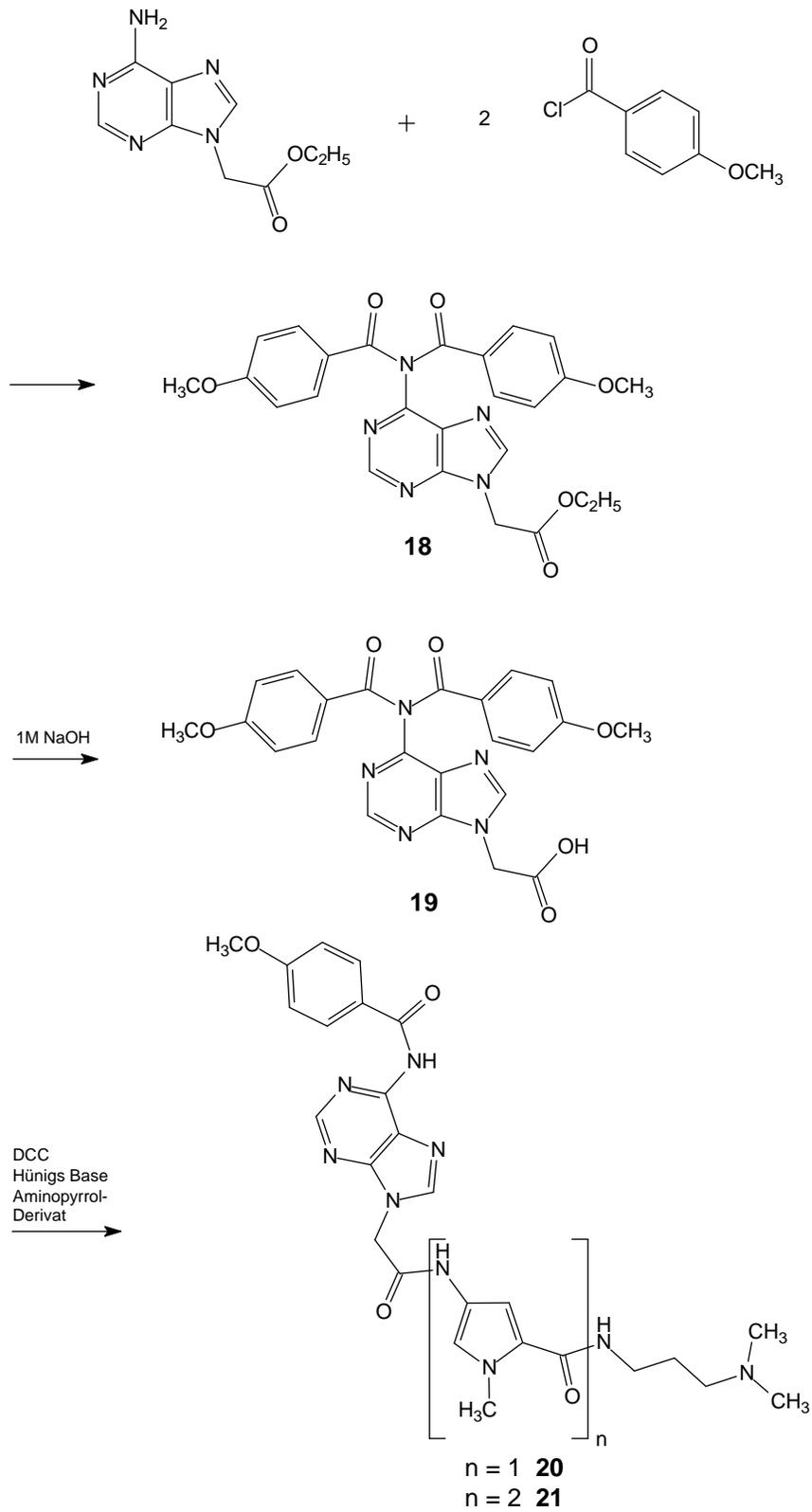


Abb. 4.6: Syntheschema der 6-Amino-geschützten Adenin-haltigen Pyrrolcarboxamide.

4.2.2 Abspaltung der Schutzgruppe

Nun folgte die Aufgabe, an **20** und **21** die Anisoyl-Schutzgruppen selektiv unter Erhalt der anderen in den Molekülen vorhandenen Amidgruppen abzuspalten. Hierzu wurde das in der Nucleinsäurechemie und speziell bei Adenin häufig eingesetzte CDMC [(Chloromethylen)dimethylammoniumchlorid)] verwendet ^[41]. Das Reagenz wurde aus Thionylchlorid und Dimethylformamid in Dichlormethan hergestellt und als 2M Lösung zu den jeweils in DMF gelösten, geschützten Adeninderivaten bei Raumtemperatur hinzugegeben. Durch Zugabe von Methanol wurden nach 10 Minuten die Reaktionen gestoppt und die primär gebildeten 6-*N*-Dimethylaminomethylenderivate **A** (Formamidinium-Ionen) (s. Abbildung 4.7) zerstört, so dass sich die freien Adeninderivate **22** und **23** bildeten.

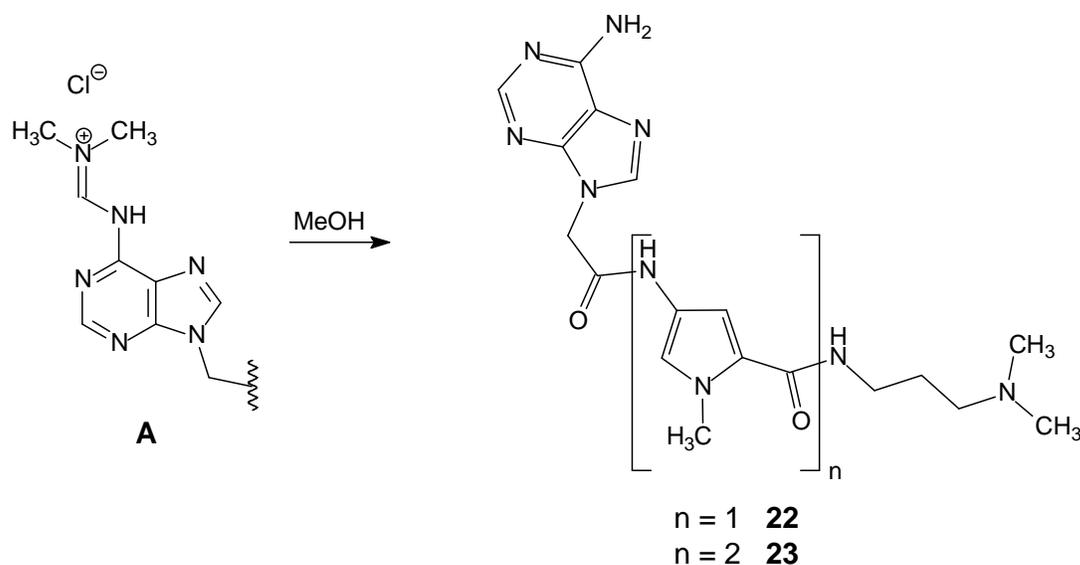


Abb.4.7: Methanolyse der intermediär entstehenden kationischen 6-*N*-Dimethylaminomethylenderivate

Deren Strukturen konnten mittels EI-MS bestätigt werden und auch die ¹H-NMR-Spektren zeigten die Abwesenheit der Anisoylreste. Leider konnten die Produkte aber aufgrund zahlreicher Nebenprodukte und der Labilität nicht in der notwendigen Reinheit isoliert werden.

4.2.3 Löslichkeitsvermittlung durch Pyridiniumchlorid

Hisatome et al. ^[42] gelang es, an der Aminogruppe ungeschützte Adenin-buttersäure- und -valeriansäure mit einem Anilinderivat zu Amidieren zu koppeln. Die Reaktionen fanden in Anwesenheit von Pyridiniumchlorid statt, welches als Löslichkeitsvermittler in einer DMF/THF-Mischung diente. Der hierfür verantwortliche Mechanismus ist jedoch bislang nicht geklärt. Pyridiniumchlorid hat in Wasser einen pK_s -Wert von ca. 5,2 ^[43], was theoretisch nicht ausreicht, um die Betainform der Adeninalkancarbonsäuren durch Protonierung der Carboxylatgruppe in das Kation zu überführen, da die Carbonsäuren einen pK_s -Wert in Wasser von unter 5 haben. Deshalb ist eine Ionenpaarbildung der Adeninalkancarbonsäure mit dem Pyridiniumchlorid als Ursache der Löslichkeitsvermittlung in Betracht zu ziehen.

Da bei Hisatome auch keine Konkurrenzreaktion der Amino-Gruppe an Position 6 des Adenins mit der Anilin-Aminogruppe des von ihm eingesetzten Porphyrinderivates auftrat, sollte dies in unserem Fall, wegen der im Vergleich zum Anilin größeren Nucleophilie des Aminopyrrollderivates, ebenfalls auszuschließen sein. Folglich wurden die Adeninalkancarbonsäuren in ungeschützter Form synthetisiert.

4.2.4 Darstellung der Adeninalkancarbonsäuren

Die Adeninessigsäure wurde durch alkalische Hydrolyse ihres käuflichen Esters gewonnen, die Adeninpropion- und -buttersäure analog zu den jeweiligen Pyrimidinalkancarbonsäuren durch N-Alkylierung mit einem ω -Bromalkancarbonsäureester und anschließender Esterhydrolyse dargestellt (s. Kapitel 4.1.2/4.1.3, S. 31/34, s. Tabelle 4.1, S. 45).

Auch beim Adenin traten Regioisomere auf, die wieder mittels Säulenchromatographie isoliert und mit speziellen NMR-Verfahren identifiziert wurden.

4.2.4.1 Strukturaufklärung der beiden Regioisomeren von Adeninbuttersäureethylester

Es konnten 2 Regioisomere isoliert werden:

1. 4-(Adenin-9-yl)buttersäureethylester **24**
2. 4-(Adenin-3-yl)buttersäureethylester **25**

4.2.4.1a 4-(Adenin-9-yl)buttersäureethylester (**24**)

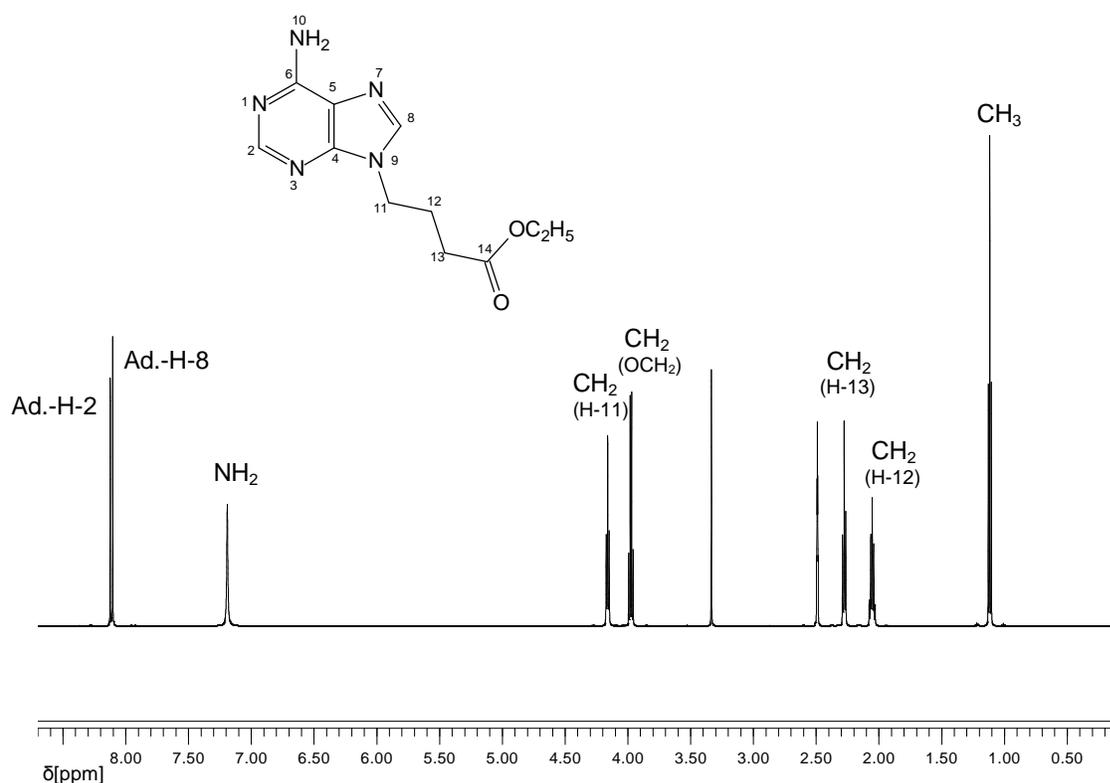


Abb.4.8: ¹H-NMR-Spektrum von 4-(Adenin-9-yl)buttersäureethylester **24**. Lösungsmittel: DMSO-d⁶.

Die Zuordnung der ¹H-NMR-Signale der Seitenkette von **24** erfolgte analog zu Thyminbuttersäureethylester und die Zugehörigkeit des Signals bei δ=7.22 zur Aminogruppe wurde durch Zugabe von D₂O und daraus resultierender Auslöschung des Signals durch Austausch der H- gegen D-Atome bewiesen. Nur die genaue Zuordnung der beiden Adenin-H-Atome war noch nicht sofort möglich. Die Signale

des ^{13}C -NMR-Spektrums (hier nicht abgebildet) konnten dagegen problemlos unter Zuhilfenahme von Datenbankspektren den entsprechenden C-Atomen zugeteilt werden.

Zum Beweis der N-9-Alkylierung beim Hauptprodukt war es nötig, ein low-pass-HMBC-Spektrum aufzunehmen. Hierbei handelt es sich um eine zweidimensionale heteronukleare Korrelation des ^1H - mit dem ^{13}C -NMR-Spektrum, bei der die ^1J - und ^2J -Kopplungen unterdrückt werden, da sie für die Auswertung nicht von Relevanz sind.

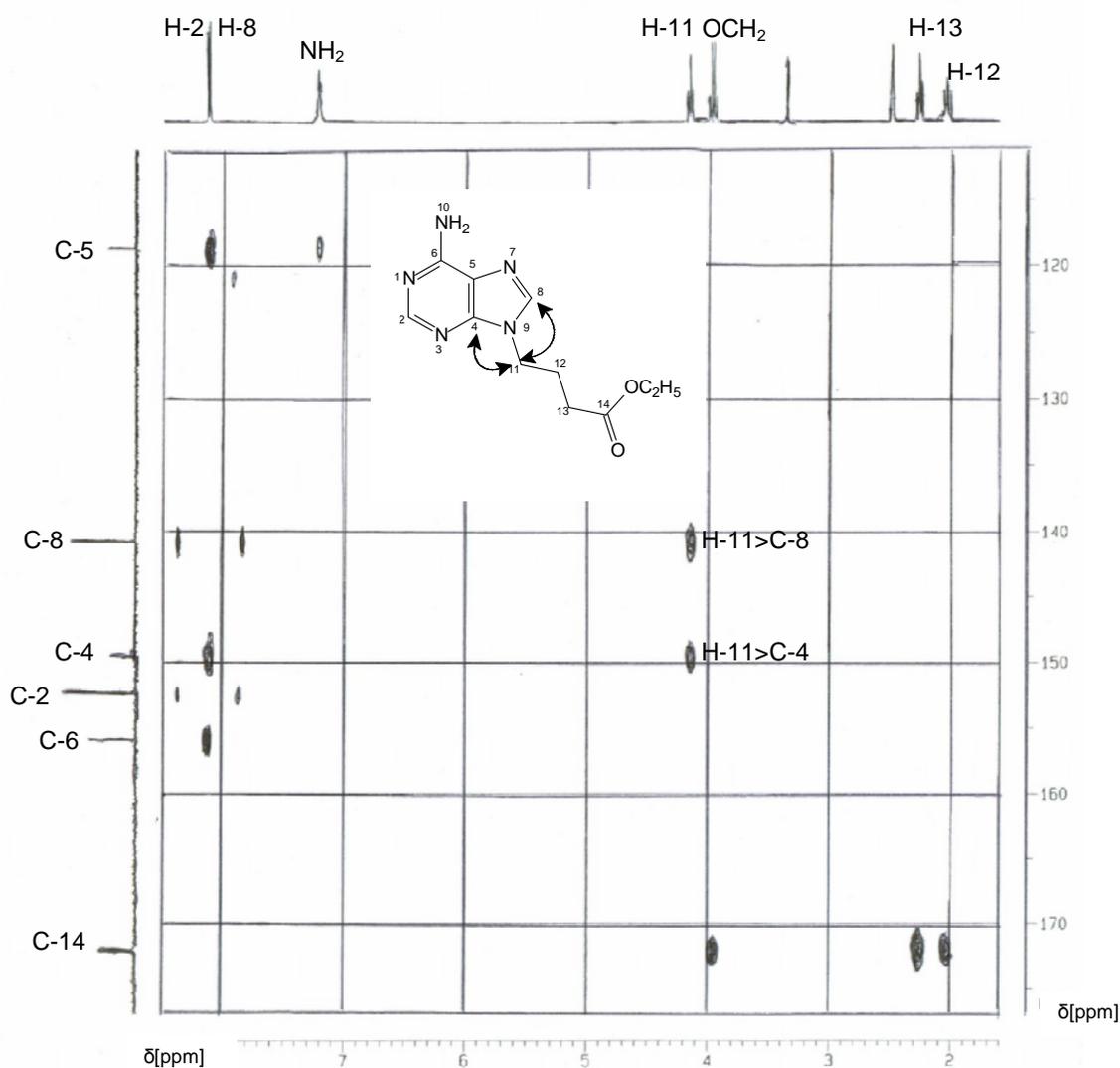


Abb.4.9: low-pass-HMBC-Spektrum von 4-(Adenin-9-yl)-buttersäureethylester. Lösungsmittel: DMSO- d_6 .

Die entscheidenden Signale für den Beweis der N-9-Alkylierung waren die ^3J -Kopplungen zwischen H-11 und C-4 und H-11 und C-8.

Zur Zuordnung der beiden Adenin-H-Atome wurde erneut der NOE genutzt. Hierbei wurde in H-11 eingestrahlt, was zu einer Signalintensivierung des höherfeldigen der beiden Signale führte. Bei diesem handelte es sich folglich um H-8 (s. Abbildung 4.10).

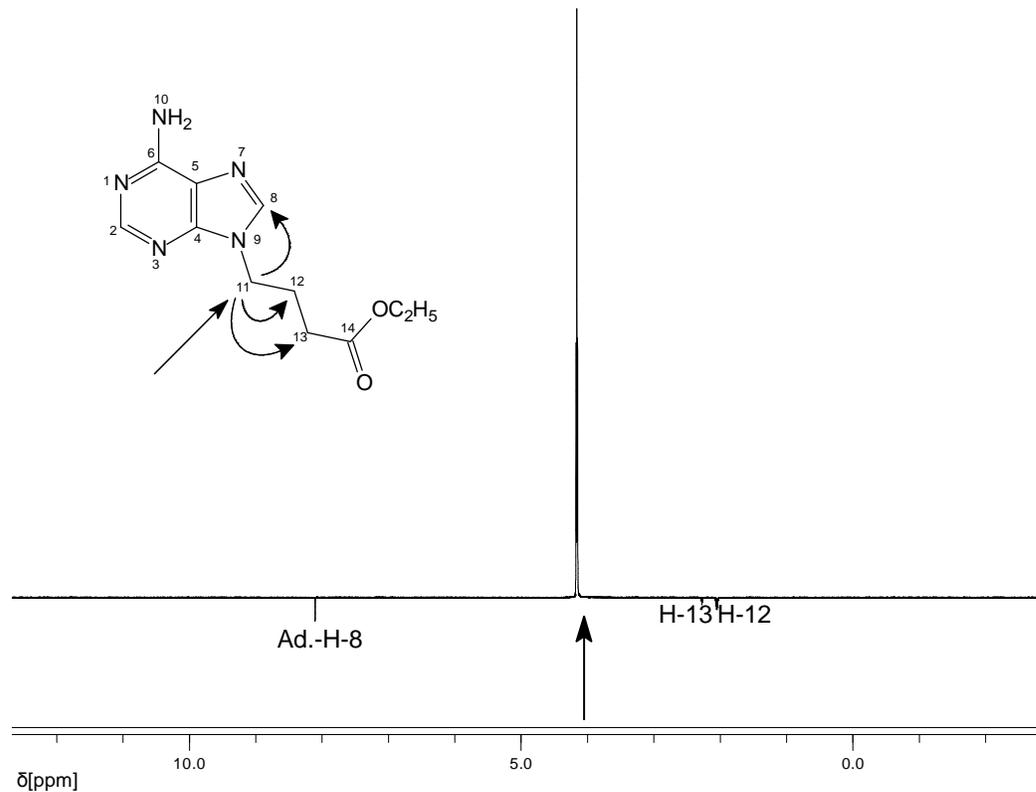


Abb. 4.10: Einstrahllexperiment in H-11, Signalintensivierung bei Adenin-H-8, H-12 und H-13. Lösungsmittel: DMSO-d^6 .

4.2.4.1b 4-(Adenin-3-yl)buttersäureethylester (**25**)

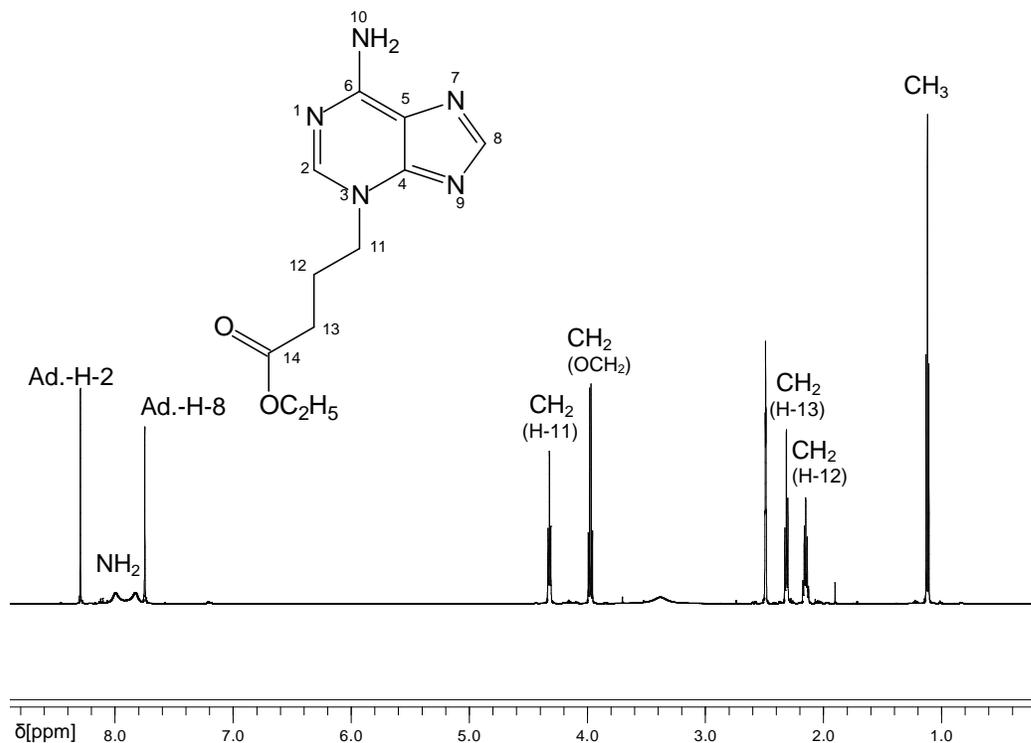


Abb. 4.11: ¹H-NMR von 4-(Adenin-3-yl)buttersäureethylester **25**. Lösungsmittel: DMSO-d⁶.

Die ¹H- und ¹³C-Signale von **25** konnten in Analogie zum in Position 9 alkylierten Derivat zugeordnet werden, mit Ausnahme der beiden Adenin-H-Signale.

Auch in diesem Fall wurde wieder ein low-pass-HMBC-Spektrum zur Identifizierung des alkylierten N-Atoms aufgenommen.

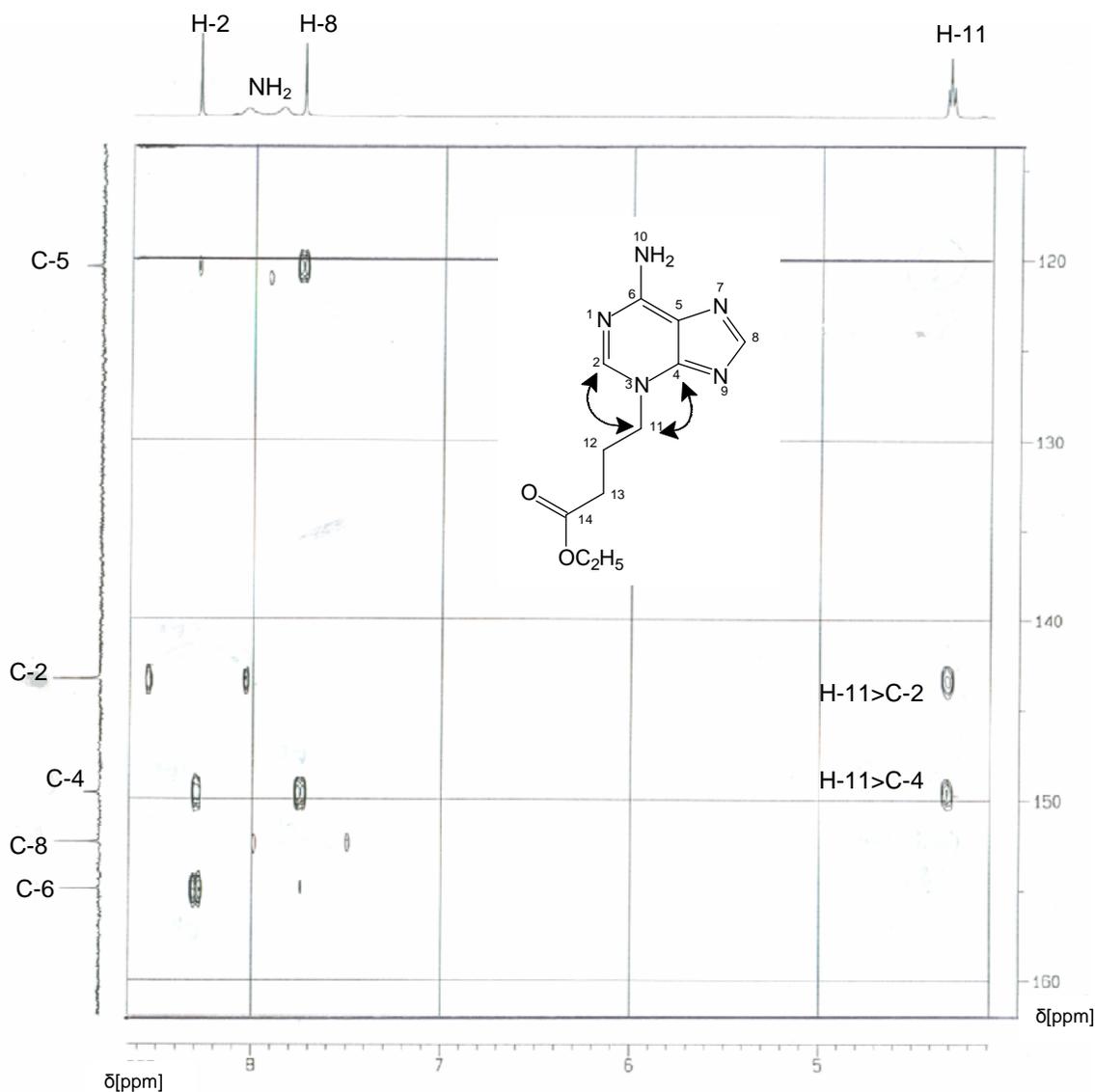


Abb. 4.12: low-pass-HMBC-Spektrum von 4-(Adenin-3-yl)buttersäureethylester **25**. Lösungsmittel: DMSO- d_6 .

Den Beweis für die N-3-Alkylierung lieferten die 3J -Kopplungen zwischen H-11 und C-2 und H-11 und C-4.

Das Einstrahlen in die Frequenz von H-11 führte zu einer Signalintensivierung des tieferfeldigen der beiden aromatischen Signale durch den NOE, weswegen dieses H-2 zugeordnet werden konnte, wogegen H-8 wie auch bei **24** das höherfeldige Signal verursachte (s. Abbildung 4.13, S. 44).

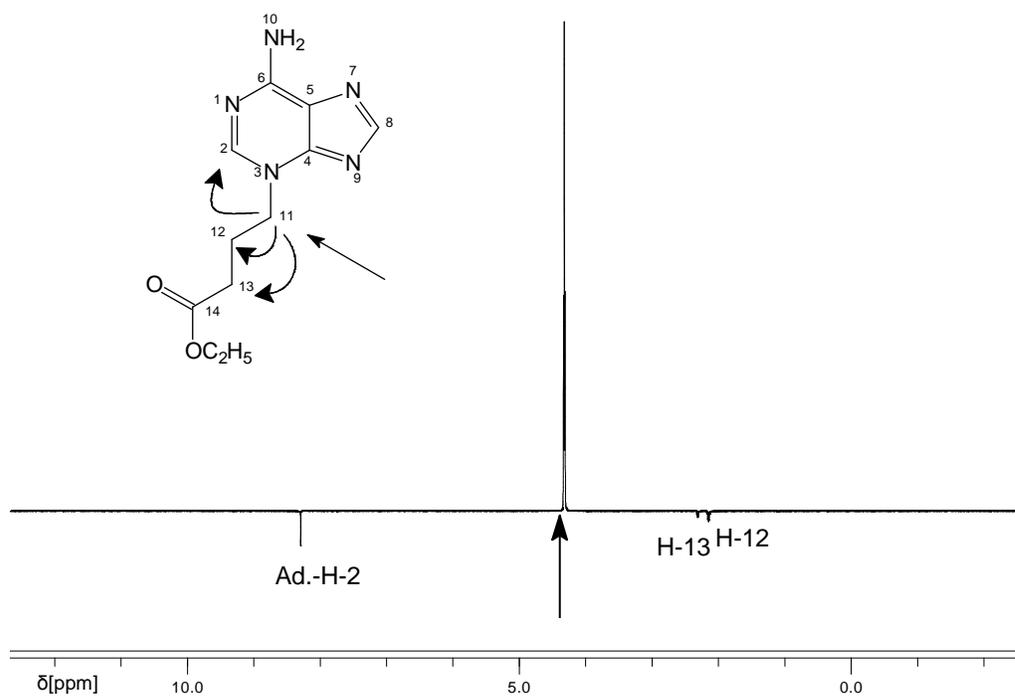
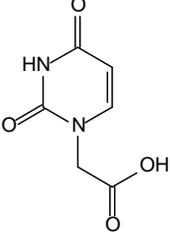
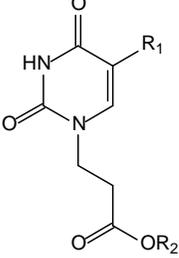
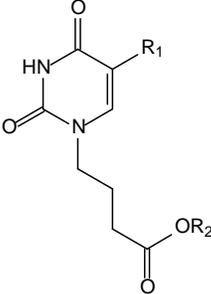
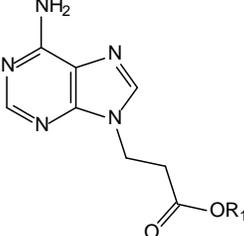
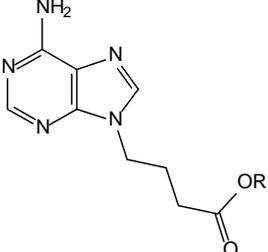


Abb.4.13: Einstrahllexperiment in H-11. Signalintensivierung bei Adenin-H-2. Lösungsmittel: DMSO-d⁶.

Edukt	Reagenzien	Produkt	Ausbeute [%]	Verbindung Nr.
Uracil	1. KOH Chloressigsäure 2. HCl		64	17
$R_1 = \text{H}$ Uracil $R_1 = \text{CH}_3$ Thymin	1. K_2CO_3 2. 3-Brompropionsäureethylester 3. NaOH 4. HCl	 $R_1 = \text{H}, \text{CH}_3$ $R_2 = \text{C}_2\text{H}_5, \text{H}$	$R_2 = \text{C}_2\text{H}_5$ 34 ($R_1 = \text{H}$) 39 ($R_1 = \text{CH}_3$) $R_2 = \text{H}$ 100 ($R_1 = \text{H}$ $= \text{CH}_3$)	26 27 28 29
$R_1 = \text{H}$ Uracil $R_1 = \text{CH}_3$ Thymin	1. NaH 2. 4-Brombuttersäureethylester 3. NaOH 4. HCl	 $R_1 = \text{H}, \text{CH}_3$ $R_2 = \text{C}_2\text{H}_5, \text{H}$	$R_2 = \text{C}_2\text{H}_5$ 22 ($R_1 = \text{H}$) 26 ($R_1 = \text{CH}_3$) $R_2 = \text{H}$ 100 ($R_1 = \text{H}$ $= \text{CH}_3$)	30 31 32 33
Adenin	1. K_2CO_3 2. 3-Brompropionsäureethylester 3. NaOH 4. HCl	 $R_1 = \text{C}_2\text{H}_5, \text{H}$	61 ($R_1 = \text{C}_2\text{H}_5$) 100 ($R_1 = \text{H}$)	34 35
Adenin	1. NaH 2. 4-Brombuttersäureethylester 3. NaOH 4. HCl	 $R_1 = \text{C}_2\text{H}_5, \text{H}$	71 ($R_1 = \text{C}_2\text{H}_5$) 100 ($R_1 = \text{H}$)	24 36

Tab.4.1: Überblick über die synthetisierten Nucleobasalkancarbonsäure(ester), die zur Kupplungsreaktion verwendet werden.

5 Darstellung von Pyrrolcarboxamiden mit Nucleobasen-alkancarbonsäuren als N-terminaler Funktion

5.1 Auswahl des geeigneten Kupplungsverfahrens

5.1.1 Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) als Reagenzien

Zur Durchführung der Amidkupplung wurde zunächst das seit der Ergebnisse von Sheehan und Hess (1955) bei Peptidsynthesen am häufigsten verwendete DCC ausgewählt ^[44]. Die eingesetzte Carbonsäure bzw. das in Lösung vorliegende Carboxylat-Anion addiert sich hierbei nucleophil an das DCC unter Bildung eines O-Acylisoharnstoffderivates, das ein wirksames Acylierungsmittel ist (s. Abbildung 5.1).

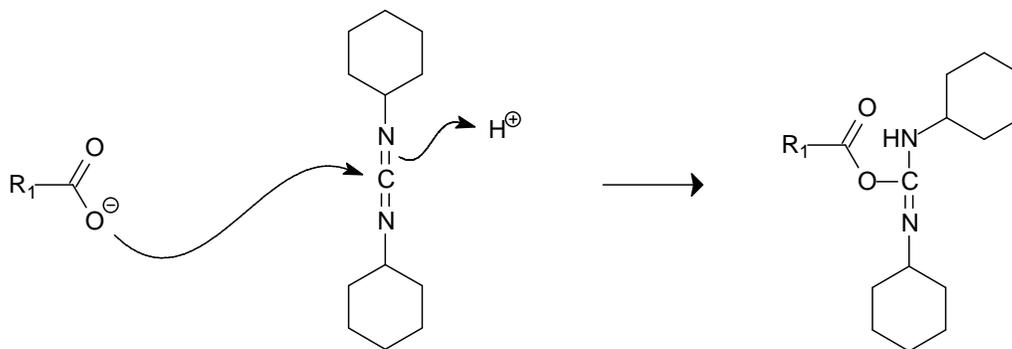


Abb.5.1: Schematische Darstellung der Bildung des O-Acylisoharnstoffderivates aus Carbonsäure und DCC

Durch Zugabe eines Amins (in diesem Fall des Aminopyrrolderivates) kommt es zur raschen Aminolyse, wobei sich neben dem Carbonsäureamid der Dicyclohexylharnstoff bildet (s. Abbildung 5.2).

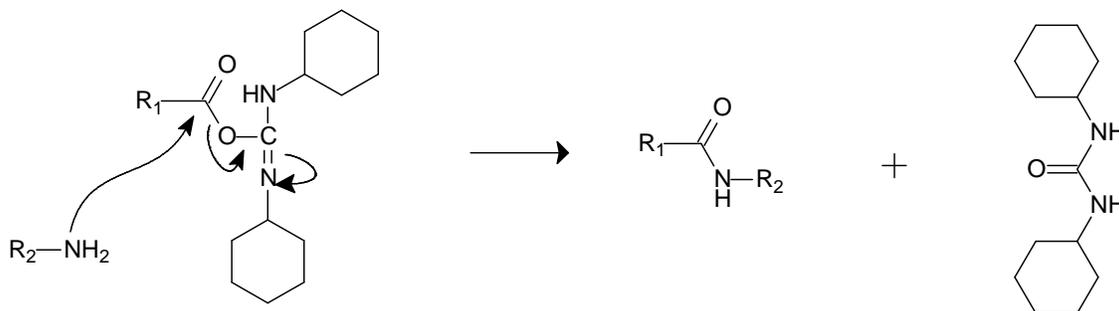


Abb. 5.2: Schematische Darstellung der Bildung des Dicyclohexylharnstoffs

Ein Problem bei der Kupplung mit DCC ist, dass es aufgrund der Reaktivität des Zwischenproduktes - insbesondere bei eher langsam reagierenden Aminen - zu einem intramolekularen Acyltransfer unter Bildung eines N-Acylharnstoffderivates (Ureid) kommt, welches nicht mehr zum gewünschten Produkt umgesetzt werden kann (s. Abbildung 5.3).

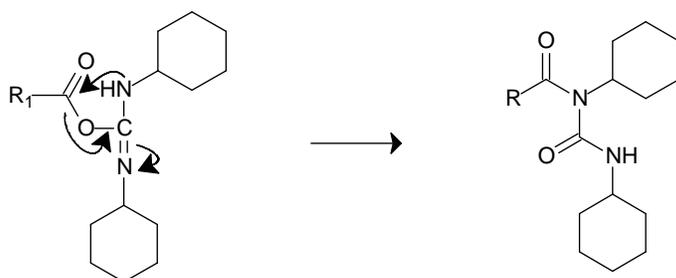


Abb. 5.3: Intramolekulare Umlagerung des O-Acylisoharnstoffderivates zum N-Acylharnstoffderivat

Diese Gefahr lässt sich in Gegenwart von 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) deutlich vermindern. Dieses kann mit dem O-Acylisoharnstoffderivat sehr rasch reagieren, bevor Nebenreaktionen auftreten. Im Gegensatz zum Ureid ist das O-Acylhydroxybenzotriazol ebenso wie das O-Acylisoharnstoffderivat als aktivierte Carbonsäure aufzufassen und somit ebenfalls der Aminolyse zugänglich. Aus diesem Grund kann die Ausbeute im Vergleich zur Verwendung von DCC alleine gesteigert werden.

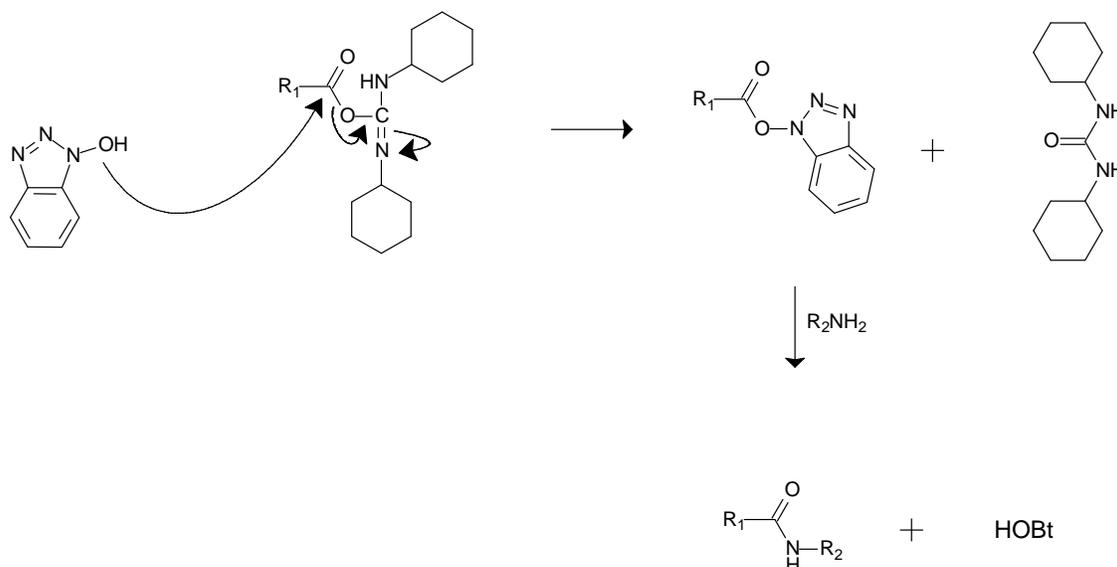


Abb.5.4: Reaktion des O-Acylisoharnstoffderivates mit 1-Hydroxybenzotriazol zum O-Acylhydroxybenzotriazol

Zur Durchführung der Reaktion wurden die Carbonsäure, DCC und das Aminopyrrol im Verhältnis 1:1:1 (jeweils in DMF gelöst) bei Raumtemperatur zusammengegeben, mit einigen Tropfen Hünigs Base versetzt und die Mischung für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Trotz Verwendung von HOBt waren die Ausbeuten bei der Umsetzung der Nucleobasenalkancarbonsäuren vergleichsweise gering, was möglicherweise an der - aufgrund der schlechten Edukt-Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln - relativ hohen benötigten DMF-Menge lag. Demzufolge fanden weitere Kupplungsreagenzien Verwendung.

5.1.2 1-Methyl-2-chlor-pyridiniumiodid (Methode nach Mukaiyama)^[45]

Beim Verfahren nach Mukaiyama wird die Carbonsäure zunächst durch nucleophile Substitution des Chloratoms im 2-Chlor-*N*-methylpyridiniumiodid aktiviert. Die anschließende Aminolyse führt zum gewünschten Carbonsäureamid und dem 1-Methyl- α -pyridon (s. Abbildung 5.5).

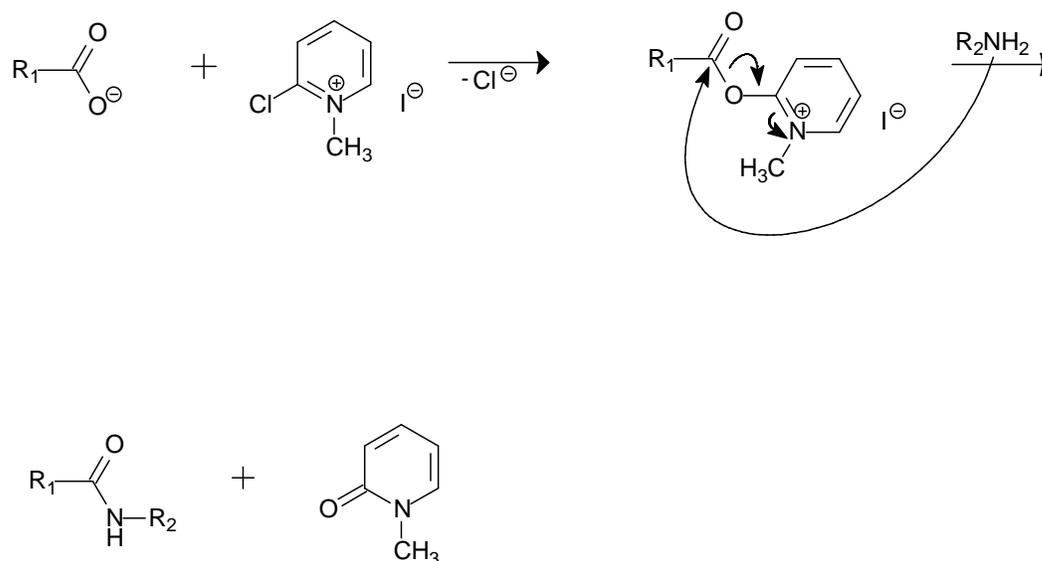


Abb. 5.5: Mechanismus der Amidbildung nach der Mukaiyama-Methode

Es wurden 1.1 mmol Thyminbuttersäure, 1.3 mmol 1-Methyl-2-chlor-pyridiniumiodid, 1.1 mmol Aminopyrrolcarboxamid (jeweils in DMF gelöst) und einige Tropfen Hünigs Base miteinander versetzt und 2 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Anschließend ließ man bei Raumtemperatur weiterrühren. Weder die aufgeführte Reaktionsführung,

noch Modifikationen des Verfahrens in Bezug auf Menge der eingesetzten Komponenten und Temperatur führten zu der gewünschten Umsetzung.

5.1.3 Chlorameisensäureethylester ^[42]

Dieses Verfahren beruht auf der Bildung und Aminolyse eines gemischten Carbonsäure-Kohlensäureanhydrids. Als Aktivierungsreagenz wird Chlorameisensäureethylester eingesetzt.

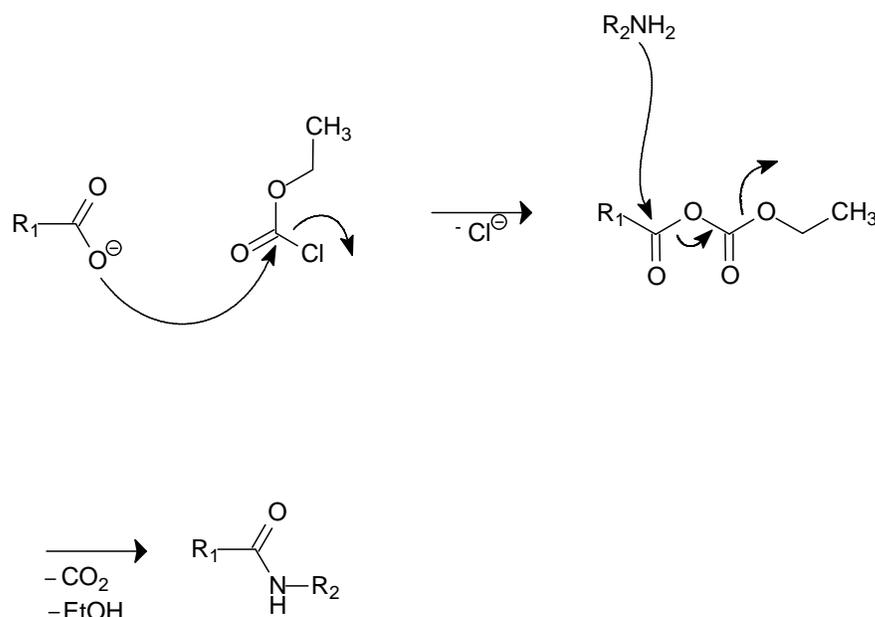


Abb. 5.6: Mechanismus der Amidbildung mit Chlorameisensäureethylester als Aktivierungsreagenz.

Der Angriff des Amins erfolgt selektiv an der ursprünglichen Carbonsäure-Carbonylgruppe (s. Abbildung 5.6), weil die Reaktivität der O-Acyloxykohlensäureester-Carbonylgruppe durch Mesomeriestabilisierung mit den zwei benachbarten Sauerstoffatomen vermindert ist ^[44]. Außerdem führt die Bildung von thermodynamisch stabilem Kohlendioxid zu einem Entropiegewinn. Da die gemischten Anhydride sehr labil sind und sich bei Raumtemperatur zersetzen, ist eine Reaktionsdurchführung bei Temperaturen unter -20°C erforderlich.

Dieses Verfahren erwies sich nach präparativ notwendigen Modifikation der Vorschrift [42] als geeignet. Die Ausbeuten waren deutlich besser als beim DCC-Verfahren, weshalb es für die meisten der folgenden Amidkupplungen verwendet wurde.

5.2 Darstellung der Carboxamide

5.2.1 Amid-Kupplung der Thymin- und Uracilalkancarbonsäuren

Die Thymin- bzw. Uracilalkancarbonsäuren wurden mit Chlorameisensäureethylester zum gemischten Anhydrid aktiviert und anschließend mit dem Aminopyrrolcarboxamid, das zuvor durch Reduktion des Nitropyrrol-Derivates gewonnen wurde, zum Carbonsäureamid umgesetzt (s. Abbildung 5.7). Die Isolierung des Produktes erfolgte mittels Säulenchromatographie.

5.2.2 Amid-Kupplung der Adeninalkancarbonsäuren

Die Durchführung entsprach der Synthese der Thymin- und Uracilderivate mit dem Unterschied, dass die Adeninalkancarbonsäuren zunächst mit Pyridiniumchlorid (s. Kapitel 4.2.3, S. 38) in Lösung gebracht wurden. Vor Durchführung der säulenchromatographischen Trennung wurde das Pyridiniumchlorid durch Extraktion entfernt.

Die Adeninessigsäure war selbst in Anwesenheit von Pyridiniumchlorid nicht löslich, weshalb nur die Propion- und Buttersäurederivate gekuppelt werden konnten.

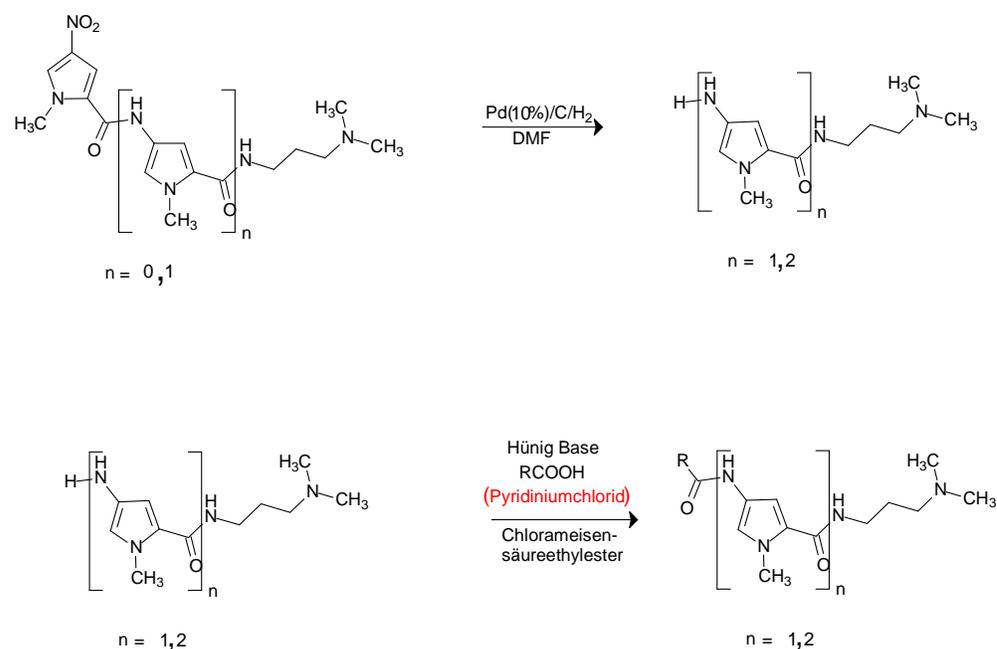
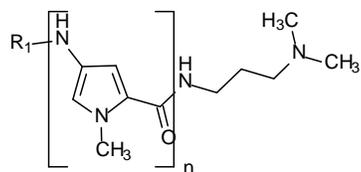


Abb.5.7: Allgemeines Reaktionsschema zur Darstellung der Nucleobasen-gekoppelten Oligopyrrol-carboxamide; R = Nucleobasen-Alkyl-Rest



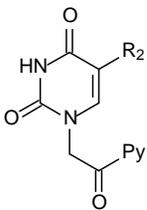
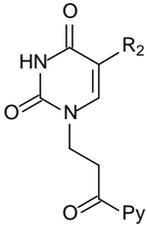
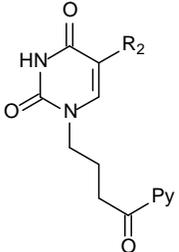
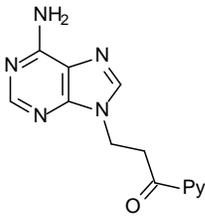
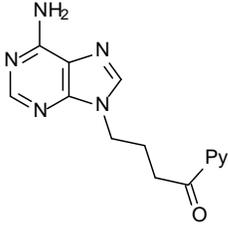
R ₁	R ₂	n	Ausbeute [%]	Verbindung Nr.
	- H	1	47	37
	- CH ₃	1	49	38
	- H	1	31	39
	- H	2	27	40
	- CH ₃	1	25	41
	- CH ₃	2	36	42
	- H	1	35	43
	- H	2	33	44
	- CH ₃	1	45	45
	- CH ₃	2	37	46
		1	30	47
		2	19	48
		1	37	49
		2	22	50

Abb. 5.8: Überblick über die synthetisierten Nucleobasen-gekoppelten Lexitropine

6. Zellbiologische Zytotoxizitäts-Studien und biophysikalische, biochemische Untersuchungen an der DNA

Alle Verbindungen der ersten Serie der vorliegenden Arbeit wurden beim NCI (National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, USA) ^[46] auf ihre Zytotoxizität an verschiedenen Tumorzelllinien getestet. Parallel dazu wurden von Bailly et al. im Laboratory of Pharmacology, INSERM in Lille, Frankreich, mit ausgewählten Substanzen validierte biophysikalische und biochemische Testungen an DNA bzw. Topoisomerasen I und II durchgeführt.

Die Ergebnisse sollten zeigen, ob Wechselwirkungen mit DNA und Topoisomerasen auftreten, und bei positiven Resultaten Aussagen über den Bindungsmodus und die Sequenzselektivität der Bindung erlauben. Das NCI-Screening sollte zusätzlich Hinweise auf die Membranpermeation liefern: sind die Testsubstanzen in der Lage ihr Target zu erreichen und das Wachstum von Tumorzellen zu hemmen?

Anhand dieser Ergebnisse war die Ableitung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen geplant. Hierbei sollte neben der Untersuchung der Eigenschaften der einzelnen Basen insbesondere der Linkerlänge und der Anzahl der Pyrrolbausteine besondere Beachtung geschenkt werden.

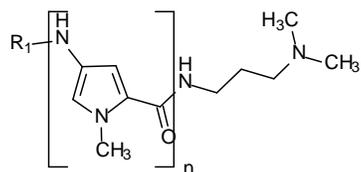
Die Verfahrensweise und die Ergebnisse werden in folgender Weise besprochen:

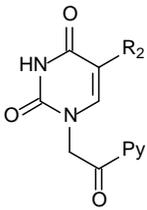
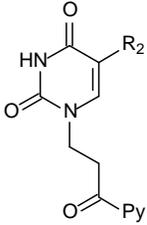
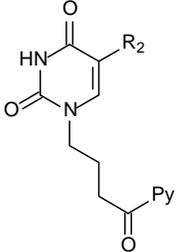
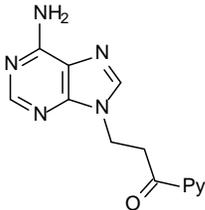
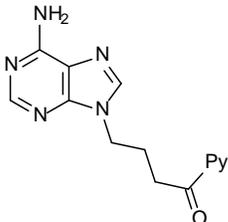
- 1) Zellbiologische NCI-Testungen (Antitumor-Screening) und deren Ergebnisse
- 2) Beschreibung der verwendeten biophysikalischen und biochemischen Verfahren
- 3) Ergebnisse der Verfahren aus 2)
- 4) Interpretation der Ergebnisse

6.1 Zellbiologische NCI-Testungen und deren Ergebnisse

Alle Nucleobasen-gekoppelten Verbindungen wurden im Primary Anticancer Assay des NCI auf ihre zytotoxische Potenz hin an drei empfindlichen Tumorzelllinien (MCF7 breast cancer, NCI-H460 lung cancer und SF-268 glioma) untersucht. Eine Substanz wird als aktiv betrachtet, wenn ihre 10^{-4} molare Lösung in DMSO das Wachstum mindestens einer Zelllinie auf 32 % oder weniger reduziert (Durchführung s. [46]). Dieses Ziel wurde von keiner der Testsubstanzen erreicht.

Eine Übersicht über die genauen Ergebnisse liefert Tabelle 6.2 (S. 54).



R ₁	R ₂	n	Verbindung Nr.
	- H	1	37
	- CH ₃	1	38
	- H	1	39
		2	40
	- CH ₃	1	41
		2	42
	- H	1	43
		2	44
	- CH ₃	1	45
		2	46
		1	47
		2	48
		1	49
		2	50

Tab.6.1: Im Primary Anticancer Assay des NCI untersuchte Verbindungen

Verbindung	MCF7 (Brust)	NCI-H460 (Lunge)	SF-268 (ZNS)	Ergebnis
37	105	111	129	inaktiv
38	104	101	113	inaktiv
39	108	111	126	inaktiv
40	88	112	121	inaktiv
41	108	110	127	inaktiv
42	86	87	98	inaktiv
43	98	103	107	inaktiv
44	78	116	122	inaktiv
45	99	94	102	inaktiv
46	97	108	98	inaktiv
47	97	92	101	inaktiv
48	101	90	107	inaktiv
49	81	96	94	inaktiv
50	81	115	123	inaktiv

Tab.6.2: Ergebnisse des Primary Screenings. Die Werte in der Tabelle geben das Zellwachstum der Tumorzell-Linien in Prozent an, nachdem die Zellkulturen mit einer 10^{-4} M Lösung der Testsubstanz in DMSO versetzt worden sind. Je kleiner die Werte in der Tabelle sind, desto stärker zytotoxisch wirksam ist die Substanz.

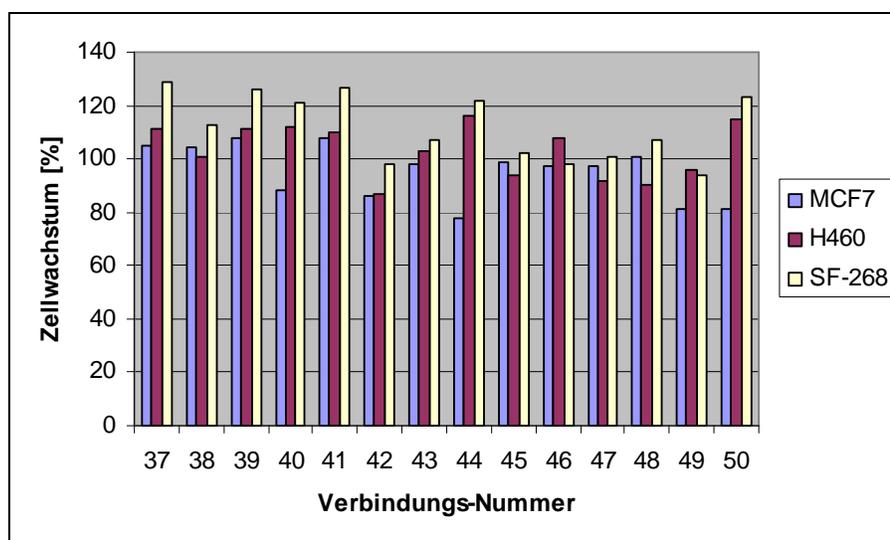


Abb.6.1: Übersicht über die NCI-Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms. x-Achse: Verbindungs-Nummer; y-Achse: Prozentuales Zellwachstum, welches nach Einwirkung einer 10^{-4} M Lösung der Testsubstanz in DMSO auf die jeweilige Tumor-Zellkultur verbleibt.

Wie Abb. 6.1 (S. 54) zeigt, liegen die Substanzen in ihrer Aktivität in einem Bereich von 78-129 %. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Verbindungen mit verschiedenen Nucleobasen bzw. unterschiedlicher Linkerlänge.

6.2 Beschreibung der verwendeten biophysikalischen und biochemischen Verfahren

6.2.1 Thermische Denaturierung/Bestimmung der Schmelztemperatur der DNA (ΔT_m -Wert) ^[34,47,48]

Durch Temperaturerhöhung einer wässrigen DNA-Lösung kommt es zum „Schmelzen“ der DNA, d.h. die Doppelstränge werden getrennt. Der Denaturierungsprozess kann anhand einer charakteristischen hyperchromen Absorptionsverschiebung im UV-Bereich ($\lambda = 250-280$ nm; Absorptionsmaxima der Purin- und Pyrimidinbasen), die durch Aufhebung der elektronischen Wechselwirkungen (π -Stacking) zwischen den gestapelten Basen bedingt ist, verfolgt werden. Der T_m -Wert ist der Wendepunkt der Absorptionskurve; hier liegt folglich die Hälfte der DNA doppelsträngig, die andere Hälfte einzelsträngig vor.

Tritt eine Substanz in Wechselwirkung mit der DNA, wird die Doppelhelix stabilisiert und es kommt zur Erhöhung der Denaturierungstemperatur. Die Differenz zwischen T_m der Nucleinsäure mit gebundener Substanz und T_m^0 der reinen Nucleinsäure ist der ΔT_m -Wert. Dieser korreliert in der Regel mit der Bindungsstärke einer Substanz an die DNA, ohne aber Aussagen über den Bindungsmodus zu machen.

Im Labor von Bailly (INSERM, Lille) wurde jeweils sowohl Kalbthymus DNA, die einen GC-Anteil von 42% hat, als auch das doppelsträngige Polymer Poly(dAT)₂ mit der doppelt molaren Menge der Testsubstanzen versetzt. Aufgrund des GC-Anteils schmilzt CT-DNA bei einer höheren Temperatur ($T_m = 87$ °C), was zur Folge hat, dass der Nachweis mit Poly(dAT)₂ ($T_m = 47$ °C) empfindlicher ist ^[49,50]. Deshalb wurde diese zusätzlich im Verhältnis 1:10 mit den ausgewählten Verbindungen getestet.

6.2.2 DNA-Relaxations-Assay/Topoisomerase-Hemmtest

DNA-Moleküle, die sich nur in ihrer Verwindungszahl Lk (linking number; Anzahl der Rechtswindungen eines DNA-Stranges um die in einer Ebene gelegte Helixachse)

voneinander unterscheiden, bezeichnet man in der Stereochemie als Topoisomere. Diese können durch Schneiden eines oder beider DNA-Stränge und anschließender Religation ineinander überführt werden, was durch Topoisomerasen katalysiert wird. Typ-I-Topoisomerasen katalysieren durch Spaltung nur eines DNA-Stranges die Entspiralisierung negativ superspiralisierter DNA, wobei die relaxierte Form entsteht. Typ-II-Topoisomerasen ermöglichen dagegen in Anwesenheit von ATP durch Spaltung beider Stränge den entgegengesetzten Prozess - die Superspiralisierung [51].

Da die negativ *superspiralisierte*, die *relaxierte* und auch die sogenannte *nicked* DNA (DNA mit Einzelstrangbruch) mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden können (s. Abb. 6.2, S. 57), kann mit diesem Verfahren die Aktivität von Topoisomerase-I-Inhibitoren sichtbar gemacht werden. Diese Inhibitoren, sofern es sich um TOPO-I-*Poisons* (s. Einleitung S. 10) handelt, hemmen nämlich die Religation der DNA-Stränge. Je größer folglich der *nicked*-DNA-Anteil ist, desto stärker ist die Topoisomerase-I-hemmende Aktivität.

Nach Einwirkung von Topoisomerase II entsteht dagegen durch Doppelstrangbruch statt der *nicked* DNA die *lineare* Form [52]. Diese kann ebenfalls geleelektrophoretisch von der negativ *superspiralisierten* und *relaxierten* Form separiert werden. Der Topoisomerase II - Hemmtest wurde bei den folgenden Serien (s. Kapitel 8 und 10, S. 81ff. und 98ff.) zusätzlich zur Überprüfung der Topoisomerase-I-Hemmaktivität, die zahlreiche Combilexine aufweisen (s. Einleitung, S. 10), durchgeführt, da die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Interkalatoren Naphthalimid, Acridin und Anthrachinon Struktur-Bestandteil bekannter TOPO-II-Hemmer sind [11,53].

Durchführung des Hemmtests:

Negativ superspiralisierte Plasmid-DNA (*nicked* DNA-Anteil: max. 10%) wurde bei 37°C für 30 min mit Topoisomerase I oder II in einem die physiologischen Bedingungen imitierenden Reaktionspuffer (beim TOPO-II-Hemmtest muss dieser zusätzlich ATP enthalten) in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen (1, 10 und 50 µM) an Testsubstanz inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS und Proteinase K gestoppt. Es folgte eine Gelelektrophorese der DNA-Proben in einem 1%igen, Ethidiumbromid (1 mg/ml) enthaltenden Agarosegel. Die Detektion der Banden erfolgte unter UV-Licht [50].

Wie oben erwähnt, gelingt in Anwesenheit von Ethidiumbromid eine Auftrennung von *nicked*, negativ *superspiralierter* und *relaxierter* DNA (s. Abb. 6.2) (beim TOPO II-Hemmtest erscheint statt der *nicked*-Form *lineare* DNA ^[52]). Während der Interkalator nämlich keinen Einfluss auf die Struktur der *nicked* DNA hat, bindet die *relaxierte* Form im Gel an Ethidiumbromid, wodurch es zu einer Verdrillung zu positiv superspiralierter DNA kommt, welche aufgrund anderer Ladungsverhältnisse auf der Oberfläche noch schneller als die negativ *superspiralisierte* Form wandert ^[54].

(+) *ethidium*

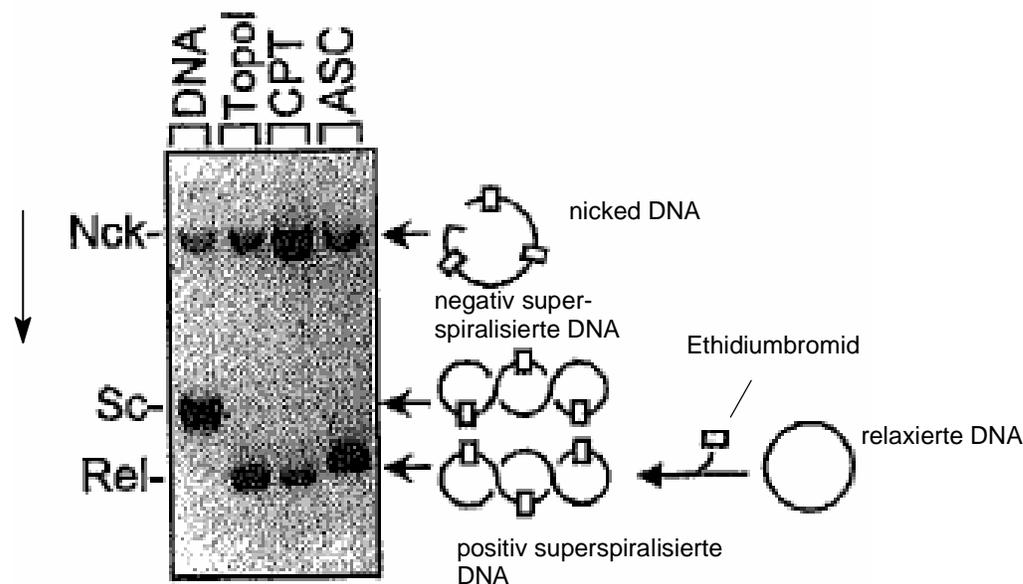


Abb.6.2: Auftrennung von *nicked* (Nck), negativ *superspiralierter* (Sc) und *relaxierter* (Rel) DNA in Ethidiumbromid-haltigem Agarosegel; DNA: negativ *superspiralisierte* pKMp27 DNA, Topo-I: DNA inkubiert mit Topoisomerase I, CPT: DNA inkubiert mit Topoisomerase I in Anwesenheit des TOPOI-Hemmers Camptothecin, ASC: DNA inkubiert mit Topoisomerase I in Anwesenheit von Ascididemin.

Im Labor von Prof. Bailly wurde zusätzlich eine Variation des Topoisomerase-I-Hemmtests durchgeführt. Die Vorgehensweise war bis auf die Verwendung von Ethidiumbromid-freiem Gel identisch. Dadurch wurde das Laufverhalten der Topoisomere verändert. Die relaxierte Form wanderte nun genauso wie *nicked* DNA wesentlich langsamer im Gel als die kompakte *superspiralisierte* Form (s. Abb. 6.3, S. 58), was eine Unterscheidung von *relaxierter* und *nicked* Form nicht mehr möglich machte.

Dieser Test dient primär der Untersuchung von DNA-Entspiralisierung, welche auch durch interkalierende Substanzen und nicht notwendigerweise durch TOPO-I-Poisons verursacht wird.

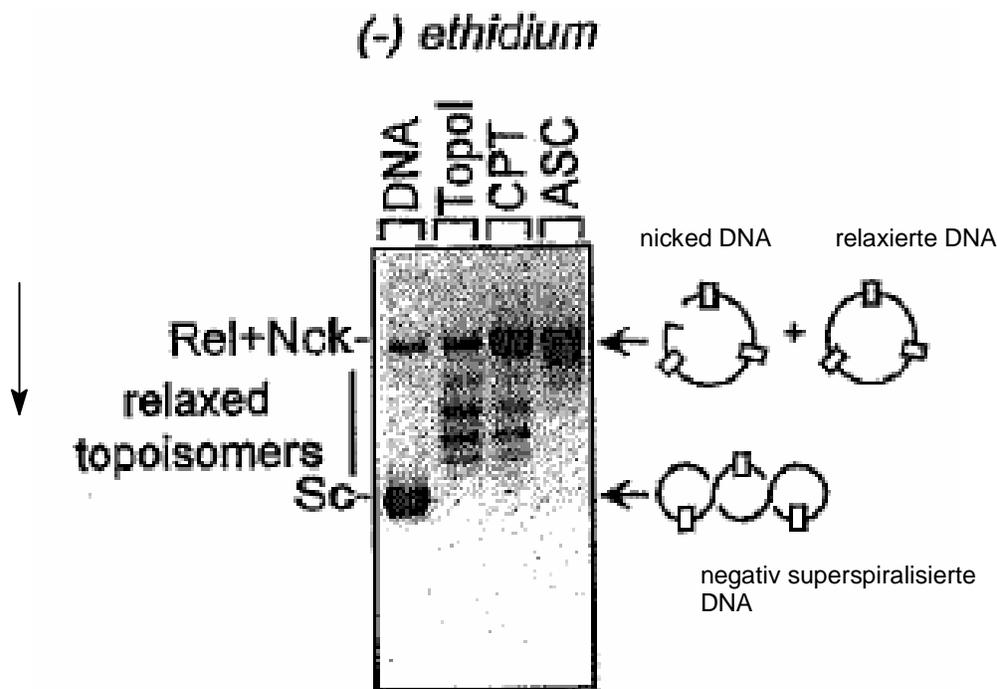


Abb.6.3: Laufverhalten von *nicked* (Nck), *superspiralisierter* (Sc) und *relaxierter* (Rel) DNA in Ethidiumbromid-freiem Agarosegel. Weitere Abkürzungen siehe Abbildung 6.2, S. 57.

6.2.3 Circulardichroismus (CD) ^[53,56]

Beim Durchgang von links- und rechtscircular polarisiertem Licht durch ein optisch aktives Molekül, kommt es zu einer unterschiedlichen Wechselwirkung der beiden Strahlenarten mit der Substanz und damit zu einer unterschiedlichen Lichtabsorption. Dies ist die Grundlage des sogenannten Circulardichroismus, welcher als Differenz ΔA der Absorption des links- und rechtszirkular polarisierten Lichtes in Abhängigkeit von der Wellenlänge definiert ist ^[55].

Durch Bindung der achiralen Testsubstanzen an die chirale DNA kommt es zu einer induzierten optischen Aktivität der Liganden. Dadurch wird es möglich mittels CD-Analyse Aussagen über den Bindungsmodus zu machen.

Trägt man ΔA gegen die Wellenlänge λ auf, kommt es bei DNA-bindenden Combilexinen zu 2 charakteristischen Signalen: ein positives CD-Signal bei ca. $\lambda=310$ nm, das durch minor-groove-binding des Oligopyrrolbausteins verursacht wird, und ein negatives CD-Signal bei der Wellenlänge des jeweiligen Interkalatorbausteins.

Insbesondere letzteres Signal kann in der Intensität stark schwanken, was durch unterschiedliche Lokalisation des Interkalators in der DNA bedingt ist. Unter Umständen sollten deshalb weitere Verfahren wie Viskosimetrie oder ELD (Electric Linear Dichroism) hinzugezogen werden. Hierauf wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

6.2.4 UV-Absorptionsspektroskopie ^[47,50,57]

Die Absorptionsspektroskopie ist ebenfalls ein Verfahren, mit dem die Bindung einer Testsubstanz an DNA nachgewiesen werden kann.

Hierzu verfolgt man die Änderung der Absorptionskurve des zu untersuchenden Moleküls während einer Titration mit z.B. CT-DNA. Kommt es zur Bindung so ist dies an einer hypochromen - in der Regel assoziiert mit einer bathochromen - Verschiebung im Absorptionsspektrum zu erkennen. Diese Effekte sind auf π,π -Wechselwirkungen der Elektronen der Testsubstanz mit denen der Nucleobasen der DNA zurückzuführen. Ein gut aufgelöster isosbestischer Punkt (s. Abbildung 6.4) gibt Hinweise auf eine homogene Interaktion, ein schlecht aufgelöster lässt auf mehrere verschiedene Bindungstypen schließen.

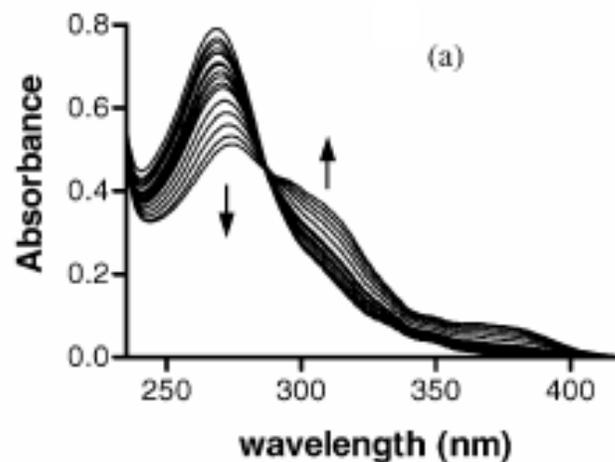


Abb.6.4: Absorptionmessungen mit einer Testsubstanz während einer Titration mit CT-DNA. Veränderung des DNA/Testsubstanz-Verhältnisses von 0 nach 20, mit der Folge einer hypochromen (Pfeil nach unten) und bathochromen (Pfeil nach oben) Verschiebung. Der isosbestische Punkt ist in dieser Modell-Abbildung gut aufgelöst, was für eine homogene Interaktion der Testsubstanz mit der DNA spricht.

Zum Zeitpunkt der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit war in der Arbeitsgruppe Bailly (INSERM, Lille) noch keine ausreichende Anzahl an Titrationen durchgeführt

worden, um den isosbestischen Punkt genau zu lokalisieren. Die Aussagekraft der zu kommentierenden UV-Ergebnisse ist also vorerst beschränkt.

6.3 Ergebnisse der biophysikalischen und biochemischen Verfahren

Aus der Serie der Nucleobasen-Hybridmoleküle wurden die Substanzen **37**, **39**, **40**, **41**, **43**, **44**, **45**, **46** und **50** ausgewählt, um mittels der in Kapitel 6.2 (S. 55) beschriebenen Methoden analysiert zu werden. Tabelle 6.3 zeigt die Ergebnisse dieser Verfahren. Bei den Verbindungen, die zu keinem signifikanten Anstieg des T_m -Wertes führten, die also keine DNA-Bindung zeigten, wurde auf die weiterführende Messung des Circular dichroismus und die UV-Titration verzichtet. Der TOPO II-Inhibitions-Assay wurde nicht durchgeführt, da eine Aktivität der Testsubstanzen aufgrund fehlender interkalierender Heterocyclen nicht zu erwarten war.

Verbindung	ΔT_m	ΔT_m	ΔT_m	CD	UV	topo I inhibition	
	CT DNA r=0,5	polydAdT r=0,5	polydAdT r=0,1			-BET	+BET
37	0	1,3	0	-	-	-	-
39	0	0	0			-	-
40	0	5,2	0	+	+(h,b)	-	-
41	0	0	0			-	-
43	0	0	0			-	-
44	1,3	6,5	2,8	+	+(h,b)	-	-
45	0	0	1,4	-	-	-	-
46	1,1	5,9	1,2	+	+(h,b)	-	-
50	1,3	6,8	2,8	+	+(h,b)	-	-

Tab.6.3: Ergebnisse der DNA-Bindungs- und Topoisomerasehem-Assays. ΔT_m : Differenz zwischen T_m der Nucleinsäure mit gebundenem Ligand und T_m^0 der reinen Nucleinsäure. r = molares Verhältnis DNA zu Testsubstanz. CD: Circular dichroismus, (+) und (-) steht für positives bzw. negatives CD-Signal. UV: UV/VIS-Spektroskopie, (-) keine Änderung der Absorptionskurve, (+) Änderung der Absorptionskurve, (b) bathochrome Verschiebung, (h) hypochrome Verschiebung. Der Topoisomerase I -Hemm-Assay wurde in Agarosegel in Anwesenheit und Abwesenheit von Ethidiumbromid (BET) durchgeführt.

Wie Tabelle 6.3 zu entnehmen ist, zeigen vier der getesteten Verbindungen (**40**, **44**, **46**, **50**) einen signifikanten Anstieg der DNA-Schmelztemperatur, v.a. bei polydAdT

mit $r = 0,5$. Damit korrelierend ist auch jeweils ein positiver Circular dichroismus und eine hypo- und bathochrome Verschiebung bei der UV-Titration. Keine der neun Verbindungen zeigt Topoisomerase I - Hemmaktivität.

6.4 Interpretation der Ergebnisse

Die Testergebnisse dieser Nucleobasen-Hybridverbindungen lassen sich nun wie folgt kommentieren:

Vier der mittels biophysikalischer und biochemischer Verfahren getesteten Verbindungen zeigten einen signifikanten wenngleich schwachen Anstieg der DNA-Schmelztemperatur. Bei diesen handelt es sich um die Bispyrrolderivate **40**, **44**, **46** und **50**, bei den inaktiven Verbindungen ausnahmslos um Monopyrrolderivate. Es sind also mindestens zwei Pyrrolcarboxamidbausteine nötig, um eine ausreichende Affinität zur DNA zu erhalten. Die Affinität der Bispyrrolderivate wird durch die positiven Ergebnisse der vier Substanzen bei den CD- bzw. UV-Messungen noch untermauert. Der positive Circular dichroismus, der bei $\lambda=320-330$ nm und damit dem Absorptionsmaximum des Bispyrrolstrukturelementes auftritt, ist ferner ein Beweis für Minor-Groove-Binding. Signifikante Unterschiede zwischen den Adenin-, Thymin- und Uracilderivaten wurden nicht festgestellt, dafür gibt es Hinweise auf steigende Bindungsaffinität mit steigender Länge der aliphatischen Kette, wenngleich das Kollektiv der untersuchten Substanzen für eine eindeutige Aussage noch zu klein ist. Eine Hemmung der Topoisomerase I konnte bei keiner Substanz der ersten Serie nachgewiesen werden.

Auch beim Primary-Zytotoxizitätsscreening des NCI waren alle Testsubstanzen inaktiv (s. Kapitel 6.1, S. 52ff.). Als Hauptgrund ist neben der zu schwachen DNA-Bindung und der fehlenden Topoisomerase-I-Hemmung die zu große Hydrophilie aufzuführen. Berechnungen mit den Programmen ACD (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Kanada) und ChemDraw (ChemDraw Ultra, Cambridge, USA) ergaben LogP-Werte im negativen Bereich (Werte: -1,2 - -2,1), was eine passive Aufnahme der Moleküle in die Zelle erschwert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Nucleobasen-gekoppelten Hybridmoleküle den PNAs und Hairpins in Bezug auf DNA-Bindung

erwartungsgemäß weit unterlegen sind, ohne aber den entscheidenden Vorteil, den „small molecules“ häufig gegenüber supramolekularen Strukturen haben, nämlich verbesserte Membranpermeation, aufzuweisen. Von daher erscheint es aus der Sicht der vorliegenden Befunde wenig vielversprechend, den mit den Nucleobasengekoppelten Pyrrolcarboxamiden eingeschlagenen Weg weiterzuverfolgen.

7. Versuche zur Darstellung von Acridon-, Acridin-, Iminostilben- und (Nitro-)Naphthalimid-N-terminal-gekoppelten Pyrrolcarboxamiden

Nachdem die Nucleobasen-gekoppelten Pyrrolcarboxamide weder bei den biochemischen/biophysikalischen Assays noch im Zytotoxizitäts-Screening des NCI eine ausreichende Aktivität gezeigt hatten, wurden weitere strukturell sehr verschiedene N-terminale Gruppen mit tricyclischer Aromatenfunktion ausgewählt. Diese sollten alle den von Hotzel ^[34] definierten Struktur-Wirkungs-Beziehungen entsprechen: elektronenarmer Heterocyclus aus mindestens 3 anelierten Ringen bzw. ein Anthrachinongerüst. Außerdem sollte das aromatische System planar sein, damit - wie bei Combilexinen üblich - neben der Bindung des Pyrrolcarboxamid-Bausteins in der Minor-Groove auch eine Interkalation des N-terminalen Chromophors möglich ist.

Nach intensiver Literaturrecherche (s. Kapitel 7.1, 7.2, 7.3, 7.4) wurden folgende N-terminale tricyclische Systeme ausgewählt:

- Acridon
- Acridin
- Iminostilben
- Naphthalimid
- 5-Nitronaphthalimid
- Anthrachinon

Das Anthrachinon-Grundgerüst ist neben interkalativer Aktivität auch als Photosensibilisator bekannt ^[58]. Hotzel hatte erstmals Anthrachinon-2-sulfonsäure direkt an die Aminopyrrolcarboxamide gekoppelt: die synthetisierten Testsubstanzen (s. Abbildung 7.1) zeigten im NCI-Screening in bestimmten Krebs-Zelllinien eine signifikante Wachstumshemmung ^[34,59].

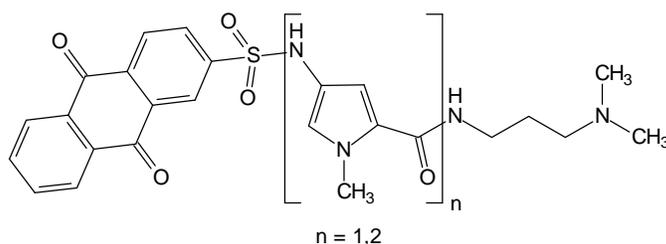
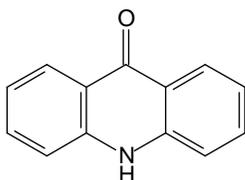


Abb. 7.1: HO 85 und HO 86

Angesichts der im Kapitel 2.2 (S. 24) aufgeführten Untersuchungen mit dem Resultat, dass ein Linker von 4 Atomen aufgrund größerer konformativer Anpassungsfreiheitsgrade optimaler zur Bindung an die DNA beiträgt, schien es vielversprechend zu sein, einen GABA-oder β -Alanin-Linker speziell zwischen Anthrachinon- und Oligopyrrol-Baustein zu schalten.

Im Folgenden soll nun näher auf die einzelnen tricyclischen Heterocyclen bzw. Aromaten eingegangen werden.

7.1 Acridon



Obwohl Acridon allen oben aufgeführten Anforderungen an N-terminale Gruppen von Combilexinen entspricht, wurde es bisher ganz im Gegensatz zu seinem Desoxoderivat Acridin nur selten bei der Entwicklung von zytostatischen Wirkstoffen eingesetzt. Bei den literaturbekannten antitumoraktiven Acridonen handelt es sich primär um anelierte Derivate wie (Bis)-imidazo- und Triazoloacridone^[60-63]. Viele von ihnen zeigten sowohl in vitro (NCI-Screening, L1210 Leukämie-Zellen), als auch in vivo (P388 Leukämiezellen in Mäusen) beachtliche antineoplastische Aktivität. Belegt ist außerdem die antivirale Wirksamkeit von Acridoncarbonsäureamiden und -carboxylaten bei verschiedenen RNA- und DNA-, z.B. Herpes-Viren^[64].

Eine indische Forschergruppe wies ferner einen modulierenden Effekt von N-alkylierten Acridonen auf die PGP-vermittelte Multi Drug Resistance (MDR) bestimmter Tumoren nach^[65].

Aufgrund dieser Literaturangaben wurde Acridon als N-terminale Funktion ausgewählt.

7.1.1 Darstellung der Acridoncarbonsäuren

Auch die Acridoncarbonsäuren wurden wieder durch Alkylierung des Heterocyclus mit ω -Brom-Alkancarbonsäureestern und anschließender alkalischer Hydrolyse synthetisiert (s. Abbildung 7.2, S. 66). Im Vergleich zu den Nucleobasen-Alkylierungen traten hier aber keine Nebenprodukte in nennenswerter Menge auf, da nur ein N-Atom im Heterocyclus vorhanden ist. Der erste Schritt der Darstellung, die N-Deprotonierung mit NaH bzw. K_2CO_3 als Base, war nach wenigen Minuten an einer intensiven Fluoreszenz zu erkennen. Diese ist bedingt durch eine aus der Starrheit des Acridon-Anions und der relativ geringen π, π^* -Differenz resultierenden Emission von Lichtenergie nach π -Elektronenanregung. Zugabe der ω -Brom-Alkancarbonsäureester führte über eine S_N2 -Reaktion zu den gewünschten funktionalisierten Produkten, die mittels Säulenchromatographie isoliert wurden. Die relativ geringen Ausbeuten (s. Kapitel 14.2.17/19/20, S. 155-158) dürften auf die hohe Stabilität und damit relativ geringe Reaktivität des anionischen Nucleophils zurückzuführen sein. Hydrolyse mit NaOH und anschließende Fällung mit HCl führten zu den freien Säuren **52**, **54** und **56** (s. Abbildung 7.2, S. 66).

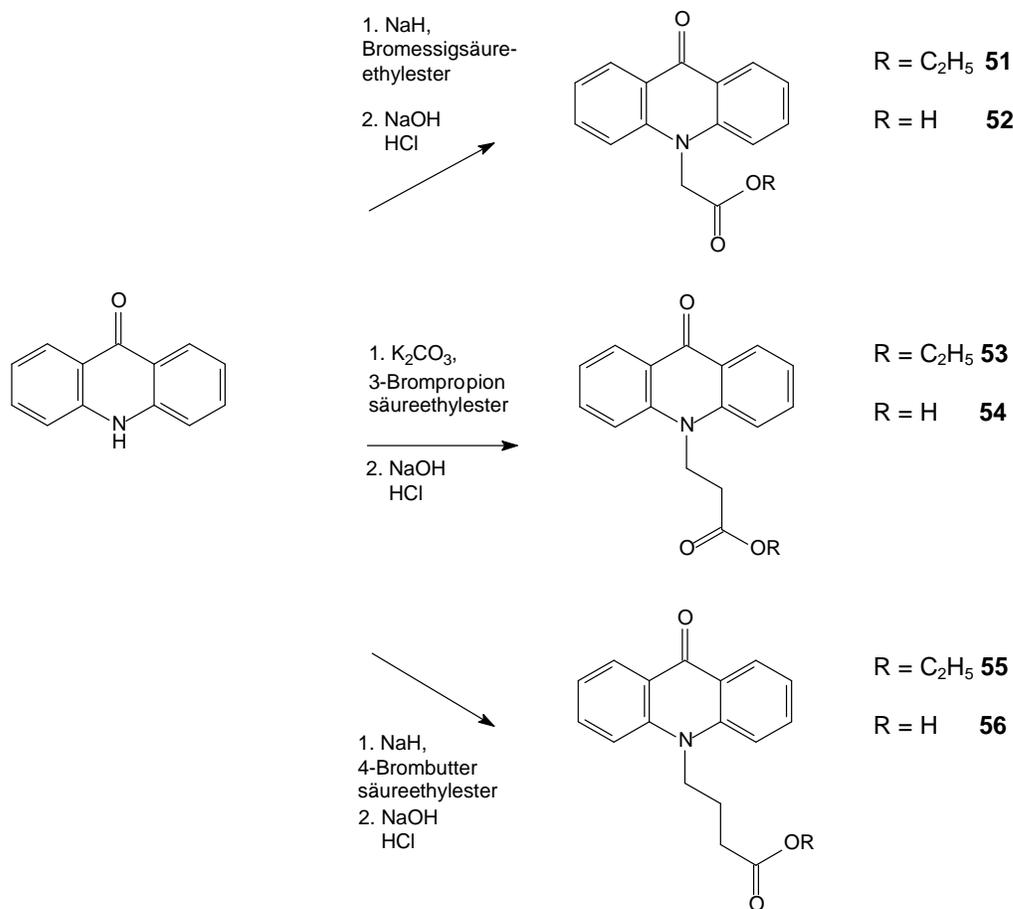
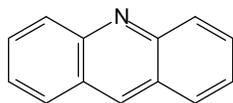


Abb.7.2: Darstellung der Acridonalkanoicarsäuren durch Alkylierung des Acridons mit ω -Bromalkanoicarsäureestern und anschließender Esterhydrolyse.

7.2 Acridin



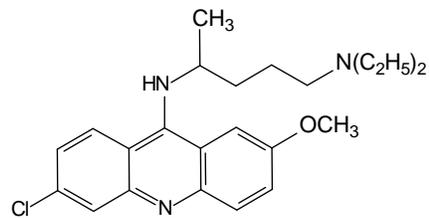
Acridin ist einer der in der Literatur zu DNA-Liganden meist zitierten heterocyclischen Grundkörper überhaupt. War bei der Anwendung des Aminoacridinderivates Mepacrin **57** (Atebrin^R) als Malaria- und Bandwurmmittel ^[66,67] im 19. und der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts das Wirkprinzip noch nicht bekannt, so weiß man heute, dass die Interkalation in die DNA und damit die Interferenz mit kritischen metabolischen Prozessen einen entscheidenden Anteil hat. Acridin, 9-Aminoacridin **58** und Proflavin **59** waren sogar die ersten Modellsubstanzen zur Entdeckung des

Interkalationsprozesses ^[68,69]. Das in der Leukämiebehandlung eingesetzte Aminoacridinderivat Amsacrin **60** war der erste synthetisierte Interkalator im klinischen Einsatz ^[70] und Acridin im allgemeinen ist der am häufigsten vorkommende Interkalator in zytostatischen Wirkstoffen ^[7,70].

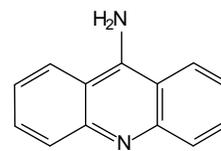
Als weitere Beispiele seien das ebenfalls im klinischen Einsatz befindliche Nitroacridinderivat Ledakrin **63** (Nitracrine) ^[71], und das für die vorliegende Arbeit besonders interessante Combilexin NetGa **62** genannt ^[72] (s. Abbildung 7.3, S. 68). Hierbei handelt es sich um einen Hybrid aus Amsacrin **60** und Netropsin **1**, der ein potentes Topoisomerase II-Poison ist und an P388 Leukämiezellen in Mäusen zytotoxisch wirkt ^[73,74]. Bailly et al. konnte mittels ESR-Spektroskopie nachweisen, dass die Acridinkomponente sozusagen als Vektor des nur langsam Membranen permeierenden Netropsins dient, und das Molekül dadurch schnell im Zellkern kumuliert. Mit diversen spektroskopischen Techniken konnte sowohl Minor-Groove-Bindung, als auch Interkalation nachgewiesen werden, wenngleich aufgrund des ungeeigneten Linkers die Passform an der DNA nicht optimal bzw. die Bindung vergleichsweise schwach war ^[11,53].

Um eine Weiterentwicklung zu NetGa **62** handelt es sich bei Verbindung R132 ^[53] (ohne Abbildung). Es ist das erste Combilexin mit 3 gut definierten Funktionalitäten: ein Netropsin- und ein Anilinoacridin-Teil wie bei NetGa und zusätzlich - über einen ϵ -Amino-capronsäure-Linker angeknüpft - Ethidium. Bailly et al. konnten mit UV-, CD-, ELD- und Fluoreszenzmessungen zeigen, dass alle 3 Funktionalitäten an der DNA-Bindung beteiligt sind. Auch diese Verbindung zeigte TOPO II-Inhibition und Zytotoxizität an P388-Zellen.

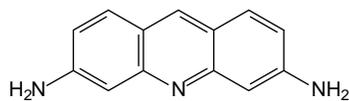
Als letztes und vielleicht bedeutendstes Beispiel in der Reihe der Acridine ist hier NetAmsa **10** aufzuführen. Bei diesem handelt es sich ebenfalls um eine Weiterentwicklung von NetGa, wobei durch eine N-terminale, positiv geladene Seitenkette, die Methoxy- und Methansulfonamid-Gruppe an der C-terminalen Anilino-Funktion und die Verknüpfung des Netropsin- mit dem Amsacrin-Teil über einen längeren Linker an Position 4 des Acridins eine größere AT-Selektivität und bessere Interaktion mit den Topoisomerasen resultieren. Außerdem zeigt NetAmsa **10** eine sogenannte „threading intercalation“, d.h. Netropsin- und Methansulfoanilin-Teil, die sowohl in Minor- als auch in Major-Groove binden, dienen als „Anker“ für das interkalierende Acridin, das sich wie ein Faden durch die DNA zieht ^[75] (s. Abbildung 7.4, S. 69).



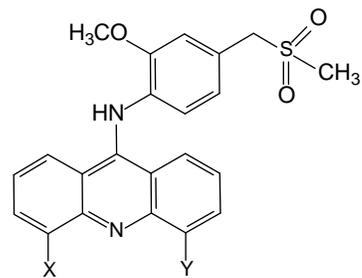
Atebrin
57



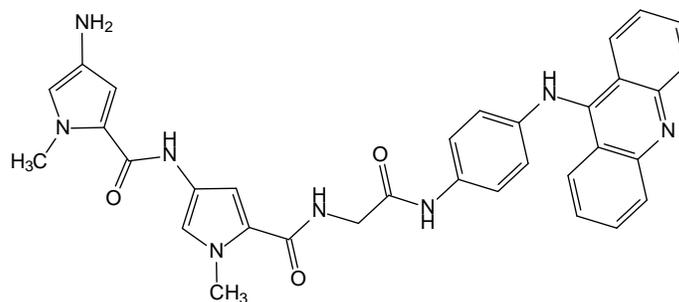
9-Aminoacridin
58



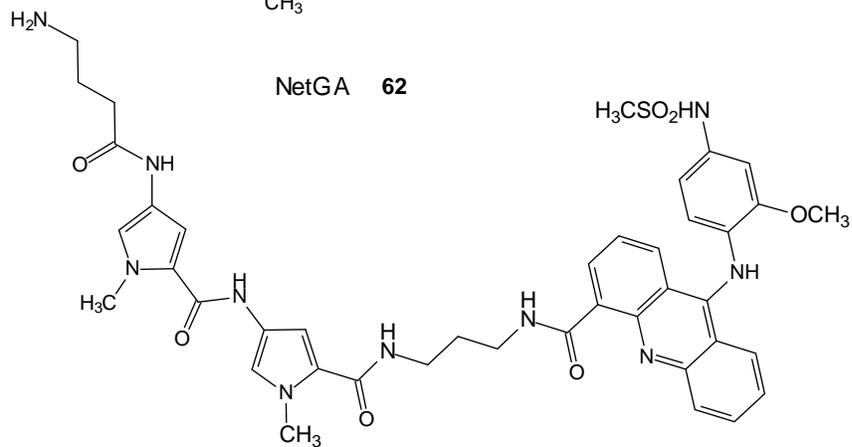
Proflavin
59



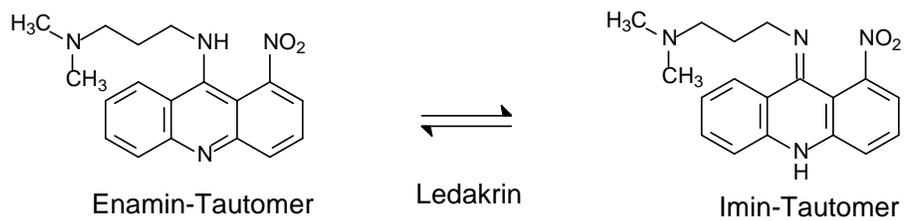
Amsacrin (X=Y=H) 60
Cl-921 (X=CH₂, Y=CONHCH₃) 61



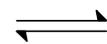
NetGA 62



NetAmsa 10



Enamin-Tautomer



Ledakrin

Imin-Tautomer

63

Abb.7.3: Acridin-haltige DNA-bindende Verbindungen

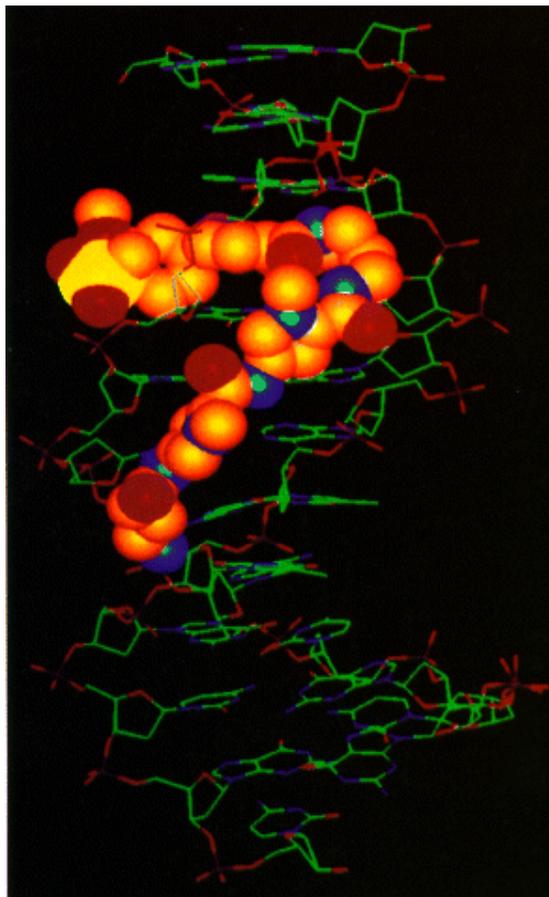


Abb.7.4: Computer-Modell von NetAmsa als „threading intercalator“ an DNA gebunden

7.2.1 Darstellung der Acridinpropionsäure

Die Acridincarbonsäuren konnten nicht nach dem bisher verwendeten Syntheschema dargestellt werden, weil keine NH-acide Funktion vorhanden war bzw. eine *N*-Alkylierung unter Beibehaltung des aromatischen und damit planaren Systems eine quartäre und damit in organischen Lösungsmitteln unlösliche Acridinium-Verbindung zur Folge gehabt hätte. Deshalb war geplant, (Acridin-9-yl)-alkancarbonsäuren darzustellen.

Es sollte zunächst Acridinpropionsäure durch ZnCl_2 -vermittelte Zyklisierung hergestellt und nach Optimierung des Verfahrens auch die entsprechende Acridinessig - und -buttersäure synthetisiert werden ^[66].

Diphenylamin, Bernsteinsäure und Zinkchlorid wurden hierzu vermischt und bei 230°C 24 h langsam gerührt. Nach Zugabe von 20%iger H_2SO_4 wurde weitere 4 h unter Rückfluß gekocht. Hierdurch protonierte man die schon entstandene Acridinpropionsäure und brachte sie in Lösung. Der zurückbleibende schwarze

Bodensatz wurde abfiltriert, das Filtrat neutralisiert, zur Trockne eingedampft und mittels Säulenchromatographie gereinigt.

Leider trat bei der 3-(Acridin-9-yl)propionsäure ein ähnliches Problem wie bei den Adenincarbonsäuren auf; Unlöslichkeit in organischen Lösungsmitteln. Der pKs-Wert von Acridin beträgt 5.6 ^[76], der von Propionsäure 4.8 ^[77]. Trotz dieser relativ geringen Differenz ist es wahrscheinlich, dass die Unlöslichkeit dadurch bedingt ist, dass die Acridinpropionsäure mit ihrer Betainform im Gleichgewicht vorliegt. Auch durch Zugabe verschiedener Mengen an Pyridiniumchlorid gelang es nicht, dieses Problem zu lösen. Da die Löslichkeit in einem nicht wässrigen Lösungsmittel für die folgende Amidkupplung essentiell war, wurde die Weiterarbeit an Acridin zunächst aufgegeben (s. Kapitel 9.2, S. 94).

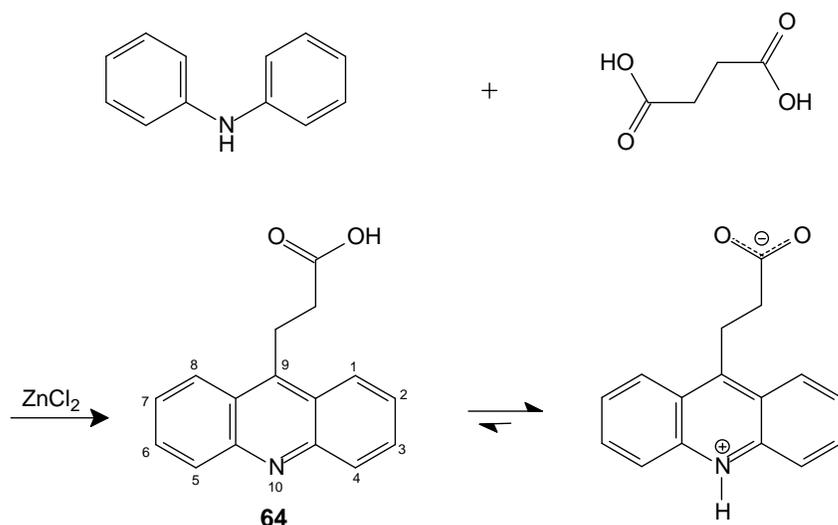
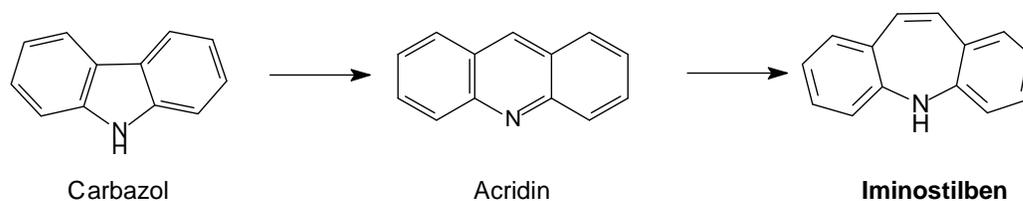


Abb.7.5: Darstellung der Acridinpropionsäure aus Diphenylamin und Bernsteinsäure; Gleichgewicht mit Betainform.

7.3 Iminostilben



Hinsichtlich seiner räumlichen Struktur stellt Iminostilben im Vergleich zu den anderen eingesetzten Hetarenen eine Besonderheit dar. Zwar treffen die von Hotzel

allgemein postulierten Struktur-Wirkungs-Beziehungen primär zu, das Iminostilben-gerüst ist aber, zumindest in der Momentaufnahme der Kristallstruktur ^[78], nicht planar. Deswegen gibt es in der Literatur auch keinerlei Hinweise auf Wechselwirkungen mit der DNA. Es kommt vielmehr in ZNS-wirksamen Arzneistoffen wie Opi Pramol (Antidepressivum) und Carbamazepin (Antikonvulsivum) vor.

Der Grund für die Verwendung von Iminostilben als Strukturelement ist, weil es gut in die chemische Homologie-Reihe hineinpasst, die von Hotzel mit Carbazol ^[34] begonnen wurde und über das als Interkalator bekannte Acridin und eben Iminostilben weitergeführt werden sollte. Darüber hinaus kann beim Iminostilben von einer zeitlich gemittelten, planaren Konformation bei der Wechselwirkung mit DNA durch einen „induced fit“ ausgegangen werden. Ein weiterer Grund für die Auswahl dieses Tricyclus als N-terminale Funktion war die Aufklärung gegebenenfalls auftretender nicht-interkalativer Interaktionen.

7.3.1 Darstellung der Iminostilbenbuttersäure

Die Synthese der Iminostilbenbuttersäure wurde erneut nach der üblichen Vorgehensweise durch N-Deprotonierung mit NaH, Alkylierung mit ω -Bromalkancarbonsäureester und abschließender alkalischer Hydrolyse durchgeführt. Aufgrund der geringen NH-Acidität musste mit 120°C eine höhere Temperatur als bei den anderen Heterocyclen gewählt werden ^[79]. Trotzdem war die Ausbeute an **66** sehr gering und das Verfahren auch nicht reproduzierbar. In anderen Reaktionsansätzen trat z.B. als Hauptprodukt das Urethan **67** auf. Eine Optimierung der Synthese ist für zukünftige Studien folglich unverzichtbar.

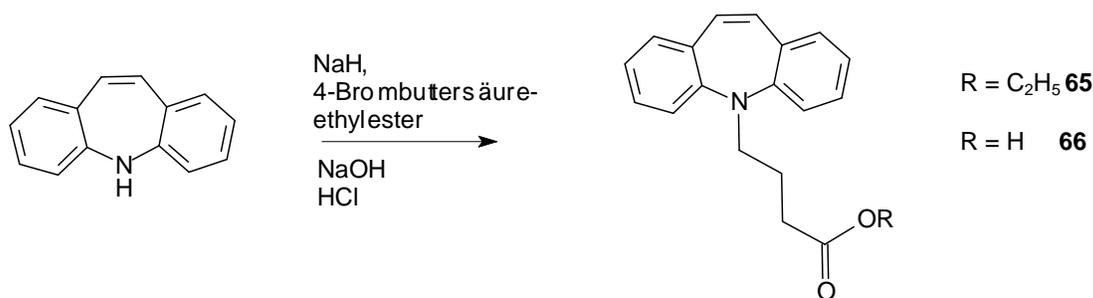
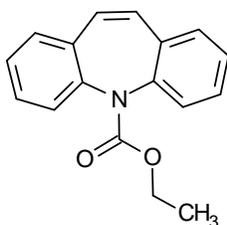
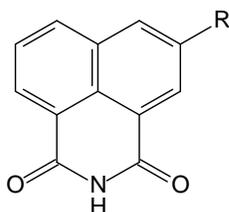


Abb.7.6: Darstellung der Iminostilbenbuttersäure.



67

7.4 (Nitro-)Naphthalimid



R= H, NO₂

Naphthalimide werden seit 1973 bei der Entwicklung von zytostatischen Wirkstoffen eingesetzt ^[80]. Der planare anelierte Aromat ist Bestandteil der in klinischen Studien befindlichen Verbindung Amonafide **69** und dessen Prodrug Mitonafide **68**. Beide sind aufgrund des interkalierenden Heterocyclus und der basischen Seitenkette, die Löslichkeit und Verankerung des Naphthalimids in der DNA gewährleistet, zytotoxisch wirksam ^[70,81,82]. Als Hauptwirkmechanismus wurde Topoisomerase II-Hemmung nachgewiesen ^[82]. Auch antivirale und antibiotische Aktivität der beiden Wirkstoffe wurde gezeigt ^[83,84]. Um eine Weiterentwicklung handelt es sich bei dem Bisnaphthalimid Elinafide **70**, das sich ebenfalls in klinischer Prüfung befindet und sich durch im Vergleich zu den Mononaphthalimiden gesteigerte Zytotoxizität auszeichnet ^[85]. Bailly et al. zeigten bei diesem Molekül Bisinterkalation in die DNA ^[86].

Da es sich bei Mitonafide um eine Nitroverbindung handelt und aufgrund der weiten Verbreitung von Nitroderivaten unter antimikrobiellen und zytostatischen Wirkstoffen, sollte neben der Naphthalimidalkancarbonsäure als N-terminaler Funktion auch ein Nitro-Derivat synthetisiert und getestet werden. Die Substitution in Position 5 zeigte in mehreren Untersuchungen Vorteile in Bezug auf die Zytotoxizität gegenüber der 4- bzw. 6-Substitution, deren Ursache vermutlich in der zum Heterocyclus koplanaren Anordnung der 5-Nitro-Gruppe liegt, was günstigere Wechselwirkungen mit den DNA-Basenpaaren ermöglicht ^[85]. Deshalb sollte in Analogie zum Mitonafide **68** das 5-Nitroderivat dargestellt werden.

Als Beispiele für Arzneistoffe mit Nitrogruppe seien die Imidazolderivate Metronidazol **71** und Misonidazol **72** ^[71,87], das Furanderivat Nitrofurantoin **73** ^[87] und das schon oben aufgeführte Ledakrin **63** (Nitracrine) (s. Abbildung 7.3, S. 68) genannt. Allen gemein ist eine selektive Toxizität gegenüber hypoxischen Zellen ^[70,71], welche in schnellwachsenden Tumoren vorkommen, da die Vaskularisierung und damit Sauerstoffversorgung nicht mehr mit der Zellvermehrung Schritt hält ^[87]. Diese Selektivität erklärt sich dadurch, dass es in vitro und in vivo zu einer Reduktion der Nitrogruppe zu reaktiven Metaboliten kommt, deren erster Schritt durch Sauerstoff rückgängig gemacht werden kann ^[88]. Die genaue Reaktionsfolge ist die primäre Bildung eines Nitro-Radikalanions, das weiter über das Nitroxid und Hydroxylamin zum Amin reduziert wird ^[70,71]. Insbesondere Nitroxide und Hydroxylamine, bzw. das aus letzterem gebildete Nitreniumion, greifen als Elektrophile an der DNA an und führen zu interstrand cross links und Strangbrüchen ^[87,89].

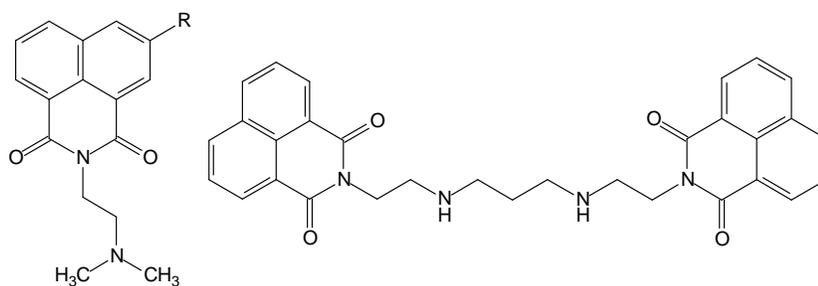
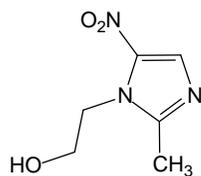
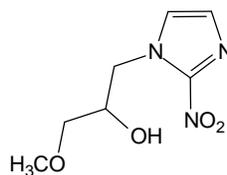
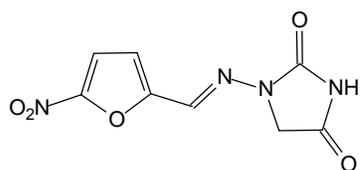
R = NO₂ Mitonafide **68**Elinafide **70**R = NH₂ Amonafide **69**Metronidazol **71**Misonidazol **72**Nitrofurantoin **73**

Abb.7.7: Wirkstoffe mit Nitrogruppe als Strukturelement an einem Hetaren.

7.4.1 Darstellung des 5-Nitronaphthalimids

Da unsubstituiertes Naphthalimid käuflich war, musste zunächst nur das Nitro-Derivat synthetisiert werden. Als Edukt diente das 3-Nitronaphthalsäureanhydrid, das mit konzentrierter NH_3 -Lösung refluxiert wurde^[90], was zur Bildung des Produktes **74** in guter Ausbeute führte.

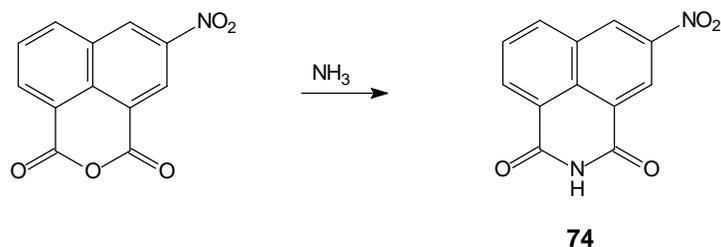


Abb.7.8: Darstellung des 5-Nitronaphthalimids **74** durch Ammonolyse des 3-Nitronaphthalsäureanhydrids.

7.4.2 Darstellung der (5-Nitro-)Naphthalimidbuttersäure

Da die biophysikalisch-biochemischen und zytotoxischen Testungen der Nucleobasen-Derivate und erste Zwischenergebnisse der Acridonalkancarbonsäuregekoppelten Combilexine auf eine deutliche Überlegenheit des Buttersäurelinkers gegenüber Propion- und Essigsäure hinwiesen, wurden bei den Naphthalimiden ausschließlich die Buttersäurederivate synthetisiert. Der erste Schritt - die Bildung des Esters - erfolgte nach der bewährten Methode mit Natriumhydrid und 4-Brombuttersäureethylester. Während das Zwischenprodukt in ausreichender Menge durch Extraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln gewonnen werden konnte, musste bei der Hydrolyse auf ein anderes Verfahren zurückgegriffen werden. Die Verwendung der bisher eingesetzten 2M NaOH-Lösung führte nämlich aufgrund der Alkalilabilität der Imidstruktur zur Abspaltung der Alkylkette. Bei den nicht-substituierten Naphthalimidbuttersäureestern konnte dieses Problem durch 6-stündiges Erhitzen mit 15%iger HCl-Lösung umgangen werden^[91], was zur quantitativen Umsetzung zur freien Säure führte. Beim Nitroderivat gelang hingegen die saure Hydrolyse nicht, weshalb die LiOH-Methode^[92] erfolgreich eingesetzt wurde. Durch den größeren kovalenten Anteil der LiOH-Bindung ist diese Methode wesentlich milder als die Verwendung von NaOH.

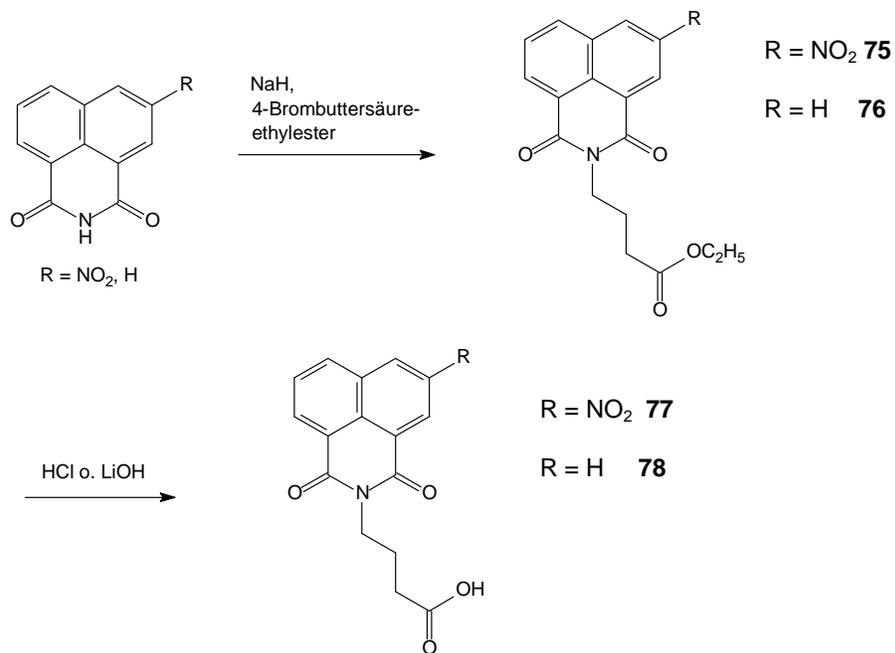


Abb.7.9: Darstellung der (5-Nitro)-Naphthalimidbuttersäure.

7.4.3 Strukturaufklärung des Naphthalimidbuttersäureethylesters (76)

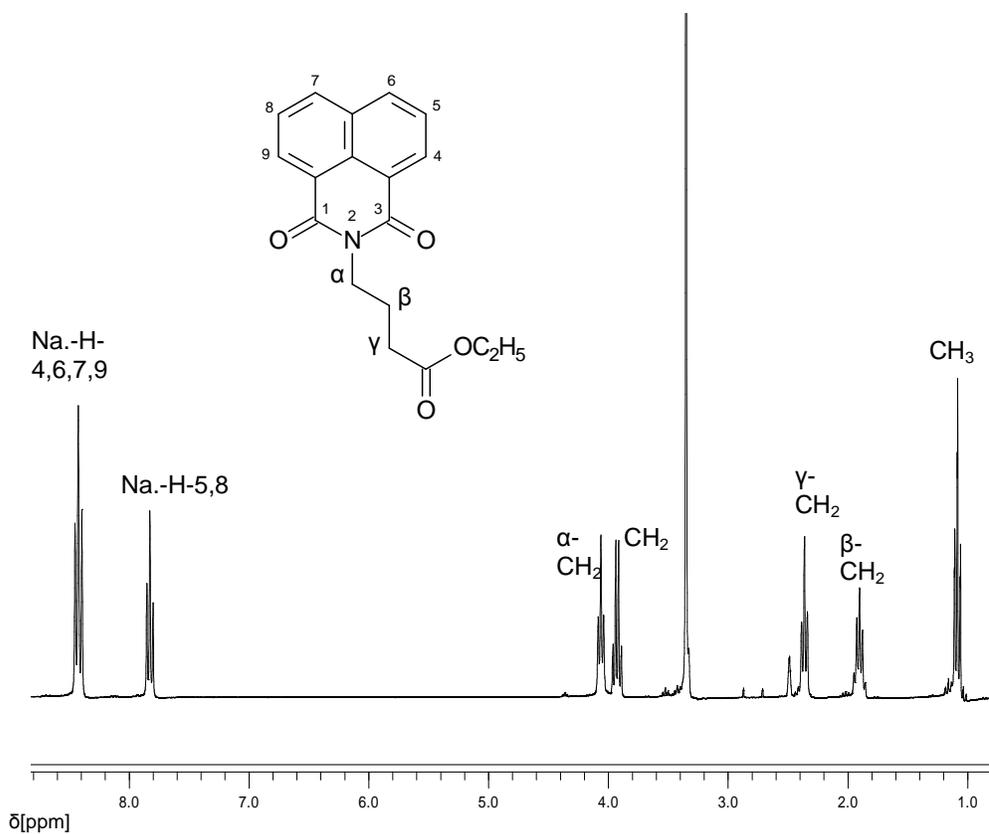
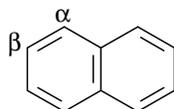


Abb.7.10: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Naphthalimidbuttersäureethylester. Lösungsmittel: DMSO-d^6 .

Eine eindeutige Zuordnung der $^1\text{H-NMR}$ -Signale von Verbindung **76** konnte ohne weitere Experimente wie NOE oder HMBC erfolgen. Die Signale der Alkylseitenkette lagen im Bereich der bisher synthetisierten Buttersäureesterderivate und im aromatischen Bereich gab es infolge der Symmetrie nur 2 Signallagen: ein Pseudotriplett der Intensität 2 bei 7.82 ppm und ein Multiplett der Intensität 4 bei 8.42 ppm. Das hochfeldigere Pseudotriplett wurde verursacht durch die aromatischen Protonen C-5 und C-8, da diese von jeweils 2 Protonen flankiert werden, das tieffeldigere Signal durch die Protonen H-4,6,7,9, die folglich isochron sind. Die Begründung dafür, dass die zur Imid-Struktur o- und p-ständigen Protonen bei tieferem Feld erscheinen liefert zum einen die elektronische Betrachtung des Moleküls – durch negativen induktiven und mesomeren Effekt der Imidstruktur haben diese Protonen die elektronenärmere Umgebung - und zum anderen der Anisotropie-Effekt.

Erklären kann man dieses Phänomen anhand der Betrachtung von Naphthalin.



Allgemein erlaubt das Ringstrom-Modell bei anelierten Aromaten eine qualitative Deutung der Spektren, wenn man die beobachtete Verschiebung als Summe der Beträge einzelner Benzolkerne auffasst. Die Resonanz der α -ständigen Protonen erfolgt in diesem Fall bei tieferem Feld als die der β -ständigen, da der anisotrope Beitrag des 2.Rings aufgrund des kürzeren Abstands der α -Stellung diese stärker beeinflusst ^[93].

Überträgt man diese Beobachtung auf Naphthalimid, so erkennt man, dass die Protonen 5 und 8 weiter vom benachbarten Benzol- bzw. Dioxopyridinring als ihre jeweiligen Nachbarprotonen entfernt sind. Daraus resultiert eine hochfeldigere Lage der zugehörigen Signale.

7.4.4 Strukturaufklärung des 5-Nitronaphthalimidbuttersäureethylesters (78)

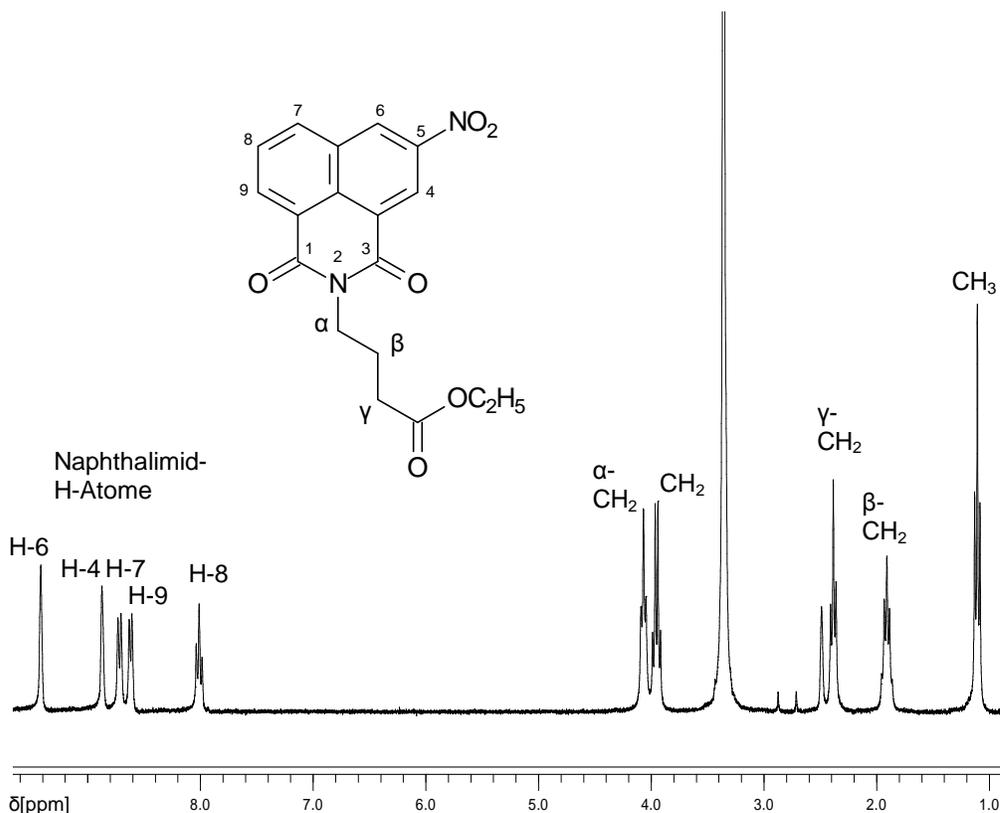


Abb.7.11: ¹H-NMR-Spektrum von 5-Nitronaphthalimidbuttersäureethylester. Lösungsmittel: DMSO-d⁶.

Interessanter ist der aromatische Bereich des ¹H-NMR-Spektrums des 5-Nitro-Derivates (s. Abbildung 7.11). Infolge Symmetrieverlustes führen 5 Ringprotonen zu 5 verschiedenen Signalsätzen. Das hochfeldigste Signal ist wieder ein Pseudotriplett, das eindeutig Position 8 zugeordnet werden kann. In Richtung Tieffeld folgen 2 Pseudodupletts und 2 Pseudosingulets; H-7+H-9 (haben jeweils ein benachbartes Proton) und H-4+H-6 (haben kein benachbartes Proton). Zur eindeutigen Zuordnung wurde jedoch ein NOE-Experiment durchgeführt. Einstrahlen in das tieferfeldige Pseudosingulett führte zu einer Signalintensivierung beim tieferfeldigen der beiden Pseudodupletts, was aufgrund des Maximalabstandes beim NOE von 3 Å nahe legt, dass es sich bei beiden Signalen um die jeweils zur Imidstruktur p-ständigen Protonen (H-6+H-7) handelt (s. Abbildung 7.12, S. 78). Zum Ausschluss einer Fehlinterpretation wurde in das hochfeldigere Pseudosingulett eingestrahlt, wobei kein NOE auftrat (s. Abbildung 7.13, S. 78). Dies entsprach den Erwartungen, da das o-ständige H-4 keine Nachbarprotonen im Abstand von 3 Å hat.

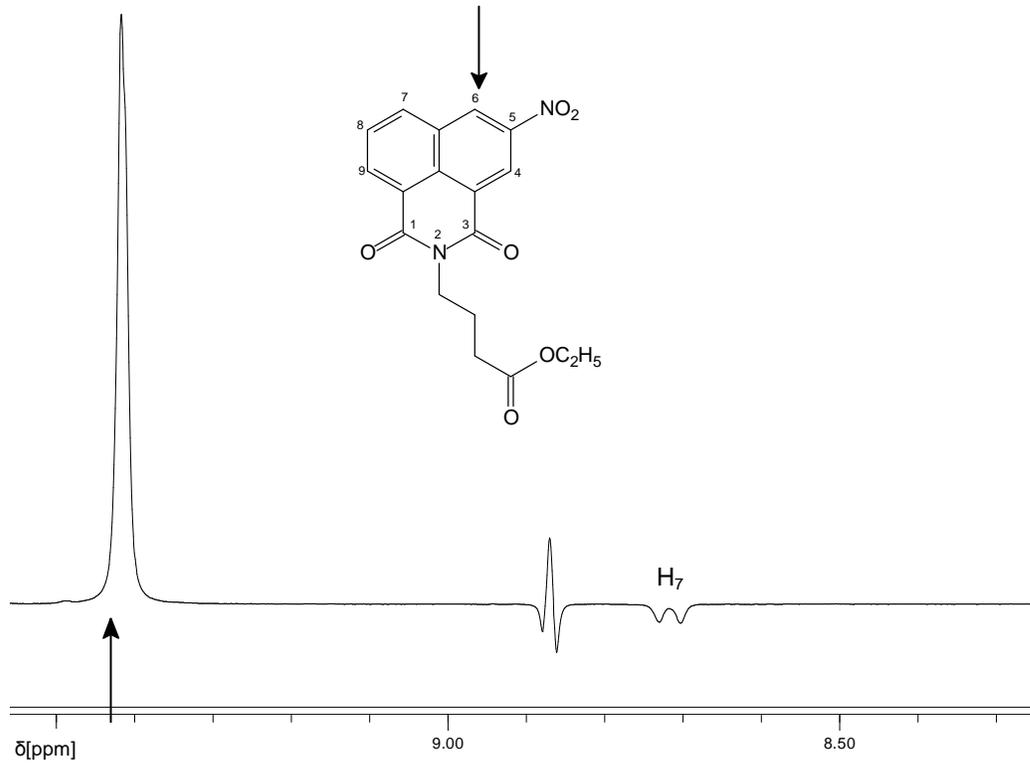


Abb.7.12: NOE-Einstrahlexperiment auf H-6. Lösungsmittel: DMSO-d^6 .

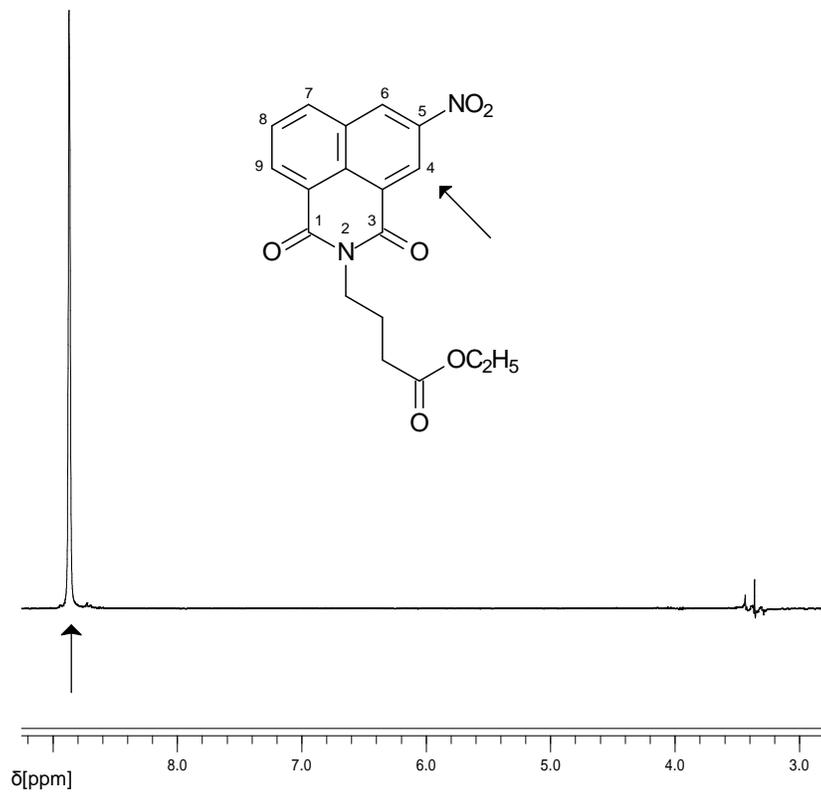
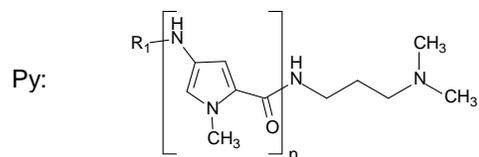


Abb.7.13: NOE-Einstrahlexperiment auf H-4. Lösungsmittel: DMSO-d^6 .

7.5 Darstellung der Combilexine

Nach intensiven Studien zur präparativen Kupplungschemie bei Peptidsynthesen und zahlreichen Versuchen hat sich die Chlorameisensäureester-Methode - analog zur Darstellung der Pyrimidinalkancarbonsäuren (s. Kapitel 5.2.1, S. 50) - besonders bewährt. Als Lösungsmittel diente wie zuvor DMF.

Eine Übersicht zu den Produkten gibt Tabelle 7.1, S. 80.



R₁	n	Ausbeute [%]	Verbindung Nr.
	1	54	79
	2	51	80
	1	59	81
	2	49	82
	1	62	83
	2	48	84
	2	20	85
	1	35	86
	2	31	87
	1	35	88
	2	21	89

Tab.7.1: Übersicht über die synthetisierten Combilexine; Py = Aminopyrrolcarboxamid.

8. Zellbiologische Zytotoxizitäts-Studien und biophysikalische, biochemische Untersuchungen an der DNA

In Analogie zu den Nucleobasen-gekoppelten Verbindungen wurden auch die Pyrrolcarboxamide der 2. Serie dieser Arbeit (s. Tabelle 7.1, S. 80) den biophysikalischen, biochemischen und zellbiologischen Testungen unterzogen.

Insbesondere beim NCI-Screening wurde aufgrund der im Vergleich zu den Nucleobasen-Derivaten gesteigerten Lipophilie und der Tatsache, dass es sich bei den verwendeten tricyclischen Heterocyclen um bekannte Interkalatoren handelt, eine größere Aktivität erwartet.

8.1 Zellbiologische NCI-Testungen und deren Ergebnisse

Tabelle 8.1 zeigt das prozentuale Zellwachstum dreier Tumorzelllinien nach Inkubation mit einer 10^{-4} M Lösung der Testsubstanzen in DMSO.

Verbindung	MCF7 (Brust)	NCI-H460 (Lunge)	SF-268 (ZNS)	Ergebnis
79	106	95	109	inaktiv
80	88	99	115	inaktiv
81	72	93	108	inaktiv
82	93	52	89	inaktiv
83	82	126	109	inaktiv
84	48	47	112	inaktiv
85	0	0	0	aktiv
86	104	92	107	inaktiv
87	68	97	94	inaktiv
88	72	90	112	inaktiv
89	64	84	109	inaktiv

Tab.8.1: Ergebnisse des NCI-Primary Screenings; die Werte in der Tabelle geben das Zellwachstum der Tumorzell-Linien in Prozent an, nachdem die Zellkulturen mit einer 10^{-4} M Lösung der Testsubstanz in DMSO versetzt worden sind. Je kleiner die Werte in der Tabelle sind, desto stärker zytotoxisch wirksam ist die Substanz.

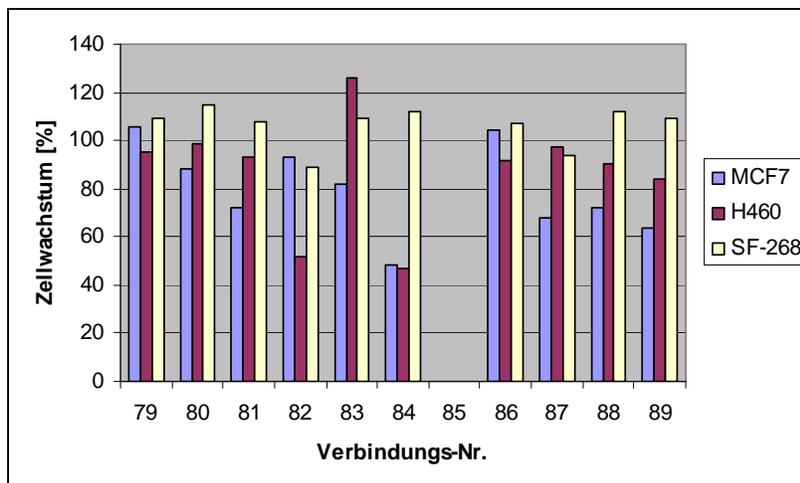


Abb.8.1: Übersicht über die NCI-Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms. X-Achse: Verbindungs-Nr.; y-Achse: Prozentuales Wachstum, welches durch Einwirkung einer 10^{-4} M Lösung der Testsubstanz in DMSO auf die jeweilige Tumor-Zellkultur verbleibt.

Wenngleich bei dieser zweiten Serie mehrere Testsubstanzen eine deutliche Tumorzellwachstumshemmung verursachten (z.B. **82** und **84**), zeigte nur die Verbindung **85** eine ausreichend hohe Aktivität (Tumorzellwachstum < 32%), um in der 2. Stufe des NCI-Screenings weiter getestet zu werden.

Hierbei werden Testsubstanzen an 60 humanen Tumorzelllinien in vitro auf Zytotoxizität geprüft. Dabei wird ein Selektivitätsprofil für jede Verbindung erstellt, das die relative Wachstumshemmung für jede einzelne Zelllinie beschreibt. Diese Selektivitätsprofile werden auch Fingerprints genannt, da sie charakteristisch für eine Substanz und damit auch reproduzierbar sind. Fingerprints von Substanzen verschiedener Stoffklassen ähneln sich interessanterweise dann, wenn auch die Wirkmechanismen vergleichbar sind, was man sich bei der COMPARE-Analyse zunutze macht ^[46,94].

Abbildung 8.2 (S. 83) zeigt den Fingerprint von **85**.

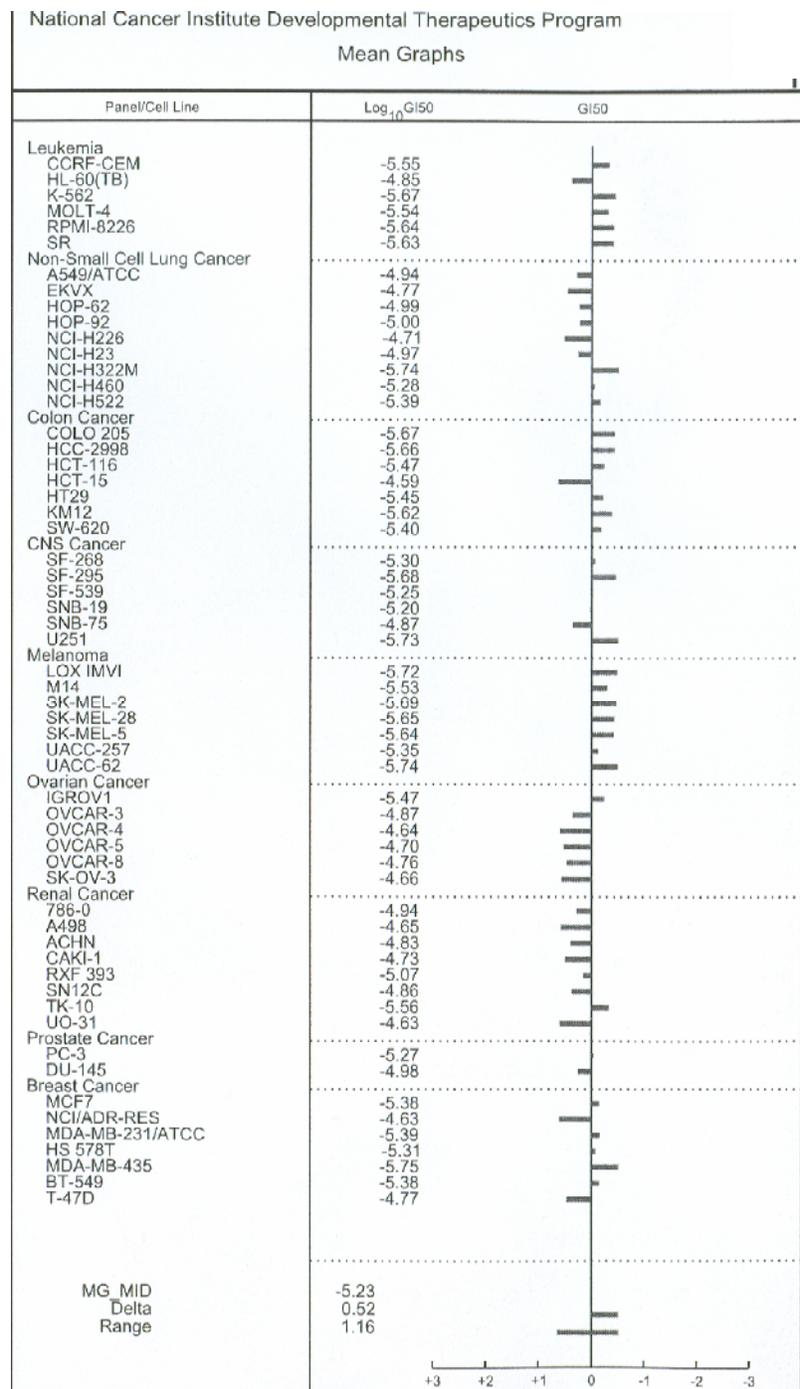
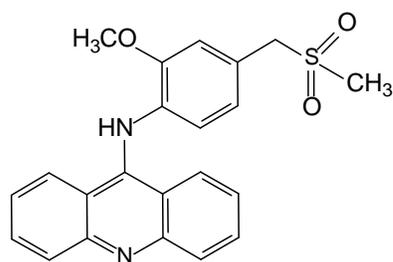


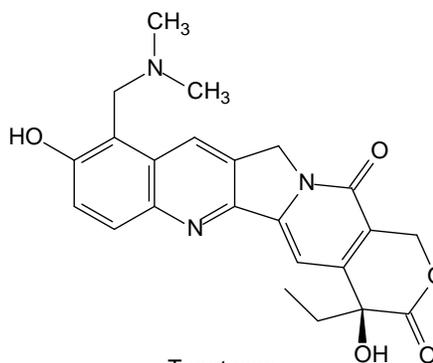
Abb.8.2: Selektivitätsprofil von Verbindung **85**; $\log_{10}GI_{50}$: dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von **85**, die zu einer Hemmung des Wachstums von 50% der Zelllinien führt; MG_MID: Mean Graph Midpoint, durchschnittlicher $\log_{10}GI_{50}$ -Wert bezogen auf alle 60 Zelllinien; GI_{50} : graphische Darstellung der Abweichung des jeweiligen $\log_{10}GI_{50}$ -Wertes vom Mean Graph Midpoint; Balken nach rechts: überdurchschnittliche Sensitivität der Zelllinien, Balken nach links: unterdurchschnittliche Sensitivität der Zelllinien.

Die Voraussetzungen, die erfüllt sein müssen, damit eine Substanz im Anschluss an den 60-Zelllinien-Assay für den Tierversuch ausgewählt wird, sind beim NCI nicht genau definiert. Das Biological Evaluation Comitee (BEC) ^[46] entscheidet anhand der Struktur, des Selektivitätsprofils bzw. einer damit durchgeführten COMPARE-Analyse, der GI₅₀-Werte und weiterer Parameter, wie verfahren wird.

Da Verbindung **85** relativ unselektiv viele verschiedene Zelltypen aus den verschiedenen Krankheitsgruppen (Leukämie, Darmkrebs, Melanom; s. Abb. 8.2, S. 83) hemmt und auch die Hemmkonzentrationen nicht im nanomolaren Bereich liegen (bei allen Zelllinien > 10⁻⁶), was auch der Durchschnittswert aller log₁₀GI₅₀-Werte bezogen auf alle 60 Zelllinien bestätigt (Mean Graph Midpoint: -5,23; Referenzsubstanzen: Topotecan **90**: -7,2, Amsacrin **60**: -6,36), wurde vom Biological Evaluation Comitee auf eine in vivo-Testung verzichtet.



Amsacrin

60

Topotecan

90

8.2 Beschreibung der verwendeten biophysikalischen und biochemischen Verfahren (s. Kapitel 6.2, S. 55)

8.3 Ergebnisse der biophysikalischen und biochemischen Verfahren

Für die biophysikalischen und biochemischen Testungen wurden die Verbindungen **79, 80, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 88** und **89** ausgewählt.

Wenngleich die Zytotoxizitätsdaten der Verbindungen dieser 2.Serie nicht den Erwartungen entsprachen (Ausnahme: Substanz **85**), lieferten die Assays an DNA bzw. Topoisomerasen sehr interessante Ergebnisse (s. Tabelle 8.2, S. 85). So konnten insbesondere bei den Bispyrrolderivaten beachtliche DNA-Schmelzpunkterhöhungen gemessen werden (v.a. bei polydAdT; ΔT_m bis zu 26,6°C), die Monopyrrolderivate waren in etwa im Bereich der besten Substanzen

der 1.Serie (Ausnahme: **79**). Alle Verbindungen bis auf das Iminostilbenderivat **85** und die Monopyrrol-naphthalimidbuttersäurederivate **86** und **88** zeigten Minor-Groove-Binding (CD: +). Überraschenderweise deutete dagegen nur beim Naphthalimid-bispyrrol-Derivat **87** ein negativer Circular dichroismus auf Interkalation hin, was aber auch an den in Kapitel 6.2.3 (S. 58) erwähnten Intensitätsschwankungen der Banden liegen kann. Alle Testsubstanzen bis auf die nicht-nitrierten Naphthalimide zeigten beim UV-Assay eine hypochrome Bandenverschiebung, Verbindung **84** zusätzlich eine bathochrome.

Die Aktivität im Topoisomerase II - Assay hing erwartungsgemäß von den Eigenschaften des N-terminalen Heterocyclus ab. Besonders interessant sind die Resultate der Acridonderivate: die Aktivität nimmt hier mit steigender Linkerlänge ab, was zum einen der sowohl bei den Substanzen der 1. Serie als auch dieser 2. Serie abzulesenden Tendenz der Überlegenheit der Buttersäureamidderivate gegenüber Essig- und Propionsäureamiden widerspricht, zum anderen aber mit dem prozentualen Anteil des TOPO II - inhibierenden Acridons am Gesamtmolekül korreliert. Desweiteren ist aufzuführen, dass die Nitronaphthalimide **88** und **89** stärker die Topoisomerase II hemmen als die unsubstituierten Derivate **86** und **87**.

Keine der Verbindungen der 2. Serie hemmte die Topoisomerase I, der Relaxationsassay ohne Ethidiumbromid weist aber bei allen Derivaten einschließlich des Iminostilbens auf DNA-Unwinding durch Interkalation hin.

Verbindung	ΔT_m	ΔT_m	ΔT_m	CD	UV	topo I inhibition		topo II inhibition	
	CT DNA r=0,5	polydAdT r=0,5	polydAdT r=0,1			-BET	+BET		
79	0	2,7	1,4	+	+	(h)	+	-	++
80	2,7	18,5	6,8	+	+	(h)	++	-	++
81	2,6	11,8	4,2	+	+	(h)	+	-	+
83	2,7	12,0	5,4	+	+	(h)	+	-	-
84	9,5	26,6	14,8	+	+	(h,b)	++	-	-
85	2,3	13,7	4,7	-	+	(h,b)	+	-	-
86	1,1	7,0	1,2	-	-		+	-	+
87	5,7	20,4	6,9	+/-	-		++	-	+
88	1,1	5,9	0		+	(h)	+	-	++
89	5,7	18,2	5,7	+	+	(h)	++	-	++

Tab.8.2: Ergebnisse der DNA-Bindungs- und Topoisomerasehemm-Assays. ΔT_m : Differenz zwischen T_m der Nucleinsäure mit gebundenem Ligand und T_m^0 der reinen Nucleinsäure. r = molares Verhältnis

DNA zu Testsubstanz. CD: Circular dichroismus, (+) und (-) steht für positives bzw. negatives CD-Signal. UV: UV/VIS-Spektroskopie. (b) bathochrom, (h) hypochrom. Der Topoisomerase I - Hemm-Assay wurde in Agarosegel in Anwesenheit und Abwesenheit von Ethidiumbromid (BET) durchgeführt. Bei den TOPO-Inhibitionsassays steht (++) für eine Hemmung des Enzyms durch 10 µM der Testsubstanz und (+) für eine Hemmung durch 50 µM.

8.4 Interpretation der Ergebnisse

Zusammenfassend kann man sagen, dass

- a) mit Ausnahme von **79** alle Verbindungen gut bis hervorragend an AT-reiche DNA-Sequenzen binden (die negativen UV-Ergebnisse von **86** und **87** werden zur Zeit überprüft),
- b) mit Ausnahme von dem Iminostilbenderivat **85** und überraschenderweise auch den Acridonbuttersäureamidderivaten **83** und **84** alle Verbindungen die Topoisomerase II hemmen und
- c) ausnahmslos alle Verbindungen im TOPO-I-Relaxationsassay in Abwesenheit von Ethidiumbromid Aktivität zeigen, was bei wie in diesem Fall nicht stattfindender Topoisomerase I - Hemmung auf Interkalation hinweist.

Trotzdem gelang es nur einer Verbindung, dem Iminostilbenderivat **85**, die 2. Stufe des NCI-Zytotoxizitätsprogramms zu erreichen. Das ist insofern überraschend, als Iminostilben weder planar noch Bestandteil bekannter zytotoxischer oder DNA-bindender Substanzen ist.

Überraschend ist allerdings auch, dass die Acridon- und Naphthalimid-Derivate trotz erwartungsgemäß guter bis sehr guter Affinität zur DNA bzw. Topoisomerase II beim NCI-Screening nicht ausreichend aktiv waren. Der Hauptgrund hierfür dürfte folglich die mangelhafte Membranpermeation und damit ein kinetisches bzw. Transportproblem sein. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurden die NCI-inaktiven Verbindungen dem aktiven Iminostilbenderivat anhand der Parameter von Lipinskis „Rule of Five“ gegenübergestellt.

„Rule of Five“^[95]:

Regeln für Wirkstoffdesign und Pharmakokinetik zur Überwindung der endogenen Barrieren. Schlechte Wirkstoff-Resorption bzw. Permeation liegt vor, wenn ein Molekül

1. mehr als 5 Wasserstoff-Brücken-Donatoren besitzt (ausgedrückt als Summe von OH und NH)
2. mehr als 2 x 5 Wasserstoffbrücken-Akzeptoren besitzt (ausgedrückt als Summe von O- und N-Atomen)
3. das Molekulargewicht von 500 übersteigt
4. einen Verteilungskoeffizient (logP) von über 5 besitzt (bei diesem Punkt sei angemerkt, dass ein zu niedriger logP-Wert für die Permeation biologischer Membranen ebenfalls ungünstig ist)

Verbindung	Anzahl HBB-Donatoren	Anzahl HBB-Akzeptoren	M _r	logP (berechnet mit ACD)
79	2	3	460	2,15
80	3	4	582	1,53
81	2	3	474	2,57
83	2	3	488	3,02
84	3	4	610	2,39
85	3	3	608	2,92
86	2	4	490	2,02
87	3	5	613	1,39
88	2	4	536	1,84
89	3	5	658	1,22

Tab.8.3: Übersicht über die 4 Parameter der „Rule of Five“ am Beispiel der Verbindungen der 2. Serie. Rot unterlegt ist die einzige NCI-aktive Verbindung **85**. HBB = Wasserstoffbrückenbindungen; ACD = Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Kanada.

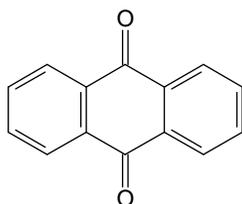
Vergleicht man die NCI-inaktiven Verbindungen mit dem rot unterlegten Iminostilbenderivat, so erkennt man, dass es bei den ersten 3 Regeln der „Rule of Five“ keine bedeutenden Unterschiede gibt, wenn man von der geringeren Molmasse der Monopyrrolderivate absieht. Bei den logP-Werten fällt allerdings auf, dass sie bei den inaktiven Verbindungen (Ausnahme: **83**) deutlich geringer liegen als bei Verbindung **85**. Da sich **85** bei den biophysikalischen/biochemischen Parametern nicht signifikant von den anderen Molekülen unterscheidet, liegt die Vermutung nahe,

dass durch Steigerung der Lipophilie der Acridon- bzw. Naphthalimidderivate durch Einführung von Halogenatomen bzw. hydrophoben Gruppen auch die zytotoxische Aktivität gesteigert werden könnte.

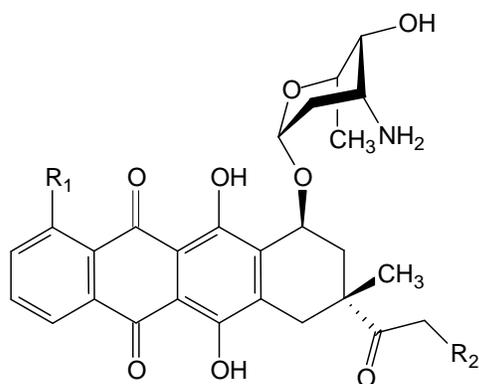
Unberücksichtigt bleibt hier die Möglichkeit, dass die auffallend große Zytotoxizität von Verbindung **85** auf einen sich von den anderen Molekülen unterscheidenden Wirkmechanismus zurückzuführen ist.

9. Darstellung von Anthrachinon- und Acridin-gekoppelten Pyrrolcarboxamiden und weitere Syntheseversuche

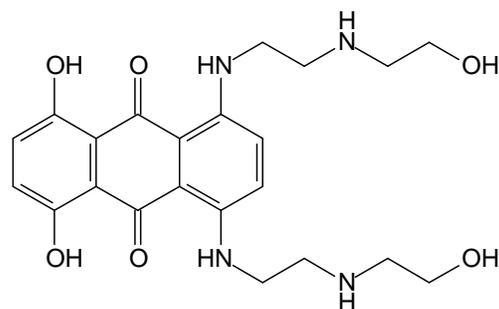
9.1 Anthrachinon



Anthrachinone sind Bestandteil von Zytostatika im klinischen Einsatz wie z.B. der Anthracycline Dauno-, Doxo-, und Idarubicin **91 - 93** bzw. des nur aus 3 anelierten Ringen bestehenden Mitoxantrons **94**.



$R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{H}$ Daunorubicin **91**
 $R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{OH}$ Doxorubicin **92**
 $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{H}$ Idarubicin **93**

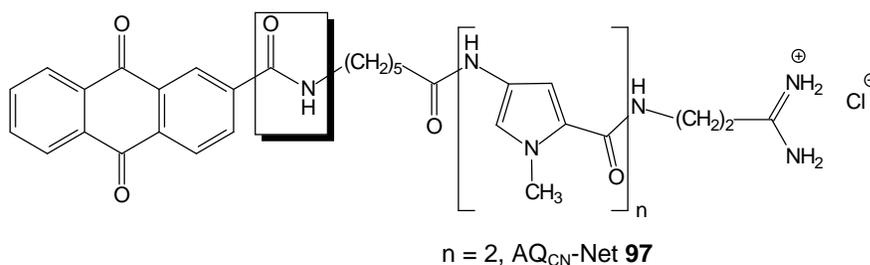
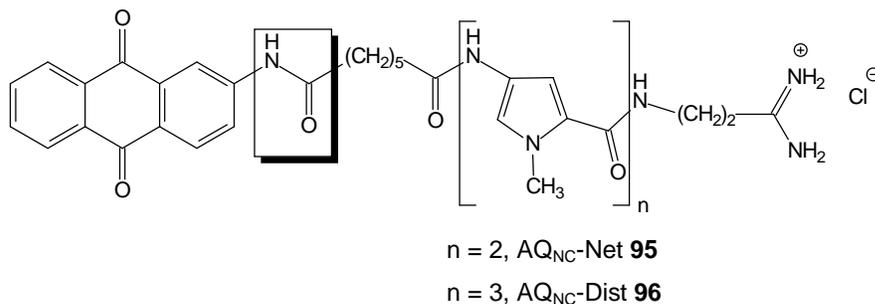


Mitoxantron **94**

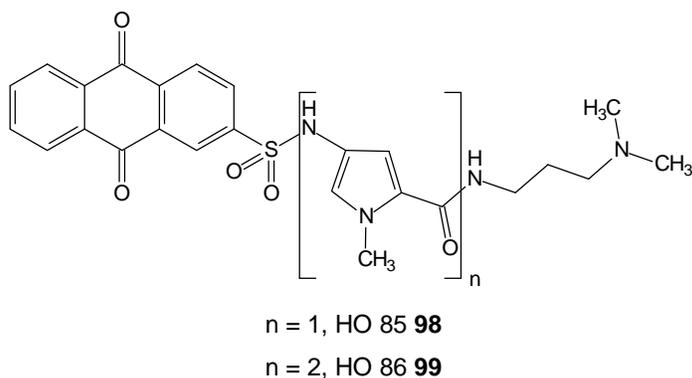
Allen gemein ist eine Interkalation in die DNA und die Induktion von Strangbrüchen durch Hemmung der Topoisomerase II ^[70,96]. Eine Besonderheit der Anthrachinone ist außerdem ihr hohes Oxidationspotential. UV-induziert kommt es über eine Radikalbildung an einem der beiden Carbonyl-Sauerstoff-Atome zur H-Abstraktion an Desoxyribose der DNA, was ebenfalls zu Strangbrüchen führt ^[58].

Von den zahlreichen synthetisierten Anthrachinonderivaten sind für diese Arbeit besonders die an Netropsin bzw. Distamycin gekoppelten Verbindungen interessant ^[11,97]. Während Combilexin **97** zwar selektiv an AT-reiche Sequenzen bindet, in

Bezug auf eine DNA-Spaltung aber inaktiv ist, spalten die inversen Amide **95** und **96** die DNA unspezifisch.



Hotzel synthetisierte als neue Variation Anthrachinonsulfonamid-gekoppelte Combilexine ^[34,59] (s.a. S. 63). Verbindung **98** und **99** zeigten Zytotoxizität im NCI-Pre-Screening und schwache TOPO I-Hemmung.



Eine Optimierung der Strukturen über einen GABA-Linker zwischen Anthrachinon- und Pyrrolcarboxamid-Baustein, um eine konformativ spannungsfreie interkalative Anpassung in Bezug auf die DNA-Bindung zu erreichen, wurde in ersten Ansätzen versucht, aber nicht erfolgreich abgeschlossen ^[34]. An diese Bemühungen sollte angeknüpft werden, da zudem durch Einführung von GABA oder auch β -Alanin als Linker durch Erweiterung des Systems im N-terminalen Bereich um eine Amid-

Funktion eine zusätzliche Möglichkeit zur H-Brücken-Interaktion an der DNA-Rinne bestünde.

9.1.1 Darstellung der Anthrachinonsulfonamid- und carbonsäureamidgekoppelten Pyrrolcarboxamide mit GABA bzw. β -Alanin als Linker

Zur Darstellung der Combilexine mit GABA-Linker wurde zunächst die gleiche Synthesestrategie wie von Hotzel gewählt ^[34]. Anthrachinon-2-sulfonylchlorid, das vorher durch Erhitzen von Na-Anthrachinonsulfonat mit Thionylchlorid hergestellt wurde, wurde mit GABA zum Sulfonamid umgesetzt. Eine Verkopplung der entstandenen Carbonsäure mit dem durch Reduktion mit Pd(10%)/C/H₂ gewonnenen Aminopyrrolderivat konnte aber selbst mit dem im Vergleich zu den von Hotzel verwendeten DCC und CDI stärkeren Kupplungsreagenz Chlorameisensäureethylester nicht erreicht werden (s. Abbildung 9.1). Eine mögliche Begründung ist, dass das bei der Kupplung im basischen Milieu im Gleichgewicht vorliegende deprotonierte Sulfonamid-N-Atom die Reaktion durch Konkurrenz mit der nur relativ schwach nucleophilen aromatischen Aminogruppe des Pyrrols stört.

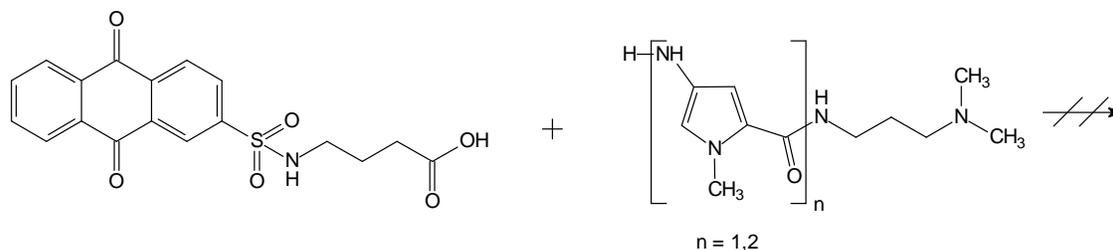


Abb.9.1: Erfolgreicher Kupplungsversuch mit Chlorameisensäureethylester.

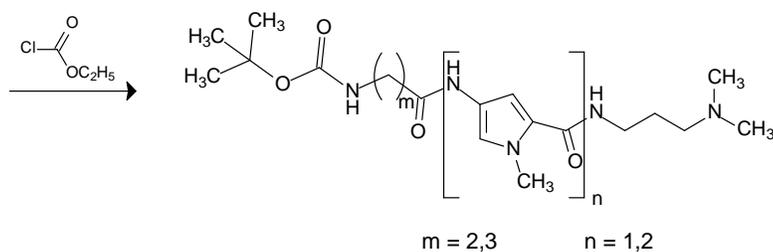
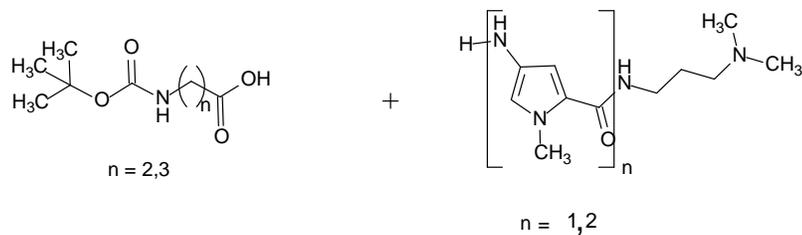
Es mussten daher andere Synthesestrategien gewählt werden. Die am N-Atom BOC-geschützte GABA wurde zunächst mit dem Aminopyrrol nach der üblichen Chlorameisensäureethylester-Methode zum Carboxamid aufgebaut. Es schloss sich eine von Jansen optimierte BOC-Abspaltung mit ethanolischer HCl-Lösung an ^[98]. Das resultierende Amin wurde in DMF gelöst und mit Anthrachinonsulfonylchlorid in Anwesenheit von Hünigs Base bei 120°C zum Sulfonamid umgesetzt. Die Ausbeute war gering. Analog wurde das Bispyrrol dargestellt (s. Abbildung 9.2, S. 93).

Um eine größere Varianz an Testsubstanzen zu erhalten, wurde zum einen der GABA- gegen einen β -Alanin-Linker, zum anderen die Anthrachinonsulfonsäure gegen eine -carbonsäure ausgetauscht. Die Synthesen verliefen analog. Zunächst

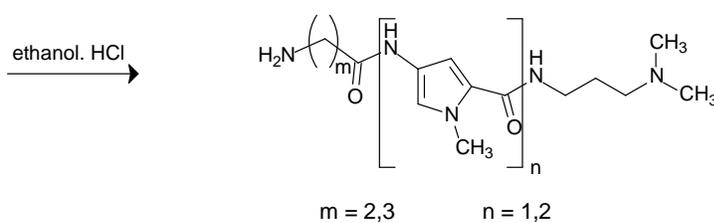
wurde BOC- β -Alanin mit dem Aminopyrrol umgesetzt. Nach Schutzgruppenabspaltung in ethanolische HCl-Lösung kam es mit einem Anthrachinonsäurechlorid zur Bildung des Produktes. Das Anthrachinoncarbonsäurechlorid wurde durch Umsetzung von Anthrachinoncarbonsäure mit Thionylchlorid gewonnen ^[99] (s. Abbildung 9.2, S. 93).

Anzumerken ist, dass der letzte Synthese-Schritt bei der Bildung von Sulfonamiden kinetisch und thermodynamisch günstiger ist als bei der Bildung der Carbonsäureamide. Die kinetische Aussage nach dem FMO-Konzept ^[100] wurde durch semiempirische AM1-Berechnung der LUMO-Energien der beiden Säurechloride untermauert: Anthrachinonsulfonylchlorid hat mit -2.39 eV ein signifikant niedrigeres LUMO als Anthrachinoncarbonsäurechlorid (-1.87 eV), wird also schneller von Nucleophilen angegriffen. Die thermodynamische Aussage ist an den Ausbeuten der jeweiligen Produkte abzulesen (s. Tabelle 9.1, S. 94) und ist bedingt durch die erhöhte Stabilität des schwefelhaltigen Produktes aufgrund besserer Delokalisierung der Elektronen durch d-Orbitalbeteiligung.

Desweiteren reagierten die β -Alanin-Derivate schneller bei höherer Ausbeute als die GABA-Derivate, was ggf. auf die zahlreicheren Möglichkeiten der intramolekularen Interaktionen der länger-kettigen Derivate zurückzuführen ist.



m	n	Verb.
2	1	100a
3	1	101a
2	2	102a
3	2	103a



m	n	Verb.
2	1	100b
3	1	101b
2	2	102b
3	2	103b

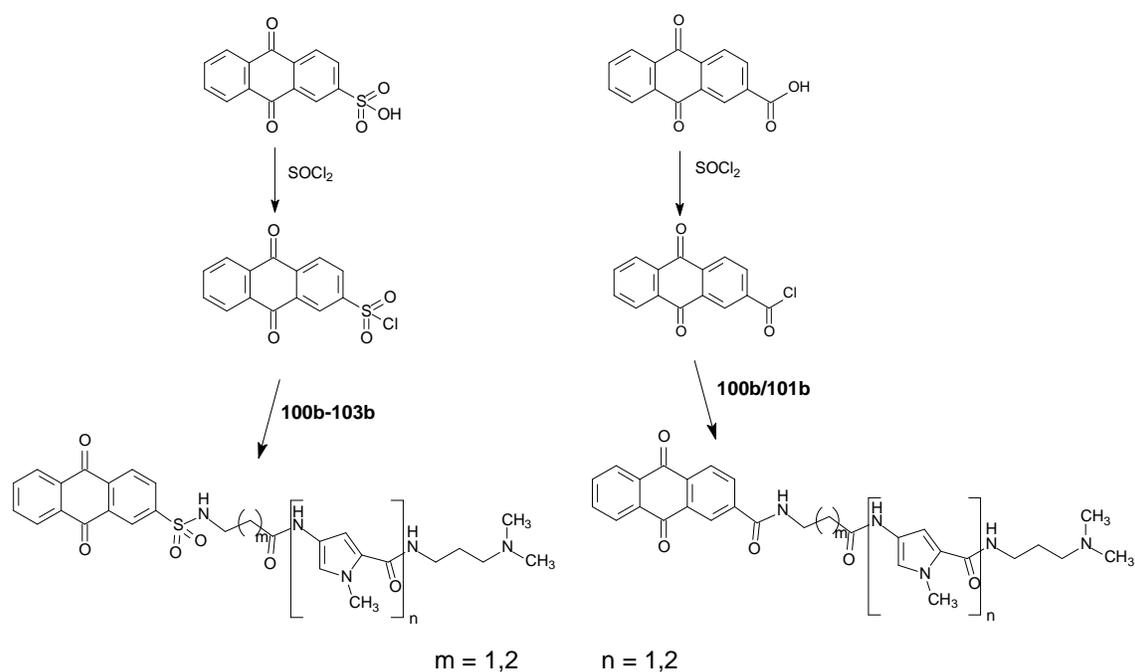
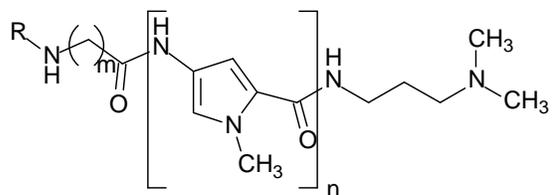


Abb.9.2: Darstellung der Combilexine mit Anthraquinon als Strukturelement durch konvergente Kupplungsreaktion mit den Aminopyrrol-Bausteinen.



R	m	n	Ausbeute [%]	Verbindung Nr.
	2	1	28	100
	3	1	17	101
	2	2	17	102
	3	2	13	103
	2	1	25	104
	3	1	14	105

Tab.9.1: Übersicht über die Anthrachinon-haltigen Combilexine

9.2 Acridin – weitere Versuchstrategien

Nach der erfolgreichen Synthese der Anthrachinonderivate und den hier gesammelten Erfahrungen wurde erneut das Acridin als Funktion aufgegriffen (s.a. Kapitel 7.2, S. 66). Zur Umgehung der in organischen Lösungsmitteln unlöslichen Acridincarbonsäuren sollte nun nach der gleichen Strategie wie bei den Anthrachinonen vorgegangen werden.

Als Linker sollte β -Alanin dienen, da die β -Alanin-haltigen Anthrachinonderivate im NCI-Screening den GABA-Derivaten deutlich überlegen waren (s. Kapitel 10.1, S. 98ff.).

Analog zu der Anthrachinoncarbonsäure wurde Acridin-9-carbonsäure zunächst mit Thionylchlorid zum Säurechlorid umgesetzt und dieses dann bei 100°C in DMF mit dem geschützten β -Alanin-mono- und -bispyrrol-Bausteinen **100b** und **102b** umgesetzt. Die Ausbeute war geringer als bei den entsprechenden Anthrachinonderivaten, eine Optimierung der Synthese wurde aber nicht vorgenommen.

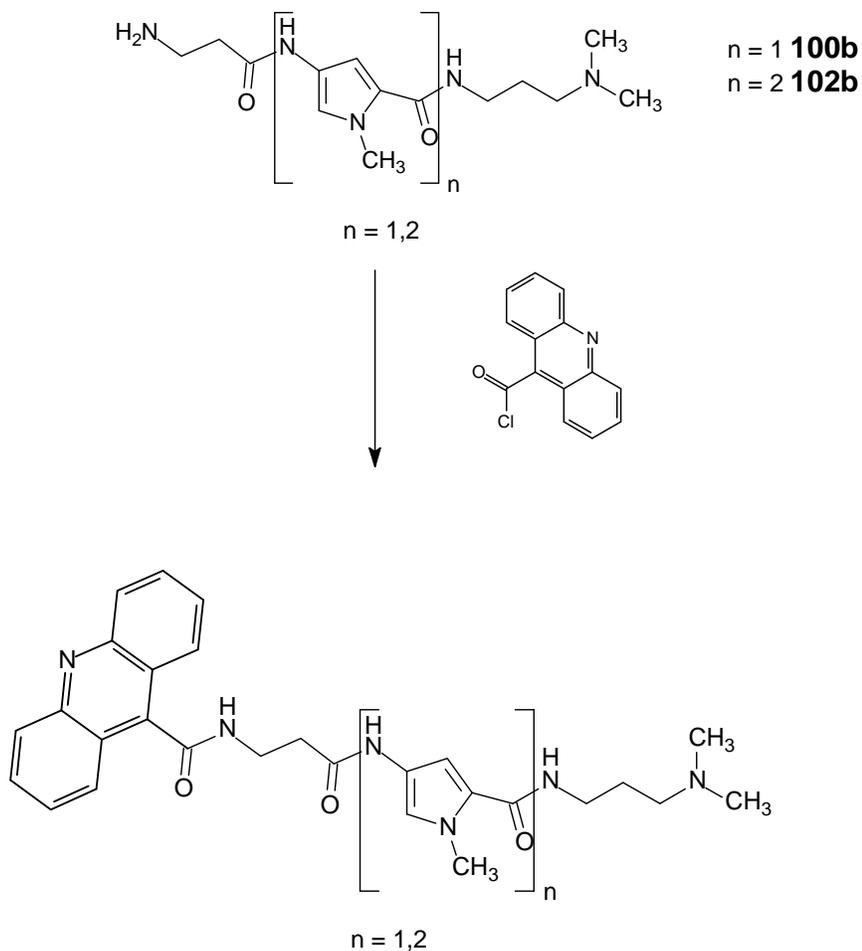


Abb.9.3: Darstellung der Combilexine mit Acridin als Strukturelement.

n	Ausbeute [%]	Verbindung Nr.
1	11	106
2	10	107

Tab.9.2: Übersicht über die Acridin-haltigen Combilexine

9.3 Weitere Syntheseveruche

Da die Acridonbuttersäure-gekoppelten Pyrrolcarboxamide nur knapp die Schwelle des NCI-Primary-Screenings zum 60 Zellkultur-Assay verfehlt hatten (s. Kapitel 6.1, S. 52ff.), wurde - wie in Kapitel 8.4 (S. 87/88) geplant - versucht, diese Strukturen synthetisch zu optimieren. Es sollte folglich die Lipophilie der Acridonderivate durch Halogenierung des anelierten Heterocyclus erhöht werden. Desweiteren sollte analog zum Naphthalimid ein Nitroderivat synthetisiert werden.

9.3.1 Synthese von 2-Chlor-, 2-Brom- und 2-Nitroacridon

Zuerst wurde versucht, das Chlor- bzw. Nitroacridon aus kleinen Einheiten aufzubauen. Hierzu sollte o-Chlorbenzoesäure und 3-Chlor- bzw. 3-Nitroanilin mit K_2CO_3 , Pentanol und Kupfer nach Art einer Ullmann-Reaktion zu den Diphenylaminderivaten umgesetzt und diese anschließend mit Phosphoroxychlorid zyklisiert und anschließend zu den Acridonderivaten verseift werden ^[101].

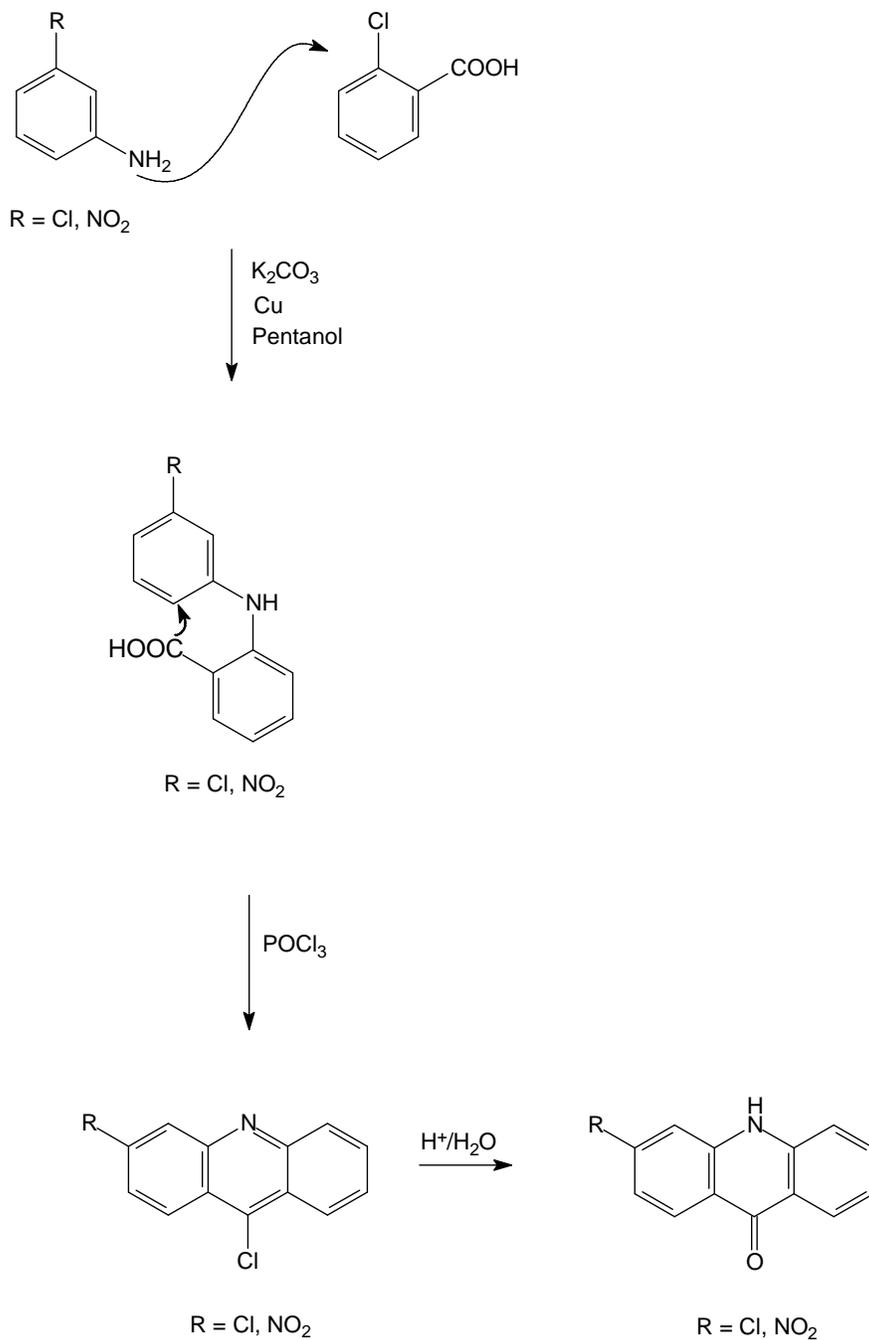


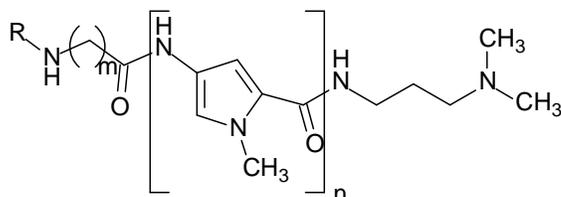
Abb.9.4: Syntheschema zur Darstellung von Chlor-/Nitro-acridon.

Leider konnten schon die Diphenylaminderivate aufgrund nur geringer Umsetzung nicht sauber isoliert werden. Auch weitere Versuche der Bromierung, Chlorierung und Nitrierung des Acridons waren wegen nicht geglückter Isolierung der monosubstituierten Derivate nicht von Erfolg gekrönt.

10. Zellbiologische Zytotoxizitäts-Studien und biophysikalische, biochemische Untersuchungen an der DNA

Auch die Anthrachinon- und Acridin-Derivate wurden den biophysikalischen, biochemischen und zellbiologischen Untersuchungen unterzogen.

10.1 Zellbiologische NCI-Testungen und deren Ergebnisse ^[46]



R	m	n	Ausbeute [%]	Verbindung Nr.
	2	1	28	100
	3	1	17	101
	2	2	17	102
	3	2	13	103
	2	1	25	104
	3	1	14	105
	2	1	11	106
	2	2	10	107

Tab.10.1: Synthetisierte Anthrachinon- und Acridin-haltigen Combilexine.

Verbindung	MCF7 (Brust)	NCI-H460 (Lunge)	SF-268 (ZNS)	Ergebnis
100	1	1	2	aktiv
101	104	50	87	inaktiv
102	27	84	98	aktiv
103	91	96	106	inaktiv
104	32	103	113	aktiv
105	39	53	76	inaktiv
106	98	106	112	inaktiv
107	90	104	110	inaktiv

Tab.10.2: Ergebnisse des Primary Screenings. Die Werte in der Tabelle geben das Zellwachstum der Tumorzell-Linien in Prozent an, nachdem die Zellkulturen mit einer 10^{-4} M Lösung der Testsubstanz in DMSO versetzt worden sind. Je kleiner die Werte in der Tabelle sind, desto stärker zytotoxisch wirksam ist die Substanz.

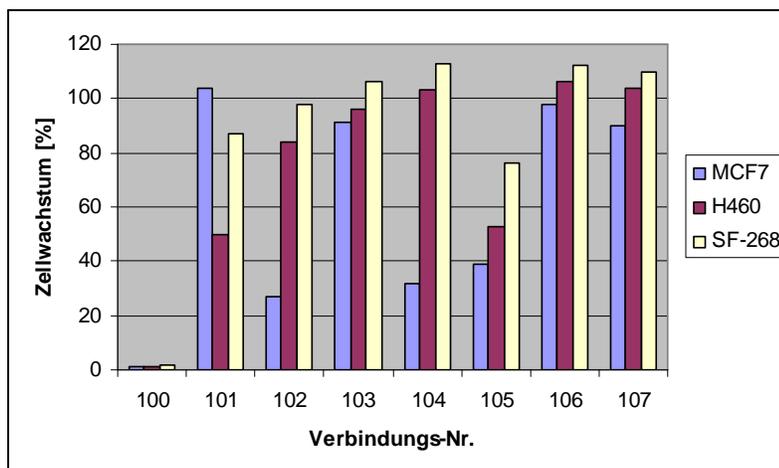


Abb.10.1: Übersicht über die NCI-Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms. X-Achse: Verbindungs-Nr.; Y-Achse: Prozentuales Wachstum, welches durch Einwirkung einer 10^{-4} M Lösung der Testsubstanz in DMSO auf die jeweilige Tumor-Zellkultur verbleibt.

Wie man der Tabelle 10.2 bzw. Abbildung 10.1 entnehmen kann, zeigten bei der letzten Serie an synthetisierten Verbindungen sogar 3 Combilexine die vom NCI geforderte Zellwachstumshemmung; die Anthrachinon-Verbindungen **100**, **102** und **104**. Diese Combilexine, die interessanterweise alle β -Alanin als Linker besitzen, wurden im 60-Zelllinien-Assay getestet und die resultierenden Selektivitätsprofile erstellt (ohne Abbildung).

Verbindung	60 Zelllinien (Auswahl)	Tumorzell-Linie	GI ₅₀ [M]	MG_MID
100	UACC-257	Melanoma	5,44 10 ⁻⁵	- 4,01
102	NCI-H322M	Non-Small Cell Lung Cancer	3,57 10 ⁻⁵	- 4,01
104	keine selektive Hemmung			- 4,13

Tab.10.3: Die hier angegebenen Werte stammen aus dem 60 Tumorzell-Linien-Assay des NCI. GI₅₀: molare Konzentration der Testsubstanz, bei der die Wachstumshemmung der ausgewählten Zelllinie 50 % beträgt; MG_MID: Mean Graph Midpoint; durchschnittlicher Log₁₀GI₅₀-Wert bezogen auf alle 60 Zelllinien.

Tabelle 10.3 zeigt, dass die Verbindungen **100** und **102** zwar selektiv jeweils eine bestimmte Zelllinie hemmen, die Hemmkonzentration aber noch zu hoch sind, um die Testsubstanzen für den Tierversuch zu qualifizieren. Verbindung **104** zeigt keine selektive Hemmung und ebenfalls sehr geringe Potenz (s. MG_MID).

10.2 Beschreibung der verwendeten biophysikalischen und biochemischen Verfahren (s. Kapitel 6.2, S. 55ff.)

10.3 Ergebnisse der biophysikalischen und biochemischen Verfahren

Die Testergebnisse der für die biophysikalischen und biochemischen Assays ausgewählten Verbindungen der 3.Serie (**101, 102, 104, 105, 106, 107**) korrelieren teilweise gut mit den NCI-Ergebnissen. Alle Testsubstanzen zeigten DNA-Bindung, wobei auch hier in der Gruppe der Anthrachinonderivate die Verbindungen mit β -Alanin-Linker hervorstachen und die höchste Affinität aufwiesen. Im scheinbaren Widerspruch zu den Zytotoxizitätsdaten steht nur die starke DNA-Bindung des Acridin-bispyrrolderivates **107**.

Alle getesteten Verbindungen bis auf **107** sind zumindest schwache TOPO-II-Hemmer ohne Affinität zur Topoisomerase I. Die positiven Resultate des Relaxationsassays ohne Ethidiumbromid weisen wieder auf eine Interkalation des Anthrachinon- bzw. Acridinanteils hin.

Eine Übersicht über die Testergebnisse der Verbindungen der 3.Serie gibt Tabelle 10.4 (S. 101).

Verbindung	ΔT_m	ΔT_m	ΔT_m	CD	UV	topo I inhibition		topo II inhibition	
	CT DNA	polydAdT	polydAdT			-BET	+BET		
	r=0,5	r=0,5	r=0,1						
101	- 1,3	6,8	2,8	+/-	+ (h)	+	-	+	
102	3,9	17,4	9,7	+	+ (h)	+	-	+	
104	3,9	13,1	5,5	+/-	+ (h)	+	-	+	
105	1,3	10,5	2,8	+/-	+ (h)	+	-	+	
106	1,1	5,9	1,2		+ (h)	+	-	+	
107	5,7	18,2	8,0		+ (h)	+	-	-	

Tab.10.4: Ergebnisse der DNA-Bindungs- und Topoisomerasehemm-Assays. ΔT_m : Differenz zwischen T_m der Nucleinsäure mit gebundenem Ligand und T_m^0 der reinen Nucleinsäure. r = molares Verhältnis DNA zu Testsubstanz. CD: Circular dichroismus, (+) und (-) steht für positives bzw. negatives CD-Signal. UV: UV/VIS-Spektroskopie. (b) bathochrom, (h) hypochrom. Der Topoisomerase I Hemm-Assay wurde in Agarosegel in Anwesenheit und Abwesenheit von Ethidiumbromid (BET) durchgeführt. Bei den TOPO-Inhibitionsassays steht (+) für eine Hemmung des Enzyms durch 50 μ M der Testsubstanz.

10.4 Interpretation der Ergebnisse

Fasst man die Ergebnisse der Testungen der Anthrachinonderivate zusammen so stellt man fest, dass β -Alanin der γ -Aminobuttersäure als Linker sowohl bei den DNA-Bindungsassays, als auch beim NCI-Screening überlegen war.

Im Vergleich zu den ersten beiden Serien erkennt man hier dagegen keine eindeutige Überlegenheit der Bispyrrol- gegenüber den entsprechenden Monopyrrol-derivaten. Es ist sogar vielmehr so, dass letztere im Primary-NCI-Screening durchweg potenter sind. Da aber von den Bispyrrol-derivaten nur Verbindung **102** auf DNA-Bindung getestet wurde und sowohl dort als auch im 60-Zelllinienassay die besten Resultate lieferte, kann hier keine Überlegenheit eine der beiden Gruppen herausgearbeitet werden. Der Grund für die auffallend hohe Aktivität der Monopyrrol-derivate ist sicherlich die zusätzliche Amidgruppe im Vergleich zu den Monopyrrol-derivaten der ersten beiden Serien, was durch einen zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungsdonator (s.Abb.1.7, S. 7) eine festere Bindung an die DNA ermöglicht.

Überraschend ist die sehr geringe Zytotoxizität der Acridinderivate. Da Acridin in anderen Verbindungen sogar als Vektor zur Membranpermeation diente (s. Kapitel 7.2, S. 67), scheint eine zu geringe Verfügbarkeit im Zellkern als Grund hierfür

unwahrscheinlich. Es fällt aber auf, dass das Monopyrrolderivat **106** nur schwach an die DNA bindet und dem sehr stark bindenden Bispyrrolderivat **107** die TOPO-II-hemmende Wirkung fehlt. Weitergehende Aussagen konnten aber zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht gemacht werden, da zum einen noch nicht alle Testergebnisse von Bailly vorlagen (CD, isosbetische Punkte der UV-Spektren) und zum anderen die Anzahl der synthetisierten Acridinderivate zu gering war.

10.5 Testung von ausgewählten Verbindungen auf antibiotische und antimykotische Aktivität

Aufgrund der antibiotischen Aktivität von Netropsin **1** ^[14] und anderen Oligopyrrolcarboxamiden ^[102] wurde exemplarisch aus allen 3 getesteten Serien jeweils eine Substanz ausgewählt (**50**, **84** und **104**), um am Department of Natural Products, Quest Institute of Life Sciences in Mumbai, Indien, an Bakterien- und Pilzzelllinien (Staphylococcus aureus 209p, Escherichia coli ESS 2231, Aspergillus fumigatus, Candida albicans, Candida albicans ATCC 10231, Candida krusei GO3, Candida glabrata HO5) auf Wachstumshemmung untersucht zu werden (Assay-Beschreibung s. [103]). Bei keiner der Testsubstanzen konnte antibiotische oder antimykotische Aktivität festgestellt werden.

11. Molecular Modelling Studien auf der Basis von semiempirischen Berechnungen; Vergleich der Ergebnisse ausgewählter Verbindungen mit den experimentellen Datensätzen

In Analogie zu den Berechnungen von Hotzel ^[34] wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels semiempirisch-quantenchemischer Verfahren (AM1-Tool in SPARTAN ^[8]) Konformationen, Molekulare Elektrostatische Potentiale (MEP) und LUMOs (tiefste unbesetzte Molekülorbitale) ausgewählter Verbindungen berechnet. Es sollte durch Gegenüberstellung dieser Parameter mit den zellbiologischen und biophysikalischen/biochemischen Resultaten überprüft werden, ob die von Hotzel erstmals postulierten Struktur-Wirkungs-Beziehungen auch auf die strukturell verwandten Moleküle dieser Arbeit anwendbar sind. Auch sollte damit festgestellt werden, ob diese Rechenverfahren zur Vorhersage und Strukturoptimierung geeignet sind.

Die Verfahrensweise und deren Ergebnisse werden in folgender Weise besprochen:

- 1) Berechnung einer Minimums-Konformation der ausgewählten Moleküle
- 2) Vergleich von Konformationen, MEPs und LUMOs der ausgewählten Moleküle mit den zellbiologischen und biophysikalischen, biochemischen Daten
- 3) Bilanz der SPARTAN-Berechnungen

11.1 Berechnung der Konformation der ausgewählten Moleküle

Aufgrund Hotzels Vorarbeit konnte auf eine Validierung des Verfahrens verzichtet werden, da als Ausgangskonformation dieselbe Kristallstruktur von Netropsin an DNA gebunden (101D) ^[9] ausgewählt wurde. Die Kristallstruktur von isoliertem (DNA-ungebundenen) Netropsin ^[10,104] wurde nicht als Basisstruktur verwendet, da zum einen bei dieser Fragestellung die Bindekonformation am Target entscheidend ist und zum anderen die Vergleichbarkeit mit Hotzels Ergebnissen gewährleistet sein sollte.

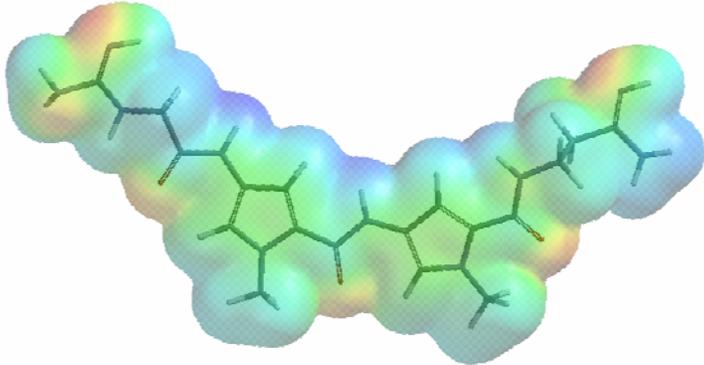
Zunächst wurde die Kristallstruktur von Netropsin an DNA gebunden (101D) aus der PDB-Datenbank ^[9] in das Programm WEB-LAB-VIEWER importiert. Die DNA-Helix und das Kristallwasser wurden entfernt und das isolierte Netropsin in das Programm

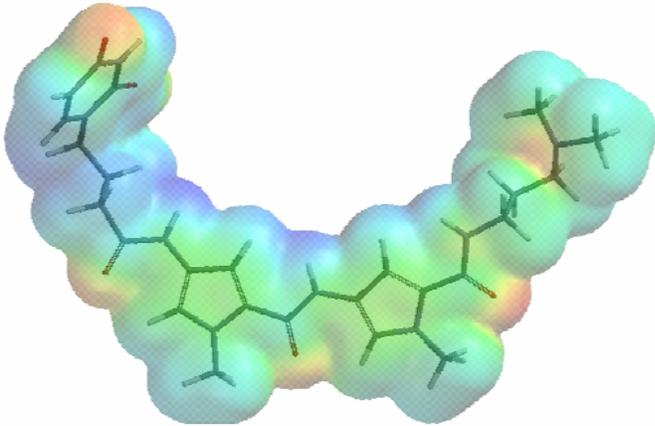
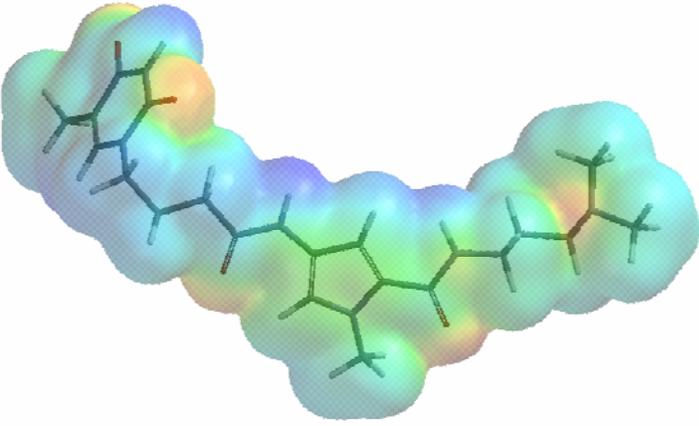
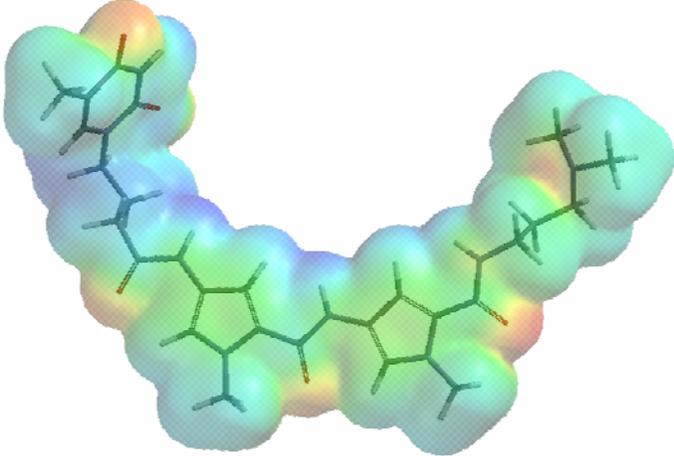
SPARTAN transferiert. Da SPARTAN den Hybridisierungszustand der Atome nicht erkennen kann, mussten die Atome zunächst konfiguriert werden. Die so erhaltene Struktur diente als Ausgangsbasis für alle berechneten Verbindungen. Es mussten nur jeweils mittels der in SPARTAN integrierten „build-up“-Tools die C- und N-terminalen Reste substituiert bzw. bei den Monopyrrolderivaten zusätzlich eine 5-Amino-2-carbonyl-*N*-methyl-pyrrol-Einheit entfernt werden. Anschließend konnte dann ohne vorherige Kraftfeldminimierung eine quantenchemische AM1-Rechnung durchgeführt werden.

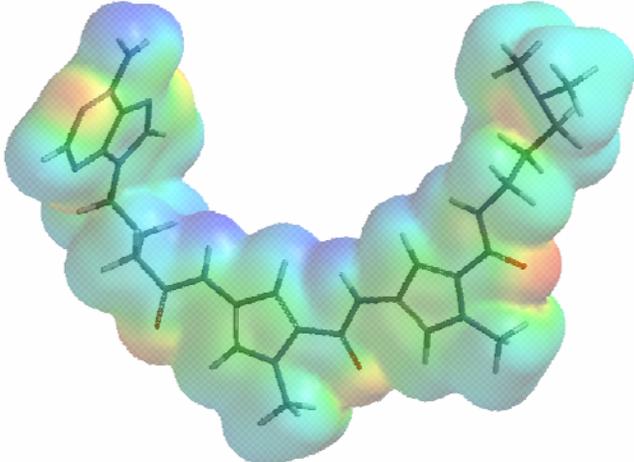
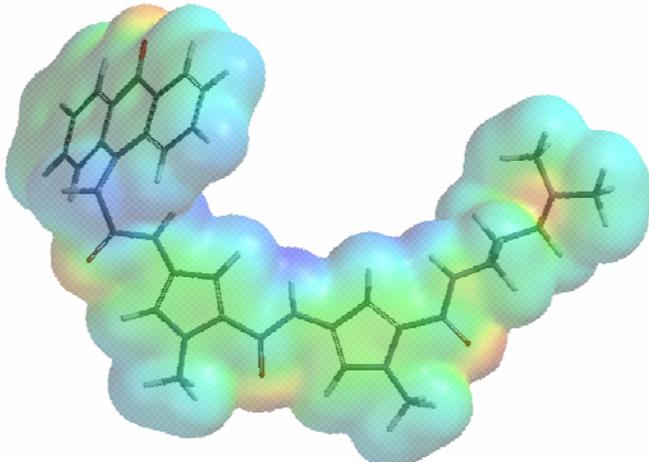
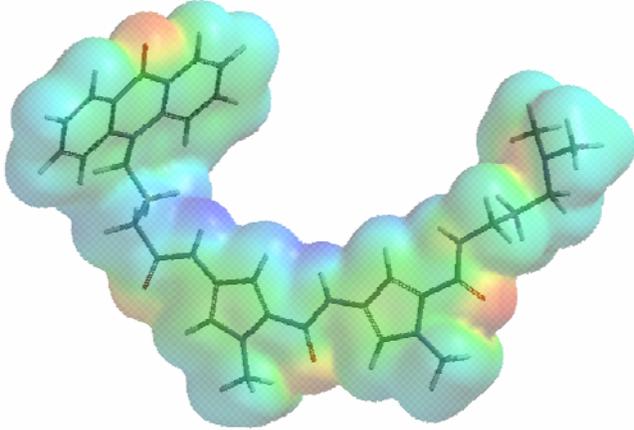
Bei allen Molekülen wurden die Berechnungen mit mehreren verschiedenen Ausgangskonformationen durchgeführt, um möglichst lokale Energieminima ausfindig zu machen. Jeweils die Konformation mit der geringsten Standardbildungsenthalpie (ΔH_{f0}) wurde ausgewählt.

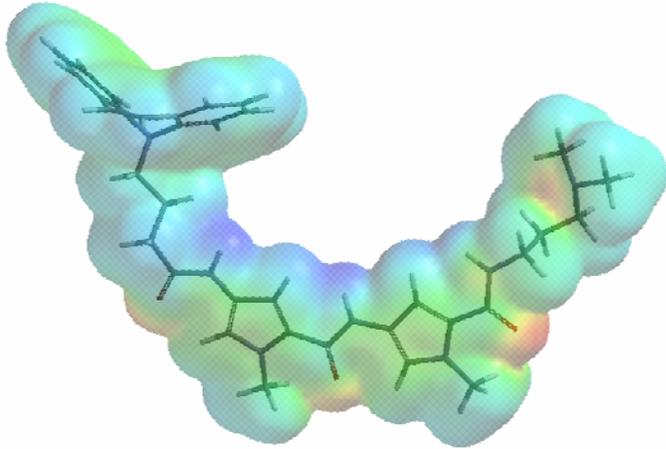
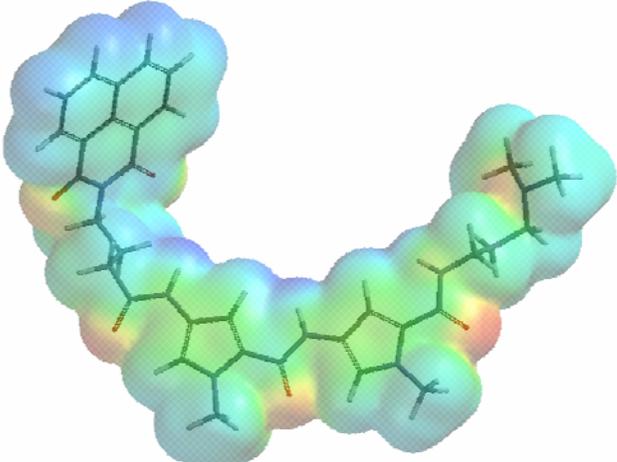
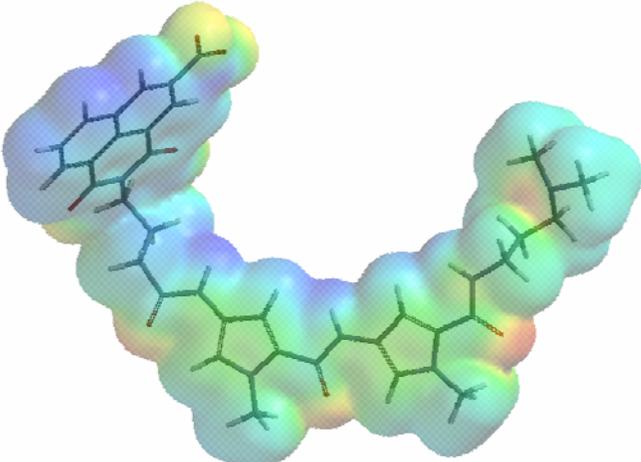
Tabelle 11.1 zeigt die Konformationen, MEPs, LUMOs und Standardbildungsenthalpien der berechneten Moleküle. Bei allen ist die für die Bindung an die Minor-Groove erforderliche (s. Kapitel 1.2, S. 3) und durch *trans*-(*Z*-)Konfiguration der Amidgruppen und 2,5-Substitution des Pyrrols bedingte sichelförmige Kurvature zu erkennen.

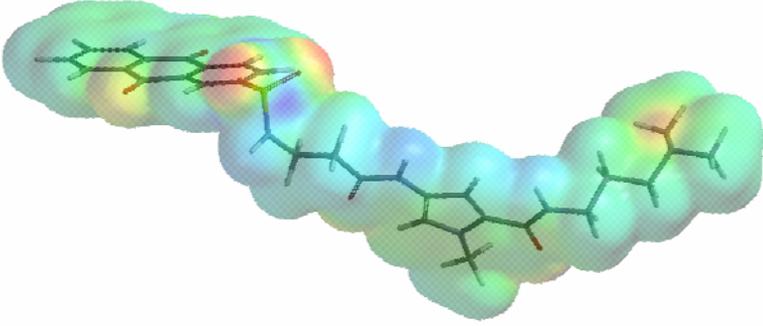
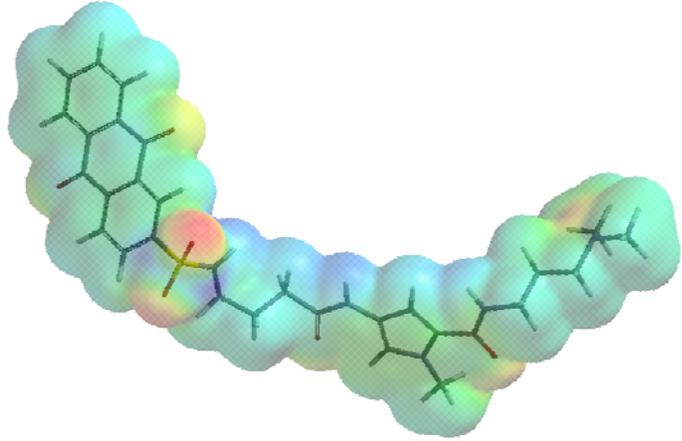
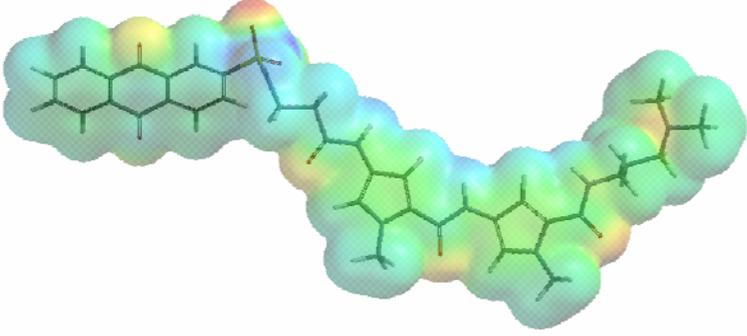
Es sei an dieser Stelle allerdings daran erinnert, dass sich diese quantenchemischen Berechnungen auf Systeme, die sich bei 0 °K (-273,15 °C) ohne Lösungsmittel im Vakuum befinden, beziehen, also nicht unbedingt die Moleküleigenschaften im physiologischen Milieu widerspiegeln.

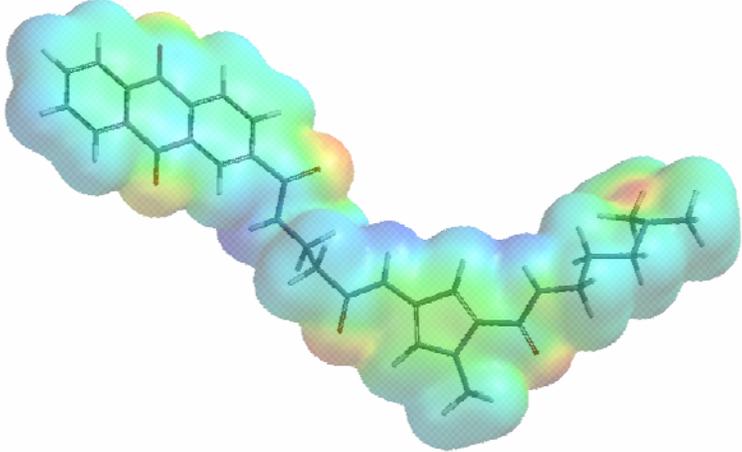
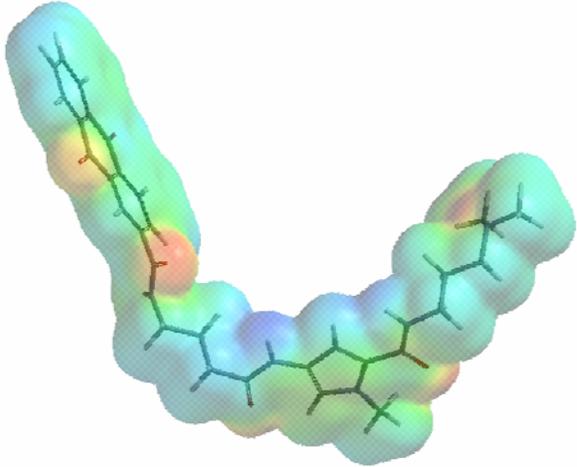
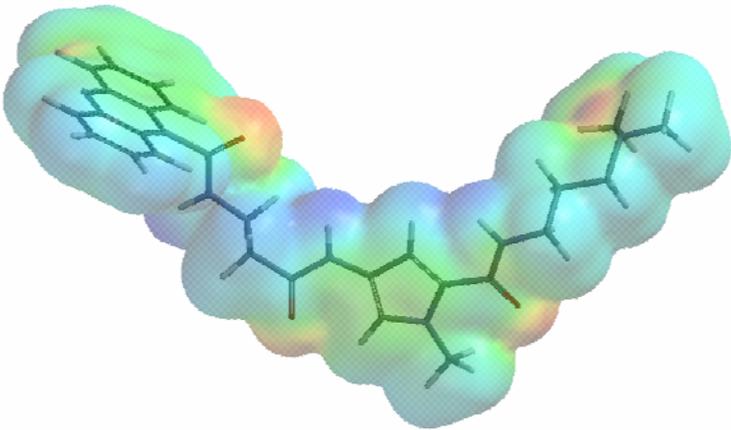
Verb.	MEP	ΔH_{f0} [kcal/mol]	LUMO [eV]
Net.		+29,93	-0,01

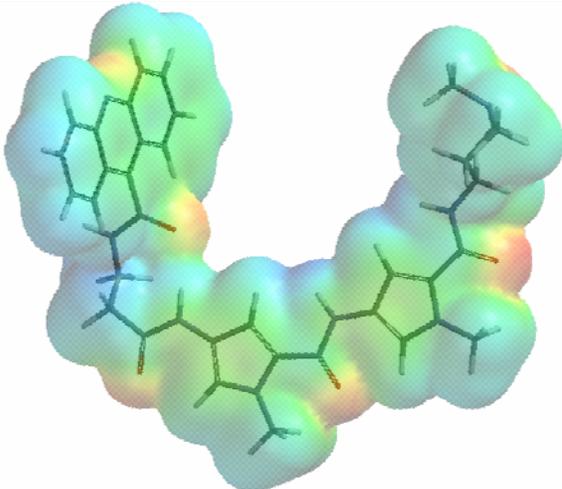
Verb.	MEP	ΔH_{fo} [kcal/mol]	LUMO [eV]
44		-68,23	-0,44
45		-91,46	-0,29
46		-75,36	-0,4

Verb.	MEP	ΔH_{fo} [kcal/mol]	LUMO [eV]
50		+70,65	-0,30
80		+24,73	-0,71
84		+12,37	-0,63

Verb.	MEP	ΔH_{fo} [kcal/mol]	LUMO [eV]
85		+65,04	-0,50
87		-36,39	-1,59
89		-29,56	-2,24

Verb.	MEP	ΔH_{fo} [kcal/mol]	LUMO [eV]
100		-98,41	-1,82
101		-104,97	-1,84
102		-82,82	-1,82

Verb.	MEP	ΔH_{fo} [kcal/mol]	LUMO [eV]
104		-69,50	-1,72
105		-75,81	-1,67
106		+16,62	-1,45

Verb.	MEP	ΔH_{fo} [kcal/mol]	LUMO [eV]
107		+29,53	-1,58

Tab.11.1: Molekulare elektrostatische Potentiale (MEPs), Standardbildungsenthalpien (ΔH_{fo}) und LUMOs von Netropsin (Net.) und 16 ausgewählten Testsubstanzen. Die MEPs in der electrostatic potential surface-Darstellung ($0,002 \text{ e/au}^3$) [8] sind mit Farben visualisiert: rot bedeutet negative Ladung, gelb schwach negativ bis neutral, grün neutral bis schwach positiv und blau positiv. Es wurden jeweils die Konformationen mit der niedrigsten Standardbildungsenthalpie ausgewählt.

11.2 Vergleich von Konformation, molekularem elektrostatischem Potential und LUMO der ausgewählten Moleküle mit den zellbiologischen und biophysikalischen, biochemischen Daten

In diesem Kapitel sollen die LUMO-Koeffizienten und molekularen elektrostatischen Potentiale (MEPs) zum einen mit den NCI-Daten und zum anderen mit den ΔT_m -Werten bzw. Ergebnissen aus den Topoisomerase-Assays korreliert werden. Dazu ist es zunächst notwendig zu erklären, warum bei Minor Groove Bindern gerade diese beiden Größen von Interesse sind.

LUMO steht für Lowest Unoccupied Molecular Orbital und gibt folglich den Energiebetrag des niedrigsten unbesetzten Molekülorbitals an. Da die in dieser Arbeit synthetisierten Moleküle als Netropsin-Varianten in AT- und damit elektronenreichen Regionen der kleinen Rinne der DNA binden (s.Kapitel 6, 8, 10, S. 52ff/81ff/98ff), war es interessant zu überprüfen, ob nach dem Grenzorbitalkonzept [100] bestimmte LUMO-Beträge der Hybridmoleküle besonders günstig für die Interaktion mit den HOMOs (Highest Occupied Molecular Orbitals) der DNA-

Fragmente sind. Hotzel postulierte, dass LUMO-Energie-Werte von Combilexinen von maximal -0,15 eV oder niedriger (= stärker negativ) Voraussetzung für zellbiologische Aktivität sind^[34].

Molekulare Elektrostatische Potentiale geben die Ladungsverteilung in einem Molekül an, die aus unterschiedlicher Aufenthaltswahrscheinlichkeit von Elektronen in den verschiedenen Teilstrukturen resultiert. Jedes Molekül hat ein charakteristisches Muster dieser Ladungsfelder auf seiner Oberfläche. Wenn sich nun ein Minor Groove Binder der kleinen Rinne der DNA nähert, ordnen sich die elektrischen Felder der beiden Moleküle zueinander an. Je besser sie zusammen passen, desto größer ist die Bindungsstärke bzw. Anziehungskraft^[105-107].

Aufgrund des oben erwähnten Elektronenüberschusses AT-reicher Regionen der kleinen Rinne und des Vergleiches mit bekannten Minor-Groove-Bindern (s.a. Kapitel 1.2, S. 3), weiß man, dass bei Combilexinen eine elektronenarme konkave Seite der Krümmung für eine feste Bindung besonders günstig ist.

Im zur Berechnung verwendeten Programm SPARTAN ist die Elektronenverteilung farbcodiert. Blau steht für elektronenarme, rot für elektronenreiche Regionen, Mischfarben charakterisieren Bereiche mittlerer Elektronendichte^[8] (s. Tabelle 11.1, S. 104-110). Da der C-terminale Teil der in der vorliegenden Arbeit synthetisierten Verbindungen konstant ist, sollte folglich besonderes Augenmerk auf die Färbung der konkaven Seite des N-terminalen Heterocyclus und die Linkerregion mit amidischer NH-Funktion gelegt werden.

Tabelle 11.2 (S. 112) zeigt eine Übersicht über die entsprechenden Daten.

Verb. Nr.	LUMO [eV]	NH	Konkavseite des N-terminalen Restes	NCI Aktiv	NCI MCF7 Cell-Growth-Inh. [%]	NCI H460 Cell-Growth-Inh. [%]	NCI SF268 Cell-Growth-Inh. [%]	ΔT_m Poly-dAdT r=0,5 [°C]	TOPO II	TOPO I -BET
44	-0,44	blau	rot	nein	78	116	122	6,5	-	-
45	-0,29	blau	rot	nein	99	94	102	0	-	-
46	-0,4	blau	rot	nein	97	108	98	5,9	-	-
50	-0,30	blau	gelb-rot	nein	81	115	123	6,8	-	-
80	-0,71	blau	blau	nein	88	99	115	18,5	++	++
84	-0,63	blau	grün	nein	48	47	112	26,6	-	++
85	-0,50	blau	blau	ja	0	0	0	13,7	-	+
87	-1,59	blau	rot	nein	68	97	94	20,4	+	++
89	-2,24	blau	rot	nein	64	84	109	18,2	++	++
100	-1,82	blau	X	ja	1	1	2	k.A.	k.A.	k.A.
101	-1,84	blau	gelb	nein	104	50	87	6,8	+	+
102	-1,82	blau	X	ja	27	84	98	17,4	+	+
104	-1,72	blau	X	ja	32	103	113	13,1	+	+
105	-1,67	grün	grün	nein	39	53	76	10,5	+	+
106	-1,45	blau	X	nein	98	106	112	5,9	+	+
107	-1,58	blau	rot	nein	90	104	110	18,2	-	+

Tab.11.2: Die Tabelle zeigt die LUMO-Energie-Werte im Vergleich zu den Farbcodierungen der Ladungsverteilungen auf der van der Waals-Oberfläche am N-terminalen Carboxamid-Stickstoff (NH) und der *Konkavseite des N-terminalen Restes*, sowie die NCI- und biophysikalischen, biochemischen Testergebnisse. X = N-terminaler Rest außerhalb der Kurvature, (-) = keine Topoisomerase-Hemmung, (+) = Hemmung mit 50 μ M einer Verbindung, (++) = Hemmung mit 10 μ M einer Verbindung, k.A. = Assay nicht durchgeführt.

11.3 Bilanz der quantenchemischen Berechnungen mit dem SPARTAN-Programm

Aufgrund des in Kapitel 11.2 erläuterten theoretischen Ansatzes müsste eine Korrelation der mittels SPARTAN berechneten Parameter primär mit der DNA-Bindungsstärke und damit der Größe des ΔT_m -wertes möglich sein. Die Zytotoxizität

einer Verbindung korreliert in der Regel nicht mit ihrer DNA-Bindungsstärke und kann zudem durch die in den vorigen Kapiteln diskutierte Permeationsproblematik negativ beeinflusst werden.

Bei näherer Betrachtung der in Tabelle 11.2 aufgeführten Resultate fällt es allerdings schwer, überhaupt Gesetzmäßigkeiten zu erkennen. Die LUMO-Energien der berechneten Moleküle liegen im Bereich zwischen -0,29 eV und -2,24 eV und erfüllen damit die von Hotzel postulierte Mindestanforderung von -0,15 eV oder darunter. Das Spektrum der 3 Verbindungen mit den höchsten ΔT_m -Werten (**80**, **84** und **87**) reicht aber von LUMO-Energie -1,59 eV bis -0,63 eV, was keine Konkretisierung der Anforderung zulässt. Die Elektronenverteilung in der Linkerregion inklusive N-terminalem amidischen NH unterscheidet sich dagegen nicht signifikant zwischen den einzelnen Testsubstanzen; bei allen Verbindungen sind die Linker gleichermaßen elektronenarm.

Interessant ist die Betrachtung des N-terminalen Restes. Bis auf die Tatsache, dass Verbindung **85**, die den elektronenärmsten Heterocyclus von allen Testsubstanzen aufweist, die zytotoxischste Verbindung der vorliegenden Arbeit ist, erkennt man anhand der *MEPs* ebenfalls keine Gesetzmäßigkeit. Die durch die imidischen Carbonyl-Sauerstoffatome auf der konkaven Seite nach außen elektronenreichen Naphthalimide **87** und **89** zeigen z.B. eine ausgezeichnete DNA-Bindung ($\Delta T_m = 20,4$ bzw. $18,2^\circ\text{C}$). Es fällt allerdings auf, dass die 3 NCI-aktiven Anthrachinonderivate **100**, **102** und **104** durch den β -Alanin-Linker eine sich von den anderen Molekülen unterscheidende gestreckte *Konformation* annehmen (s.Tabelle 11.1, S. 108/109). Das aromatische System reicht aus der Kurvature heraus und ermöglicht dadurch ggf. eine bessere Interaktion mit der DNA. Um diese Beobachtung bewerten zu können, müsste aber eine noch größere Anzahl an strukturell ähnlichen Molekülen synthetisiert werden. Ideal wären hier Röntgenstrukturen mit DNA und Ligand. Interessant ist auch, dass die hochpotente Verbindung **85** mit dem Iminostilben-Gerüst einen nichtplanaren N-terminalen Rest hat (s.Tabelle 11.1, S. 107) und trotzdem die biophysikalischen, biochemischen Testergebnisse auf DNA-Bindung prinzipiell und speziell auf eine Interkalation hinweisen (TOPO I - Assay ohne Ethidiumbromid positiv).

Fazit:

- allgemeine Regeln wie niedrige LUMO-Energie und elektronenarme Linkerregion können nicht weiter verfeinert bzw. konkretisiert werden
- schon in Hinblick auf die Membranpermeationsproblematik scheint ein elektronenarmer, kohlenstoffreicher N-terminaler Rest günstig zu sein
- völlige Planarität des Triheterocyclus scheint keine Voraussetzung für Interkalation bzw. Zytotoxizität eines Combilexins zu sein

12. Versuche der Kristallisation von ausgewählten Verbindungen für mögliche Röntgenstrukturanalysen

Da es keine publizierten Kristallstrukturen von nicht DNA-gebundenen Combilexinen gibt ^[104], wurde mittels verschiedener Kristallisationsverfahren versucht, Reinkristalle einiger der synthetisierten Verbindungen zu erhalten. Die durch Röntgenstrukturanalyse erhaltenen Kristallstrukturen sollten mit den quantenchemisch berechneten Konformationen verglichen werden, um Aussagen über die Leistungsfähigkeit des Rechenverfahrens machen zu können.

Zur Kristallisation ausgewählt wurden die Bispyrrolderivate **50** und **84**.

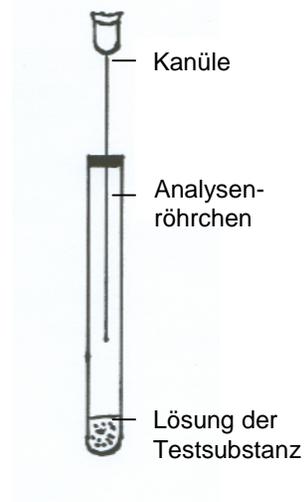
Zunächst wurden mit etherischem Chlorwasserstoff die Hydrochloride aus der etherischen Lösung der freien Basen ausgefällt, da Salze sich besser zur Kristallisation eignen.

Anschließend wurden 3 verschiedene Kristallisationsverfahren angewendet:

1. „klassische“ oder Verdunstungsmethode:
2. Sublimation
3. „Hanging Drop“-Methode

12.1 Verdunstungsmethode

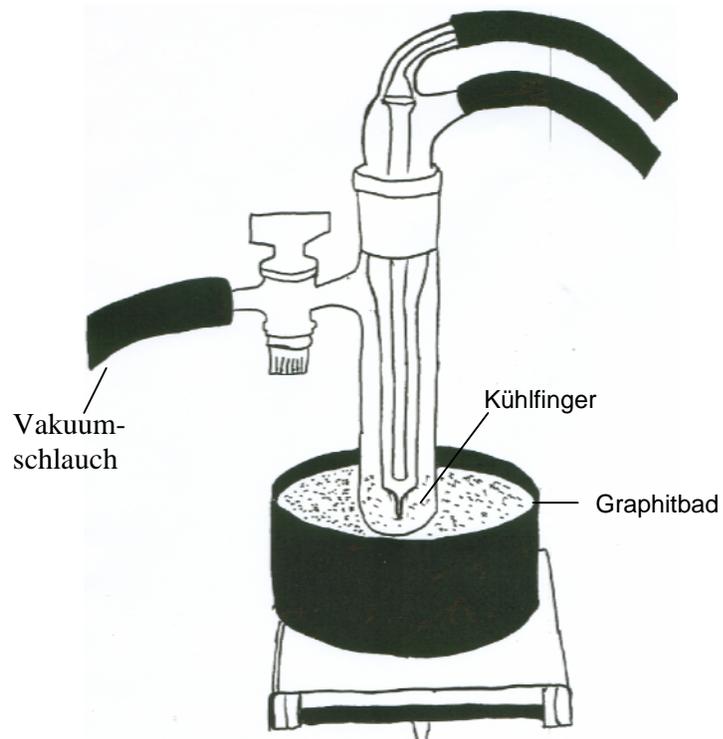
Eine konzentrierte wässrige bzw. ethanolische Combilexin-Lösung wird mehrere Wochen in einem mit einer Kanüle belüfteten Analysenröhrchen bei Raumtemperatur stehengelassen. Durch kontinuierliche Verdunstung des Lösungsmittels kommt es nach Überschreitung des Sättigungspunktes der Lösung zur Bildung von Kristallisationskeimen. Diese wachsen anschließend zu Kristallen heran.



12.2 Sublimation

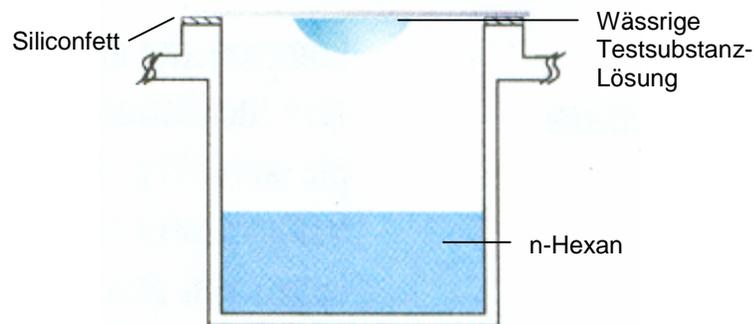
Wenige Milligramm des Combilexins werden unter Vakuum bei einer geeigneten Temperatur sublimiert. Das entstehende Gas scheidet sich anschließend an einem wassergekühlten Kühlfinger in Form von kleinen Kristallen ab.

Bei den verwendeten Combilexinen kam es allerdings sowohl bei der Durchführung bei 150°C als auch bei 100°C nach Tagen bzw. Wochen zur Zersetzung.



12.3 „Hanging-Drop“-Methode

Ein Tropfen einer konzentrierten wässrigen Combilexin-Lösung wird auf ein siliconisiertes Deckgläschen gegeben. Dieses wird anschließend unter Zuhilfenahme von Silicongel zur luftdichten Abdeckung einer Vertiefung auf einer Linbro-Platte, die das Nicht-Lösungsmittel n-Hexan enthält, verwendet. Nach Tagen bis Wochen kommt es durch Verdunstung des n-Hexans und Kondensation an der wässrigen Lösung zur Auskristallisation des Combilexins im Tropfen. Ethanol oder Methanol als Lösungsmittel sind ungeeignet, da aufgrund der geringen Oberflächenspannung die Bildung eines Tropfens nicht möglich ist.



Methode **12.1** und **12.3** führten zu Kristallwachstum. Die Kristalle konnten aber aufgrund der geringen Länge und Breite nicht röntgenkristallographisch vermessen werden. Das Problem war hierbei, dass sich neben den Kristallen auch ein amorpher Feststoff abschied, was aufgrund des resultierenden Substanzmangels in Lösung ein weiteres Kristallwachstum verhinderte.

Eine Optimierung der Kristallisationsverfahren wird für die nachfolgenden Arbeiten empfohlen.

13. Zusammenfassung und Ausblick

Die DNA ist als molekulare Gensubstanz das wichtigste Target in der Entwicklung von Zytostatika, da DNA-Modifikationen und daraus resultierende Mutationen ursächlich an der Krebsentstehung beteiligt sind. Man unterscheidet drei verschiedene Bindungstypen: Interkalation, kovalente Bindung durch Alkylantien und Minor-Groove-Binding oder eine Kombination. Von den Vertretern der letzten Gruppe, den sogenannten Rinnenbindern, ist noch keine Substanz über die Phase II klinischer Studien hinausgekommen. Ausgehend von den Leitstrukturen Netropsin **1** und Distamycin A **2** - Pyrrolcarboxamide, die AT-selektiv an die DNA binden - gibt es aber zahlreiche Weiterentwicklungen, die unter der Bezeichnung Lexitropsine (lat.= legere; die Sequenz der DNA lesen) zusammengefasst werden.

Die erste Gruppe dieser Weiterentwicklungen bilden die *Hybridmoleküle*, bei denen es sich um Kombinationen aus sequenzselektiv bindenden Minor Groove Bindern und Interkalatoren (auch genannt: *Combilexine*), Alkylantien, Antibiotika, etc. handelt. Als zweite große Gruppe sind die aufgrund ihrer haarnadelförmigen Konformation *Hairpins* genannten supramolekularen Moleküle zu nennen. Es handelt sich hierbei um Peptidomimetika (Nachahmung von DNA-bindenden Peptiden oder Proteinen), bei denen durch Kombination verschiedener Heterocyclen wie Pyrrol, Hydroxypyrrol und Imidazol eine Differenzierung zwischen allen 4 DNA-Basen erreicht wurde und die somit sequenzspezifisch binden. Ebenfalls sequenzspezifisch bindend, wenngleich nicht von Netropsin/Distamycin A abgeleitet, sind die Peptide Nucleic Acids (PNAs), bei denen es sich um Oligonucleotidderivate mit durch Peptidgruppen ausgetauschtem Phosphorsäureesterrückgrat handelt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es vom Netropsin abgeleitete, selektiv an bestimmte DNA-Sequenzen bindende zytotoxische Hybridmoleküle zu synthetisieren, biologisch und biophysikalisch zu evaluieren und anhand der ermittelten Datensätze und quantenchemischer Rechnungen Struktur-Wirkungs-Beziehungen abzuleiten. Das Augenmerk sollte auf neue N-terminal-funktionalisierte Pyrrolcarboxamide gerichtet werden. Nach Erfahrungen im Arbeitskreis und vielen Vorversuchen waren die herkömmlichen Syntheseoperationen im speziellen nicht reproduzierbar, so dass zahlreiche Verfahren von Grund auf optimiert bzw. praktisch völlig neu erarbeitet werden mussten.

Im ersten Teil der Arbeit wurden zunächst über verschiedene Amidkupplungsverfahren Nucleobasenalkancarbonsäuren - dargestellt durch Alkylierung der Nucleobasen mit ω -Halogenalkancarbonsäureestern und anschließender Hydrolyse - an Aminopyrrolcarboxamide geknüpft. Letztere wurden nach einem von Nishiwaki und Shibuya ^[37] entwickelten und von Hotzel ^[34,38] optimierten Syntheseverfahren synthetisiert. Da Oligopyrrolcarboxamide selektiv an AT-reiche Sequenzen der DNA binden, wurden die zueinander komplementären Nucleobasen Adenin, Thymin und Uracil ausgewählt. Sie sollten, ähnlich wie die PNAs über Ausbildung von Hoogsteen-Basenpaarungen quasi als „DNA-Tripelhelix“ die Sequenzselektivität der Bindung weiter erhöhen und durch Störung des physiologischen DNA-Metabolismus die Zytotoxizität steigern. Neben der Auswahl der unterschiedlichen Basen erfolgten Variationen bei der Anzahl der Pyrrolbausteine (1 und 2) und der Länge des aliphatischen Linkers zwischen Pyrrol- und Nucleobasen-Baustein (C₂-C₄).

Bei der Testung der synthetisierten Derivate auf Zytotoxizität durch das National Cancer Institute (NCI) der USA und auf DNA-Bindung und Topoisomerase-Hemmung durch das Laboratory of Pharmacology, INSERM in Lille, Frankreich, stellte sich allerdings heraus, dass keine der Substanzen ausreichend zytotoxisch oder TOPO-hemmend und nur die Bispyrrollderivate **40**, **44**, **46** und **50** v.a. mit zunehmender Linkerlänge schwach DNA-bindend waren. Neben der zu schwachen DNA-Bindung wurden für die unzureichende Zytotoxizität auch Permeationsprobleme vermutet; alle Verbindungen waren mit einem berechneten logP-Wert von unter -1 vermutlich zu hydrophil, um an ihren Zielort, den Zellkern, zu gelangen.

Auf die Synthese dieser 1.Serie an Lexitropsinen folgte die Darstellung „klassischer“ Combilexine (Pyrrolcarboxamid mit Interkalator verknüpft) mit Acridon, Naphthalimid, 5-Nitronaphthalimid und Iminostilben als Interkalatorkomponente. Die Alkylierung der Heterocyclen mit ω -Halogenalkancarbonsäureestern, Esterhydrolyse und anschließender Amidkupplung erfolgte analog zu den Nucleobasen-gekoppelten Verbindungen. Interessanterweise enthielt die im NCI-Screening potenteste Substanz dieser Serie (Verbindung **85**) völlig überraschend den nicht coplanaren und in der Entwicklung von zytotoxischen Verbindungen noch nicht erprobten Heterocyclus Iminostilben. Verschiedene in Lille durchgeführte Assays weisen auf Interkalation des Aromaten hin. Die restlichen Testsubstanzen mit den in zahlreichen

Zytostatika enthaltenen Interkalatoren Acridon und (Nitro-)Naphthalimid waren dagegen trotz ausgezeichneter DNA-Bindung bzw. TOPO II - Hemmung nicht ausreichend zytotoxisch aktiv. Sie erreichten also im Gegensatz zum Iminostilbenderivat **85** nicht den 60-Zelllinien-Assay des NCI-Screenings, was vermutlich ebenfalls pharmakokinetische Gründe haben dürfte. Insgesamt waren in dieser Serie erneut die Bispyrrolderivate mit C₄-Linker die vielversprechendsten Kandidaten.

Im dritten synthetischen Teil der vorliegenden Arbeit wurden sich strukturell im chromophoren Rest und Linkerbereich von den Verbindungen der 2. Serie unterscheidende Combilexine dargestellt. Als Interkalatoren dienten hier Anthrachinon und Acridin. Letzteres sollte schon im 2. Teil der Arbeit als Acridincarbonsäure an die Aminopyrrolcarboxamide gekuppelt werden. Diese Säure war aber aufgrund ihrer zwitterionischen Struktur unlöslich in nicht wässrigen Lösungsmitteln und damit einer Amidbildung nicht zugänglich.

Da die Ergebnisse der ersten beiden Serien eine signifikante Überlegenheit des C₄-Linkers in Bezug auf DNA-Bindung und Zytotoxizität gezeigt hatten, wurden die Anthrachinon- und Acridin-säurechloride über GABA bzw. β -Alanin als Linker an die Pyrrolcarboxamidbausteine gebunden. Diese präparativ sehr aufwendigen Synthesen (bis zu 12 Stufen) führten zumindest bei den Anthrachinonderivaten zu den in Sachen Zytotoxizität potentesten Verbindungen; 3 der Testsubstanzen (**100**, **102**, **104**) gelangten in die 2. Stufe (60-Zelllinien-Assay) des NCI-Screenings, wenngleich sie hier genauso wie Verbindung **85** keine ausreichende Aktivität für den Tierversuch zeigten. Auch gute DNA-Bindung und TOPO II - Hemmung wurden nachgewiesen. Interessant ist, dass in diesem Fall die Monopyrrol- den Bispyrrolderivaten in jeder Beziehung ebenbürtig waren, was wohl an der im Vergleich zu den Monopyrrolderivaten der ersten beiden Serien zusätzlich eingeführten Amidgruppe am Heterocyclus lag. Die β -Alanin-Derivate waren dagegen den GABA-Derivaten deutlich überlegen.

Überraschend war die trotz guter DNA-Bindung relativ geringe zytotoxische Aktivität der Acridinderivate.

Molecular Modelling Studien sollten die Befunde rationalisieren. Es wurden daher einfache quantenchemische Berechnungen an 16 ausgewählten Testsubstanzen

durchgeführt, bei denen besonderes Augenmerk auf die Konformationen, molekularen elektrostatischen Potentiale und die Energien der LUMOs gelegt wurde. Hotzel hatte in seiner Dissertation eine LUMO-Energie von -0,15 eV oder darunter und eine elektronenarme Linkerregion als Voraussetzung für Zytotoxizität postuliert, weil dadurch eine besonders gute Bindung an die AT- und damit elektronenreichen Regionen der kleinen Rinne möglich sei. Da jede der 16 ausgewählten Substanzen dieser Arbeit die beiden Bedingungen erfüllte, aber nur die wenigsten ausreichend zytotoxisch aktiv waren und zudem Zytotoxizität in der Regel nicht mit DNA-Bindung korreliert, wird die Aussagekraft dieses Postulats durch die Kollektiverweiterung relativiert. Leider konnten aus den Datensätzen auch keine anderen Gesetzmäßigkeiten abgelesen werden. Zu Erwähnen ist aber, dass sich die Konformationen der Anthrachinon-Verbindungen **100**, **102** und **104** deutlich von den Konformationen der restlichen Moleküle unterscheiden, weil das Anthrachinon aus der Krümmung des Pyrrolcarboxamid-Bausteins herausreicht. Es liegt nahe, dass diese konformative Besonderheit eine besonders günstige Interaktion mit der DNA ermöglicht. Desweiteren ist der Iminostilben-Strukturteil der zytotoxisch sehr aktiven Verbindung **85** der elektronenärmste (zu erkennen an den MEPs) der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Heterocyclen, was eventuell ein Kriterium bei der Auswahl weiterer anellierter Aromaten für zukünftige Molekülvarianten sein könnte.

Die Gesamtheit der Ergebnisse sollte eine fundierte Basis für weiterführende Arbeiten liefern. So sollte man sich v.a. mit dem im zytostatischen Bereich noch unerforschten Heterocyclen Iminostilben befassen. Die entsprechende Verbindung **85** ist wie schon erwähnt die am stärksten zytotoxische Substanz dieser Arbeit. Da aber die Synthese der Vorstufe Iminostilbenbuttersäure nur minimale Ausbeuten lieferte und zudem die Darstellung nicht reproduzierbar war, muss zunächst an dieser Stelle eine Optimierung erfolgen. Anschließend sollten verschiedene Derivatisierungen durchgeführt werden.

Ebenfalls sollten die Acridon- und Naphthalimidderivate derivatisiert werden. Da die Vertreter dieser Arbeit eine sehr starke DNA-Bindung und Topoisomerase II - Hemmung aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass durch Erhöhung des logP-Wertes durch Halogenierung des Aromaten auch eine Zytotoxizitätssteigerung möglich wäre.

Ansonsten gibt es genug Variationsmöglichkeiten in viele verschiedene Richtungen, z.B. den Austausch der Pyrroleinheiten durch andere Aromaten nach dem Bioisosterie-Prinzip zur Modifizierung der Sequenzselektivität, an denen im Arbeitskreis Pindur zum Teil schon gearbeitet wird.

14 Experimenteller Teil

14.1 Allgemeine Angaben

Schmelzpunkte:

Gerät: Büchi 510, unkorrigierte Werte in °C

Elementaranalysen:

Gerät: Haereus CHN rapid (Institut für Organische Chemie, Universität Mainz)

Massenspektren:

Geräte: Mascom 311-A EI-Massenspektrometer (Institut für Pharmazie, Universität Mainz, Herr Dr. C. Peifer, Frau S. Dieler, Frau S. Maehrlein);
70 eV Ionisierungsenergie
Finnigan MAT 7 FD-Massenspektrometer (Institut für Organische Chemie, Universität Mainz), 5 kV Ionisierungsenergie

IR-Spektren:

Gerät: Perkin-Elmer 1310 (Institut für Pharmazie, Universität Mainz)
KBr-Presslinge
Avatar 330 FT-IR (Institut für Pharmazie, Universität Mainz)
Messung der Reinsubstanz mittels AMTIR-Kristall

NMR-Spektren:

Geräte: 300 MHz (^1H) bzw. 75 MHz (^{13}C): Bruker AC-300 (Institut für Pharmazie, Universität Mainz, Herr Dr. Th. Lemster, Frau Dr. M. Jansen, Frau A. Bauer, Frau J. Jambor, Frau B. Büchs)

Bruker DRX 600 MHz (Institut für Organische Chemie, Universität Mainz, Herr H. Kolshorn);

Signal-

Abkürzungen:

s:	Singulett
d:	Duplett
t:	Triplett
q:	Quartett
quint:	Quintett
m:	Multiplett
p:	pseudo; der nachfolgende Kennbuchstabe beschreibt lediglich den Signalhabitus
J:	Kopplungskonstante als Absolutwert in Hz
LM:	Lösungsmittel
δ [ppm]:	chemische Verschiebung in δ -Skala

Chromatographie:

Dünnschichtchromatographie (DC): DC-Plastikfolien, Kieselgel 60 F₂₅₄,
Schichtdicke 0.25 mm (Fa. Merck)
DC-Plastikfolien, Aluminiumoxid 60 F₂₅₄,
neutral

Säulenchromatographie (SC): Kieselgel 60, Korngröße 0.063-0.2 mm (Fa. Merck), Aluminiumoxid (neutral), Korngröße 0.063-0.2 mm (Fa. Merck)

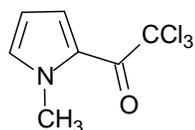
Alle Pyrrolcarboxamid-Testsubstanzen als Peptid-analoge Verbindungen waren frei von unerwünschten Signalen in ¹H- und ¹³C-NMR und zeigten bei der Dünnschichtchromatographie in mindestens 3 verschiedenen Fließmitteln nur einen Fleck. Trotzdem wurden aufgrund unstöchiometrischer Lösungsmittel-Einschlüsse keine akzeptablen C,H,N-Analysen (Abweichung von < 0.3 %) erhalten. Aufgrund dessen wird im Folgenden bei den Endprodukten auf die Angabe der Ergebnisse der

Elementaranalysen verzichtet. Auch in der Literatur sind bei Oligopyrrolcarboxamiden so gut wie keine Elementaranalysen beschrieben.

Im folgenden stehen Literaturangaben in der Kopfzeile dafür, dass das Syntheseverfahren (ggf. in modifizierter Form) übernommen wurde, aber nicht zwangsläufig, dass die entsprechende Verbindung literaturbekannt ist.

14.2 Synthesevorschriften

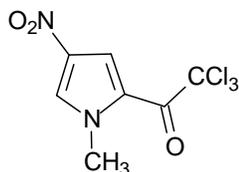
14.2.1 2,2,2-Trichloro-1-(1-methyl-1*H*-2-pyrrolyl)-1-ethanon ^[34] (13)



Vorschrift und physikalische Daten: s. Dissertation Hotzel ^[34]

Ausbeute: 2.66 g (11.77 mmol) (47.1 %), gelbe Nadeln

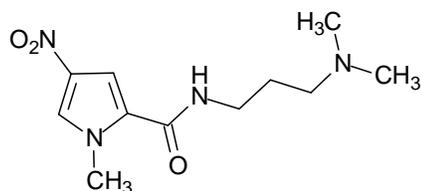
14.2.2 2,2,2-Trichloro-1-(1-methyl-4-nitro-1*H*-2-pyrrolyl)-1-ethanon ^[34] (14)



Vorschrift und physikalische Daten: s. Dissertation Hotzel ^[34]

Ausbeute: 650 mg (2.37 mmol) (53.5 %), farblose Kristalle

14.2.3 N2-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-methyl-4-nitro-1H-2-pyrrol-carboxamid ^[34] (15)

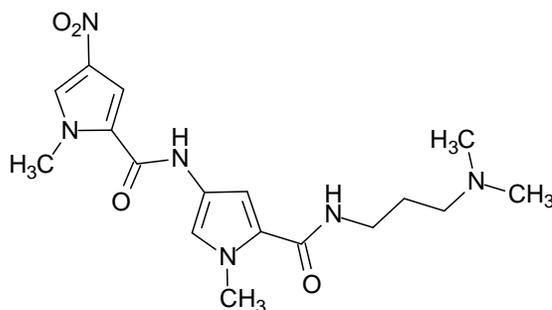


Vorschrift und physikalische Daten: s. Dissertation Hotzel ^[34]

Auf Umkristallisierung und Säulenchromatographie wurde verzichtet, da das Rohprodukt eine für die weitere Verwendung ausreichende Reinheit besaß.

Ausbeute: 1.31 g (5.16 mmol) (99.9 %), farbloser Feststoff

14.2.4 N2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1H-3-pyrrolyl]-1-methyl-4-nitro-1H-2-pyrrol-carboxamid ^[34] (16)

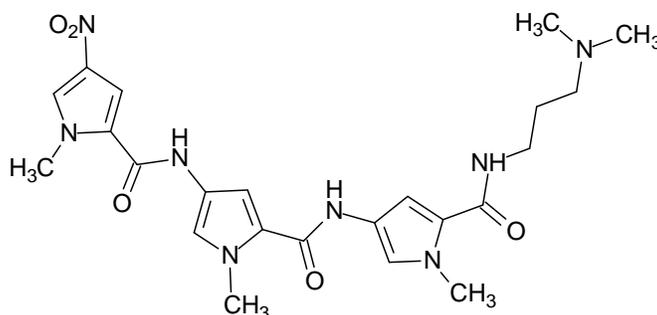


Vorschrift und physikalische Daten: s. Dissertation Hotzel ^[34]

Ausbeute: 1.06 g (2.81 mmol) (35.8 %), gelber Feststoff

14.2.5 N2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1H-3-

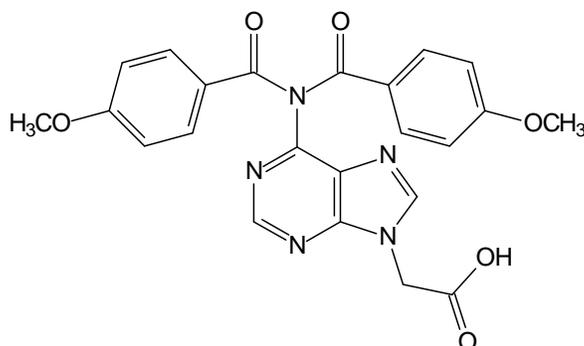
pyrrolyl]-1-methyl-4-[[[1-methyl-4-nitro-1*H*-pyrrolyl]carbonyl]-amino]1*H*-2-pyrrol-carboxamid^[34] (16a)



Vorschrift und physikalische Daten: s. Dissertation Hotzel^[34]

Ausbeute: 953 mg (1.91 mmol) (36.1 %), gelber Feststoff

14.2.6.1 2-{6-[Di(4-methoxybenzoyl)amino]-9*H*-9-purinyl}essigsäure^[34] (19)



9-Adeninessigsäureethylester (442 mg) (2 mmol) wird in wasserfreiem Pyridin suspendiert und 30 Minuten auf 80°C erhitzt. Anschließend tropft man 1.7 g (10 mmol) 4-Methoxybenzoylchlorid hinzu und lässt 24 h bei RT rühren. Das LM wird unter vermindertem Druck entfernt. Dieser Vorgang wird noch dreimal mit Toluol wiederholt. Der Rückstand wird in 70 ml Dichlormethan gelöst und zweimal mit je 30 ml wässriger Citronensäurelösung (10 %, m/V) gewaschen. Man trocknet die organische Phase mit MgSO₄ und entfernt das LM.

Der Rückstand wird in ca. 60°C warmem Ethanol (40 ml) gelöst, auf RT abgekühlt und mit 15 ml 1 M NaOH-Lösung versetzt. Man rührt 3 h bei RT, ergänzt weitere 3 ml

1 M NaOH-Lösung und unterbricht die Reaktion nach 4 h durch Ansäuern mit 1 M HCl-Lösung bis pH 5. Das Produkt fällt aus, wird abfiltriert und getrocknet.

Ausbeute: 276.64 mg (0.6 mmol) (30%), farbloser Feststoff

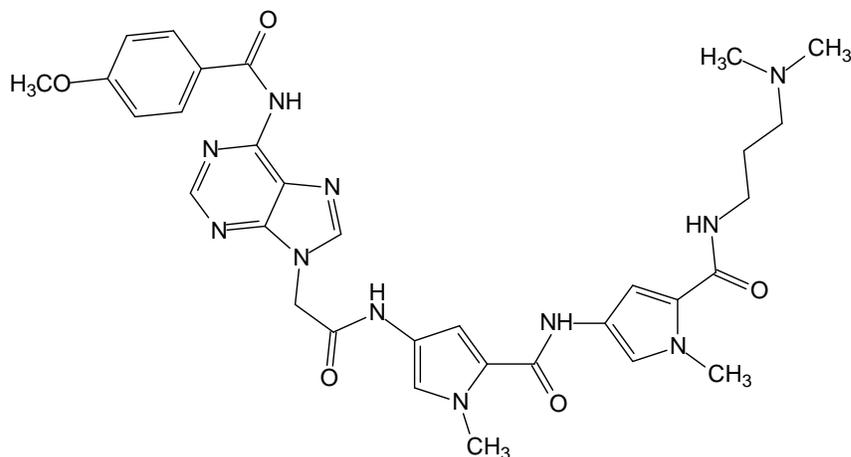
Schmelzpunkt: 97 °C

¹H-NMR, δ [ppm]: 3.8 (s, 3H, CH₃), 3.84 (s, 3H, CH₃), 5.11 (s, 2H, CH₂), 7.03 (m, (300 MHz) (DMSO d⁶) 4H, Anisoyl-H), 7.87 (pd, 2H, ³J=8.8 Hz, Anisoyl-H), 8.04 (pd, 2H, ³J=8.9 Hz, Anisoyl-H), 8.44 (s, 1H, Adenin-H₈), 8.7 (s, 1H, Adenin-H₂), 11.0 (s, 1H, COOH);

EI-MS: m/z (%): 461 (100)

Summenformel: C₂₃H₁₉N₅O₆, 461.43

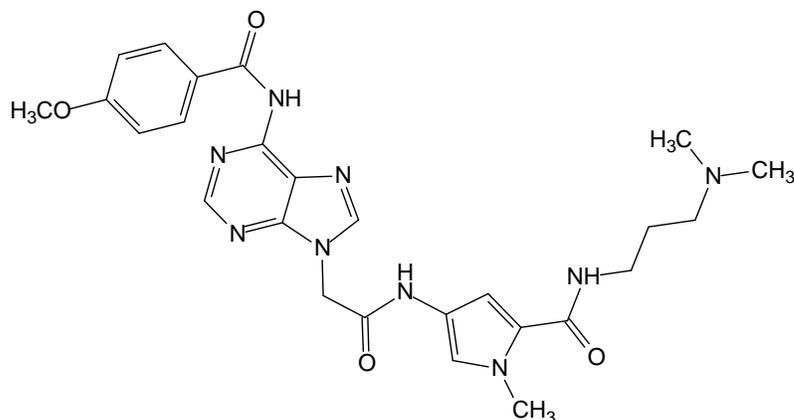
14.2.6.2 N2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1H-3-pyrrolyl]-4-{{(2-(6-[4-methoxybenzoyl]amino)-9H-9-puriny]acetyl)amino]-1-methyl-1H-2-pyrrol-carboxamid (21)}



414 mg (1,1 mmol) **16** werden zunächst mit 200 mg Pd (10 %/C) in 20 ml DMF (absolut) unter Wasserstoffatmosphäre reduziert. Nach 12 h erfolgt DC-Kontrolle auf neutralen Aluminiumoxid-Platten mit EtOH als Fließmittel. Anschließend wird der Katalysator abfiltriert und das Filtrat unter Rühren auf 0°C gekühlt. Man fügt 327 mg (1 mmol) **19** gelöst in 40 ml DMF sowie eine Spatelspitze DMAP hinzu. 248 mg (1.2 mmol) in 10 ml Methylenchlorid gelöstes DCC werden langsam hinzugegeben. Dann wird 24 h bei RT gerührt.

Ausbeute	keine Angabe, da Rohprodukt
$^1\text{H-NMR}$, δ [ppm]: (300 MHz) (DMSO d_6)	1.61 (quint., 2H, $^3J=6.9$ Hz, CH_2), 2.12 (s, 6H, 2 CH_3), 2.25 (t, 2H, $^3J=6.7$ Hz, CH_2), 3.16 (q, 2H, $^3J=6.7$ Hz, CH_2), 3.71 (s, 3H, CH_3), 3.77 (s, 3H, CH_3), 3.78 (s, 3H, CH_3), 5.15 (s, 2H, CH_2), 6.24 (d, 1H, $^4J=1.9$ Hz, Pyrrol-H-3), 6.34 (d, 1H, $^4J=1.9$ Hz, Pyrrol-H-5), 6.77 (d, 1H, $^4J=1.7$ Hz, Pyrrol-H-3'), 6.8 (d, 1H, $^4J=1.3$ Hz, Pyrrol-H-5'), 7.12 (m, 2H, Anisoyl-H), 8.09 (m, 2H, Anisoyl-H), 8.44 (s, 1H, Adenin-H-8), 8.69 (s, 1H, Adenin-H-2), 9.56 (s, 1H, NH), 9.88 (s, 1H, NH), 10.48 (s, 1H, NH);
FD-MS: m/z (%)	656 (100)
Summenformel:	$\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{N}_{11}\text{O}_5$, 655.71

14.2.6.3 N2-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-[(2-{6-[(4-methoxybenzoyl)amino]-9H-9-purinyl}acetyl)amino]-1-methyl-1H-2-pyrrol-carboxamid (20)



Die Synthese verläuft analog zur Darstellung von **21**. Anstelle von 1,1 mmol **16** werden 1,1 mmol (280 mg) **15** eingesetzt.

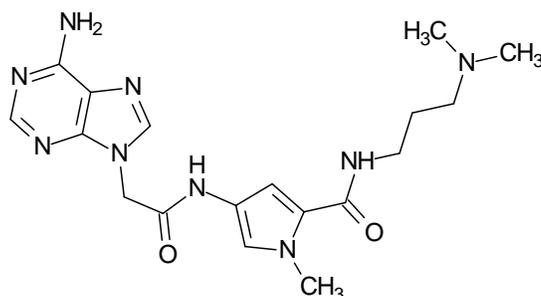
Ausbeute:	keine Angabe, da Rohprodukt
$^1\text{H-NMR}$, δ [ppm]: (300 MHz) (DMSO d_6)	1.63 (quint., 2H, $^3J=6.8$ Hz, CH_2), 2.26 (s, 6H, 2 CH_3), 2.39 (t, 2H, $^3J=6.6$ Hz, CH_2), 3.18 (q, 2H, $^3J=7.7$ Hz, CH_2), 3.76 (s, 3H, CH_3), 3.85 (s, 3H, CH_3), 5.13 (s, 2H, CH_2), 6.71 (d, 1H, Pyrrol-H-3), 7.07 (d, 1H, Pyrrol-H-5), 7.07 (m, 2H, Anisoyl-H), 8.04 (m, 2H,

Anisoyl-H), 8.1 (t, 1H, NH), 8.43 (s, 1H, Adenin-H-8), 8.68 (s, 1H, Adenin-H-2), 10.43 (s, 1H, NH);

FD-MS: m/z (%): 535 (100)

Summenformel: C₂₆H₃₁N₉O₄, 533.59.

14.2.6.4 N2-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-[[2-(6-amino-9H-puriny)acetyl]amino]-1-methyl-1H-2-pyrrol-carboxamid ^[41](22)

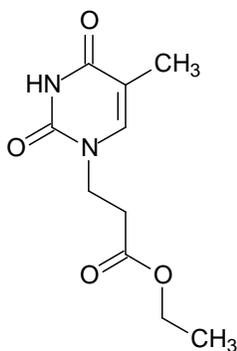


267 mg (0.5 mmol) **20** werden in 10 ml DMF gelöst. 1.25 ml (2.5 mmol) einer 2 M Lösung von CDMC ([Chloromethylen]dimethylammoniumchlorid) in Dichlormethan werden hinzugegeben und es wird 10 Minuten gerührt. Nach dieser Zeit stoppt man die Reaktion durch Zugabe von 5 ml Methanol. Hierdurch wird das primär gebildete 6-N-Dimethylaminomethylen-Derivate zum freien Amin umgesetzt. Nach 90 minütigem Rühren bei RT, wird die Lösung mit 7,5 ml einer Methanol-Wasser-Triethylamin-Mischung (5:5:2) verdünnt und anschließend zur Trockne eingedampft. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie. Leider konnte aufgrund zahlreicher Nebenprodukte trotz mehrfachen Säulens mit verschiedenen Fließmitteln das gewünschte Produkt nicht in ausreichender Reinheit isoliert werden.

EI-MS: m/z (%): 400

Summenformel: C₁₈H₂₅N₉O₂, 399.45

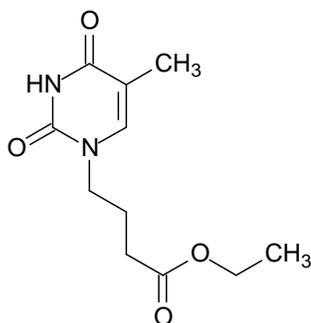
14.2.7 3-(5-Methyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl) propionsäureethylester ^[108](27)



3.44 g (19 mmol) 3-Brompropionsäureethylester werden in 20 ml DMF gelöst. Man gibt 1.59 g (12.6 mmol) Thymin und 5.75 g (41.6 mmol) Kaliumcarbonat hinzu und rührt die Mischung für 24 h bei 70°C. Anschließend wird das Kaliumcarbonat abfiltriert und das Filtrat bis zur Trockne eingedampft. Den Rückstand reinigt man mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (CHCl₃-MeOH (40:1)).

Ausbeute: 1.1 g (4.86 mmol) (38.6 %), farbloser Feststoff
 Schmelzpunkt: 71 °C [lit. [108]: 68-70 °C]
¹H-NMR, δ [ppm]: 1.15 (t, 3H, ³J=7.1 Hz, CH₃), 1.75 (s, 3H, Thymin-CH₃), 2.48 (t, (300 MHz) (DMSO d⁶) 2H, CH₂), 4.0 (2 t, 4H, 2 CH₂), 7.31 (s, 1H, Thymin-H-6), 10.93 (s, 1H, Thymin-NH);
 EI-MS: m/z (%): 226 (100)
 Summenformel: C₁₀H₁₄N₂O₄, 226.23.

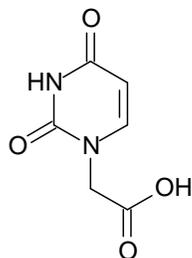
14.2.8 4-(5-Methyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)buttersäureethylester ^[42] (31)



Zu einer Suspension von 2 g Thymin (15.9 mmol) in 160 ml DMF gibt man 0.4 g Natriumhydrid (95 %) (15.9 mmol) und rührt unter Stickstoffatmosphäre bei RT. Nach einer Stunde werden 6.2 g 4-Brombuttersäureethylester (31.8 mmol) und eine Spatelspitze Tetrabutylammoniumjodid hinzugefügt. Man rührt die Mischung 48 h bei RT. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (CHCl₃-MeOH (20:1)) isoliert.

Ausbeute: 980 mg (4.08 mmol) (25.7 %), farbloser Feststoff
 Schmelzpunkt: 134-135 °C [lit. [42]: 134-135 °C]
¹H-NMR, δ [ppm]: 1.2 (t, 3H, ⁴J=7.2 Hz, CH₃), 1.75 (d, 3H, Thymin-CH₃), 1.8 (300 MHz) (DMSO d₆) (quint., 2H, ⁴J=7.2 Hz, CH₂), 2.3 (t, 2H, ⁴J=7.4 Hz, CH₂), 3.6 (t, 2H, ⁴J=6.9 Hz, CH₂), 4.0 (q, 2H, ⁴J=7.1 Hz, CH₂), 7.5 (d, 1H, ⁴J=1.15 Hz, Thymin-H-6), 11.2 (s, 1H, Thymin-NH);
 EI-MS: m/z (%): 240 (100)
 Summenformel: C₁₁H₁₆N₂O₄, 240.25.

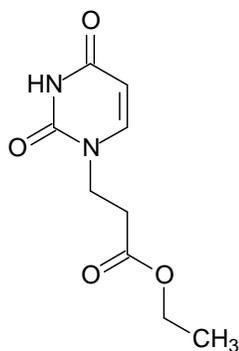
14.2.9 2-(2,4-Dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)essigsäure^[39] (17)



1.12 g (10 mmol) Uracil, 1.12 g (20 mmol) Kaliumhydroxid und 1.42 g (15 mmol) Chloressigsäure werden in 100 ml Wasser gelöst und unter Rückfluss gekocht. Nach wenigen Minuten bildet sich ein weißer Niederschlag, der sich durch Zugabe einiger Tropfen einer gesättigten KOH-Lösung wieder löst. Nach 24 h lässt man die Mischung auf RT abkühlen und säuert mit 1 M HCl an. Die Lösung wird so weit eingeeengt, bis sich ein weißer Niederschlag bildet, den man abfiltriert. Hierbei handelt es sich um das Produkt, welches abfiltriert wird .

Ausbeute: 1.1 g (6.47 mmol) (64.7 %), farbloser Feststoff
 Schmelzpunkt: 285 °C [lit. [39]: 285 °C]
¹H-NMR, δ [ppm]: 4.39 (s, 2H, CH₂), 5.59 (d, 1H, ³J=7.7 Hz, Uracil-H-5), 7.61 (d, (300 MHz) (DMSO d⁶) 1H, ³J=7.9 Hz, Uracil-H-6), 11.36 (s, 1H, COOH);
 EI-MS: m/z (%): 170 (100)
 Summenformel: C₆H₆N₂O₄, 170.12.

14.2.10 3-(2,4-Dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)propionsäureethylester ^[108](26)



26 wird analog zu **27** synthetisiert. Uracil (1.41 g) (12.6 mmol), 3-Brompropionsäureethylester (3.44 g) (19 mmol), Kaliumcarbonat (5.75 g) (41.6 mmol).

Ausbeute: 900 mg (4.24 mmol) (33.7 %), farbloser Feststoff

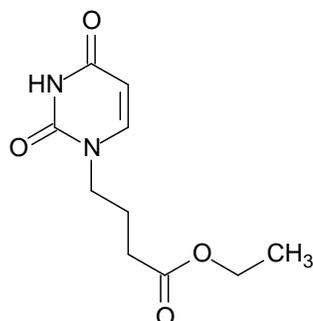
Schmelzpunkt: 94 °C [lit. [109]: 68-70 °C]

¹H-NMR, δ [ppm]: 1.14 (t, 3H, ³J=7.1 Hz, CH₃), 2.51 (t, 2H, CH₂), 3.99 (m, 4H, (300 MHz) (DMSO d₆) 2 CH₂), 5.57 (d, 1H, ³J=7.6 Hz, Uracil-H-5), 7.42 (d, 1H, ³J=7.6 Hz, Uracil-H-6), 11.15 (s, 1H, Uracil-NH);

EI-MS: m/z (%): 212 (100)

Summenformel: C₉H₁₂N₂O₄, 212.2.

14.2.11 4-(2,4-Dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)buttersäureethylester^[42] (30)



30 wird analog zu **31** synthetisiert. Uracil (1.78 g) (15.9 mmol), 4-Brombuttersäureethylester (6.2 g) (31.8 mmol), NaH (95 %) (0.4 g) (15.9 mmol).

Ausbeute: 800 mg (3.54 mmol) (22.2 %), farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 120-125 °C

$^1\text{H-NMR}$, δ [ppm]: 1.15 (t, 3H, $^4J=7.1$ Hz, CH_3), 1.82 (quint., 2H, $^4J=7.1$ Hz, CH_2),
(300 MHz) ($\text{DMSO } d_6$) 2.29 (t, 2H, $^4J=7.4$ Hz, CH_2), 3.66 (t, 2H, $^4J=6.9$ Hz, CH_2), 4.0 (q, 2H, $^4J=7.1$ Hz, CH_2), 5.51 (d, 1H, $^4J=7.9$ Hz, Uracil-H-5), 7.59 (d, 1H, $^4J=7.6$ Hz, Uracil-H-6), 11.2 (s, 1H, Uracil-NH);

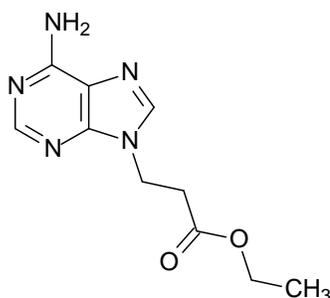
EI-MS: m/z (%): 226 (100)

Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$, 226.23

Elementaranalyse: Ber.: C 53,09 H 6,24 N 12,38

Gef.: C 53,60 H 6,20 N 12,44.

14.2.12 3-(6-Amino-9H-9-purinyll)propionsäureethylester ^[108] (**34**)



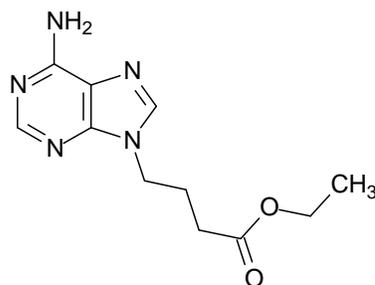
34 wird analog zu **27** synthetisiert. Adenin (1.7 g) (12.6 mmol), 3-

Brompropionsäureethylester (3.44 g) (19 mmol), Kaliumcarbonat (5.75 g) (41.6 mmol). Kaliumcarbonat wird auch hier abfiltriert und das Filtrat zur Trockne

eingedampft. Bei Verbindung **34** ist aber keine Reinigung mittels Säulenchromatographie nötig, sondern das Produkt wird durch Umkristallisierung mit 20 ml einer Mischung aus Methanol und Wasser (1:1) gewonnen.

Ausbeute: 1.8 g (7.66 mmol) (60.7%), farbloser Feststoff
 Schmelzpunkt: 170 °C [lit. [108]: 170-171 °C]
¹H-NMR, δ [ppm]: 1.1 (t, 3H, ³J=7.1 Hz, CH₃), 2.93 (t, 2H, ³J=6.6 Hz, CH₂), 4.0 (q, (300 MHz) (DMSO d⁶) 2H, ³J=7.1 Hz, CH₂), 4.38 (t, 2H, ³J=6.7 Hz, CH₂), 7.21 (s, 2H, NH₂), 8.08 (s, 1H, Adenin-H-8), 8.13 (s, 1H, Adenin-H-2);
 EI-MS: m/z (%): 235 (100)
 Summenformel: C₁₀H₁₃N₅O₂, 235.24.

14.2.13 4-(6-Amino-9H-9-purinylyl)buttersäureethylester ^[42] (**24**)



24 wird analog zu **31** synthetisiert. Adenin (2 g) (14.8 mmol), DMF (200 ml), 4-Brombuttersäureethylester (4.4 g) (22.57 mmol), NaH (95 %) (0.4 g), (15.9 mmol). Reinigung mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (MeOH-CHCl₃ (10:1)).

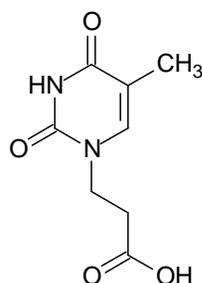
Ausbeute: 2.6 g (10.44 mmol) (70.5 %), farbloser Feststoff
 Schmelzpunkt: 108-109 °C [lit. [42]: 108-109 °C]
¹H-NMR, δ [ppm]: 1.11 (t, 3H, ³J=7.1 Hz, CH₃), 2.05 (quint., 2H, ³J=6.8 Hz, CH₂), (600 MHz) (DMSO d⁶) 2.27 (t, 2H, ³J=7.4 Hz, CH₂), 3.97 (q, 2H, ³J=7.2 Hz, CH₂), 4.16 (t, 2H, ³J=6.9 Hz, CH₂), 7.22 (s, 2H, NH₂), 8.11 (s, 1H, Adenin-H-8), 8.12 (s, 1H, Adenin-H-2);
¹³C-NMR, δ [ppm]: 14.0 (CH₃), 24.9 (CH₂), 30.6 (CH₂), 42.2 (CH₂), 59.9 (CH₂),

(150 MHz) (DMSO d_6) 118.7 (C_q), 140.8 (CH), 149.6 (C_q), 152.4 (CH), 156.0 (C_q), 172.1 (CO);
 EI-MS: m/z (%): 249 (100)
 Summenformel: C₁₁H₁₅N₅O₂, 249.27.

14.2.14 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Darstellung der Nucleobasen-alkancarbonsäuren durch Hydrolyse ihrer Ester

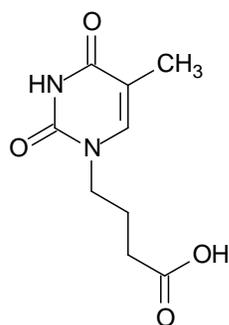
Die Carbonsäureester werden in Ethanol (20 ml pro mmol) gelöst. Der 2-fach molare Überschuss an 2M-NaOH wird hinzugegeben und die Mischung 12 h bei RT gerührt. Bei nicht quantitativer Umsetzung (Verlaufskontrolle mittels DC; Fließmittel s. Ester) wird noch weitere 2M-NaOH ergänzt. Bei kompletter Umsetzung säuert man mit 1M-HCl an, filtriert den entstehenden Niederschlag ab und trocknet ihn unter vermindertem Druck. Die Carbonsäuren werden ohne weitere Reinigung verwendet.

14.2.14.1 3-(5-Methyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)propionsäure (29)



Ausbeute: quantitative Umsetzung, farbloser Feststoff
 Schmelzpunkt: > 250 °C
¹H-NMR, δ [ppm]: 1.75 (s, 3H, Thymin-CH₃), 2.42 (t, 2H, ³J=7.6 Hz, CH₂), 3.96 (t, 2H, ³J=7.7 Hz, CH₂), 7.29 (s, 1H, Thymin-H-6), 10.92 (s, 1H, NH), 12.32 (s, 1H, COOH);
 (300 MHz) (DMSO d_6)
 EI-MS: m/z (%): 198 (100)
 Summenformel: C₈H₁₀N₂O₄, 198.18.

14.2.14.2 4-(5-Methyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)buttersäure (33)



Ausbeute: quantitative Umsetzung, farbloser Feststoff

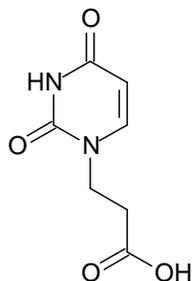
Schmelzpunkt: > 250 °C

$^1\text{H-NMR}$, δ [ppm]: 1.73 (s, 3H, Thymin- CH_3), 1.77 (quint., 2H, $^3\text{J}=7.2$ Hz, CH_2), 2.21 (t, 2H, $^3\text{J}=7.4$ Hz, CH_2), 3.62 (t, 2H, $^3\text{J}=7.0$ Hz, CH_2), 7.48 (s, 1H, Thymin-H-6), 11.19 (s, 1H, Thymin-NH);

EI-MS: m/z (%): 212 (100)

Summenformel: $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$, 212.2.

14.2.14.3 3-(2,4-Dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)propionsäure (28)



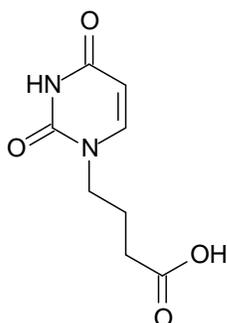
Ausbeute: quantitative Umsetzung, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: > 250 °C

$^1\text{H-NMR}$, δ [ppm]: 2.43 (t, 2H, $^3\text{J}=8.0$ Hz, CH_2), 3.93 (t, 2H, $^3\text{J}=7.7$ Hz, CH_2), 5.56

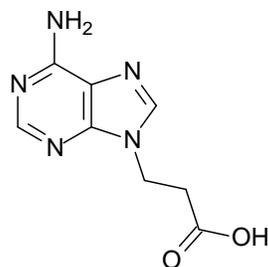
(300 MHz) (DMSO d_6) (d, 1H, $^3J=7.3$ Hz, Uracil-H-5), 7.4 (d, 1H, $^3J=7.6$ Hz, Uracil-H-6),
 11.2 (s, 1H, NH);
 EI-MS: m/z (%): 184 (100)
 Summenformel: $C_7H_8N_2O_4$, 184.15.

14.2.14.4 4-(2,4-Dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)buttersäure (32)



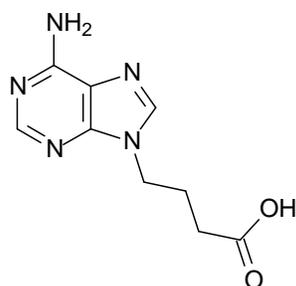
Ausbeute: quantitative Umsetzung, farbloser Feststoff
 Schmelzpunkt: > 250 °C
 1H -NMR, δ [ppm]: 1.78 (quint., 2H, $^3J=7.1$ Hz, CH_2), 2.23 (t, 2H, $^3J=7.3$ Hz, CH_2),
 (300 MHz) (DMSO d_6) 3.65 (t, 2H, $^3J=6.8$ Hz, CH_2), 5.55 (d, 1H, $^3J=7.1$ Hz, Uracil-H-5),
 7.6 (d, 1H, $^3J=7.9$ Hz, Uracil-H-6), 11.22 (s, 1H, NH);
 EI-MS: m/z (%): 198 (100)
 Summenformel: $C_8H_{10}N_2O_4$, 198.18.

14.2.14.5 3-(6-Amino-9H-9-purinyI)propionsäure (35)



Ausbeute: quantitative Umsetzung, farbloser Feststoff
 Schmelzpunkt: > 250 °C
¹H-NMR, δ [ppm]: 2.85 (t, 2H, ³J=6.7 Hz, CH₂), 4.32 (t, 2H, ³J=6.8 Hz, CH₂), 7.20 (300 MHz) (DMSO d⁶) (s, 2H, NH₂), 8.07 (s, 1H, Adenin-H-8), 8.12 (s, 1H, Adenin-H-2);
 EI-MS: m/z (%): 207 (100)
 Summenformel: C₈H₉N₅O₂, 207.19.

14.2.14.6 4-(6-Amino-9H-9-purinyl)buttersäure (36)



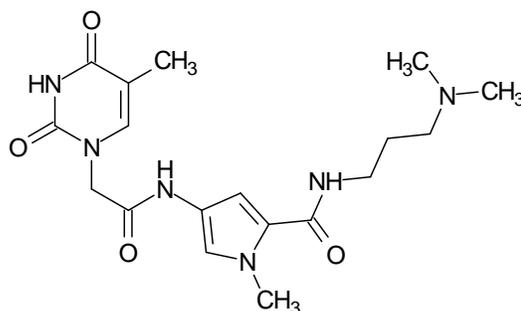
Ausbeute: quantitative Umsetzung, farbloser Feststoff
 Schmelzpunkt: 298 °C [lit. > 300 °C]^[42]
¹H-NMR, δ [ppm]: 2.01 (quint., 2H, ³J=7.0 Hz, CH₂), 2.2 (t, 2H, ³J=7.2 Hz, CH₂), (300 MHz) (DMSO d⁶) 4.15 (t, 2H, ³J=6.9 Hz, CH₂), 7.21 (s, 2H, NH₂), 8.12 (s, 2H, Adenin-H-2+8), 12.1 (s, 1H, COOH);
 EI-MS: m/z (%): 221 (100)
 Summenformel: C₉H₁₁N₅O₂, 221.21.

14.2.15 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der Pyrrolcarboxamide mit Thymin- und

Uracilalkancarbonsäuren als Strukturelementen ^[42]

1.3 mmol der Nucleobasen-Alkancarbonsäure wird in 40 ml DMF gelöst. Die Lösung wird auf -20°C gekühlt, 1.2 mmol (0,1 ml) Chlorameisensäureethylester werden hinzugefügt und man rührt die Mischung bei dieser Temperatur für 20 Minuten. Dann gibt man 1 mmol des Aminopyrrolderivates, welches zuvor durch Reduktion der jeweiligen Nitroeinheit mit Pd (10%/ C) in 20 ml DMF unter Wasserstoffatmosphäre hergestellt wurde (s. **14.2.6.2**, S. 128), und 1 mmol (129 mg) *N,N*-diisopropyl-ethylamin hinzu. Man rührt lichtgeschützt bei RT für 24 h. Anschließend wird die Lösung zur Trockne eingedampft und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Kieselgel MeOH-NH₃ (97:3)) gereinigt.

14.2.15.1 **N2-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-methyl-4-[[2-(5-methyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)acetyl]amino]-1H-2-pyrrol-carboxamid (38)**



Einwaage: 240 mg 2-Thyminessigsäure, 254 mg **15**

Ausbeute: 192.4 mg (0.49 mmol) (49.4 %), gelber Feststoff

Schmelzpunkt: > 250 °C

¹H-NMR, δ [ppm]: 1.6 (quint., 2H, ³J=6.5 Hz, CH₂), 1.75 (s, 3H, Thymin-CH₃), 2.2 (s, 6H, 2 CH₃), 2.4 (t, 2H, ³J=7.0 Hz, CH₂), 3.2 (q, 2H, ³J=6.7 Hz, CH₂), 3.75 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 4.4 (s, 2H, CH₂), 6.7 (d, 1H, ⁴J=1.7 Hz, Pyrrol-H-3), 7.1 (d, 1H, ⁴J=1.7 Hz, Pyrrol-H-5), 7.5 (s, 1H, Thymin-H-6), 8.1 (t, 1H, ³J=6.7 Hz, NH), 10.1 (s, 1H, NH);

¹³C-NMR, δ [ppm]: 12.71 (CH₃), 27.25 (CH₂), 36.31 (CH₃), 37.23 (CH₂), 45.24 (2

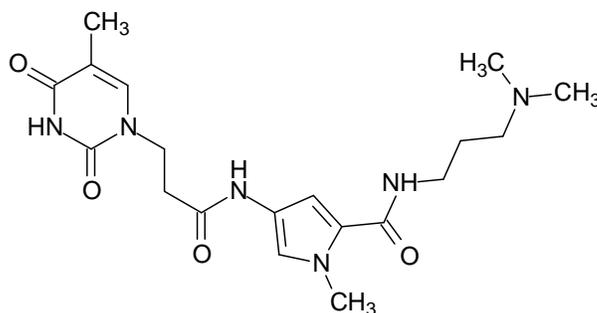
(75 MHz) (DMSO d^6) CH₃), 49.81 (CH₂), 56.85 (CH₂), 103.6 (CH), 108.23 (C_q), 117.83 (CH), 121.52 (C_q), 123.51 (C_q), 142.79 (CH), 151.41 (CO), 161.34 (CO), 164.3 (CO), 164.78 (CO);

FD-MS: m/z (%): 391 (100)

Summenformel: C₁₈H₂₆N₆O₄, 390.44

IR (KBr) (cm⁻¹): 3303, 3157, 3040, 2945, 2812, 1660, 1577, 1524, 1463, 1435, 1406, 1346, 1223, 1144, 805, 760.

14.2.15.2 N2-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-methyl-4-[[3-(5-methyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)propanoyl]amino]-1H-2-pyrrol-carboxamid (41)



Einwaage: 258 mg **29**, 254 mg **15**

Ausbeute: 101 mg (0.25 mmol) (25 %), gelber Feststoff

Schmelzbereich: 130-140 °C

¹H-NMR, δ [ppm]: 1.62 (quint., 2H, ³J=7 Hz, CH₂), 1.76 (s, 3H, Thymin-CH₃), 2.2 (s, 6H, 2 CH₃), 2.34 (t, 2H, ³J=7.1 Hz, CH₂), 2.46 (t, 2H, ³J=7.3 Hz, CH₂), 3.17 (q, 2H, ³J=5.6 Hz, CH₂), 3.77 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 4.1 (t, 2H, ³J=7.8 Hz, CH₂), 6.64 (d, 1H, ⁴J=1.9 Hz, Pyrrol-H-3), 7.07 (d, 1H, ⁴J=1.5 Hz, Pyrrol-H-5), 7.3 (s, 1H, Thymin-H-6), 8.11 (t, 1H, NH), 9.84 (s, 1H, NH), 10.9 (s, 1H, NH);

(300 MHz) (DMSO d^6)

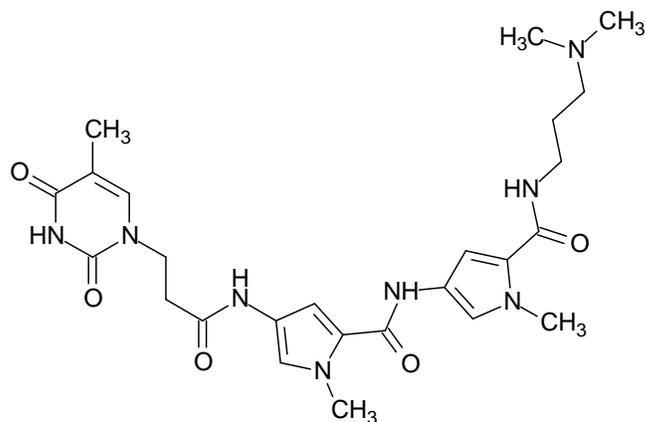
¹³C-NMR, δ [ppm]: 12.76 (CH₃), 26.32 (CH₂), 33.79 (CH₂), 36.28 (CH₃), 36.63 (CH₂), 36.84 (CH₂), 44.17 (2 CH₃), 56.34 (CH₂), 103.83 (CH), 107.47 (C_q), 117.98 (CH), 122.09 (C_q), 123.12 (C_q), 136.69 (CH), 151.44 (CO), 161.59 (CO), 164.00 (CO), 167.26 (CO);

(75 MHz) (DMSO d^6)

FD-MS: m/z (%): 406 (100)

Summenformel: $C_{19}H_{28}N_6O_4$, 404.46
 IR (KBr, cm^{-1}): 3230, 2900, 2680, 2420, 1680, 1610, 1500, 1420, 1360, 1260, 1180, 1100, 750, 600.

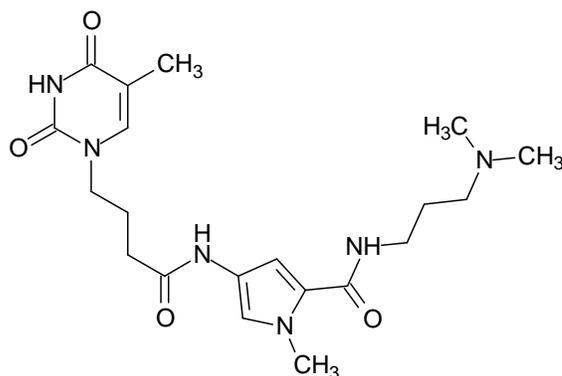
14.2.15.3 N2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1H-3-pyrrolyl]-1-methyl-4-{{[3-(5-methyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)propanoyl]amino}-1H-2-pyrrol-carboxamid (42)



Einwaage: 258 mg **29**, 376 mg **16**
 Ausbeute: 190 mg (0.36 mmol) (36.1 %), gelber Feststoff
 Schmelzbereich: 180-190 °C
 1H -NMR, δ [ppm]: 1.61 (quint., 2H, $^3J=5.9$ Hz, CH_2), 1.77 (s, 3H, Thymin- CH_3), 2.2 (s, 6H, 2 CH_3), 2.31 (t, 2H, $^3J=6.4$ Hz, CH_2), 3.16 (q, 2H, CH_2), 3.78 (s, 3H, Pyrrol- CH_3), 3.81 (s, 3H, Pyrrol- CH_3), 4.03 (t, 2H, $^3J=6.4$ Hz, CH_2), 6.81 (d, 1H, Pyrrol-H-3), 6.84 (d, 1H, Pyrrol-H-5), 7.14 (d, 1H, Pyrrol-H-3'), 7.17 (d, 1H, Pyrrol-H-5'), 7.31 (s, 1H, Thymin-H-6), 8.08 (t, 1H, NH), 9.86 (s, 1H, NH), 9.9 (s, 1H, NH), 10.9 (s, 1H, Thymin-NH);
 ^{13}C -NMR, δ [ppm]: 12.77 (CH_3), 27.15 (CH_2), 33.83 (CH_2), 36.24 (CH_3), 36.4 (CH_3), 36.85 (CH_2), 37.15 (CH_2), 45.1 (2 CH_3), 57.07 (CH_2), 104.29 (CH), 104.35 (CH), 107.48 (C_q), 118.1 (CH), 118.51 (CH), 122.0 (C_q), 122.25 (C_q), 122.36 (C_q), 123.04 (C_q), 136.84 (CH), 151.42 (CO), 158.66 (CO), 161.51 (CO), 164.0 (CO), 167.31 (CO);
 FD-MS: m/z (%): 528 (100)

Summenformel: $C_{25}H_{34}N_8O_5$, 526.59
 IR (KBr, cm^{-1}): 3380, 3250, 3100, 2820, 2660, 1640, 1620, 1520, 1480, 1420, 1370, 1260, 1150, 800, 620.

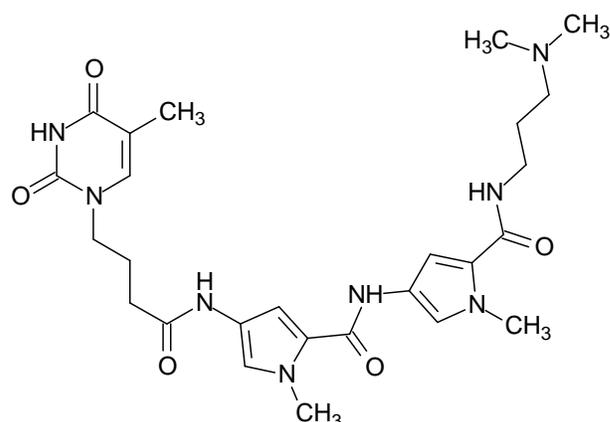
14.2.15.4 N2-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-methyl-4-[[4-(5-methyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)butanoyl]amino]-1H-2-pyrrol-carboxamid (45)



Einwaage: 276 mg **33**, 254 mg **15**
 Ausbeute: 188 mg (0.45 mmol) (44.9 %), gelber Feststoff
 Schmelzpunkt: 105 °C
 1H -NMR, δ [ppm]: 1.6 (quint., 2H, $^3J=7.4$ Hz, CH_2), 1.72 (s, 3H, Thymin- CH_3), 1.84 (quint., 2H, $^3J=7.2$ Hz, CH_2), 2.2 (t, 2H, $^3J=6.6$ Hz, CH_2), 2.3 (s, 6H, 2 CH_3), 2.5 (t, 2H, CH_2), 3.2 (q, 2H, $^3J=6.3$ Hz, CH_2), 3.65 (t, 2H, $^3J=6.9$ Hz, CH_2), 3.75 (s, 3H, Pyrrol- CH_3), 6.63 (d, 1H, $^4J=1.9$ Hz, Pyrrol-H-3), 7.05 (d, 1H, $^4J=1.45$ Hz, Pyrrol-H-5), 7.5 (d, 1H, Thymin-H-6), 8.05 (t, 1H, $^3J=5.5$ Hz, NH), 9.8 (s, 1H, NH), 11.2 (s, 1H, Thymin-NH);
 ^{13}C -NMR, δ [ppm]: 12.26 (CH_3), 24.99 (CH_2), 26.77 (CH_2), 32.71 (CH_2), 36.24 (CH_3), 36.92 (CH_2), 44.7 (2 CH_3), 47.18 (CH_2), 55.21 (CH_2), 103.65 (CH), 108.78 (C_q), 117.83 (CH), 122.22 (C_q), 123.19 (C_q), 141.67 (CH), 151.21 (CO), 161.5 (CO), 164.62 (CO), 168.8 (CO);
 FD-MS: m/z (%): 420 (100)
 Summenformel: $C_{20}H_{30}N_6O_4$, 418.49

IR (KBr, cm^{-1}): 3400, 2920, 1650, 1520, 1450, 1440, 1390, 1340, 1270, 1200, 1110, 720, 610.

14.2.15.5 N2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1H-3-pyrrolyl]-1-methyl-4-{{[4-(5-methyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)butanoyl]amino}-1H-2-pyrrol-carboxamid (46)}



Einwaage: 276 mg **33**, 376 mg **16**

Ausbeute: 200 mg (0.37 mmol) (37 %), gelber Feststoff

Schmelzbereich: 170-175 °C

$^1\text{H-NMR}$, δ [ppm]: 1.6 (quint., 2H, $^3\text{J}=7.1$ Hz, CH_2), 1.73 (s, 3H, Thymin- CH_3), 1.85 (quint., 2H, $^3\text{J}=7.2$ Hz, CH_2), 2.2 (s, 6H, 2 CH_3), 2.2 (t, 2H, CH_2), 2.3 (t, 2H, $^3\text{J}=6.0$ Hz, CH_2), 3.2 (q, 2H, $^3\text{J}=6.3$ Hz, CH_2), 3.65 (t, 2H, $^3\text{J}=6.9$ Hz, CH_2), 3.78 (s, 3H, Pyrrol- CH_3), 3.8 (s, 3H, Pyrrol- CH_3), 6.8 (d, 1H, $^4\text{J}=1.7$ Hz, Pyrrol-H-3), 6.83 (d, 1H, $^4\text{J}=1.9$ Hz, Pyrrol-H-5), 7.13 (d, 1H, $^4\text{J}=1.4$ Hz, Pyrrol-H-3'), 7.16 (d, 1H, $^4\text{J}=1.6$ Hz, Pyrrol-H-5'), 7.5 (s, 1H, Thymin-H-6), 8.1 (t, 1H, $^3\text{J}=5.5$ Hz, NH), 9.84 (d, 1H, $^4\text{J}=1.3$ Hz, NH), 11.2 (s, 1H, Thymin-NH);

$^{13}\text{C-NMR}$, δ [ppm]: 12.26 (CH_3), 25.02 (CH_2), 27.1 (CH_2), 32.72 (CH_2), 36.24 (CH_3), 36.37 (CH_3), 37.13 (CH_2), 45.05 (2 CH_3), 47.19 (CH_2), 57.04 (CH_2), 104.21 (CH), 104.38 (CH), 108.83 (C_q), 118.11 (CH), 118.41 (CH), 122.25 (C_q), 122.36 (C_q), 123.05 (C_q), 123.25 (C_q),

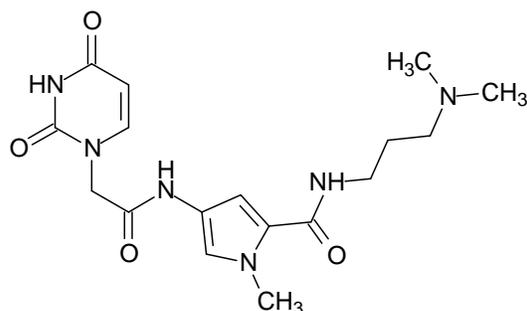
141.72 (CH), 151.24 (CO), 158.67 (CO), 161.56 (CO), 164.65 (CO), 168.89 (CO);

FD-MS: m/z (%): 542 (100)

Summenformel: C₂₆H₃₆N₈O₅, 540.62

IR (KBr, cm⁻¹): 3380, 2880, 1650, 1600, 1550, 1500, 1440, 1410, 1380, 1340, 1260, 1180, 1100, 1040, 700, 590.

14.2.15.6 N2-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-methyl-4-[[2-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)acetyl]amino}-1H-2-pyrrol-carboxamid (37)



Einwaage: 222 mg **17**, 254 mg **15**

Ausbeute: 178 mg (0.47 mmol) (47 %), gelber Feststoff

Schmelzpunkt: > 250 °C

¹H-NMR, δ [ppm]: 1.65 (quint., 2H, ³J=7.0 Hz, CH₂), 2.3 (s, 6H, 2 CH₃), 2.45 (t, 2H, CH₂), 3.16 (q, 2H, ³J=6.1 Hz, CH₂), 3.76 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 4.46 (s, 2H, CH₂) 5.57 (d, 1H, ³J=7.9 Hz, Uracil-H-5), 6.68 (d, 1H, Pyrrol-H-3), 7.07 (d, 1H, ⁴J=1.1 Hz, Pyrrol-H-5), 7.58 (d, 1H, ³J=7.9 Hz, Uracil-H-6), 8.13 (t, 1H, NH), 10.16 (s, 1H, NH), 11.32 (s, 1H, Uracil-NH);

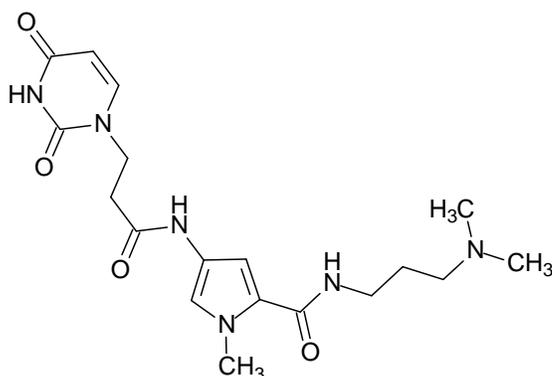
¹³C-NMR, δ [ppm]: 26.65 (CH₂), 36.33 (CH₃), 36.82 (CH₂), 44.58 (2 CH₃), 50.0 (CH₂), 58.1 (CH₂), 100.77 (CH), 104.3 (CH), 117.91 (CH), 121.4 (C_q), 121.52 (C_q), 123.42 (CH), 147.1 (CO), 151.4 (CO), 161.4 (CO), 164.16 (CO);

FD-MS: m/z (%): 377 (100)

Summenformel: C₁₇H₂₄N₆O₄, 376.41

IR (KBr, cm^{-1}): 3300, 3160, 3040, 2940, 2810, 1660, 1580, 1520, 1460, 1430, 1400, 1350, 1220, 1150, 800, 760.

14.2.15.7 N2-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-methyl-4-[[3-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)propanoyl]amino]-1H-2-pyrrol-carboxamid (39)



Einwaage: 240 mg **28**, 254 mg **15**

Ausbeute: 121 mg (0.31 mmol) (31%), gelber Feststoff

Schmelzbereich: 140-145 °C

$^1\text{H-NMR}$, δ [ppm]: 1.6 (quint., 2H, $^3\text{J}=7.0$ Hz, CH_2), 2.18 (s, 6H, 2 CH_3), 2.3 (t, 2H, $^3\text{J}=7.0$ Hz, CH_2), 2.47 (t, 2H, CH_2), 3.14 (q, 2H, $^3\text{J}=6.7$ Hz, CH_2), 3.75 (s, 3H, Pyrrol- CH_3), 3.98 (t, 2H, $^3\text{J}=7.6$ Hz, CH_2), 5.57 (d, 1H, $^4\text{J}=7.7$ Hz, Uracil-H-5), 6.61 (d, 1H, $^4\text{J}=1.5$ Hz, Pyrrol-H-3), 7.07 (s, 1H, Pyrrol-H-5), 7.41 (d, 1H, $^3\text{J}=7.6$ Hz, Uracil-H-6), 8.08 (t, 1H, $^3\text{J}=5.3$ Hz, NH), 9.85 (s, 1H, NH);

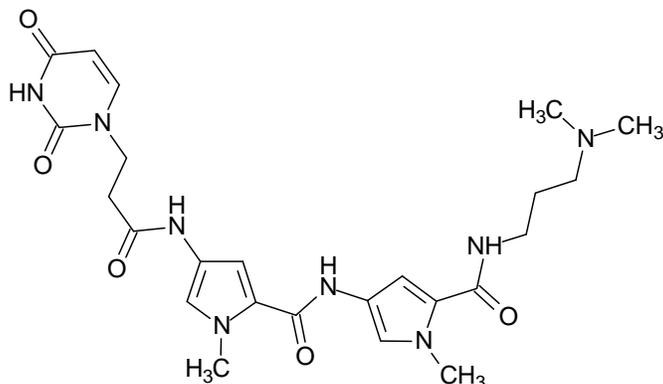
$^{13}\text{C-NMR}$, δ [ppm]: 27.16 (CH_2), 33.78 (CH_2), 36.24 (CH_3), 36.6 (CH_2), 37.16 (CH_2), 45.16 (2 CH_3), 57.14 (CH_2), 100.09 (CH), 103.62 (CH), 117.85 (CH), 122.04 (C_q), 123.25 (C_q), 140.91 (CH), 151.56 (CO), 161.43 (CO), 163.3 (CO), 167.15 (CO);

FD-MS: m/z (%): 392 (100)

Summenformel: $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_4$, 390.44

IR (KBr, cm^{-1}): 3380, 3060, 2900, 2820, 2780, 1680, 1640, 1520, 1440, 1380, 1350, 1260, 1220, 1110, 780, 760, 610.

14.2.15.8 N2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1*H*-3-pyrrolyl]-1-methyl-4-{{[3-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)propanoyl]amino}-1*H*-2-pyrrol-carboxamid (40)



Einwaage: 240 mg **28**, 376 mg **16**

Ausbeute: 138 mg (0.27 mmol) (27 %), gelber Feststoff

Schmelzpunkt: > 250 °C

¹H-NMR, δ [ppm]: 1.67 (quint., 2H, ³J=7.3 Hz, CH₂), 2.32 (s, 6H, 2 CH₃), 2.5 (2 t, (300 MHz) (DMSO d⁶) 4H, 2 CH₂), 3.18 (q, 2H, ³J=6.6 Hz, CH₂), 3.78 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 3.81 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 4.01 (t, 2H, ³J=7.6 Hz, CH₂), 5.58 (d, 1H, ³J=7.7 Hz, Uracil-H-5), 6.83 (2 d, 2H, Pyrrol-H-3+5), 7.13 (d, 1H, ⁴J=1.7 Hz, Pyrrol-H-3'), 7.17 (d, 1H, ⁴J=1.7 Hz, Pyrrol-H-5'), 7.42 (d, 1H, ³J=7.7 Hz, Uracil-H-6), 7.94 (s, 1H, NH), 8.1 (t, 1H, NH), 9.87 (s, 1H, NH), 9.9 (s, 1H, NH);

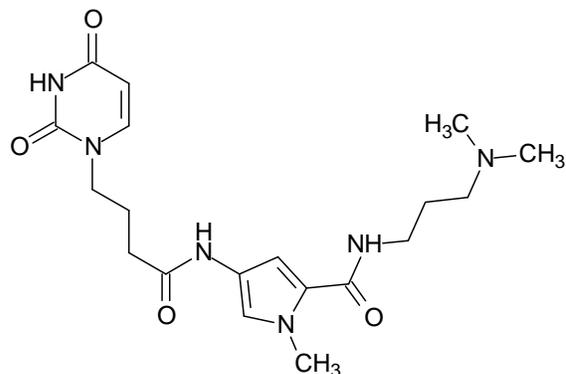
¹³C-NMR, δ [ppm]: 26.67 (CH₂), 30.1 (CH₂), 33.8 (CH₂), 36.26 (CH₃), 36.61 (CH₃), (75 MHz) (DMSO d⁶) 36.85 (CH₂), 44.55 (2 CH₃), 56.64 (CH₂), 100.1 (CH), 104.32 (CH), 104.54 (CH), 118.17 (CH), 118.51 (CH), 121.99 (C_q), 122.27 (C_q), 122.38 (C_q), 123.00 (C_q), 140.94 (CH), 151.58 (CO), 158.68 (CO), 161.7 (CO), 163.32 (CO), 167.31 (CO);

FD-MS: m/z (%): 513 (100)

Summenformel: C₂₄H₃₂N₈O₅, 512.56

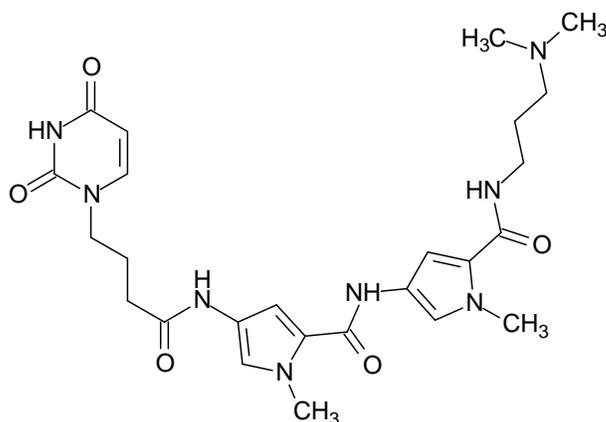
IR (KBr, cm⁻¹): 3380, 2900, 1680, 1620, 1550, 1500, 1420, 1370, 1080, 780, 750, 600.

14.2.15.9 N2-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-methyl-4-[[4-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)butanoyl]amino]-1H-2-pyrrol-carboxamid (43)



- Einwaage: 258 mg **32**, 254 mg **15**
- Ausbeute: 142 mg (0.35 mmol) (35 %), gelber Feststoff
- Schmelzpunkt: ab 150 °C Zersetzung
- ¹H-NMR, δ [ppm]: 1.63 (quint., 2H, ³J=7.2 Hz, CH₂), 1.84 (quint., 2H, ³J=7.2 Hz, CH₂), 2.22 (t, 2H, CH₂), 2.26 (s, 6H, 2 CH₃), 2.4 (t, 2H, ³J=7.0 Hz, CH₂), 3.15 (q, 2H, CH₂), 3.67 (t, 2H, ³J=6.9 Hz, CH₂), 3.75 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 5.53 (d, 1H, ³J=7.9 Hz, Uracil-H-5), 6.62 (d, 1H, ⁴J=1.9 Hz, Pyrrol-H-3), 7.06 (d, 1H, ⁴J=1.9 Hz, Pyrrol-H-5), 7.61 (d, 1H, ³J=7.9 Hz, Uracil-H-6), 8.07 (t, 1H, ³J=5.3 Hz, NH), 9.78 (s, 1H, NH), 11.23 (s, 1H, Uracil-NH);
- ¹³C-NMR, δ [ppm]: 24.97 (CH₂), 27.12 (CH₂), 32.61 (CH₂), 36.24 (CH₃), 37.0 (CH₂), 45.01 (2 CH₃), 47.42 (CH₂), 56.85 (CH₂), 101.21 (CH), 103.62 (CH), 117.82 (CH), 122.18 (C_q), 123.21 (C_q), 145.96 (CH), 151.25 (CO), 161.46 (CO), 164.05 (CO), 168.79 (CO);
- FD-MS: m/z (%): 405 (100)
- Summenformel: C₁₉H₂₈N₆O₄, 404.46
- IR (KBr, cm⁻¹): 3410, 1660, 1620, 1520, 1450, 1390, 1280, 1110, 800, 620.

14.2.15.10 N2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1H-3-pyrrolyl]-1-methyl-4-[[4-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1-pyrimidinyl)butanoyl]amino]-1H-2-pyrrol-carboxamid (44)



- Einwaage: 258 mg **32**, 376 mg **16**
- Ausbeute: 173 mg (0.33 mmol) (32.9 %), gelber Feststoff
- Schmelzpunkt: > 250 °C
- ¹H-NMR, δ [ppm]: 1.7 (quint., 2H, ³J=7.1 Hz, CH₂), 1.86 (quint., 2H, ³J=7.2 Hz, CH₂), 2.24 (t, 2H, ³J=7.4 Hz, CH₂), 2.39 (s, 6H, 2 CH₃), 2.57 (t, 2H, ³J=7.3 Hz, CH₂), 3.18 (q, 2H, ³J=6.4 Hz, CH₂), 3.7 (t, 2H, ³J=6.8 Hz, CH₂), 3.78 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 3.8 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 5.54 (d, 1H, ³J=7.8 Hz, Uracil-H-5), 6.83 (s, 2H, Pyrrol-H-3+5), 7.13 (d, 1H, ⁴J=1.4 Hz, Pyrrol-H-3'), 7.16 (d, 1H, ⁴J=1.5 Hz, Pyrrol-H-5'), 7.63 (d, 1H, ³J=7.9 Hz, Uracil-H-6), 8.11 (t, 1H, ³J=5.3 Hz, NH), 9.85 (s, 2H, 2 NH), 11.24 (d, 1H, ⁴J=0.6 Hz, Uracil-NH);
- ¹³C-NMR, δ [ppm]: 25.01 (CH₂), 26.32 (CH₂), 32.64 (CH₂), 36.28 (CH₃), 36.38 (CH₃), 36.64 (CH₂), 44.14 (2 CH₃), 47.44 (CH₂), 56.31 (CH₂), 101.22 (CH), 104.25 (CH), 104.53 (CH), 118.22 (CH), 118.45 (CH), 122.24 (C_q), 122.38 (C_q), 123.01 (C_q), 123.09 (C_q), 145.98 (CH), 151.27 (CO), 158.69 (CO), 161.68 (CO), 164.09 (CO), 168.87 (CO);
- FD-MS: m/z (%): 528 (100)
- Summenformel: C₂₅H₃₄N₈O₅, 526.59
- IR (KBr, cm⁻¹): 3420, 1660, 1560, 1530, 1450, 1420, 1380, 1340, 1250, 1090, 800, 770, 610.

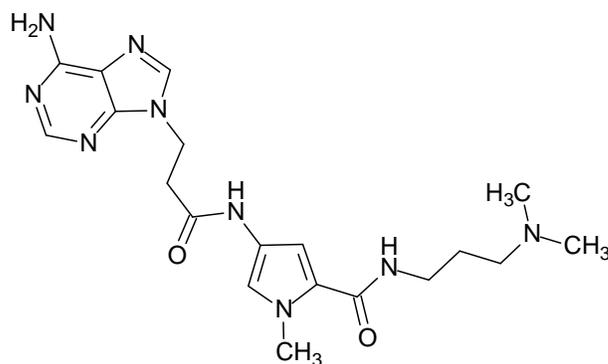
14.2.16 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der

Pyrrolcarboxamide mit Adeninalkancarbonsäuren als Strukturelementen ^[42]

1.3 mmol der Adeninalkancarbonsäure werden in 40 ml DMF suspendiert. 789 mg (6.89 mmol) Pyridiniumchlorid werden in 20 ml DMF gelöst und zu der Suspension hinzugegeben. Die Mischung wird für 5 Minuten heftig gerührt. Es entsteht eine kolloidale bis klare Lösung, welche auf -20°C abgekühlt wird. 1.2 mmol (0,1 ml) Chlorameisensäureethylester werden ergänzt und man rührt die Mischung bei dieser Temperatur für 20 Minuten. Dann gibt man 1 mmol des Aminopyrrolderivates, welches zuvor durch Reduktion der jeweiligen Nitroeinheit mit Pd (10%/ C) in 20 ml DMF unter Wasserstoffatmosphäre hergestellt wurde (s, **14.2.6.2**, S. 128), und 1 mmol (129 mg) *N,N*-diisopropyl-ethylamin hinzu. Man rührt bei RT im Dunkeln für 24 h.

Anschließend versetzt man den Reaktionsansatz mit 300 ml Chloroform, wäscht die organische Phase mehrmals mit 10 %-iger NaOH- sowie anschließend gesättigter NaCl-Lösung und trocknet über Na₂SO₄. Das Trockenmittel wird abfiltriert, das Filtrat eingedampft und das Produkt mittels Säulenchromatographie (Kieselgel MeOH-NH₃ (97:3)) gereinigt.

14.2.16.1 **N**2-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-[[3-(6-amino-9*H*-9-purinyloxy)propanoyl]amino]-1-methyl-1*H*-2-pyrrol-carboxamid (47)



Einwaage:	270 mg 35 , 254 mg 15
Ausbeute:	125 mg (0.3 mmol) (30.2 %), gelber Feststoff
Schmelzpunkt:	235 °C

¹H-NMR, δ [ppm]: 1.69 (quint., 2H, ³J=7.0 Hz, CH₂), 2.45 (s, 6H, 2 CH₃), 2.65 (t, 2H, ³J=6.9 Hz, CH₂), 2.84 (t, 2H, ³J=6.5 Hz, CH₂), 3.17 (q, 2H, ³J=6.0 Hz, CH₂), 3.75 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 4.39 (t, 2H, ³J=6.5 Hz, CH₂), 6.62 (d, 1H, Pyrrol-H-3), 7.06 (d, 1H, ⁴J=1.1 Hz, Pyrrol-H-5), 7.19 (s, 2H, NH₂), 8.0 (s, 1H, Adenin-H-8), 8.1 (t, 1H, ³J=5.2 Hz, NH), 8.14 (s, 1H, Adenin H-2), 9.88 (s, 1H, NH);

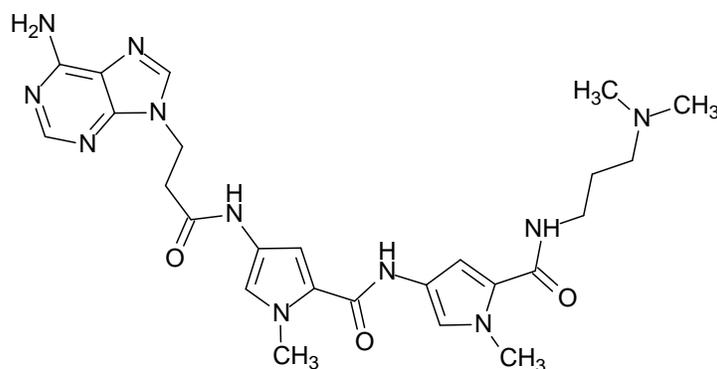
¹³C-NMR, δ [ppm]: 26.19 (CH₂), 35.48 (CH₂), 36.28 (CH₃), 36.54 (CH₂), 40.1 (CH₂), 44.01 (2 CH₃), 56.20 (CH₂), 103.73 (CH), 117.94 (CH), 119.02 (C_q), 121.87 (C_q), 123.16 (C_q), 141.26 (CH), 149.72 (C_q), 152.68 (CH), 156.23 (C_q), 161.56 (CO), 166.90 (CO);

FD-MS: m/z (%): 415 (100)

Summenformel: C₁₉H₂₇N₉O₂, 413.48

IR (KBr, cm⁻¹): 3380, 2910, 2700, 2070, 1620, 1510, 1420, 1390, 1100, 790, 760, 710, 610.

14.2.16.2 N2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1H-3-pyrrolyl]-4-{{[3-(6-amino-9H-9-puriny)propanoyl]amino}-1-methyl-1H-2-pyrrol-carboxamid (48)}



Einwaage: 270 mg **35**, 376 mg **16**

Ausbeute: 100 mg (0.19 mmol) (18.7 %)

Schmelzpunkt: 145 °C

¹H-NMR, δ [ppm]: 1.68 (quint., 2H, ³J=7.1 Hz, CH₂), 2.38 (s, 6H, 2 CH₃), 2.6 (t, 2H, ³J=6.9 Hz, CH₂), 2.86 (t, 2H, ³J=6.4 Hz, CH₂), 3.18 (q, 2H, ³J=6.0 Hz, CH₂), 3.78 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 3.8 (s, 3H, Pyrrol-

CH₃), 4.4 (t, 2H, ³J=6.3 Hz, CH₂), 6.8 (d, 1H, ⁴J=1.7 Hz, Pyrrol-H-3), 6.83 (d, 1H, ⁴J=1.6 Hz, Pyrrol-H-5), 7.12 (d, 1H, ⁴J=1.5 Hz, Pyrrol-H-3'), 7.15 (d, 1H, ⁴J=1.4 Hz, Pyrrol-H-5'), 7.19 (s, 2H, NH₂), 8.0 (s, 1H, Adenin-H-8), 8.1 (t, 1H, ³J=3.0 Hz, NH), 8.15 (s, 1H, Adenin-H-2), 9.84 (s, 1H, NH), 9.93 (s, 1H, NH);

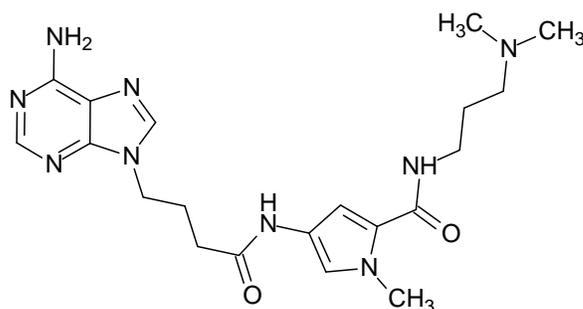
¹³C-NMR, δ [ppm]: 26.18 (CH₂), 35.44 (CH₂), 36.56 (CH₃), 36.62 (CH₃), 36.84 (CH₂), (75 MHz) (DMSO d⁶) 40.1 (CH₂), 44.1 (2 CH₃), 57.1 (CH₂), 104.01 (CH), 104.45 (CH), 117.8 (CH), 118.01 (CH), 118.56 (C_q), 121.89 (C_q), 122.47 (C_q), 123.06 (C_q), 123.15 (C_q), 141.2 (CH), 149.81 (C_q), 152.74 (CH), 156.23 (C_q), 159.7 (CO), 161.3 (CO), 166.91 (CO);

FD-MS: m/z (%): 537 (100)

Summenformel: C₂₅H₃₃N₁₁O₃, 535.6

IR (KBr, cm⁻¹): 3380, 3350, 2880, 2700, 2050, 1620, 1500, 1440, 1400, 1370, 1100, 790, 750, 600.

14.2.16.3 N2-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-[[4-(6-amino-9H-9-puriny)butanoyl]amino}-1-methyl-1H-2-pyrrol-carboxamid (49)



Einwaage: 288 mg **36**, 254 mg **15**

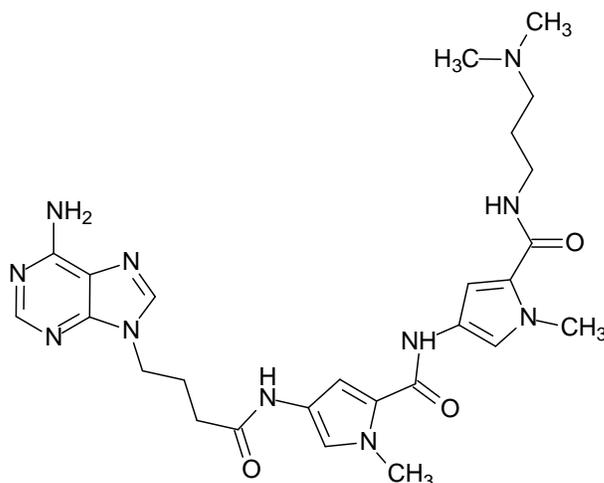
Ausbeute: 160 mg (0.37 mmol) (37.4 %), gelber Feststoff

Schmelzpunkt: 201 °C

¹H-NMR, δ [ppm]: 1.67 (quint., 2H, ³J=7.0 Hz, CH₂), 2.09 (quint., 2H, ³J=6.5 Hz, CH₂), 2.2 (t, 2H, ³J=7.4 Hz, CH₂), 2.39 (s, 6H, 2 CH₃), 2.57 (t, 2H, ³J=6.8 Hz, CH₂), 3.18 (q, 2H, ³J=6.0 Hz, CH₂), 3.75 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 4.16 (t, 2H, ³J=6.4 Hz, CH₂), 6.63 (s, 1H, Pyrrol-H-

3), 7.07 (s, 1H, Pyrrol-H-5), 7.2 (s, 2H, NH₂), 8.08 (t, 1H, ³J=5.6 Hz, NH), 8.13 (s, 2H, Adenin-H-8+2), 9.79 (s, 1H, NH);
¹³C-NMR, δ [ppm]: 26.04 (CH₂), 26.37 (CH₂), 32.82 (CH₂), 36.26 (CH₃), 36.64 (CH₂),
 (75 MHz) (DMSO d⁶) 42.84 (CH₂), 44.21 (2 CH₃), 56.37 (CH₂), 103.74 (CH), 117.89
 (CH), 119.06 (C_q), 122.19 (C_q), 123.10 (C_q), 141.14 (CH), 149.88
 (C_q), 152.69 (CH), 156.28 (C_q), 161.60 (CO), 168.69 (CO);
 FD-MS: m/z (%): 429 (100)
 Summenformel: C₂₀H₂₉N₉O₂, 427.5
 IR (KBr, cm⁻¹): 3380, 2910, 2700, 2070, 1620, 1510, 1450, 1420, 1380, 1100,
 785, 760, 710, 640, 610.

14.2.16.4 N2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1H-3-pyrrolyl]-4-{{[4-(6-amino-9H-9-purinyl)butanoyl]amino}-1-methyl-1H-2-pyrrol-carboxamid (50)}



Einwaage: 288 mg **36**, 376 mg **16**
 Ausbeute: 120 mg (0.22 mmol) (21.8 %), gelber Feststoff
 Schmelzpunkt: ab 150 °C Zersetzung
¹H-NMR, δ [ppm]: 1.66 (quint., 2H, ³J=7.0 Hz, CH₂), 2.1 (quint., 2H, ³J=6.9 Hz,

(300 MHz) (DMSO d_6) CH₂), 2.21 (t, 2H, ³J=7.4 Hz, CH₂), 2.32 (s, 6H, 2 CH₃), 3.19 (t+q, 4H, 2 CH₂), 3.78 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 3.8 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 4.17 (t, 2H, ³J=6.6 Hz, CH₂), 6.83 (s, 2H, NH₂), 7.13 (d, 1H, ⁴J=1.4 Hz, Pyrrol-H-3), 7.16 (d, 1H, ⁴J=1.4 Hz, Pyrrol-H-5), 7.21 (s, 2H, Pyrrol-H-3'+5'), 8.09 (t, 1H, ³J=5.9 Hz, NH), 8.14 (s, 2H, Adenin H-8+2), 9.85 (s, 2H, 2 NH);

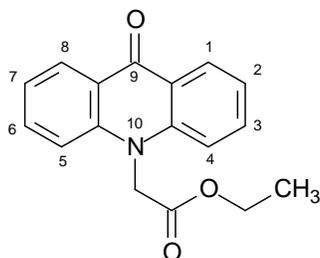
¹³C-NMR, δ [ppm]: 26.05 (CH₂), 26.7 (CH₂), 32.84 (CH₂), 36.26 (CH₃), 36.39 (CH₃), 36.84 (CH₂), 42.86 (CH₂), 44.57 (2 CH₃), 56.65 (CH₂), 104.22 (CH), 104.45 (CH), 118.16 (CH), 118.43 (CH), 119.08 (C_q), 122.22 (C_q), 122.38 (C_q), 123.03 (C_q), 123.15 (C_q), 141.13 (CH), 149.9 (C_q), 152.7 (CH), 156.29 (C_q), 158.67 (CO), 161.62 (CO), 168.76 (CO);

FD-MS: m/z (%): 552 (100)

Summenformel: C₂₆H₃₅N₁₁O₃, 549.63

IR (KBr, cm⁻¹): 3380, 2900, 1620, 1580, 1560, 1520, 1450, 1420, 1390, 1250, 1190, 1130, 1110, 1090, 1050, 790, 760, 640, 610.

14.2.17 2-(9-Oxo-9,10-dihydro-10-acridinyl)essigsäureethylester ^[110](51)

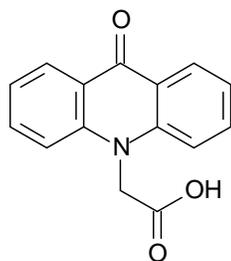


0.15 g (6.06 mmol) NaH (97 %) werden in 10 ml DMF suspendiert. Man gibt eine Suspension von 1 g (5.12 mmol) Acridon in 20 ml DMF hinzu und lässt die Mischung 0.5 h bei RT rühren. Die Deprotonierung an N-10 ist an der auftretenden Fluoreszenz zu erkennen. Man kühlt auf 0°C, fügt 1.28 g (7.66 mmol) 2-Bromessigsäureethylester sowie eine Spatelspitze Tetrabutylammoniumjodid hinzu und lässt 24 h bei RT rühren. Der Reaktionsansatz wird in 25 ml kaltes Wasser gegossen. Den

entstehenden Niederschlag filtriert man ab und trocknet ihn unter Vakuum. Eine weitere Reinigung ist nicht notwendig.

Ausbeute: 1.2 g (4.27 mmol) (83.3 %), gelber Feststoff
 Schmelzpunkt: 172 °C
¹H-NMR, δ [ppm]: 1.23 (t, 3H, ³J=7.2 Hz, CH₃), 4.21 (q, 2H, ³J=7.2 Hz, CH₂), 5.4 (s, (300 MHz) (DMSO d⁶) 2H, CH₂), 7.35 (pt, 2H, ³J=7.4 Hz, Acridon-H), 7.65 (pd, 2H, ³J=8.6 Hz, Acridon-H-4+5), 7.8 (pt, 2H, ³J=7.1 Hz, Acridon-H), 8.35 (pd, 2H, ³J=7.9 Hz, Acridon-H-1+8) ^[111];
 FD-MS: m/z [%]: 283 (100)
 Summenformel: C₁₇H₁₅NO₃, 281.31.

14.2.18 2-(9-Oxo-9,10-dihydro-10-acridinyl)essigsäure ^[110](52)



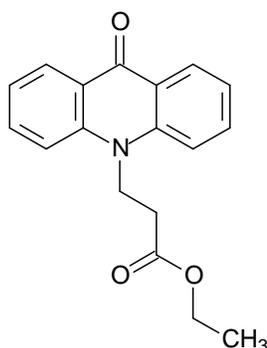
1.2 g (4.27 mmol) **51** werden in 200 ml heißem Ethanol gelöst. Man gibt 4 ml 2M-NaOH-Lösung hinzu und kocht die Mischung 25 Minuten unter Rückfluß. Nach ca. 20 Minuten fällt ein gelber Niederschlag aus. Zur Vervollständigung der Fällung wird 30 min auf -20°C gekühlt, der Niederschlag abfiltriert und mit Chloroform gewaschen. Der Feststoff wird in 20 ml Wasser gelöst und mit 1M-HCl angesäuert. Der entstehende Niederschlag wird wieder abfiltriert und getrocknet.

Ausbeute: 500 mg (1.97 mmol) (46.2 %), gelber Feststoff
 Schmelzpunkt: > 250 °C
¹H-NMR, δ [ppm]: 5.33 (s, 2H, CH₂), 7.35 (pt, 2H, ³J=7.5 Hz, Acridon-H), 7.66 (pd, (300 MHz) (DMSO d⁶) 2H, ³J=8.7 Hz, Acridon-H-4+5), 7.81 (pt, 2H, ³J=8.3 Hz, Acridon-H), 8.34 (pd, 2H, ³J=7.9 Hz, Acridon-H-1+8);

FD-MS: m/z (%): 254 (100)

Summenformel: C₁₅H₁₁NO₃, 253.25.

14.2.19 3-(9-Oxo-9,10-dihydro-10-acridinyl)propionsäureethylester (53)



2.8 g (15.46 mmol) 3-Brompropionsäureethylester werden in 20 ml DMF gelöst. Man fügt 1 g (5.1 mmol) Acridon und 2.35 g (17.03 mmol) K₂CO₃ hinzu und rührt 24 h bei 90°C. Der Ansatz wird zur Trockne eingedampft. Die Reinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie (Kieselgel PE-EA 1.5:1).

Ausbeute: 250.92 mg (0.84 mmol) (16.6 %)

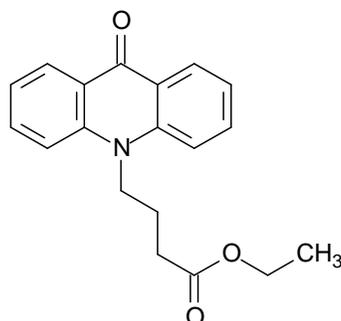
Schmelzpunkt: 97 °C

¹H-NMR, δ [ppm]: 1.13 (t, 3H, ³J=7.1 Hz, CH₃), 2.86 (t, 2H, ³J=7.5 Hz, CH₂), 4.03 (q, 2H, ³J=7.2 Hz, CH₂), 4.74 (t, 2H, ³J=7.5 Hz, CH₂), 7.32 (m, 2H, Acridon-H), 7.82 (m, 4H, Acridon-H), 8.34 (m, 2H, Acridon-H-1+8).

EI-MS: m/z (%): 296 (100)

Summenformel: C₁₈H₁₇NO₃.

14.2.20 4-(9-Oxo-9,10-dihydro-10-acridinyl)buttersäureethylester (55)



0.15 g (6.06 mmol) NaH (97 %) werden in 10 ml DMF suspendiert. Man gibt eine Suspension von 1 g (5.12 mmol) Acridon in 20 ml DMF hinzu und lässt die Mischung 0.5 h bei RT rühren. Anschließend ergänzt man 3 g (15.38 mmol) 4-Brombuttersäureethylester und eine Spatelspitze Tetrabutylammoniumjodid und rührt 2 Stunden bei 80°C. Das LM wird im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie über basischem Aluminiumoxid (PE-EA 2:1).

Ausbeute: 270 mg (0.87 mmol) (17.1 %), gelber Feststoff

Schmelzpunkt: 93 °C

¹H-NMR, δ [ppm]: 1.21 (t, 3H, ³J=7.1 Hz, CH₃), 2.05 (quint., 2H, ³J=7.6 Hz, CH₂)
(300 MHz) (DMSO d₆) 2.65 (t, 2H, ³J=6.6 Hz, CH₂), 4.1 (q, 2H, ³J=7.1 Hz, CH₂), 4.47 (t, 2H, ³J=8.2 Hz, CH₂), 7.34 (m, 2H, Acridon-H), 7.82 (m, 2H, Acridon-H₄₊₅), 7.93 (m, 2H, Acridon-H), 8.34 (m, 2H, Acridon-H-1+8);

FD-MS: m/z (%): 309 (100)

Summenformel: C₁₉H₁₉NO₃, 309.36

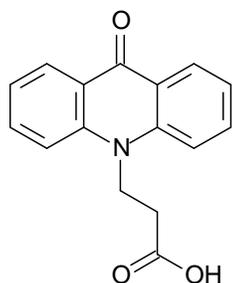
Elementaranalyse: Ber.: C 73,77 H 6,19 N 4,53

Gef.: C 73,42 H 6,32 N 4,91.

14.2.21 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der Acridonpropion und -buttersäure durch Hydrolyse ihrer Ester

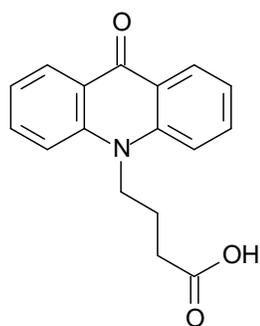
Durchführung identisch mit der Vorschrift 14.2.14 (S. 137).

14.2.21.1 3-(9-Oxo-9,10-dihydro-10-acridinyl)propionsäure (54)



Ausbeute:	quantitative Umsetzung, gelber Feststoff
Schmelzpunkt:	> 250 °C
¹ H-NMR, δ [ppm]: (300 MHz) (DMSO d ⁶)	2.69 (t, 2H, ³ J=6.2 Hz, CH ₂), 4.7 (t, 2H, ³ J=7.6 Hz, CH ₂), 7.31 (m, 2H, Acridon-H), 7.83 (m, 4H, Acridon-H), 8.32 (m, 2H, Acridon-H-1+8);
FD-MS: m/z (%):	267 (100)
Summenformel:	C ₁₆ H ₁₃ NO ₃ , 267.28.

14.2.21.2 4-(9-Oxo-9,10-dihydro-10-acridinyl)buttersäure (56)

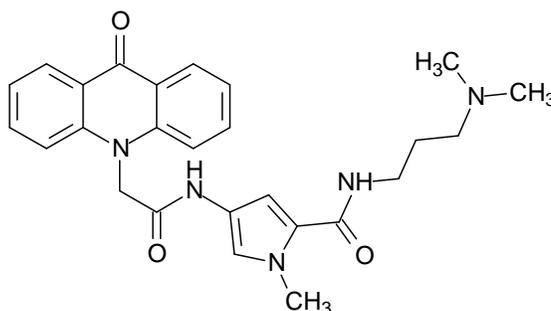


Ausbeute:	quantitative Umsetzung, gelber Feststoff
Schmelzpunkt:	193 °C
¹ H-NMR, δ [ppm]: (300 MHz) (DMSO d ⁶)	2.0 (quint., 2H, ³ J=8.2 Hz, CH ₂), 2.57 (t, 2H, ³ J=6.8 Hz, CH ₂), 4.47 (t, 2H, ³ J=8.3 Hz, CH ₂), 7.33 (m, 2H, Acridon-H), 7.83 (m, 2H, Acridon-H-4+5), 7.94 (m, 2H, Acridon-H), 8.34 (m, 2H, Acridon-H-1+8);
EI-MS: m/z (%):	281 (100)
Summenformel:	C ₁₇ H ₁₅ NO ₃ , 281.31.

**14.2.22 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der
Pyrrolcarboxamide mit Acridonalkancarbonsäuren als
Strukturelementen**

Durchführung identisch mit Vorschrift **14.2.15** (S. 141).

14.2.22.1 N2-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-methyl-4-{[2-(9-oxo-9,10-dihydro-10-acridinyl)acetyl]amino}-1H-2-pyrrol-carboxamid (79)



Einwaage: 331 mg **52**, 254 mg **15**

Ausbeute: 250 mg (0.54 mmol) (54.4 %), gelber Feststoff

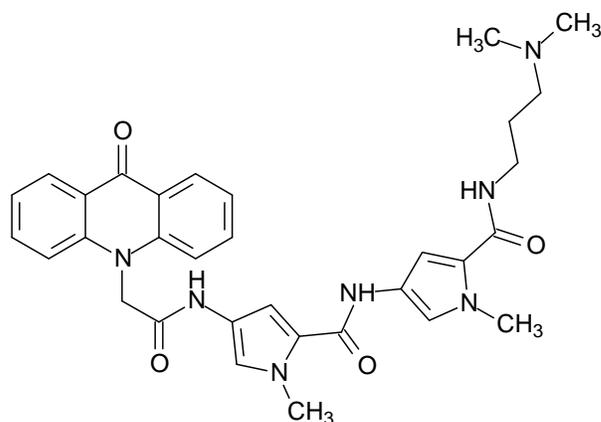
Schmelzbereich: 206-208 °C

$^1\text{H-NMR}$, δ [ppm]: 1.68 (quint., 2H, $^3\text{J}=6.7$ Hz, CH_2), 2.4 (s, 6H, 2 CH_3), 2.6 (t, 2H, $^3\text{J}=7.1$ Hz, CH_2), 3.17 (q, 2H, $^3\text{J}=6.3$ Hz, CH_2), 3.76 (s, 3H, Pyrrol- CH_3), 5.33 (s, 2H, CH_2), 6.76 (s, 1H, Pyrrol-H-3), 7.09 (s, 1H, Pyrrol-H-5), 7.35 (pt, 2H, $^3\text{J}=7.5$ Hz, Acridon-H), 7.65 (pd, 2H, $^3\text{J}=8.8$ Hz, Acridon-H-4+5), 7.79 (m, 2H, Acridon-H), 8.11 (t, 1H, $^3\text{J}=5.1$ Hz, NH), 8.35 (m, 2H, Acridon-H-1+8), 10.43 (s, 1H, NH);

$^{13}\text{C-NMR}$, δ [ppm]: 26.29 (CH_2), 36.32 (CH_3), 36.58 (CH_2), 44.13 (2 CH_3), 49.14 (CH_2), 56.26 (CH_2), 104.08 (CH), 116.21 (2 CH), 118.12 (CH), 121.56 (C_q), 121.79 (2 CH), 121.95 (2 C_q), 123.36 (C_q), 126.88 (2 CH), 134.38 (2 CH), 142.91 (2 C_q), 161.52 (CO), 164.48 (CO), 177.09 (CO);

FD-MS: m/z (%): 460 (100)
 Summenformel: C₂₆H₂₉N₅O₃, 459.54
 IR (KBr, cm⁻¹): 3350, 3200, 1570, 1470, 1440, 1380, 1350, 1270, 1220, 1160,
 1090, 740, 660, 605.

14.2.22.2 N2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1H-3-pyrrolyl]-1-methyl-4-{{2-(9-oxo-9,10-dihydro-10-acridinyl)acetyl]amino}-1H-2-pyrrol-carboxamid (80)



Einwaage: 331 mg **52**, 376 mg **16**
 Ausbeute: 296.65 mg (0.51 mmol) (51.4 %), gelber Feststoff
 Schmelzpunkt: 212 °C
¹H-NMR, δ [ppm]: 1.67 (quint., 2H, ³J=6.9 Hz, CH₂), 2.35 (s, 6H, 2 CH₃), 2.5 (t, 2H, ³J=7.1 Hz, CH₂), 3.17 (q, 2H, ³J=6.4 Hz, CH₂), 3.77 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 3.8 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 5.33 (s, 2H, CH₂), 6.82 (d, 1H, ⁴J=1.7 Hz, Pyrrol-H-3), 6.97 (d, 1H, ⁴J=1.6 Hz, Pyrrol-H-5), 7.15 (s, 2H, 2 Pyrrol-H), 7.35 (pt, 2H, ³J=7.4 Hz, Acridon-H), 7.65 (pd, 2H, ³J=8.8 Hz, Acridon-H-4+5), 7.79 (m, 2H, Acridon-H), 8.08 (t, 1H, ³J=5.5 Hz, NH), 8.35 (m, 2H, Acridon-H-1+8), 9.86 (s, 1H, NH), 10.48 (s, 1H, NH);
¹³C-NMR, δ [ppm]: 26.58 (CH₂), 36.26 (CH₃), 36.43 (CH₃), 36.78 (CH₂), 44.43 (2 CH₃), 49.2 (CH₂), 56.56 (CH₂), 104.43 (CH), 104.56 (CH), 116.21 (2 CH), 118.16 (CH), 118.64 (CH), 121.6 (C_q), 121.78 (2 CH), 121.99 (2 C_q), 122.36 (C_q), 123.19 (C_q), 123.3 (C_q), 126.89

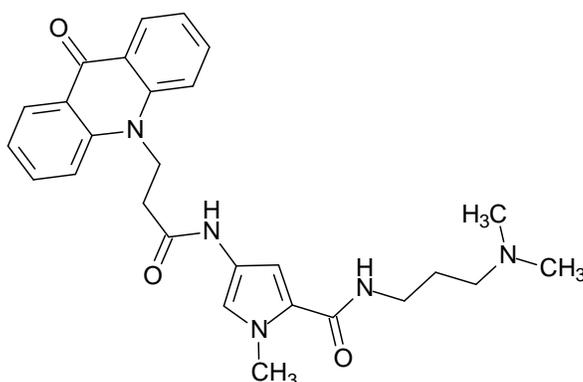
(2 CH), 134.38 (2 CH), 142.93 (2 C_q), 158.58 (CO), 161.65 (CO),
164.54 (CO), 177.11 (CO).

FD-MS: m/z (%): 582 (100)

Summenformel: C₃₂H₃₅N₇O₄, 581.67

IR (KBr, cm⁻¹): 3350, 3190, 1600, 1540, 1470, 1440, 1400, 1380, 1350, 1270,
1220, 1120, 1070, 910, 790, 740, 650, 600.

14.2.22.3 N2-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-methyl-4-[[3-(9-oxo-9,10-dihydro-10-acridinyl)propanoyl]amino]-1H-2-pyrrol-carboxamid (81)



Einwaage: 348 mg **54**, 254 mg **15**

Ausbeute: 280 mg (0.59 mmol) (59,1 %), gelber Feststoff

Schmelzpunkt: > 250 °C

¹H-NMR, δ [ppm]: 1.68 (quint., 2H, ³J=7.2 Hz, CH₂), 2.38 (s, 6H, 2 CH₃), 2.57 (t, 2H, ³J=6.4 Hz, CH₂), 2.85 (t, 2H, ³J=7.2 Hz, CH₂), 3.18 (q, 2H, ³J=6.3 Hz, CH₂), 3.78 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 4.78 (t, 2H, ³J=7.1 Hz, CH₂), 6.67 (d, 1H, ⁴J=1.4 Hz, Pyrrol-H-3), 7.15 (d, 1H, ⁴J=1.4 Hz, Pyrrol-H-5), 7.35 (pt, 2H, ³J=7.3 Hz, Acridon-H), 7.86 (m, 4H, Acridon-H), 8.1 (t, 1H, NH), 8.35 (m, 2H, Acridon-H-1+8), 10.02 (s, 1H, NH);

¹³C-NMR, δ [ppm]: 26.46 (CH₂), 33.96 (CH₂), 36.36 (CH₃), 36.7 (CH₂), 42.53 (CH₂), 44.3 (2 CH₃), 56.43 (CH₂), 103.72 (CH), 116.03 (2 CH), 118.03 (CH), 121.74 (2 CH), 121.98 (2 C_q), 123.25 (2 C_q), 127.12 (2

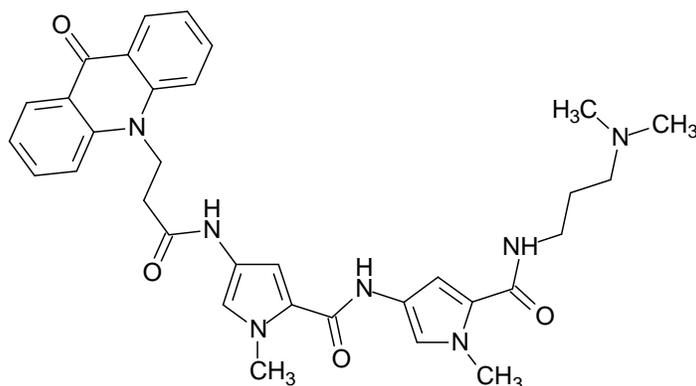
CH), 134.61 (2 CH), 141.76 (2 C_q), 161.53 (CO), 167.17 (CO),
176.84 (CO).

FD-MS: m/z (%): 474.4 (100)

Summenformel: C₂₇H₃₁N₅O₃, 473.57

IR (KBr, cm⁻¹): 3400, 1610, 1590, 1570, 1480, 1440, 1390, 1360, 1280, 1170,
1100, 750, 670.

14.2.22.4 N2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1H-3-pyrrolyl]-1-methyl-4-{{[3-(9-oxo-9,10-dihydro-10-acridinyl)propanoyl]amino}-1H-2-pyrrol-carboxamid (82)}



Einwaage: 348 mg **54**, 376 mg **16**

Ausbeute: 290 mg (0.49 mmol) (48.7 %), gelber Feststoff

Schmelzbereich: 190-200 °C

¹H-NMR, δ [ppm]: 1.69 (quint., 2H, ³J=7.1 Hz, CH₂), 2.4 (s, 6H, 2 CH₃), 2.58 (t, 2H, ³J=6.9 Hz, CH₂), 2.87 (t, 2H, ³J=7.0 Hz, CH₂), 3.2 (q, 2H, ³J=6.3 Hz, CH₂), 3.79 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 3.83 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 4.79 (t, 2H, ³J=6.9 Hz, CH₂), 6.85 (d, 1H, ⁴J=1.8 Hz, Pyrrol-H-3), 6.87 (d, 1H, ⁴J=1.7 Hz, Pyrrol-H-5), 7.17 (d, 1H, ⁴J=1.8 Hz, Pyrrol-H-3'), 7.21 (d, 1H, ⁴J=1.6 Hz, Pyrrol-H-5'), 7.35 (pt, 2H, ³J=7.0 Hz, Acridon-H), 7.86 (m, 4H, Acridon-H), 8.1 (t, 1H, 5.7 Hz, NH), 8.35 (m, 2H, Acridon-H-1+8), 9.87 (s, 1H, NH), 10.07 (s, 1H, NH);

¹³C-NMR, δ [ppm]: 26.51 (CH₂), 33.99 (CH₂), 36.29 (CH₃), 36.48 (CH₃), 36.73 (CH₂), 42.54 (CH₂), 44.36 (2 CH₃), 56.49 (CH₂), 104.23 (CH),

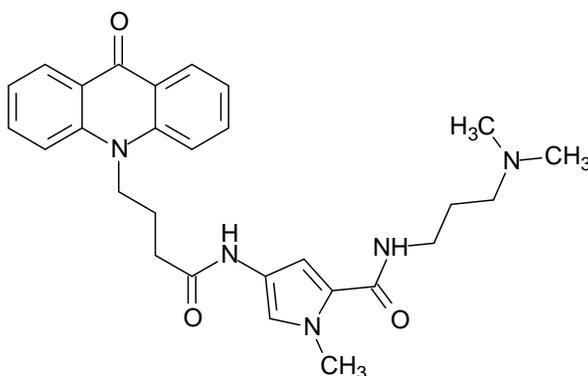
104.5 (CH), 116.04 (2 CH), 118.22 (CH), 118.58 (CH), 121.74 (2 CH), 121.98 (2 C_q), 122.35 (2 C_q), 123.15 (2 C_q), 127.13 (2 CH), 134.62 (2 CH), 141.78 (2 C_q), 158.63 (CO), 161.67 (CO), 167.24 (CO), 176.84 (CO);

FD-MS: m/z (%): 596.3 (100)

Summenformel: C₃₃H₃₇N₇O₄, 595.7

IR (KBr, cm⁻¹): 3350, 1620, 1570, 1480, 1440, 1420, 1390, 1360, 1270, 1250, 1160, 1100, 750, 660, 610.

14.2.22.5 N2-[3-(Dimethylamino)propyl]-1-methyl-4-{[4-(9-oxo-9,10-dihydro-10-acridinyl)butanoyl]amino}-1H-2-pyrrol-carboxamid (83)



Einwaage: 365 mg **56**, 254 mg **15**

Ausbeute: 300 mg (0.62 mmol) (61.5 %), gelber Feststoff

Schmelzbereich: 140-145 °C

¹H-NMR, δ [ppm]: 1.67 (quint., 2H, ³J=6.9 Hz, CH₂), 2.08 (quint., 2H, CH₂), 2.32 (s, 3H, 2 CH₃), 2.5 (t, 2H, CH₂), 2.58 (t, 2H, ³J=6.2 Hz, CH₂), 3.19 (q, 2H, ³J=6.0 Hz, CH₂), 3.79 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 4.51 (t, 2H, ³J=8.0 Hz, CH₂), 6.71 (s, 1H, Pyrrol-H-3), 7.16 (s, 1H, Pyrrol-H-5), 7.34 (pt, 2H, ³J=7.4 Hz, Acridon-H), 7.84 (pt, 2H, ³J=7.3 Hz, Acridon-H), 7.97 (pd, 2H, ³J=8.6 Hz, Acridon H-4+5), 8.14 (t, 1H, NH), 8.35 (pd, 2H, ³J=7.9 Hz, Acridon-H₁₊₈), 9.92 (s, 1H, NH);

¹³C-NMR, δ [ppm]: 22.58 (CH₂), 26.67 (CH₂), 32.01 (CH₂), 36.3 (CH₃), 37.02 (CH₂),

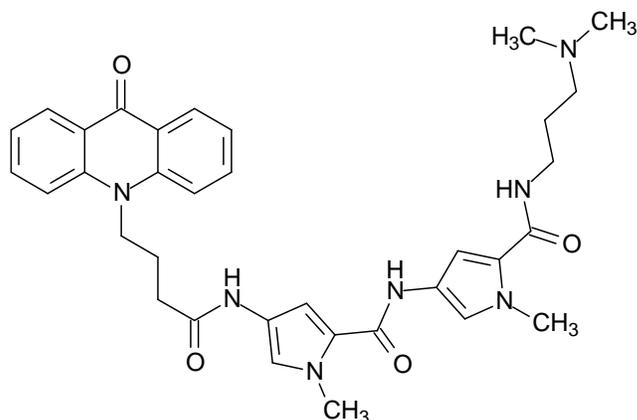
(75 MHz) (DMSO d_6) 44.58 (2 CH₃), 45.39 (CH₂), 56.68 (CH₂), 104.12 (CH), 116.21 (2 CH), 117.95 (CH), 121.61 (2 CH), 121.89 (2 C_q), 122.17 (C_q), 123.29 (C_q), 127.06 (2 CH), 134.57 (2 CH), 141.86 (2 C_q), 161.55 (CO), 169.28 (CO), 176.81 (CO);

FD-MS: m/z (%): 488.3 (100)

Summenformel: C₂₈H₃₃N₅O₃, 487.6

IR (KBr, cm⁻¹): 3200, 3000, 2880, 1600, 1570, 1500, 1460, 1440, 1420, 1370, 1350, 1260, 1240, 1160, 1120, 1080, 1020, 910, 730, 660, 590.

14.2.22.6 N₂-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1*H*-3-pyrrolyl]-1-methyl-4-{{[4-(9-oxo-9,10-dihydro-10-acridinyl)butanoyl]amino}-1*H*-2-pyrrol-carboxamid (84)



Einwaage: 365 mg **56**, 376 mg **16**

Ausbeute: 290 mg (0.48 mmol) (47.5 %), gelber Feststoff

Schmelzpunkt: > 250 °C

¹H-NMR, δ [ppm]: 1.67 (quint., 2H, CH₂), 2.09 (quint., 2H, CH₂), 2.37 (s, 6H, 2 CH₃), 2.59 (2t, 4H, 2 CH₂), 3.2 (q, 2H, 6.3 Hz, CH₂), 3.8 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 3.85 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 4.53 (t, 2H, ³J=7.7 Hz, CH₂), 6.86 (d, 1H, ⁴J=1.7 Hz, Pyrrol-H-3), 6.92 (d, 1H, ⁴J=1.7 Hz, Pyrrol-H-5), 7.18 (d, 1H, ⁴J=1.4 Hz, Pyrrol-H-3'), 7.21 (d, 1H, Pyrrol-H-5'), 7.34 (pt, 2H, ³J=7.4 Hz, Acridon-H), 7.84 (pt, 2H, ³J=7.0 Hz, Acridon-H), 7.99 (pd, 2H, ³J=8.8 Hz, Acridon-H-4+5), 8.1 (t, 1H,

$^3J=5.5$ Hz, NH), 8.36 (pd, 2H, $^3J=8.2$ Hz, Acridon-H-1+8), 9.88 (s, 1H, NH), 9.96 (s, 1H, NH);

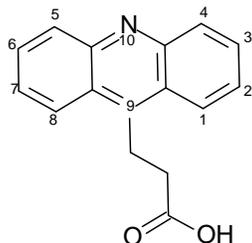
$^{13}\text{C-NMR}$, δ [ppm]: 22.59 (CH_2), 26.58 (CH_2), 32.03 (CH_2), 36.28 (CH_3), 36.44 (CH_3), 36.78 (CH_2), 44.41 (2 CH_3), 45.4 (CH_2), 56.53 (CH_2), 104.4 (CH), 104.5 (CH), 116.23 (2 CH), 118.21 (CH), 118.54 (CH), 121.62 (2 CH), 121.91 (2 C_q), 122.22 (C_q), 122.4 (C_q), 123.13 (2 C_q), 127.07 (2 CH), 134.59 (2 CH), 141.87 (2 C_q), 158.69 (CO), 161.65 (CO), 169.36 (CO), 176.81 (CO);

FD-MS: m/z (%): 610.3 (100)

Summenformel: $\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{N}_7\text{O}_4$, 609.72

IR (KBr, cm^{-1}): 3360, 3220, 2900, 1610, 1570, 1480, 1440, 1420, 1380, 1360, 1340, 1280, 1250, 1190, 1160, 1080, 920, 800, 750, 660.

14.2.23 3-(9-Acridinyl)propionsäure ^[66] (64)



1.7 g (10 mmol) Diphenylamin, 3.55 g (30 mmol) Bernsteinsäure und 2 g (50 mmol) Zinkchlorid werden gemischt und bei 230°C 24 h erhitzt. Man ergänzt anschließend 50 ml 20 %ige H₂SO₄-Lösung und kocht weitere 4 h unter Rückfluss. Man lässt abkühlen und filtriert den schwarzen Rückstand ab. Das Filtrat wird mit 25 %iger NH₃-Lösung neutralisiert und bis zur Trockne eingedampft. Die Isolierung des Produktes erfolgt mittels Säulenchromatographie (MeOH-EA (1:4)).

Ausbeute: 630 mg (2.5 mmol) (25.1 %), leuchtend grüner Feststoff

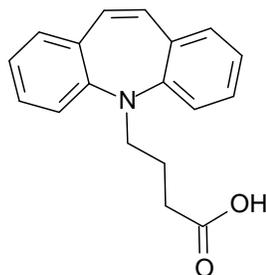
Schmelzpunkt: > 250 °C (lit. [66]: 300 °C)

¹H-NMR, δ [ppm]: 2.65 (t, 2H, ³J=8.0 Hz, CH₂), 3.9 (t, 2H, ³J=7.85 Hz, CH₂),
(300 MHz) (DMSO d₆) 7.64 (pt, 2H, Acridin-H-2+7), 7.84 (pt, 2H, Acridin-H-3+6), 8.14
(pd, ³J=8.6 Hz, 2H, Acridin-H-4+5), 8.38 (pd, 2H, ³J=8.6 Hz,
Acridin-H-1+8), 12.13 (s, 1H, COOH);

¹³C-NMR, δ [ppm]: 22.61 (CH₂), 35.29 (CH₂), 124.57 (CH), 124.92 (CH), 126.37 (2
CH), 130.16 (2 CH), 130.4 (2 CH), 142.3 (C_q), 145.45 (2 C_q),
148.4 (2 C_q), 173.74 (COOH);

EI-MS: m/z (%): 250.9 (100)

Summenformel: C₁₆H₁₃NO₂, 251.28.

14.2.24 4-(5*H*-Dibenzo[*b,f*]azepin-5-yl)buttersäure (66)


0.15 g (6.06 mmol) NaH (97 %) werden in 10 ml DMF suspendiert. Man gibt eine Suspension von 1 g (5.17 mmol) Iminostilben in 20 ml DMF hinzu und lässt 0.5 h rühren. Dann ergänzt man 3 g (15.38 mmol) 4-Brombuttersäureethylester und eine Spatelspitze Tetrabutylammoniumjodid und rührt 48 h bei 120°C. Reinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (PE-EA (8:1)).

Der entstehende 4-(5*H*-dibenzo[*b,f*]azepin-5-yl)buttersäureethylester wird ohne Aufreinigung als Rohprodukt der Hydrolyse unterzogen.

Hierzu löst man den Ester (ca. 300 mg, 0.98 mmol) in 50 ml Ethanol, fügt 5 ml 2*M*-NaOH-Lösung hinzu und rührt 12 h bei RT. Nach kompletter Umsetzung (Kontrolle mittels DC: Kieselgel PE-EA (8:1)) wird die Lösung mit 1*M*-HCl angesäuert und der entstehende Niederschlag abfiltriert und getrocknet.

Ausbeute: 200 mg (0.72 mmol) (13.8 %), grüner Feststoff

Schmelzpunkt: > 250 °C

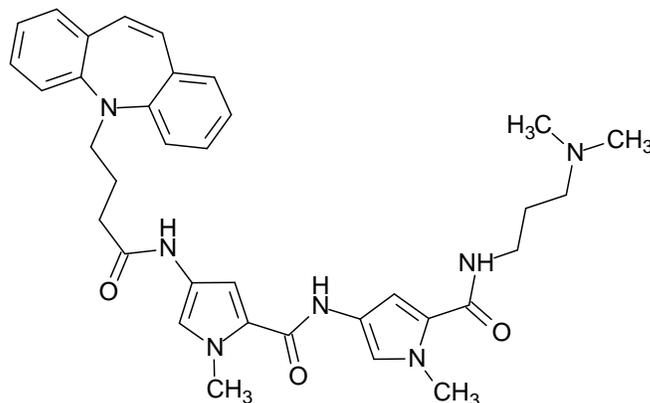
¹H-NMR, δ [ppm]: 1.63 (quint., 2H, ³J=7.0 Hz, CH₂), 2.24 (t, 2H, ³J=7.1 Hz, CH₂),
(300 MHz) (DMSO d₆) 3.68 (t, 2H, ³J=6.7 Hz, CH₂), von 6.69-7.35 (m, 10 H,
Iminostilben-H);

¹³C-NMR, δ [ppm]: 22.71 (CH₂), 30.87 (CH₂), 49.02 (CH₂), 120.74 (2 CH), 123.55 (2
(75 MHz) (DMSO d₆) CH), 129.26 (4 CH), 132.29 (2 CH), 133.68 (2 C_q), 150.73 (2 C_q),
174.64 (CO);

FD-MS: m/z (%): 279.5 (100)

Summenformel: C₁₈H₁₇NO₂, 279.33.

14.2.25 **N2-[5-({[3-(dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1*H*-3-pyrrolyl]-4-{{[4-(5*H*-dibenzo[*b,f*]azepin-5-yl)butanoyl]amino}-1-methyl-1*H*-2-pyrrol-carboxamid (85)**



Durchführung: analog zu **14.2.15** (S. 141)

Einwaage: 182 mg (0.65 mmol) **67**, 188 mg (0.5 mmol) **16**, 0.6 mmol (0.05 ml) Chlorameisensäureethylester

Ausbeute: 60 mg (0.1 mmol) (20 %), grüner Feststoff

Schmelzpunkt: > 250 °C

¹H-NMR, δ [ppm]: 1.67 (2 quint., 4H, 2 CH₂), 2.29 (s, 6H, 2 CH₃), 2.44 (t, 2H, CH₂), (300 MHz) (DMSO d⁶) 3.18 (q/t, 4H, 2 CH₂), 3.72 (t, 2H, ³J=7.0 Hz, CH₂), 3.77 (s, 6H, 2 Pyrrol-CH₃), 6.75 (s, 2H, Pyrrol-H-3+5), 6.81 (s, 2H, Pyrrol-H-3'+5'), 6.93-7.35 (m, 10H, Iminostilben-H), 8.1 (t, 1H, NH), 9.73 (s, 1H, NH), 9.82 (s, 1H, NH);

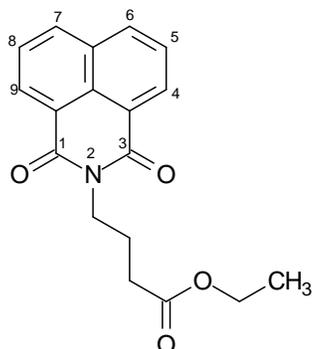
¹³C-NMR, δ [ppm]: 23.53 (CH₂), 26.84 (CH₂), 32.87 (CH₂), 36.26 (CH₃), 36.34 (CH₃), (75 MHz) (DMSO d⁶) 36.94 (CH₂), 44.75 (2 CH₃), 49.5 (CH₂), 56.8 (CH₂), 104.23 (CH), 104.4 (CH), 118.12 (2 CH), 118.34 (2 CH), 120.72 (C_q), 122.28 (C_q), 122.97 (C_q), 123.18 (C_q), 123.54 (2 CH), 129.25 (4 CH), 132.33 (2 CH), 133.67 (2 C_q), 150.82 (2 C_q), 158.66 (CO), 161.6 (CO), 169.53 (CO);

FD-MS: m/z [%]: 608.2 (100)

Summenformel: C₃₅H₄₁N₇O₃, 607.75

IR (KBr, cm⁻¹): 3270, 2940, 1640, 1580, 1520, 1460, 1430, 1400, 1250, 1200, 1140, 1040, 760.

14.2.26 4-(1,3-Dioxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d,e*]isochinolin-2-yl)buttersäureethylester ^[91] (76)



0.3 g (12.12 mmol) NaH (97 %) und 1 g (5.07 mmol) Naphthalimid werden in 5 ml DMF bei 0°C für 20 Minuten gerührt. 2.93 g (15.03 mmol) 4-Brombuttersäureethylester werden zugesetzt und die Mischung für 24 h bei RT gerührt. DC-Kontrolle erfolgt auf Kieselgel-Platten (Hexan-Diethylether (1:1)).

Man versetzt die Mischung mit Wasser und extrahiert 3 mal mit Diethylether. Die Etherphase, in der jetzt nur noch das Produkt und 4-Brombuttersäureethylester gelöst ist, wird einrotiert und mit 40 ml Ethanol versetzt. Hierbei löst sich das Edukt, das Produkt bleibt unlöslich und kann abfiltriert werden. Eine weitere Reinigung ist nicht erforderlich.

Ausbeute: 1 g (3.21 mmol) (32.1 %), farblose Nadeln

Schmelzpunkt: 90 °C

¹H-NMR, δ [ppm]: 1.1 (t, 3H, ³J=7.2 Hz, CH₃), 1.9 (quint., 2H, ³J=7.2 Hz, CH₂),
(300 MHz) (DMSO d⁶) 2.36 (t, 2H, ³J=7.4 Hz, CH₂), 3.91 (q, 2H, ³J=7.1 Hz, CH₂), 4.08
(t, 2H, ³J=6.8 Hz, CH₂), 7.83 (pt, 2H, Naphthalimid-H-5+8), 8.42
(m, 4H, Naphthalimid-H-4+6+7+9);

¹³C-NMR, δ [ppm]: 14.31 (CH₃), 23.18 (CH₂), 31.51 (CH₂), ein Signal überlagert von
(75 MHz) (DMSO d⁶) DMSO-Peak, 60.04 (CH₂), 122.39 (2 C_q), 127.46 (2 CH), 127.69
(C_q), 130.93 (2 CH), 131.55 (C_q), 134.53 (2 CH), 163.84 (2 CO),
172.83 (CO);

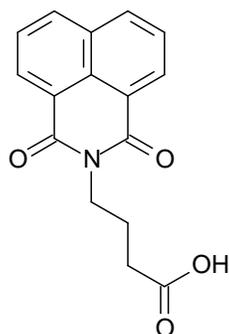
FD-MS: m/z (%): 312 (100)

Summenformel: C₁₈H₁₇NO₄, 311.33

Elementaranalyse: Ber.: C 69,44 H 5,50 N 4,50

Gef.: C 69,11 H 5,39 N 4,71.

14.2.27 4-(1,3-Dioxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d,e*]isochinolin-2-yl)buttersäure ^[91] (78)



780 mg (2.51 mmol) **76** werden in 21.5 ml 15%iger HCl-Lösung suspendiert und 6 h unter Rückfluss erhitzt. DC-Kontrolle erfolgt auf Kieselgel-Platten (PE-EA (1:1)). Der Feststoff wird abfiltriert und getrocknet.

Ausbeute: quantitative Umsetzung, farbloser Feststoff

Schmelzpunkt: 185 °C

¹H-NMR, δ [ppm]: 1.88 (quint., 2H, ³J=6.9 Hz, CH₂), 2.3 (t, 2H, ³J=7.4 Hz, CH₂),
(300 MHz) (DMSO d₆) 4.07 (q, 2H, ³J=6.9 Hz, CH₂), 7.84 (pt, 2H, Naphthalimid-H-5+8),
8.44 (m, 4H, Naphthalimid-H-4+6+7+9);

FD-MS: m/z (%): 284 (100)

Summenformel: C₁₆H₁₃NO₄, 283.28

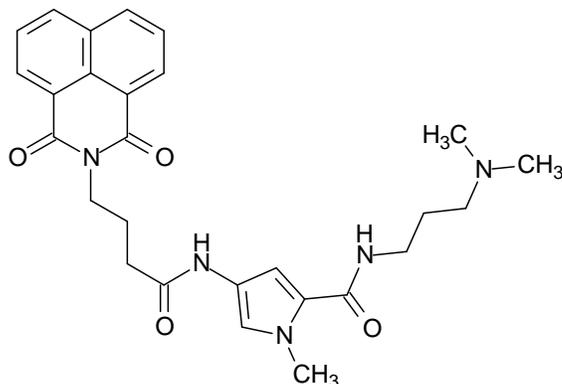
Elementaranalyse: Ber.: C 67,84 H 4,63 N 4,94

Gef.: C 68,11 H 4,67 N 4,93.

14.2.28 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der Pyrrolcarboxamide mit Naphthalimidbuttersäure als Strukturelement

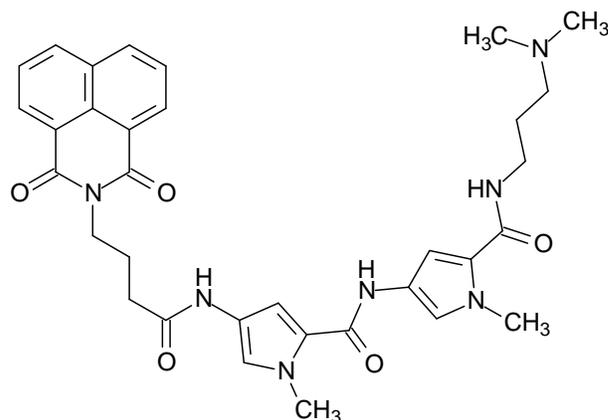
Durchführung identisch mit der Vorschrift **14.2.15** (S.141).

14.2.28.1 N2-[3-(Dimethylamino)propyl]4-{[4-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d,e]isochinolin-2-yl)butanoyl]amino}-1-methyl-1H-2-pyrrol-carboxamid (86)



Einwaage:	370 mg 78 , 254 mg 15
Ausbeute:	170 mg (0.35 mmol) (34.7 %), gelber Feststoff
Schmelzpunkt:	125 °C
¹ H-NMR, δ [ppm]: (300 MHz) (DMSO d ⁶)	1.63 (quint., 2H, ³ J=6.8 Hz, CH ₂), 1.94 (quint., 2H, ³ J=7.0 Hz, CH ₂), 2.21 (s, 6H, 2 CH ₃), 2.31 (2t, 4H, 2 CH ₂), 3.17 (q, 2H, ³ J=6.0 Hz, CH ₂), 3.7 (s, 3H, Pyrrol-CH ₃), 4.08 (t, 2H, ³ J=6.9 Hz, CH ₂), 6.56 (d, 1H, Pyrrol-H-3), 6.94 (d, 1H, Pyrrol-H-5), 7.82 (pt, 2H, Naphthalimid-H-5+8), 8.04 (t, 1H, NH), 8.43 (m, 4H, Naphthalimid-H-4+6+7+9), 9.73 (s, 1H, NH);
¹³ C-NMR, δ [ppm]: (75 MHz) (DMSO d ⁶)	24.15 (CH ₂), 27.02 (CH ₂), 33.66 (CH ₂), 36.18 (CH ₃), 37.11 (CH ₂), ein Signal überlagert von DMSO-Peak, 45.0 (2 CH ₃), 57.01 (CH ₂), 103.48 (CH), 117.65 (CH), 122.2 (C _q), 122.4 (2 C _q), 123.12 (C _q), 127.45 (2 CH), 127.72 (C _q), 131.0 (2 CH), 131.56 (C _q), 134.52 (2 CH), 161.44 (CO), 163.81 (2 CO), 169.02 (CO);
FD-MS: m/z (%):	489.9 (100)
Summenformel:	C ₂₇ H ₃₁ N ₅ O ₄ , 489.57
IR (KBr, cm ⁻¹):	3330, 2950, 1650, 1630, 1590, 1520, 1460, 1440, 1340, 1240, 1200, 1170, 1160, 1030, 970, 930, 850, 780, 670.

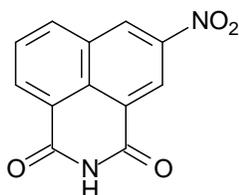
14.2.28.2 N2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1H-3-pyrrolyl]-4-{{[4-(1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d,e]isochinolin-2-yl)butanoyl]amino}-1-methyl-1H-2-pyrrol-carboxamid (87)}



- Einwaage: 370 mg **78**, 376 mg **16**
- Ausbeute: 190 mg (0.31 mmol) (31.1 %), gelber Feststoff
- Schmelzpunkt: 165 °C
- ¹H-NMR, δ [ppm]: 1.62 (quint., 2H, ³J=7.0 Hz, CH₂), 1.95 (quint., 2H, ³J=7.0 Hz, CH₂), 2.21 (s, 6H, 2 CH₃), 2.31 (2t, 4H, 2 CH₂), 3.17 (q, 2H, ³J=6.0 Hz, CH₂), 3.75 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 3.78 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 4.11 (t, 2H, ³J=6.8 Hz, CH₂), 6.78 (s, 1H, Pyrrol-H-3), 6.81 (s, 1H, Pyrrol-H-5), 6.99 (s, 1H, Pyrrol-H-3'), 7.16 (s, 1H, Pyrrol-H-5'), 7.84 (pt, 2H, ³J=7.6 Hz, Naphthalimid-H-5+8), 8.06 (t, 1H, NH), 8.45 (m, 4H, Naphthalimid-H-4+6+7+9), 9.79 (s, 1H, NH), 9.82 (s, 1H, NH);
- ¹³C-NMR, δ [ppm]: 24.17 (CH₂), 27.14 (CH₂), 33.68 (CH₂), 36.24 (CH₃), 36.32 (CH₃), 37.14 (CH₂), ein Signal überlagert von DMSO-Peak, 45.09 (2 CH₃), 57.05 (CH₂), 104.13 (CH), 104.35 (CH), 118.09 (CH), 118.3 (CH), 122.27 (C_q), 122.37 (2 C_q), 122.44 (C_q), 122.91 (C_q), 123.22 (C_q), 127.48 (2 CH), 127.75 (C_q), 131.02 (2 CH), 131.6 (C_q), 134.53 (2 CH), 158.64 (CO), 161.54 (CO), 163.84 (2 CO), 169.09 (CO);
- FD-MS: m/z (%): 613.1 (100)
- Summenformel: C₃₃H₃₇N₇O₅, 611.7

IR (KBr, cm^{-1}): 3300, 2940, 1650, 1590, 1530, 1430, 1400, 1385, 1235, 1140, 1100, 1045, 780.

14.2.29 5-Nitro-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d,e*]isochinolin-1,3-dion ^[90] (74)



4.48 g (18.42 mmol) 3-Nitro-naphthalsäureanhydrid werden in 75 ml DMF suspendiert und anschließend mit 80 ml NH_3 (26 %) versetzt. Man rührt 12 h bei 200°C unter Rückfluss. DC-Kontrolle erfolgt auf Kieselgel-Platten (PE-EA (3:1)). Der Feststoffanteil wird abfiltriert. Hierbei handelt es sich um das Produkt in ausreichender Reinheit.

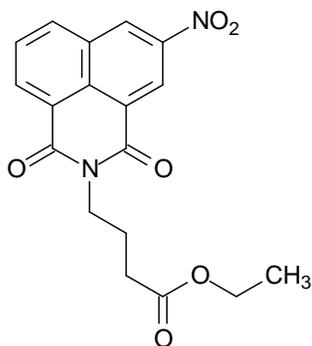
Ausbeute: 3.57 g (14.74 mmol) (80 %), rosafarbener Feststoff

Schmelzpunkt: $> 250^\circ\text{C}$

EI-MS: m/z (%): 242.7 (100)

Summenformel: $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_4$, 242.19.

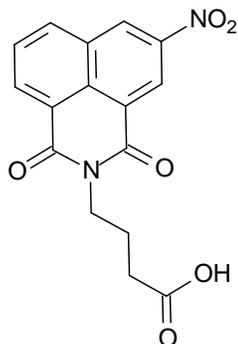
14.2.30 4-(5-Nitro-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d,e*]isochinolin-2-yl)buttersäureethylester ^[91] (75)



1.26 g (5 mmol) **74** werden mit 0.32 g (12.93 mmol) NaH (97 %) versetzt und in 20 ml DMF suspendiert. Man lässt 30 min rühren; hierbei entsteht eine rosa Färbung. Dann fügt man 3 g 4-Brombuttersäureethylester (15.38 mmol) hinzu und lässt 24 h bei RT rühren. DC-Kontrolle erfolgt auf Kieselgel-Platten (PE-EA (3:1)). Nach kompletter Umsetzung wird das LM eingedampft und der Rückstand in 40 ml Ethanol suspendiert. Der unlösliche Anteil wird abfiltriert und getrocknet. Es handelt sich um das Produkt in ausreichender Reinheit.

Ausbeute: 1.6 g (4.49 mmol) (89.8 %), rotbrauner Feststoff
 Schmelzpunkt: 157 °C (Zersetzung)
¹H-NMR, δ [ppm]: 1.11 (t, 3H, ³J=7.1 Hz, CH₃), 1.91 (q, 2H, ³J=7.0 Hz, CH₂), 2.38 (t, 2H, ³J=7.2 Hz, CH₂), 3.95 (q, 2H, ³J=7.0 Hz, CH₂), 4.07 (t, 2H, ³J=6.6 Hz, CH₂), 8.01 (pt, 1H, Naphthalimid-H-8), 8.62 (pd, 1H, Naphthalimid-H-9), 8.72 (pd, 1H, Naphthalimid-H-7), 8.87 (ps, 1H, Naphthalimid-H-4), 9.42 (ps, 1H, Naphthalimid-H-6);
 EI-MS: m/z (%): 356.9 (100)
 Summenformel: C₁₈H₁₆N₂O₆, 356.33.

14.2.31 4-(5-Nitro-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-benzo[*d,e*]isochinolin-2-yl)buttersäure ^[98] (**77**)



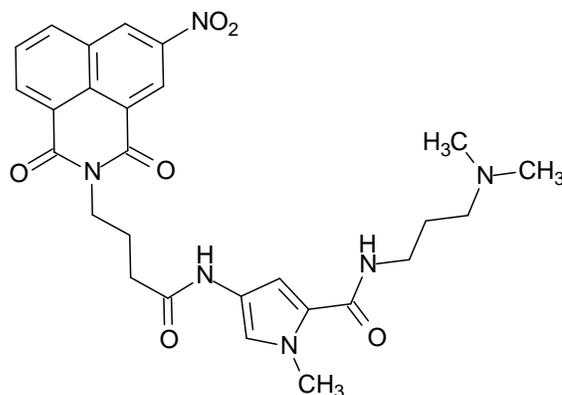
1 g (2.81 mmol) **75**, 28 ml THF, 14 ml H₂O und 142 mg (3.37 mmol) LiOH-Monohydrat werden 16 Stunden bei RT gerührt. Bei erfolgter Umsetzung (DC: Kieselgel PE-EA (3:1)) wird mit 1M HCl-Lösung neutralisiert und der entstehende Niederschlag abfiltriert. Es handelt sich um das Produkt in ausreichender Reinheit.

Ausbeute: quantitative Umsetzung, ockerfarbener Feststoff
 Schmelzpunkt: ab 200 °C Zersetzung
¹H-NMR, δ [ppm]: 1.88 (q, 2H, ³J=6.9 Hz, CH₂), 2.31 (t, 2H, ³J=7.3 Hz, CH₂), 4.07 (300 MHz) (DMSO d⁶) (t, 2H, ³J=6.7 Hz, CH₂), 8.0 (pt, 1H, Naphthalimid-H-8), 8.61 (pd, 1H, Naphthalimid-H-9), 8.71 (pd, 1H, Naphthalimid-H-7), 8.86 (ps, 1H, Naphthalimid-H-4), 9.4 (ps, 1H, Naphthalimid-H-6);
 EI-MS: m/z (%): 328 (100)
 Summenformel: C₁₆H₁₂N₂O₆, 328.28
 Elementaranalyse: Ber.: C 58,54 H 3,68 N 8,53
 Gef.: C 58,80 H 3,71 N 8,44.

14.2.32 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der Pyrrolcarboxamide mit 5-Nitro-naphthalimidbuttersäure als Strukturelement

Durchführung identisch mit der Vorschrift **14.2.15** (S. 141).

14.2.32.1 N2-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-[[4-(5-nitro-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[d,e]isochinolin-2-yl)butanoyl]amino]-1-methyl-1H-2-pyrrol-carboxamid (**88**)



Einwaage: 427 mg **77**, 254mg **15**
 Ausbeute: 185 mg (0.35 mmol) (34.6 %), rotbrauner Feststoff

Schmelzpunkt: ab 158 °C (Zersetzung)

¹H-NMR, δ [ppm]: 1.62 (quint, 2H, ³J=6.8 Hz, CH₂), 1.98 (quint., 2H, ³J=6.3 Hz, CH₂), 2.26 (s, 6H, 2 CH₃), 2.29 (t, 2H, CH₂), 2.4 (t, 2H, ³J=6.9 Hz, CH₂), 3.14 (q, 2H, CH₂), 3.6 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 4.1 (t, 2H, CH₂), 6.41 (d, 1H, Pyrrol-H-3), 6.67 (d, 1H, Pyrrol-H-5), 7.96 (m, 2H, Naphthalimid-H-8+NH), 8.58 (pd, 1H, Naphthalimid-H-9), 8.67 (pd, 1H, Naphthalimid-H-7), 8.84 (ps, 1H, Naphthalimid-H-4), 9.35 (ps 1H, Naphthalimid-H-6), 9.69 (s, 1H, NH);

¹³C-NMR, δ [ppm]: 23.51 (CH₂), 26.8 (CH₂), 33.54 (CH₂), 36.09 (CH₃), 37.03 (CH₂), ein Signal überlagert von DMSO-Peak, 44.81 (2 CH₃), 56.87 (CH₂), 103.18 (CH), 117.31 (CH), 122.18 (C_q), 122.86 (2 C_q), 122.99 (CH), 124.21 (C_q), 129.31 (CH), 129.62 (CH), 129.79 (C_q), 131.01 (C_q), 134.08 (CH), 136.3 (CH), 145.85 (C_q), 161.31 (CO), 162.67 (CO), 163.11 (CO), 168.9 (CO);

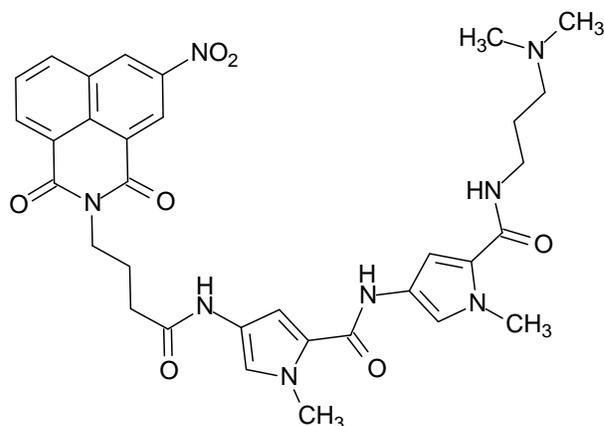
FD-MS: m/z (%): 536 (100)

Summenformel: C₂₇H₃₀N₆O₆, 534.57

IR (FT, cm⁻¹): 3420, 2940, 1670, 1590, 1540, 1490, 1330, 1250, 1210, 1090, 1010, 970, 850, 810, 750.

14.2.32.2 N2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1H-3-pyrrolyl]-4-{{[4-(5-nitro-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-

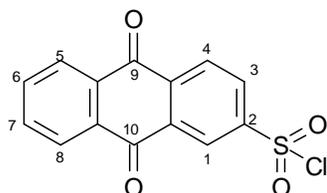
benzo[*d,e*]isochinolin-2-yl)butanoyl]amino}-1-methyl-1*H*-2-pyrrol-carboxamid (89)



- Einwaage: 427 mg **77**, 376 mg **16**
- Ausbeute: 80 mg (0.21 mmol) (21.2 %), rotbrauner Feststoff
- Schmelzpunkt: 161-185 °C
- ¹H-NMR, δ [ppm]: 1.68 (quint., 2H, ³J=6.8 Hz, CH₂), 2.0 (quint., 2H, ³J=7.0 Hz, CH₂), 2.34 (s+t, 8H, 2 CH₃+CH₂), 3.19 (q+t, 4H, 2 CH₂), 3.68 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 3.78 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 4.18 (t, 2H, CH₂), 6.67 (s, 1H, Pyrrol-H-3), 6.8 (s, 1H, Pyrrol-H-5), 6.82 (s, 1H, Pyrrol-H-3'), 7.15 (s, 1H, Pyrrol-H-5'), 7.99 (pt, 1H, Naphthalimid-H-8), 8.09 (t, 1H, NH), 8.62 (pd, 1H, Naphthalimid-H-9), 8.69 (pd, 1H, Naphthalimid-H-7), 8.89 (ps, 1H, Naphthalimid-H-4), 9.39 (ps, 1H, Naphthalimid-H-6), 9.74 (s, 1H, NH), 9.76 (s, 1H, NH);
- ¹³C-NMR, δ [ppm]: 23.65 (CH₂), 26.64 (CH₂), 33.59 (CH₂), 36.25 (2 CH₃), 36.88 (CH₂), ein Signal überlagert von DMSO-Peak, 44.51 (2 CH₃), 56.61 (CH₂), 103.94 (CH), 104.48 (CH), 118.03 (CH), 118.18 (CH), 122.25 (2 C_q), 122.4 (2 C_q), 122.97 (C_q), 123.08 (CH), 124.36 (C_q), 129.36 (CH), 129.72 (CH), 129.92 (C_q), 131.09 (C_q), 134.14 (CH), 136.37 (CH), 145.99 (C_q), 158.57 (CO), 161.63 (CO), 162.75 (CO), 163.2 (CO), 169.04 (CO);
- FD-MS: m/z (%): 658.3 (100)
- Summenformel: C₃₃H₃₆N₈O₇, 656.69

IR (FT, cm^{-1}): 3350, 3100, 2960, 1700, 1660, 1600, 1540, 1460, 1430, 1400, 1340, 1330, 1245, 1210, 1140, 1110, 1060, 785, 760, 670.

14.2.33 9,10-Dioxo-9,10-dihydro-2-anthracensulfonsäurechlorid ^[34] (100c)



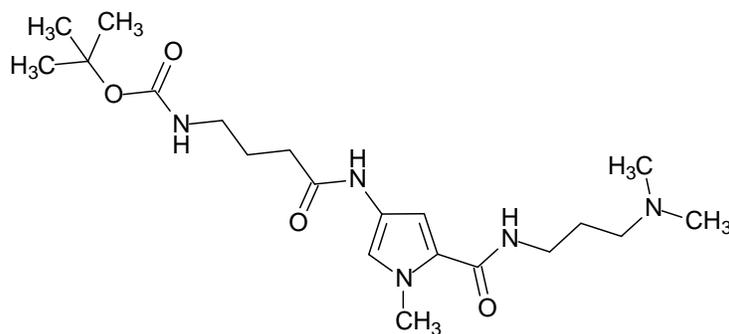
Vorschrift und physikalische Daten: s. Dissertation Hotzel

Ausbeute: 1.1 g (3.59 mmol) (90.8 %), gelber Feststoff

14.2.34 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Darstellung der mit BOC-geschützten GABA- und β -Alanin-funktionalisierten Monopyrrol- und Bispyrrol-carboxamide

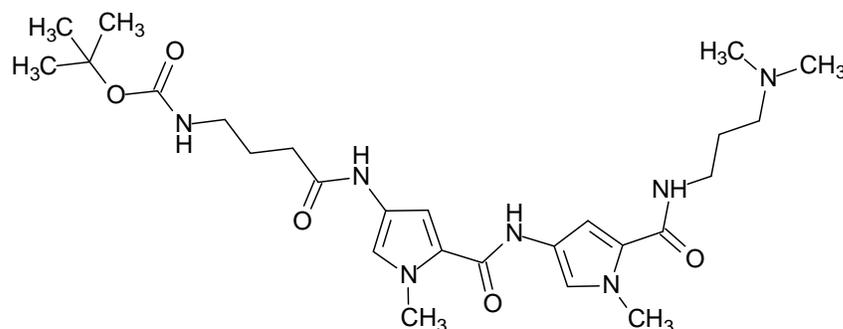
Durchführung identisch mit der Vorschrift 14.2.15 (S. 141).

14.2.34.1 *tert*-Butyl *N*-(4-([5-([3-(dimethylamino)propyl]amino)carbonyl]-1-methyl-1*H*-3-pyrrolyl]amino)-4-oxobutyl)carbamate (101a)



Einwaage: 265 mg BOC-GABA, 254 mg **15**
 Ausbeute: 290 mg (0.71 mmol) (70.8 %), ockerfarbener Feststoff
 Schmelzbereich: 125-130 °C
¹H-NMR, δ [ppm]: 1.35 (s, 9H, 3 CH₃), 1.62 (2 quint., 4H, 2 CH₂), 2.2 (t, 2H, CH₂),
 (300 MHz) (DMSO d⁶) 2.27 (s, 6H, 2 CH₃), 2.37 (t, 2H, ³J=6.9 Hz, CH₂), 2.91 (q, 2H,
³J=6.3 Hz, CH₂), 3.16 (q, 2H, ³J=6.1 Hz, CH₂), 3.76 (s, 3H,
 Pyrrol-CH₃), 6.63 (d, 1H, ⁴J=1.7 Hz, Pyrrol-H-3), 6.84 (t, 1H,
 NH), 7.07 (d, 1H, ⁴J=1.6 Hz, Pyrrol-H-5), 8.07 (t, 1H, ³J=5.3 Hz,
 NH), 9.73 (s, 1H, NH);
¹³C-NMR, δ [ppm]: 26.16 (CH₂), 27.0 (CH₂), 28.57 (3 CH₃), 33.39 (CH₂), 36.22
 (75 MHz) (DMSO d⁶) (CH₃), 37.07 (2 CH₂), 44.96 (2 CH₃), 56.97 (CH₂), 77.76 (C_q),
 103.6 (CH), 117.74 (CH), 122.26 (C_q), 123.22 (C_q), 155.9 (CO),
 161.47 (CO), 169.37 (CO);
 EI-MS: m/z (%): 409.6 (100)
 Summenformel: C₂₀H₃₅N₅O₄, 409.52.

14.2.34.2 tert.-Butyl N-(4-[[5-([3-(dimethylamino)propyl]amino)carbonyl]-1-methyl-1H-3-pyrrolyl]amino)carbonyl)-1-methyl-1H-3-pyrrolyl]amino)-4-oxobutyl)carbamate (103a)



Einwaage: 265 mg BOC-GABA, 376 mg **16**
 Ausbeute: 320 mg (0.6 mmol) (60.2 %), ockerfarbener Feststoff
 Schmelzbereich: 160-170 °C
¹H-NMR, δ [ppm]: 1.36 (s, 9H, 3 CH₃), 1.63 (2 quint., 4H, 2 CH₂), 2.21 (t, 2H, CH₂),

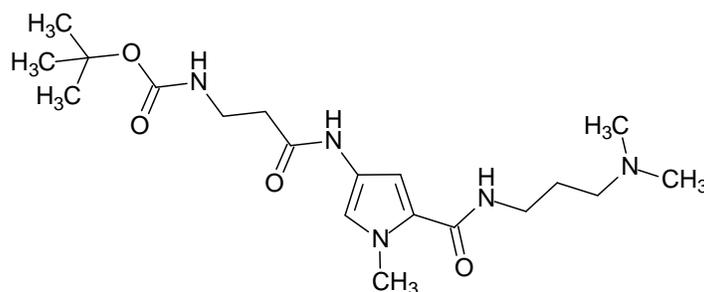
(300 MHz) (DMSO d_6) 2.23 (s, 6H, 2 CH₃), 2.35 (t, 2H, ³J=7.0 Hz, CH₂), 2.93 (q, 2H, ³J=6.4 Hz, CH₂), 3.17 (q, 2H, ³J=6.4 Hz, CH₂), 3.78 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 3.8 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 6.8 (s, 1H, Pyrrol-H-3), 6.84 (d, 1H, ⁴J=1.7 Hz, Pyrrol-H-5), 7.13 (d, 1H, ⁴J=1.7 Hz, Pyrrol-H-3'), 7.16 (d, 1H, ⁴J=1.8 Hz, Pyrrol-H-5'), 8.07 (t, 1H, ³J=5.4 Hz, NH), 9.78 (s, 1H, NH), 9.84 (s, 1H, NH);

¹³C-NMR, δ [ppm]: 26.19 (CH₂), 27.12 (CH₂), 28.57 (3 CH₃), 31.0 (CH₂), 33.41 (CH₂), 36.23 (CH₃), 36.36 (CH₃), 37.13 (CH₂), 45.06 (2 CH₃), 57.06 (CH₂), 77.77 (C_q), 104.21 (CH), 104.35 (CH), 118.09 (CH), 118.37 (CH), 122.37 (2 C_q), 123.03 (C_q), 123.25 (C_q), 155.9 (CO), 158.68 (CO), 161.55 (CO), 169.46 (CO);

FD-MS: m/z (%): 532 (100)

Summenformel: C₂₆H₄₁N₇O₅, 531.65.

14.2.34.3 tert.-Butyl N-(3-([5-([3-(dimethylamino)propyl]amino)carbonyl]-1-methyl-1H-3-pyrrolyl]amino)-3-oxopropyl)carbamate (100a)



Einwaage: 250 mg BOC- β -Alanin, 254 mg **15**

Ausbeute: 300 mg (0.76 mmol) (75.9 %), ockerfarbener Feststoff

Schmelzbereich: 140-145 °C

¹H-NMR, δ [ppm]: 1.36 (s, 9H, 3 CH₃), 1.59 (quint., 2H, ³J=7.0 Hz, CH₂), 2.16 (s, 6H, 2 CH₃), 2.27 (t, 2H, ³J=7.05 Hz, CH₂), 2.36 (t, 2H, ³J=7.4 Hz, CH₂), 3.16 (2q, 4H, 2 CH₂), 3.75 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 6.61 (d, 1H, ⁴J=1.4 Hz, Pyrrol-H-3), 6.81 (t, 1H, ³J=5.0 Hz, NH), 7.08 (d, 1H, Pyrrol-H-5), 8.06 (t, 1H, NH), 9.79 (s, 1H, NH);

(300 MHz) (DMSO d_6)

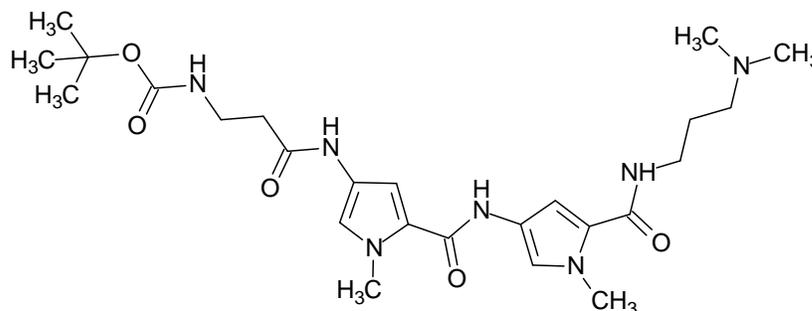
¹³C-NMR, δ [ppm]: 27.25 (CH₂), 28.54 (3 CH₃), 36.22 (CH₃), 36.93 (CH₂), 37.15

(75 MHz) (DMSO d_6) (CH₂), 37.29 (CH₂), 45.29 (2 CH₃), 57.24 (CH₂), 77.93 (C_q), 103.5 (CH), 117.76 (CH), 122.14 (C_q), 123.28 (C_q), 155.73 (CO), 161.37 (CO), 167.77 (CO);

FD-MS: m/z (%): 396.6 (100)

Summenformel: C₁₉H₃₃N₅O₄, 395.5.

14.2.34.4 tert-Butyl N-(3-([5-([3-(dimethylamino)propyl]amino)carbonyl]-1-methyl-1H-3-pyrrolyl]amino)carbonyl)-1-methyl-1H-3-pyrrolyl]amino)-3-oxopropyl)carbamate (102a)



Einwaage: 250 mg BOC-β-Alanin, 376 mg **16**

Ausbeute: 350 mg (0.68 mmol) (67.6 %), brauner Feststoff

Schmelzbereich: 185-190 °C

¹H-NMR, δ [ppm]: 1.36 (s, 9H, 3 CH₃), 1.61 (quint., 2H, ³J=7.0 Hz, CH₂), 2.19 (s, 6H, 2 CH₃), 2.3 (t, 2H, ³J=7.1 Hz, CH₂), 2.38 (t, 2H, ³J=7.3 Hz, CH₂), 3.17 (2q, 4H, 2 CH₂), 3.78 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 3.8 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 6.81 (s, 1H, Pyrrol-H-3), 6.84 (s, 1H, Pyrrol-H-5), 7.14 (s, 1H, Pyrrol-H-3'), 7.16 (s, 1H, Pyrrol-H-5'), 8.05 (2t, 2H, 2 NH), 9.85 (2s, 2H, 2 NH);

(300 MHz) (DMSO d_6)

¹³C-NMR, δ [ppm]: 27.22 (CH₂), 28.55 (3 CH₃), 36.24 (2 CH₃), 36.39 (CH₂), 37.08 (CH₂), 37.2 (CH₂), 45.2 (2 CH₃), 57.15 (CH₂), 77.95 (C_q), 104.2 (CH), 104.34 (CH), 118.08 (CH), 118.43 (CH), 122.21 (C_q), 122.34 (C_q), 123.03 (C_q), 123.27 (C_q), 155.84 (CO), 158.66 (CO), 161.5 (CO), 167.85 (CO);

(75 MHz) (DMSO d_6)

FD-MS: m/z (%): 517.8 (100)

Summenformel: C₂₅H₃₉N₇O₅, 517.62.

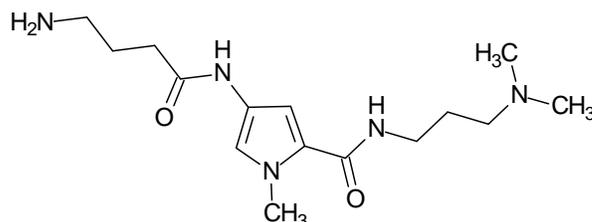
14.2.35 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Abspaltung der BOC-Schutzgruppe bei den Verbindungen 100a-103a ^[98]

1 mmol der BOC-geschützten Verbindung wird in 60 ml Ethanol gelöst. Man gibt einen 4.5 molaren Überschuss an 2.3M-ethanolischer HCl hinzu und rührt die Reaktionsmischung bei 60°C. Der Reaktionsverlauf wird mittels DC (Kieselgel MeOH-NH₃ (97:3)) verfolgt und ggf. weitere ethanolische HCl ergänzt. Nach vollständiger Umsetzung lässt man auf RT abkühlen und gibt ca. 100 ml Ethylacetat hinzu. Es entsteht ein milchig-weißer Niederschlag, welcher abfiltriert und getrocknet wird.

Darstellung der 2.3M-ethanolischen HCl :

170 ml Ethanol werden im Messkolben vorgelegt und im Eisbad gekühlt. Man tropft langsam 41 ml (0.58 mol) Acetylchlorid ($M_r=78.5$; $d=1.104$) unter Eiskühlung hinzu und lässt 1.5 h bei RT rühren. Anschließend wird mit Ethanol auf 250 ml aufgefüllt.

14.2.35.1 N2-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-[(4-amino-butanoyl)amino]-1-methyl-1H-2-pyrrol-carboxamid (101b)



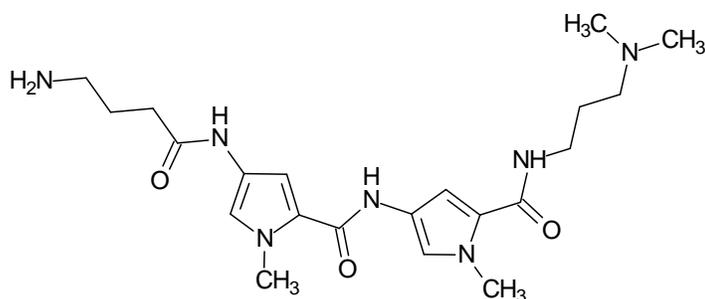
Ausbeute:	quantitative Umsetzung
Schmelzpunkt:	aufgrund starker Hygroskopizität nicht messbar
¹ H-NMR, δ [ppm]:	1.85 (2 quint., 4H, 2 CH ₂), 2.2 (t, 2H, CH ₂), 2.35 (t, 2H, CH ₂),
(300 MHz) (DMSO d ⁶)	2.75 (s, 6H, 2 CH ₃), 3.01 (quint., 2H, CH ₂), 3.21 (q, 2H, CH ₂),
	3.78 (s, 3H, Pyrrol-CH ₃), 6.73 (d, 1H, ⁴ J=1.6 Hz, Pyrrol-H-3),

7.11 (d, 1H, $^4J=1.5$ Hz, Pyrrol-H-5), 8.14 (2t, 3H, NH+NH₂),
10.05 (s, 1H, NH);

FD-MS: m/z (%): 310.3 (100)

Summenformel: C₁₅H₂₇N₅O₂, 309.41.

14.2.35.2 N2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1*H*-3-pyrrolyl]-4-[(4-aminobutanoyl)amino]-1-methyl-1*H*-2-pyrrol-carboxamid (103b)



Ausbeute: quantitative Umsetzung

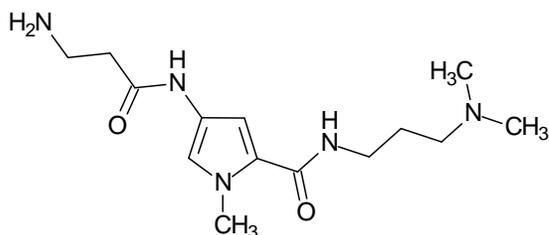
Schmelzpunkt: aufgrund starker Hygroskopizität nicht messbar

Summenformel: C₂₁H₃₃N₇O₃, 431.54.

Aufgrund schlechter Handhabbarkeit keine weitere Analytik betrieben.

Der Strukturbeweis erfolgte durch Analytik des Folgeproduktes.

14.2.35.3 N2-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-[(3-amino-propanoyl)amino]-1-methyl-1*H*-2-pyrrol-carboxamid (100b)



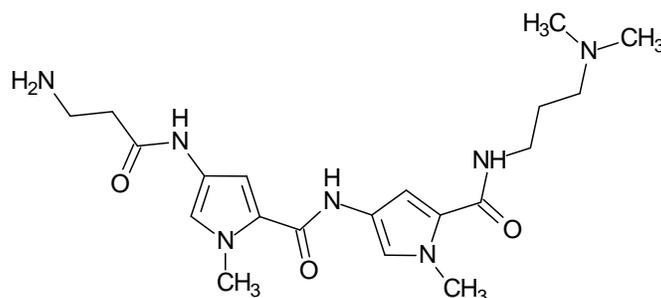
Ausbeute: quantitative Umsetzung

Schmelzpunkt: aufgrund starker Hygroskopizität nicht messbar

Summenformel: $C_{14}H_{25}N_5O_2$, 295.38.

Der Strukturbeweis erfolgte durch Analytik des Folgeproduktes.

14.2.35.4 N2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1H-3-pyrrolyl]-4-[(3-aminopropanoyl)amino]-1-methyl-1H-2-pyrrol-carboxamid (102b)



Ausbeute: quantitative Umsetzung

Schmelzpunkt: aufgrund starker Hygroskopizität nicht messbar

Summenformel: $C_{20}H_{31}N_7O_3$, 417.51.

Der Strukturbeweis erfolgte durch Analytik des Folgeproduktes.

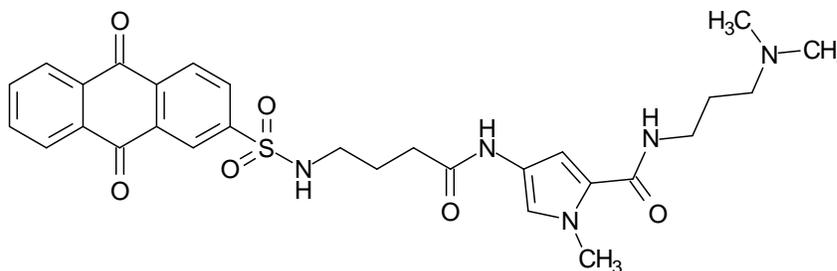
14.2.36 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Kupplung von 100c mit den Verbindungen 100b-103b

Zu 615 mg (2 mmol) **100c**, gelöst in 30 ml DMF, wird eine Lösung von 1.5 mmol des Amins in 30 ml DMF sowie 1 mmol (129 mg) *N,N*-diisopropylethylamin hinzugegeben. Die Mischung wird 48 h bei 100°C gerührt. Zwischendurch wird mehrmals eine Spatelspitze **100c** ergänzt. DC-Kontrolle und Isolierung des Produktes mittels Säulenchromatographie erfolgen über Kieselgel (MeOH-NH₃ (97:3)).

Anmerkung: Bei den Anthrachinonsulfonamid-Derivaten erscheint aufgrund der im Vergleich zu den -carbonsäureamiden erhöhten Acidität nicht das entsprechende NH-Triplett im ¹H-NMR-Spektrum, da es

hier schnell zu einem Austausch mit Deuterium aus dem LM kommt.

14.2.36.1 N2-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-[(4-[(9,10-dioxo-9,10-dihydro-2-anthracenyl)sulfonyl]amino}butanoyl)amino]-1-methyl-1H-2-pyrrol-carboxamid (101b)



Einwaage: 470 mg **101b**

Ausbeute: 150 mg (0.26 mmol) (17.2 %), brauner Feststoff

Schmelzpunkt: ab 210 °C Zersetzung

¹H-NMR, δ [ppm]: 1.66 (2 quint., 4H, 2 CH₂), 2.21 (t, 2H, ³J=6.8 Hz, CH₂), 2.37 (s, 6H, 2 CH₃), 2.57 (q, 2H, ³J=6.5 Hz, CH₂), 2.84 (t, 2H, CH₂), 3.17 (q, 2H, CH₂), 3.7 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 6.58 (s, 1H, Pyrrol-H-3), 6.98 (s, 1H, Pyrrol-H-5), 7.95 (m, 2H, Anthrachinon-H-6+7), 8.04 (t, 1H, NH), 8.15 (t, 1H, NH), 8.23 (m, 2H, Anthrachinon-H-5+8), 8.36 (pd, 1H, Anthrachinon-H-4), 8.39 (pd, 1H, Anthrachinon-H-3), 8.51 (ps, 1H, Anthrachinon-H-1), 9.69 (s, 1H, NH);

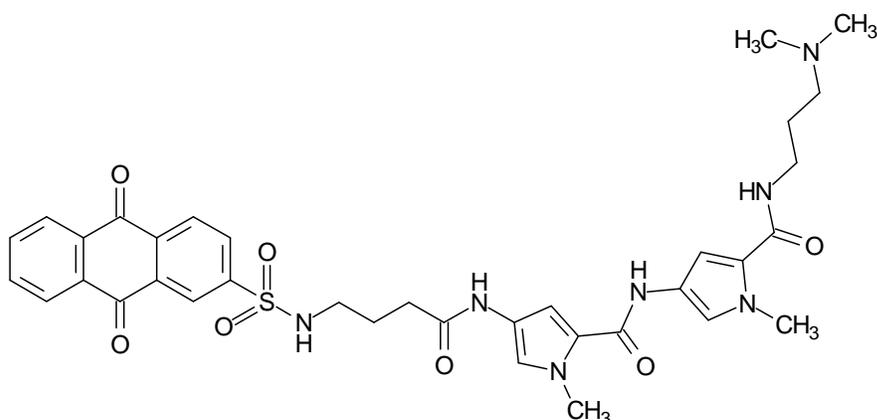
¹³C-NMR, δ [ppm]: 25.44 (CH₂), 26.46 (CH₂), 32.52 (CH₂), 36.21 (CH₃), 36.73 (CH₂), 42.45 (CH₂), 44.34 (2 CH₃), 56.48 (CH₂), 103.62 (CH), 117.75 (CH), 122.16 (C_q), 123.06 (C_q), 124.85 (CH), 127.22 (2 CH), 128.54 (CH), 131.86 (CH), 133.32 (2 C_q), 134.1 (C_q), 135.08 (2 CH), 135.63 (C_q), 145.77 (C_q), 161.5 (CO), 168.88 (CO), 181.95 (2 CO);

FD-MS: m/z (%): 580.2 (100)

Summenformel: C₂₉H₃₃N₅O₆S, 579.67

IR (KBr, cm⁻¹): 3400, 1650, 1600, 1570, 1510, 1450, 1420, 1390, 1320, 1270, 1165, 1140, 1100, 950, 920, 700, 610.

14.2.36.2 N2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1H-3-pyrrolyl]-4-[(4-{{(9,10-dioxo-9,10-dihydro-2-anthracenyl)sulfonyl}amino}butanoyl)amino]-1-methyl-1H-2-pyrrol-carboxamid (103)



Einwaage: 650 mg **103b**

Ausbeute: 140 mg (0.2 mmol) (13.3 %), brauner Feststoff

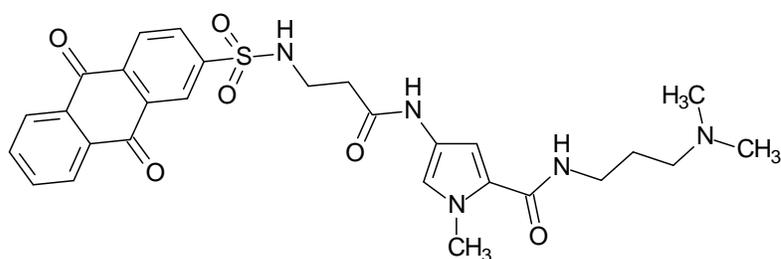
Schmelzpunkt: ab 230 °C Zersetzung

¹H-NMR, δ [ppm]: 1.67 (2 quint., 4H, 2 CH₂), 2.25 (t, 2H, CH₂), 2.35 (s, 6H, 2 CH₃),
(300 MHz) (DMSO d⁶) 2.71 (q, 2H, CH₂), 2.85 (t, 2H, CH₂), 3.18 (q, 2H, CH₂), 3.76 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 3.78 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 6.78 (d, 1H, ⁴J=1.4 Hz, Pyrrol-H-3), 6.83 (d, 1H, ⁴J=1.3 Hz, Pyrrol-H-5), 7.04 (d, 1H, ⁴J=1.4 Hz, Pyrrol-H-3'), 7.15 (d, 1H, ⁴J=1.3 Hz, Pyrrol-H-5'), 7.93 (m, 2H, Anthrachinon-H-6+7), 8.12 (t, 1H, NH), 8.22 (m, 2H, Anthrachinon-H-5+8), 8.37 (pd, 1H, Anthrachinon-H-4), 8.4 (pd, 1H, Anthrachinon-H-3), 8.5 (ps, 1H, Anthrachinon-H-1), 9.73 (s, 1H, NH), 9.8 (s, 1H, NH);

¹³C-NMR, δ [ppm]: 25.4 (CH₂), 26.54 (CH₂), 32.78 (CH₂), 36.21 (CH₃), 36.36 (CH₃),
(75 MHz) (DMSO d⁶) 36.75 (CH₂), 42.9 (CH₂), 44,44 (2 CH₃), 56.53 (CH₂), 103.62 (CH), 103.84 (CH), 117.75 (CH), 118.03 (CH), 122.16 (C_q), 122.69 (C_q), 123.06 (C_q), 123.39 (C_q) 124.85 (CH), 127.47 (2 CH), 128.57 (CH), 132.03 (CH), 133.33 (2 C_q), 134.4 (C_q), 134.98 (2 CH), 135.73 (C_q), 145.87 (C_q), 158.6 (CO), 161.72 (CO), 169.07 (CO), 182.00 (2 CO);

FD-MS: m/z (%): 702.4 (100)
 Summenformel: C₃₅H₃₉N₇O₇S, 701.79
 IR (KBr, cm⁻¹): 3400, 1670, 1590, 1530, 1460, 1440, 1400, 1340, 1290, 1180,
 1150, 1110, 990, 960, 930, 820, 780, 720, 660, 630.

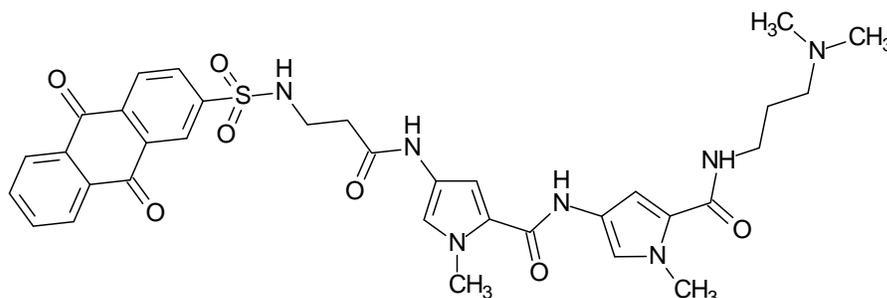
14.2.36.3 N2-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-[(3-[(9,10-dioxo-9,10-dihydro-2-anthracenyl)sulfonyl]amino}propanoyl)amino]-1-methyl-1H-2-pyrrol-carboxamid (100)



Einwaage: 445 mg **100b**
 Ausbeute: 240 mg (0.42 mmol) (28.2 %), brauner Feststoff
 Schmelzpunkt: ab 150 °C Zersetzung
¹H-NMR, δ [ppm]: 1.64 (quint., 2H, ³J=6.6 Hz, CH₂), 2.29 (s, 6H, 2 CH₃), 2.37 (t, 2H, CH₂), 2.5 (t, 2H, CH₂), 3.13 (2q, 4H, 2 CH₂), 3.61 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 6.48 (d, 1H, Pyrrol-H-3), 6.9 (d, 1H, Pyrrol-H-5), 7.94 (m, 2H, Anthrachinon-H-6+7), 8.2 (m, 3H, Anthrachinon-H-5+8+NH), 8.25 (pd, 1H, Anthrachinon-H-4), 8.33 (pd, 1H, Anthrachinon-H-3), 8.5 (ps, 1H, Anthrachinon-H-1), 9.73 (s, 1H, NH);
¹³C-NMR, δ [ppm]: 26.64 (CH₂), 36.1 (CH₂), 36.17 (CH₃), 36.79 (CH₂), 36.91 (CH₂), 44.61 (2 CH₃), 56.73 (CH₂), 103.39 (CH), 117.73 (CH), 121.91 (C_q), 122.97 (C_q), 124.88 (CH), 127.16 (2 CH), 128.39 (CH), 131.82 (CH), 133.24 (2 C_q), 133.98 (C_q), 135.04 (2 CH), 135.94 (C_q), 145.94 (C_q), 161.24 (CO), 166.86 (CO), 181.84 (CO), 181.91 (CO);
 FD-MS: m/z (%): 566.6 (100)
 Summenformel: C₂₈H₃₁N₅O₆S, 565.64

IR (KBr, cm^{-1}): 3400, 1650, 1610, 1500, 1450, 1420, 1390, 1320, 1270, 1165, 1140, 1100, 950, 930, 700, 610.

14.2.36.4 N2-[5-({[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1H-3-pyrrolyl]-4-[(3-{{(9,10-dioxo-9,10-dihydro-2-anthracenyl)sulfonyl}amino}propanoyl)amino]-1-methyl-1H-2-pyrrol-carboxamid (102)



Einwaage: 630 mg **102b**

Ausbeute: 180 mg (0.26 mmol) (17.4 %), brauner Feststoff

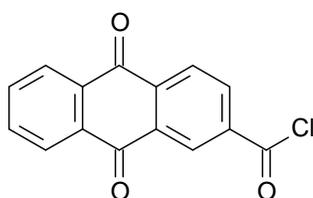
Schmelzpunkt: ab 170 °C Zersetzung

$^1\text{H-NMR}$, δ [ppm]: 1.62 (quint., 2H, $^3\text{J}=6.9$ Hz, CH_2), 2.19 (s, 6H, 2 CH_3), 2.31 (t, 2H, $^3\text{J}=7.0$ Hz, CH_2), 2.4 (t, 2H, $^3\text{J}=6.8$ Hz, CH_2), 3.15 (2q, 4H, 2 CH_2), 3.68 (s, 3H, Pyrrol- CH_3), 3.78 (s, 3H, Pyrrol- CH_3), 6.71 (d, 1H, $^4\text{J}=1.7$ Hz, Pyrrol-H-3), 6.78 (d, 1H, $^4\text{J}=1.9$ Hz, Pyrrol-H-5), 6.97 (d, 1H, $^4\text{J}=1.9$ Hz, Pyrrol-H-3'), 7.14 (d, 1H, $^4\text{J}=1.7$ Hz, Pyrrol-H-5'), 7.92 (m, 2H, Anthrachinon-H-6+7), 8.19 (t, 1H; NH), 8.21 (m, 2H, Anthrachinon-H-5+8), 8.26 (pd, 1H, Anthrachinon-H-4), 8.33 (pd, 1H, Anthrachinon-H-3), 8.51 (pd, 1H, Anthrachinon-H-1), 9.72 (s, 1H, NH), 9.8 (s, 1H; NH);

$^{13}\text{C-NMR}$, δ [ppm]: 27.22 (CH_2), 36.12 (CH_2), 36.24 (CH_3), 36.33 (CH_3), 37.06 (CH_2), 37.18 (CH_2), 45.16 (2 CH_3), 57.13 (CH_2), 103.97 (CH), 104.37 (CH), 118.13 (CH), 118.34 (CH), 121.95 (C_q), 122.26 (C_q), 122.86 (C_q), 123.2 (C_q), 124.9 (CH), 127.2 (2 CH), 128.4 (CH), 131.83 (CH), 133.24 (2 C_q), 134.0 (C_q), 135.04 (2 CH), 135.52

(C_q), 145.92 (C_q), 158.45 (CO), 161.55 (CO), 167.95 (CO), 181.9 (2 CO);
 FD-MS: m/z (%): 688.9 (100)
 Summenformel: C₃₄H₃₇N₇O₇S, 687.77
 IR (KBr, cm⁻¹): 3400, 1670, 1590, 1530, 1460, 1440, 1400, 1350, 1290, 1180, 1150, 1100, 990, 960, 930, 820, 720, 660, 630.

14.2.37 9,10-Dioxo-9,10-dihydro-2-anthracencarbonsäurechlorid ^[99] (104a)



1 g (4 mmol) Anthrachinoncarbonsäure und 10 ml (140 mmol) Thionylchlorid werden 6 h unter Rückfluss erhitzt. Man lässt abkühlen und entfernt das überschüssige Thionylchlorid im Vakuum. Nach 3 stündiger Trocknung kann das Produkt ohne weitere Reinigung verwendet werden.

DC-Kontrolle erfolgt auf Kieselgel-Platten (PE-EA (1:2)). Das Produkt wird in Methanol gelöst. Der entstehende Ester zeigt ein anderes Laufverhalten als die freie Säure.

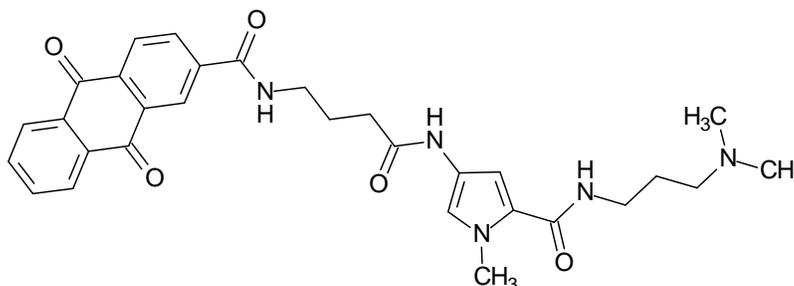
Ausbeute: 980 mg (3.62 mmol) (90.5 %), gelber Feststoff
 Schmelzpunkt: 141 °C
¹H-NMR, δ [ppm]: 7.91 (m, 2H, Anthrachinon-H-6+7), 8.2 (m, 2H, Anthrachinon-H-5+8), 8.24 (pd, 1H, Anthrachinon-H-4), 8.32 (pd, 1H, Anthrachinon-H-3), 8.58 (pd, 1H, Anthrachinon-H-1);
 (300 MHz) (DMSO d⁶)
 Summenformel: C₁₅H₇ClO₃, 270.67.

14.2.38 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Kupplung von 104a mit den

Verbindungen 100b und 101b

Die Durchführung verläuft analog zu **14.2.36** (S. 185). 2 mmol des Säurechlorids **104a** entsprechen hier 542 mg.

14.2.38.1 **N2-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-[(4-[(9,10-dioxo-9,10-dihydro-2-anthracenyl)carbonyl]amino}butanoyl)amino]-1-methyl-1H-2-pyrrol-carboxamid (105)**



Einwaage: 470 mg **101b**

Ausbeute: 110 mg (0.2 mmol) (13.5 %), brauner Feststoff

Schmelzpunkt: ab 210 °C Zersetzung

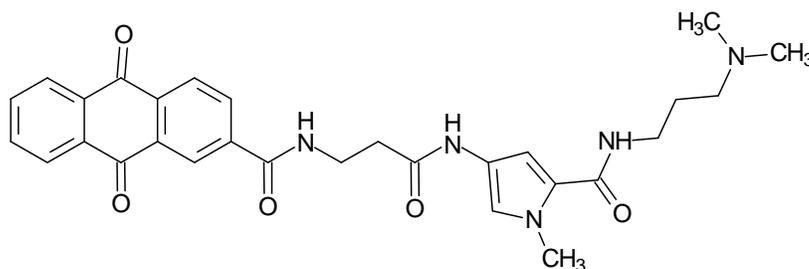
¹H-NMR, δ [ppm]: 1.68 (quint., 2H, ³J=7.3 Hz, CH₂), 1.86 (quint., 2H, ³J=7.0 Hz, CH₂), 2.3 (t, 2H, CH₂), 2.38 (s, 6H, 2 CH₃), 2.55 (t, 2H, CH₂), 3.18 (q, 2H, CH₂), 3.36 (q, 2H, CH₂), 3.74 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 6.63 (d, 1H, Pyrrol-H-3), 7.1 (d, 1H, Pyrrol-H-5), 7.94 (m, 2H, Anthrachinon-H-6+7), 8.09 (t, 1H, NH), 8.22 (m, 2H, Anthrachinon-H-5+8), 8.27 (pd, 1H, Anthrachinon-H-4), 8.31 (pd, 1H, Anthrachinon-H-3), 8.64 (pd, 1H, Anthrachinon-H-1), 8.99 (t, 1H, NH), 9.8 (s, 1H, NH);

¹³C-NMR, δ [ppm]: 25.44 (CH₂), 26.38 (CH₂), 32.09 (CH₂), 33.1 (CH₂), 36.25 (CH₃), 36.72 (CH₂), 44.28 (2 CH₃), 56.41 (CH₂), 103.69 (CH), 117.89 (CH), 122.17 (C_q), 123.78 (C_q), 125.82 (CH), 127.36 (2 CH), 127.97 (CH), 133.14 (CH), 133.38 (2 C_q), 134.83 (C_q), 135.01 (2 CH), 135.73 (C_q), 139.69 (C_q), 161.57 (CO), 164.95 (CO), 169.44 (CO), 182.48 (2 CO);

FD-MS: m/z (%): 544.6 (100)

Summenformel: $C_{30}H_{33}N_5O_5$, 543.62
 IR (KBr, cm^{-1}): 3450, 2900, 1650, 1620, 1570, 1520, 1450, 1420, 1390, 1310, 1270, 1240, 1170, 1100, 920, 770, 700, 610.

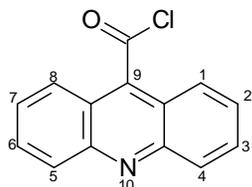
14.2.38.2 N2-[3-(Dimethylamino)propyl]-4-[(3-[(9,10-dioxo-9,10-dihydro-2-anthracenyl)carbonyl]amino)propanoyl]amino}-1-methyl-1H-2-pyrrol-carboxamid (104)



Einwaage: 445 mg **100b**
 Ausbeute: 195 mg (0.37 mmol) (24.7 %), brauner Feststoff
 Schmelzpunkt: ab 150 °C Zersetzung
 1H -NMR, δ [ppm]: 1.68 (quint., 2H, $^3J=6.7$ Hz, CH_2), 2.36 (s, 6H, 2 CH_3), 2.54 (t, 2H, CH_2), 2.6 (t, 2H, CH_2), 3.19 (q, 2H, $^3J=5.9$ Hz, CH_2), 3.59 (q, 2H, $^3J=6.0$ Hz, CH_2), 3.78 (s, 3H, Pyrrol- CH_3), 6.67 (d, 1H, Pyrrol-H-3), 7.13 (d, 1H, Pyrrol-H-5), 7.94 (m, 2H, Anthrachinon-H-6+7), 8.11 (t, 1H, $^3J=4.3$ Hz, NH), 8.21 (m, 2H, Anthrachinon-H-5+8), 8.26 (pd, 1H, Anthrachinon-H-4), 8.32 (pd, 1H, Anthrachinon-H-3), 8.62 (pd, 1H, Anthrachinon-H-1), 9.08 (t, 1H, $^3J=5.0$ Hz, NH), 9.9 (s, 1H, NH);
 ^{13}C -NMR, δ [ppm]: 26.1 (CH_2), 35.4 (CH_2), 36.0 (CH_3), 36.4 (2 CH_2), 44.0 (2 CH_3), 56.1 (CH_2), 103.4 (CH), 117.6 (CH), 121.9 (C_q), 122.9 (C_q), 125.5 (CH), 126.8 (CH), 126.9 (CH), 127.1 (CH), 132.8 (CH), 133.0 (C_q), 133.1 (2 C_q), 134.5 (C_q), 134.7 (2 C_q), 139.3 (C_q), 161.2 (CO), 164.7 (CO), 167.5 (CO), 182.1 (CO), 182.2 (CO);
 FD-MS: m/z (%): 530.8 (100)
 Summenformel: $C_{29}H_{31}N_5O_5$, 529.59

IR (FT, cm^{-1}): 3450, 2900, 1650, 1620, 1570, 1520, 1450, 1420, 1390, 1310, 1270, 1230, 1160, 1100, 920, 770, 700, 610.

14.2.39 Acridin-9-carbonsäurechlorid ^[99] (106a)



900 mg (4 mmol) Acridin-9-carbonsäure-Hydrat werden mit 10 ml (140 mmol) Thionylchlorid versetzt und 6 h refluxiert. Anschließend wird das überschüssige Thionylchlorid im Vakuum entfernt und der Rückstand getrocknet. DC-Kontrolle erfolgt auf Kieselgel-Platten (PE-EA (1:2)). Das Produkt wird in Methanol gelöst. Der entstehende Ester zeigt ein anderes Laufverhalten als die freie Säure.

Ausbeute: 930 mg (3.85 mmol) (96.2 %), gelber Feststoff

Schmelzpunkt: 225 °C

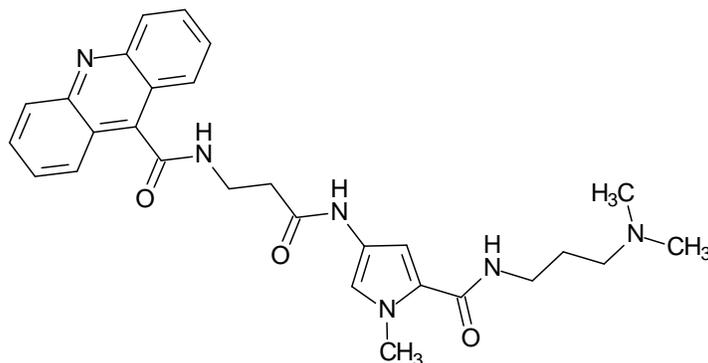
¹H-NMR, δ [ppm]: 7.96 (pt, 2H, Acridin-Protonen), 8.27 (m, 4H, Acridin-Protonen),
(300 MHz) (DMSO d_6) 8.6 (m, 2H, Acridin-Protonen);

Summenformel: $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{ClNO}$, 241.67.

14.2.40 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Kupplung von 106a mit den Verbindungen 100b und 102b

Die Durchführung verläuft analog zu 14.2.36 (S. 185). 2 mmol des Säurechlorids 106a entsprechen hier 485 mg.

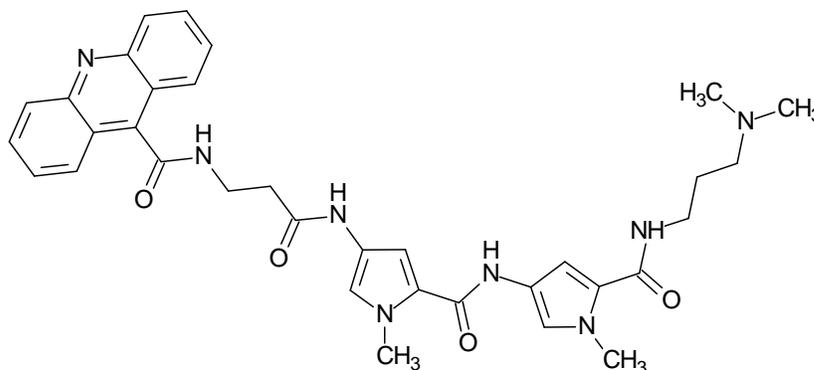
14.2.40.1 N9-(3-([5-([3-(Dimethylamino)propyl]amino)carbonyl]-1-methyl-1H-

3-pyrrolyl]amino}-3-oxopropyl)-9-acridincarboxamid (106)

- Einwaage: 445 mg **100b**
- Ausbeute: 80 mg (0.16 mmol) (10.7 %), ockerfarbener Feststoff
- Schmelzpunkt: ab 140 °C Zersetzung
- ¹H-NMR, δ [ppm]: 1.63 (quint., 2H, ³J=6.7 Hz, CH₂), 2.22 (s, 6H, 2 CH₃), 2.34 (t, 2H, ³J=6.7 Hz, CH₂), 2.72 (t, 2H, ³J=6.3 Hz, CH₂), 3.18 (2q, 4H, 2 CH₂), 3.79 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 6.7 (s, 1H, Pyrrol-H-3), 7.18 (s, 1H, Pyrrol-H-5), 7.57 (pt, 2H, Acridin-H-2+7), 7.85 (pt, 2H, Acridin-H-3+6), 8.0 (pd, 2H, Acridin-H-4+5), 8.14 (t, 1H, NH), 8.15 (pd, 2H, Acridin-H-1+8), 9.12 (t, 1H, ³J=5.0 Hz, NH), 10.03 (s, 1H, NH);
- ¹³C-NMR, δ [ppm]: 27.04 (CH₂), 35.68 (CH₂), 36.31 (CH₃), 36.43 (CH₂), 37.18 (CH₂), 45.01 (2 CH₃), 57.05 (CH₂), 103.51 (CH), 117.85 (CH), 122.31 (C_q), 123.27 (C_q), 126.16 (2 CH), 126.89 (2 CH), 129.47 (2 CH), 130.9 (2 CH), 142.65 (C_q), 148.44 (4 C_q), 161.49 (CO), 166.37 (CO), 167.67 (CO);
- FD-MS: m/z (%): 501.5 (100)
- Summenformel: C₂₈H₃₂N₆O₃, 500.6
- IR (FT, cm⁻¹): 3300, 3050, 2940, 1640, 1580, 1520, 1470, 1435, 1410, 1270, 1130, 1100, 1050, 750.

14.2.40.2 N9-(3-{{[5-{{[3-(Dimethylamino)propyl]amino}carbonyl]-1-

methyl-1*H*-3-pyrrolyl]amino}carbonyl)-1-methyl-1*H*-3-pyrrolyl]amino}-3-oxopropyl)-9-acridincarboxamid (107)



- Einwaage: 630 mg **102b**
- Ausbeute: 90 mg (0.14 mmol) (9.6 %), ockerfarbener Feststoff
- Schmelzpunkt: ab 165°C Zersetzung
- ¹H-NMR, δ [ppm]: 1.68 (quint., 2, ³J=6.4 Hz, CH₂), 2.37 (s, 6H, 2 CH₃), 2.53 (t, 2H, CH₂), 2.74 (t, 2H, ³J=6.6 Hz, CH₂), 3.21 (2q, 4H, 2CH₂), 3.79 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 3.84 (s, 3H, Pyrrol-CH₃), 6.86 (s, 1H, Pyrrol-H-3), 6.93 (s, 1H, Pyrrol-H-5), 7.18 (s, 1H, Pyrrol-H-3'), 7.24 (s, 1H, Pyrrol-H-5'), 7.56 (pt, 2H, Acridin-H-2+7), 7.85 (pt, 2H, Acridin-H-3+6), 8.01 (pd, 2H, Acridin-H-4+5), 8.1 (t, 1H, NH), 8.16 (pd, 2H, Acridin-H-1+8), 9.14 (t, 1H, ³J=4.9 Hz, NH), 9.91 (s, 1H, NH), 10.09 (s, 1H, NH);
- ¹³C-NMR, δ [ppm]: 26.44 (CH₂), 35.61 (CH₂), 36.28 (CH₃), 36.46 (CH₃), 36.72 (CH₂), 37.2 (CH₂), 44.25 (2 CH₃), 56.41 (CH₂), 104.19 (CH), 104.55 (CH), 118.25 (CH), 118.49 (CH), 122.07 (C_q), 122.38 (C_q), 123.04 (C_q), 123.12 (C_q), 126.14 (2 CH), 126.89 (2 CH), 129.48 (2 CH), 130.92 (2 CH), 142.64 (C_q), 148.46 (4 C_q), 158.72 (CO), 161.67 (CO), 166.39 (CO), 167.76 (CO);
- FD-MS: m/z [%]: 623.8 (100)
- Summenformel: C₃₄H₃₈N₈O₄, 622.73
- IR (FT, cm⁻¹): 3290, 1640, 1580, 1530, 1460, 1430, 1400, 1260, 1140, 1090, 1060, 815, 760.

15. Literaturverzeichnis

- [1] Homepage: www.rki.de/GBE/KREBS/KID2004/KID2004_.pdf
- [2] B.S.P. Reddy, S.K.Sharma, J.W.Lown, *Curr.Med.Chem.* 8 (2001), 475-508
- [3] M.Gniazdowski, W.A.Denny, S.M.Nelson, M.Czyz, *Curr.Med.Chem.* 10 (2003), 909-924
- [4] U.Pindur, G.Fischer, *Curr.Med.Chem.* 3 (1996), 379-406
- [5] V.A.Ryabinin, *Eur.Med.Chem.* 35 (2000), 989-1000
- [6] K.Bielawski, A.Bielawski, D.Bartulewicz, A.Rózanski, *Act.Bioch.Pol.* 47, No.3 (2000), 855-866
- [7] C.Bailly, J.-P.Hénichart, *Bioconjugate Chemistry* 2 (1991), 379-393
- [8] Spartan `04 Windows – Tutorial and User’s Guide, Wavefunction Inc.
- [9] Homepage: www.rcsb.org/pdb
- [10] H.M.Berman, S.Neidle, C.Zimmer, H.Thrum, *Bioch.Bioph.Act.* 561 (1979), 124-131
- [11] C.Bailly, J.B.Chaires, *Bioconjugate Chemistry* 9, No.5 (1998), 513-538
- [12] P.B.Dervan, *Science* 232 (1986), 464-471
- [13] M.A.Krivtsova, E.B.Moroshkina, E.N.Glibin, E.V.Frisman, *Molecular Biology* 18 (1984), 950-956
- [14] Z.Zhang, P.Herdewijn, *Curr.Med.Chem* 8 (2001), 517-531
- [15] C.Hotzel, A.Marotto, U.Pindur, *Eur.Med.Chem.* 37 (2002), 367-378
- [16] C.Bailly, *Curr.Med.Chem.* 7 (2000), 39-58
- [17] L.-H.Meng, Z.-Y.Liao, Y.Pommier, *Curr.Top.Med.Chem.* 3 (2003), 305-320
- [18] L.H.Hurley, *Nature Reviews/Cancer* 2 (2002), 188-200
- [19] D.S.Goodsell, *Curr.Med.Chem.* 8 (2001), 509-516
- [20] J.W.Lown, *J.Mol.Recognit.* 7 (1994), 79-88
- [21] J.G.Pelton, D.E.Wemmer, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86 (1989), 5723-5727
- [22] P.B.Dervan, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9 (2001), 2215-2235
- [23] C.L.Kielkopf, S.White, J.W.Szewozyk, J.M.Turner, E.Baird, P.B.Dervan, D.C.Rees, *Science* 282 (1998), 111-115
- [24] M.Mrkisch, P.D.Dervan, *J.Am.Chem.Soc.* 116 (1994), 3663-3664
- [25] S.Foister, M.A.Marques, R.M.Doss, P.B.Dervan, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11 (2003), 4333-4340
- [26] J.M.Belitsky, D.H.Nguyen, N.R.Wurtz, P.B.Dervan, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10 (2002), 2767-2774
- [27] J.M.Gottesfeld, L.Neely, J.W.Trauger, E.E.Baird, P.B.Dervan, *Nature* 387 (1997), 202
- [28] P.E.Nielsen, M.Egholm, R.H.Berg, O.Buchardt, *Science* 254 (1991), 1497-1500
- [29] E.Uhlmann, A.Peyman, G.Breipohl, D.W.Will, *Angew.Chem.* 110 (1998), 2954-2983
- [30] M.Egholm, O.Buchardt, L.Christensen, C.Behrens, S.M.Freier, D.A.Driver, R.H.Berg, S.K.Kim, B.Norden, P.E.Nielsen, *Nature* 365 (1993), 566-568
- [31] R.Gambari, *Curr.Med.Chem.* 11 (2004), 1253-1263
- [32] P.E.Nielsen, *Accounts of Chemical Research* 32, No.7 (1999), 624-630
- [33] A.H.Krotz, S.Larsen, O.Buchardt, M.Erikson, P.E.Nielsen, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 6 (1998), 1983-1992
- [34] C.Hotzel, Dissertation “Design und Synthese von Oligopyrrolcarboxamiden als neue DNA-Liganden mit potentieller Antitumoraktivität” (2003)
- [35] A.Eliadis, D.R.Phillips, J.A.Reiss, A.Skorobogaty, *J.Chem.Soc., Chem.Commun.* 15 (1988), 1049-1052
- [36] A.Ciucci, S.Manzini, P.Lombardi, F.Arcamone, *Nucleic Acids Research* 24 (1996), 311
- [37] E.Nishiwaki, S.Tanaka, H.Lee, M.Shibuya, *Heterocycles* 27, No.8 (1988), 1945-1952
- [38] T.Lemster, U.Pindur, *Rec.Res.Devel.Org.Biorg.Chem.* 5 (2002), 99-115
- [39] H.L.Wheeler, L.M.Liddle, *J.Am.Chem.Soc.* 30 (1908), 1152-1156
- [40] Z.Timár, L.Kovács, G.Kovács, Z.Schmél, *J.Chem.Soc., Perkin Trans.1* (2000), 19-26
- [41] M.Endová, M.Masojdková, I.Rosenberg, *Nucleosides & Nucleotides* 16 (12) (1997), 2151-2164
- [42] M.Hisatome, N.Maruyama, K.Ikeda, T.Furutera, T.Ishikawa, K.Yanakawa, *Chem.Pharm.Bull.* 44 (10) (1996), 1801-1811
- [43] T.Wieland, J.Faesel, H.Faulstich, *Liebigs Ann.Chem.* 713 (1968), 201-208
- [44] J.Jones, *Synthese von Aminosäuren und Peptiden*, Wiley-VCH Verlag (1999)
- [45] E.Bald, K.Saigo, T.Mukaiyama, *Chemistry Letters* 4 (1975), 1163-1166
- [46] Homepage: <http://dtp.nci.nih.gov>
- [47] M.Facompré, B.Baldehyrou, C.Bailly, F.Anizon, C.Marminon, M.Prudhomme, P.Colson, C.Houssier, *Eur.Med.Chem.* 37 (2002), 925-932

- [48] A.Marotto, Dissertation "Etablierung und Anwendung von biophysikalischen und molekularbiologischen Methoden zur Untersuchung von Wirkmechanismen neuer Indol-, Carbazol- und Oligopyrrolcarboxamid-Derivate als potentielle antitumoraktive Stoffe" (2001)
- [49] C.Tardy, M.Facompré, W.Laine, B.Baldeyrou, D.Garcia-Gravalos, A.Francesch, C.Mateo, A.Pastor, J.A.Jiménez, I.Manzanares, C.Cuevas, C.Bailly, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12 (2004), 1697-1712
- [50] F.Charmantroy, M.Demeunynck, D.Carrez, A.Croisy, A.Lansiaux, C.Bailly, P.Colson, *J.Med.Chem.* 46 (2003), 967-977
- [51] J.M.Berg, J.L.Tymoczko, L.Stryer, *Biochemie*, 5.Auflage, Spektrum, Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin (2002), 829-835
- [52] J.Kluza, B.Baldeyrou, P.Colson, P.Rasoanaivo, L.Mambu, F.Frappier, C.Bailly, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 20 (2003), 383-391
- [53] C.Carrasco, P.Helisse, M.Haroun, B.Baldeyrou, A.Lansiaux, P.Colson, C.Houssier, S.Giorgi-Renault, C.Bailly, *ChemBioChem* 4 (2003), 50-61
- [54] C.Bailly, *Methods in Enzymology* 340 (2001), 610-623
- [55] G.Rücker, M.Neugebauer, G.G.Willems, *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*, 3.Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (2001), 56-65
- [56] C.Bourdouxhe-Housiaux, P.Colson, C.Houssier, M.J.Waring, C.Bailly, *Biochemistry* 35, No.13 (1996), 4251-4264
- [57] S.Prado, S.Michel, F.Tillequin, M.Koch, B.Pfeiffer, A.Pierré, S.Léonce, P.Colson, B.Baldeyrou, A.Lansiaux, C.Bailly, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14 (2004), 3943-3953
- [58] B.Armitage, *Chem.Rev.* 98 (1998), 1171-1200
- [59] C.Hotzel, A.Marotto, U.Pindur, *Eur.Med.Chem.* 38 (2003), 189-197
- [60] W.M.Cholody, S.Mastelli, J.Paradziej-Lukowicz, J.Konopa, *J.Med.Chem.* 33 (1990), 49-52
- [61] W.M.Cholody, S.Mastelli, J.Konopa, *J.Med.Chem.* 35 (1992), 378-382
- [62] W.M.Cholody, S.Mastelli, J.Konopa, *J.Med.Chem.* 33 (1990), 2852-2856
- [63] W.M.Cholody, L.Hernandez, L.Hassner, D.A.Scudiero, D.B.Djurickovic, C.J.Michejda, 38 (1995), 3043-3052
- [64] R.I.Fryer, E.Grunberg (Hoffmann-La Roche), United States Patent 3,681,360 (1972)
- [65] R.Hegde, P.Thimmaiah, M.C.Yerigeri, G.Krishnegowda, K.N.Thimmaiah, P.J.Houghton, *Eur.Med.Chem.* 39 (2004), 161-177
- [66] N.V.Eldho, M.Saminathan, D.Ramaiah, *Synth.Commun.* 29 (22) (1999), 4007-4014
- [67] O.J.Magidson, A.M.Grigorowsky, *Chemische Berichte* 69 (1936), 396-412
- [68] L.S.Lerman, *J.Mol.Biol.* 3 (1961), 18-30
- [69] L.S.Lerman, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 49 (1963), 94-105
- [70] B.C.Baguley, *Anticancer Drug Design* 6 (1991), 1-35
- [71] K.Gorlewska, Z.Mazerska, P.Sowinski, J.Konopa, *Chem.Res.Tox.* 14, No.1 (2001), 1-10
- [72] C.Bailly, J.P.Hénichart, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 167 (1990), 798-806
- [73] C.Bailly, M.Collin-d'Hooghe, D.Lantoine, C.Fournier, B.Hecquet, P.Fosse, J.M.Saucier, P.Colson, C.Houssier, J.P.Hénichart, *Biochem.Pharmacol.* 43 (1992), 457-466
- [74] C.Bailly, C.Oh Uigin, R.Houssin, P.Colson, C.Houssier, C.Rivallé, E.Bisagni, J.P.Hénichart, *Mol.Pharmacology* 41 (1992), 845-855
- [75] C.Boudouxhe-Housiaux, P.Colson, M.J.Waring, C.Bailly, *Biochemistry* 35, No.14 (1996), 4251-4264
- [76] H.Lettau, *Chemie der Heterocyclen*, 1.Auflage, Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig (1980)
- [77] J.March, *Advanced Organic Chemistry*, Fourth Edition, Wiley, New York (1992)
- [78] J.P.Reboul, B.Cristau, J.C.Soyfer, *Acta.Cryst.* B36 (1980), 2683-2688
- [79] I.Gozlan, M.Halpern, M.Rabinovitz, D.Aomir, *Heterocyclic Chem.* 19 (1982), 1569-1571
- [80] M.F.Brana, J.M.C.Berlanga, C.M.Roldan, DE Patent 2,318,136 (1973), C.A.86; 106,236 (1977)
- [81] J.M.Castellano, C.M.Roldan, C.Roldan, *Eur.Med.Chem.-Chimica Therapeutica* 16, No.3 (1981), 207-212
- [82] Y.-H.Hsiang, J.B.Jiang, L.F.Liu, *Molecular Pharmacology* 36 (1989), 371-376
- [83] A.G.Gancedo, C.Gil-Fernández, P.Vilas, S.Perez, E.Paez, F.Rodriguez, M.F.Brana, C.M.Roldán, *Arch.Virol.* 74 (1982), 157-165
- [84] C.M.Roldan, S.J.Cubero, F.Rubio, *Diag.Biol.* XXVIII (1979), 443
- [85] M.F.Brana, A.Raines, *Curr.Med.Chem-Anti Cancer Agents* 1 (2001), 237-255
- [86] C.Bailly, M.Brana, J.Waring, *J.Eur.Biochem* 240 (1996), 195-202
- [87] B.Halliwell, J.M.C.Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2.Auflage (1989), 341-345
- [88] W.R.Wilson, R.F.Anderson, W.A.Denny, *J.Med.Chem.* 32 (1989), 23-30

- [89] A.Bartoszek, P.Dackiewicz, J.Konopa, A.Skladanowski, *Chemico-Biological Interactions* 103 (1997), 131-151
- [90] M.Alexiou, J.Tyman, I.Wilson, *Tetrahedron Letters* 22, No.24 (1981), 2303-2306
- [91] Y.Takahashi, T.Miyashi, Ung Chan Yoon, Sun Wha Oh, M.Mancheno, Z.Su, D.F.Falvey, P.S.Mariano, *J.Am.Chem.Soc.* 121 (1999), 3926-3932
- [92] D.V.Patel, F.VanMiddlesworth, J.Donaubauer, P.Gannett, C.J.Sih, *J.Am.Chem.Soc.* 108 (1986), 4603-4614
- [93] H.Günther, *NMR-Spektroskopie*, 2.Auflage (1983), 82
- [94] C.Kunick, T.Lemcke, *Pharmazeutische Zeitung* 23/2002, 22-29
- [95] A.Link, *Pharmazeutische Zeitung* 43/2001, 10-16
- [96] G.Bischoff, S.Hoffmann, *Curr.Med.Chem.* 9, No.3 (2002), 321-348
- [97] P.Helissey, C.Bailly, J.N.Vishwakarana, C.Auclair, M.J.Waring, S.Giorgio-Renault, *Anti-Cancer-Drug-Design* 11 (1996), 527-551
- [98] M.Jansen, Dissertation „Antagonisten der Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors“ (2001)
- [99] G.Zerza, M.C.Scharber, C.J.Brabec, N.Serdar Saricifta, R.Goméz, J.L.Segura, N.Martín, V.I.Srdanov, *J.Phys.Chem.A* 104, No.35 (2000), 8315-8322
- [100] I.Fleming, *Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions*, John Wiley & Sons, Ltd. 1976
- [101] K.Lehmstedt, K.Schrader, *Chem.Ber.* 70 (1937), 838-848
- [102] C.R.Harris, A.Thorarensen, *Curr.Med.Chem.* 11 (2004), 2213-2243
- [103] *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Williams and Wilkins, Baltimore, 3rd edition, Chapter 1, 1-16
- [104] Homepage: www.ccdc.cam.ac.uk
- [105] Auterhoff, Knabe, Höltje, *Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1999), 3
- [106] A.R.Leach, *Molecular Modelling – Principles and Applications*, Addison Wesley Longman Limited (1996)
- [107] R.Mannhold, H.Kubinyi, H.Timmermann, *Molecular Modelling – Basic Principles and Applications*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, VCH Publishers Inc. New York, NY, USA (1997)
- [108] M.Tarui, N.Nomoto, Y.Hasegawa, K.Minoura, M.Do, T.Ishida, *Chem.Pharm.Bull.* 44 (11) (1996), 1998-2002
- [109] H.Singh, P.Aggarwal, S.Kumar, *Synthesis* 6 (1990), 520-522
- [110] Z.Szulc, J.Mlochowski, J.Palus, *Journal für prakt.Chemie*, Band 330, Heft 6 (1988), 1023-1029
- [111] G.Boger, R.M.Claramunt, J.Elguero, M.Fathalla, C.Foces-Foces, C.Jaime, A.L.Llamas-Saiz, *J.Chem.Soc.Perkin Trans.2* (1993), 757

Lebenslauf

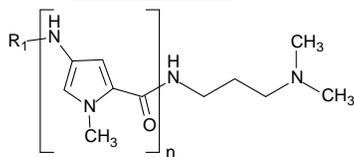
Name: Christoph Matthias Keuser
geboren: am 2. Dezember 1976 in Mainz
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Promotion:
Seit 01.05.2002 Promotion im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. U. Pindur
am Institut für Pharmazie, Mainz
Fachbereich: Chemie und Pharmazie
Thematik: *Design, Synthese und biologische Evaluierung von
Pyrrolcarboxamiden mit Nucleobasen- oder tricyklischer
Aromaten-Funktion*

Beruf: seit November 2002 Tätigkeit als Apotheker in der Hirsch-
Apotheke in 60313 Frankfurt am Main

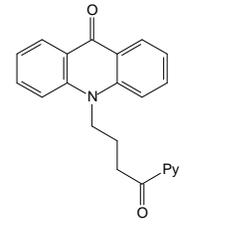
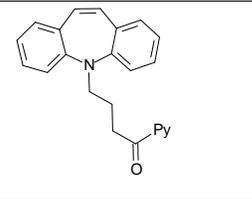
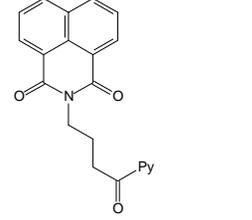
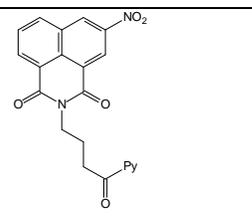
Studium: WS 1997/98 bis SS 2001 Studium der Pharmazie an der
Johannes Gutenberg Universität in Mainz.
Erstes Staatsexamen: August 1999
Zweites Staatsexamen: Oktober 2001
Drittes Staatsexamen: November 2002
Approbation zum Apotheker im November 2002

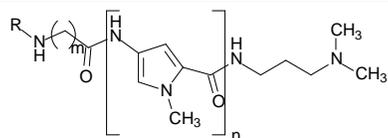
Bundeswehr: 2.9.1996 - 30.6.1997 Wehrdienst beim ABC-Abwehr-
Bataillon 310 in Zweibrücken; Verabschiedung als
Obergefreiter

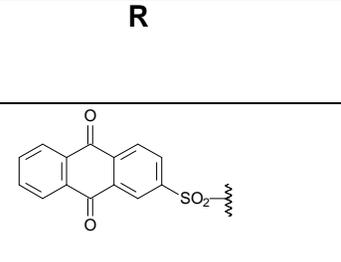
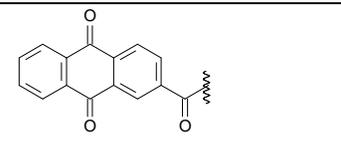
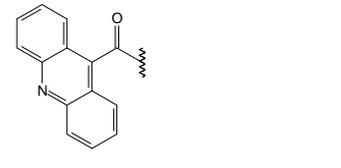
Schule: Von 1983 bis 1987 Alfred Mumbächer Grundschule in
Mainz-Bretzenheim
Von 1987 bis 1996 Bischöfliches Willigis Gymnasium in
Mainz.
Am 17.06.1996 Erreichen der Allgemeinen Hochschulreife.

Formeltafel

R₁	R₂	n	Verbindung Nr.
	-H	1	37
	-CH ₃	1	38
	-H	1	39
		2	40
	-CH ₃	1	41
		2	42
	-H	1	43
		2	44
	-CH ₃	1	45
		2	46
		1	47
		2	48
		1	49
		2	50
		1	79
		2	80
		1	81
		2	82

		1 2	83 84
		2	85
		1 2	86 87
		1 2	88 89



R	m	n	Verbindung Nr.
	2	1	100
	3	1	101
	2	2	102
	3	2	103
	2	1	104
	3	1	105
	2	1	106
	2	2	107

