

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls Universität
Heidelberg

Vorgelegt von

Chemikerin (M.Sc) Sonja Wolf

aus Stuttgart

Tag der mündlichen Prüfung:

16. Februar 2006

Synthese
saccharidhaltiger Substanzbibliotheken zur
Darstellung neuartiger, wasserlöslicher
Therapeutika

Gutachter:
Prof. Dr. Wießler
Prof. Dr. Metzler-Nolte

**Aus der Abteilung Molekulare Toxikologie,
Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Manfred Wießler
am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ),
Heidelberg**

Für meine Eltern

Zusammenfassung

Es wurde eine saccharidhaltige Substanzbibliothek von 37 Verbindungen hergestellt und deren Wirkung auf Krebszellen mit unterschiedlichem p53 Status untersucht. Bekannt ist, dass niedermolekulare Moleküle in der Lage sind an mutiertes p53 zu binden und dessen Funktion wiederherzustellen [Bykov *et al.*, 2002a; Foster *et al.*, 1999]. Des Weiteren ist bekannt, dass durch die erhöhte biologische Aktivität in Tumorzellen glycosilierte Tumortherapeutika eine selektive Anreicherung der Cytostatika in Tumorzellen ermöglichen [Veyl *et al.*, 1998; Brock *et al.*, 2000].

Ziel der Arbeit war es durch den Einsatz von Parallelsynthese eine saccharidhaltige Substanzbibliothek herzustellen. Die Wirkung dieser Substanzen auf verschiedene Tumorzelllinien mit unterschiedlichem p53 Status sollte untersucht werden. Idealerweise sollten Substanzen identifiziert werden, die Apoptose in Zelllinien mit mutiertem p53 einleiten.

Alle Substanzen der Bibliothek wurden mittels der Diels-Alder Reaktion hergestellt. Als Diene wurden verschiedene, glycolisierte Furane synthetisiert und eingesetzt. Die Dienophile wurden ausgehend vom Maleinimid als Grundsubstanz hergestellt. Durch Kombination dieser Edukte wurde eine Substanzbibliothek dargestellt, die in einem Cytotoxizitätassay an Tumorzelllinien mit unterschiedlichen p53 Status getestet wurden. Dabei wurde gefunden, dass die Diels-Alder Addukte selbst nur wenig zytotoxisch sind. Es zeigte sich jedoch, dass die Maleinimide, abhängig von ihrer N-Substitution, Zytotoxizität zeigen und im Falle von N-(4-(Bis-(2-chloro-ethyl)-amino)-phenyl)-maleinimid (**63**) bei Saos-2 Zellen auch Apoptose einleiten können. Dieses Ergebnis ist unerwartet, da Maleinimide normalerweise (z.B. MIRA1 [Bykov *et al.* 2002-b]) die spezifische DNA Bindung von p53 wiederherstellen können. Da die Saos-2 Zelllinie kein p53 exprimiert, kann die Apoptoseaktivität von (**63**) nicht auf die Regulation von mutiertem p53 zurückgeführt werden. Vermutet wird daher, dass die Zytotoxizität der Maleinimide durch einen anderen Wirkmechanismus bedingt ist. Spekuliert werden kann, dass die Apoptoseaktivität der Verbindung (**63**) über die N-lost Funktionalität, die eine Interkalation der Verbindung in DNA bewirken kann, eingeleitet wird.

Summary

A saccharide based library containing 37 new substances was synthesized. The bioactivity of those compounds was tested on three tumour cell lines with different p53 status. It is known that small, low molecular weight compounds can bind to p53, which is mutated, and restore its functionality [Bykov et al., 2002a, Foster et al., 1999] It is also known that tumour cells selectively accumulate glycosylated antitumour agents, due to their higher biological activity [Veyl et al., 1998, Brock et al., 2000].

The purpose of this project was to generate a saccharide based library by employing the principle of parallel synthesis. The bioactivity of those compounds was assed on tumour cell lines with different p53 status. In an ideal case substances that initiate apoptosis in cell lines with mutated p53, should have been identified.

All compounds of the library were obtained via the Diels-Alder reaction. Various glycosylated furans were used as diens. The dienophiles were synthesized using maleinimide as starting material. By combining the various diens with the dienophiles the library was generated. The products were tested on three cell lines with different p53 status. The Diels-Alder products did not show any significant cyto-toxicity. It was found though that the maleinimides, depending upon their N-substitution, were cyto-toxic, and in the case of *N*-(4-(Bis-(2-chloroethyl)-amino)-phenyl)-maleinimide (**63**) did initiate apoptosis in Saos-2 cells.

This result was unexpected since maleinimides (i.e. MIRA 1 [Bykov *et al*, 2002b]) can restore the specific DNA-binding properties of p53. Since Saos-2 cells do not express any p53, the induction of apoptosis by (**63**) can not be attributed to the regulation of mutated p53. It is assumed that the cyto-toxicity of the maleinimides is based on a different mode of action. It can be speculated that the induction of apoptosis by (**63**) is triggered by the N-lost functionality. The N-lost function can intercalate into DNA and induce Apoptosis over this mode of action, or interact with another target in the cell.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	9
Summary	10
Inhaltsverzeichnis	11
Abkürzungsverzeichnis	13
1 Einleitung	15
1.1 Tumorthherapie	15
1.2 Apoptose und Krebstherapie	17
1.3 p53 und Krebstherapie	25
1.3.1 Mechanismen zur Wiederherstellung der p53 Funktion durch neue Therapeutika:	30
1.3.2 CP-31398	31
1.3.3 WR1065	33
1.3.4 PRIMA-1 und MIRA-1	34
1.3.5 Peptide	35
1.4 Glucose: Drug-targeting für Tumorzellen	37
1.5 Kombinatorische Chemie und Wirkstoffsuche	39
1.5.1 Was ist eine Leitstruktur ?	42
1.5.2 Virtuelles Screening und Modelling in der Wirkstoffsuche	44
2 Aufgabenstellung und Zielsetzung	46
3 Ergebnisse	48
3.1 Chemische Synthese	48
3.1.1 Darstellung der Furankomponenten	51
3.1.2 Synthese sekundärer Aminderivate	57
3.1.3 Synthese weiterer Furanderivate:	58
3.1.4 Darstellung der Maleinimidkomponenten	60
3.1.5 Diels-Alder Reaktionen:	62
3.1.6 Nicht-Glycosilierte DA-Produkte:	63
3.1.7 Darstellung der Monoglycosilierten Diels-Alder Produkte:	65
3.1.8 Darstellung von Di-glycosilierten Diels-Alder Addukten:	66
3.1.9 NMR-Untersuchungen der Diels-Alder Addukte	66
3.1.10 Weitere Synthesen	70
3.1.11 Stabilitätsuntersuchungen in wäßrigen Lösungen	71
3.2 Molecular Modeling der p-53 Rescue Molekülen	77
3.3 Biologische Wirksamkeit <i>in vitro</i>	81
3.3.1 Allgemeine Wachstumskurve	81
3.3.2 Wachstumsverhalten auf der 96-Well Platte	82
3.3.3 Toxizitätsuntersuchungen	84
3.3.4 Morphologische Veränderungen der Zellen	93
3.4 Untersuchungen zum Zelltod	98
3.4.1 DNA-Fragmentierungs-Assays	99
3.4.2 Bestimmung des Zelltodes mittels Durchflusscytometrie (FACS)	
103	
4 Diskussion und Ausblick	110
4.1 Chemische Synthese	110
4.1.1 Synthese der Furankomponenten	111
4.1.2 Synthese der Maleinimide	113

4.1.3	Diels-Alder Verbindungen.....	114
4.2	Biologische Wirksamkeit in vitro	116
4.2.1	Zelllinien	116
4.2.2	Cytotoxizität und Zelltod	118
5	Material und Methoden	123
5.1	Materialien zur chemischen Synthese und Analytik.....	123
5.2	Zellkultur	125
5.2.1	Allgemeine Methode für die laufende Kultivierung.....	127
5.2.2	Zellzahlbestimmung mittels des XTT-Tests:.....	130
5.2.3	Wachstumskurven:	131
5.2.4	Zytotoxizitätstest:.....	131
5.2.5	Apoptosebestimmung mit Annexin V/ Propidiumiodid; Durchfluss- zytometrie	131
5.2.6	DNA- Fragmentierungs ELISA.....	132
5.2.7	Isolation von apoptotischen DNA-Fragmenten	134
6	Synthesevorschriften	136
6.1	Synthese der Furanderivate.....	136
6.1.1	Allgemeine Synthesevorschrift zur Darstellung der sekundären Aminderivate	137
6.1.2	Allgemeine Synthesevorschrift der Furanamidderivate	141
6.2	Darstellung der Maleinimide	145
6.2.1	Allgemeine Darstellungsvorschrift für Maleinimide mit NMM:....	146
6.3	Synthese der Diels-Alder Verbindungen:.....	154
6.3.1	Allgemeine Synthesevorschrift	154
6.4	Allgemeine Synthesevorschrift zur Darstellung der Succinimide und hydrierten Diels-Alder Verbindungen.....	171
6.5	Synthese von CP-391398.....	174
6.6	Festphasensynthese des Peptides REDEDIEW-NH ₂ (121) und des korrespondierenden N-hexylsäure Maleinimides (122)	175
7	Literatur.....	177
8	Danksagung.....	186

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl-
ACN	Acetonitril
Ac ₂ O	Acetanhydrid
ATP	Adenosintriphosphat
Bn	Benzyl-
Bz	Benzoyl-
°C	Grad Celsius
COSY	Correlated Spectroscopy
DA	Diels-Alder Reaktion
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
δ	Chemische Verschiebung in ppm (parts per million)
DEPT	Distortionless enhancement by polarisation transfer
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMEM	Dulbecco's Modified Egel's Medium
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethlyendiamintetraessigsäure
eq.	Äquivalent
ESI	Electron spray ionisation
Et	Ethyl-
Et ₃ N	Triethylamin
Et ₂ O	Diethylether
FCS	Fötales Kälberserum
FACS	Fluorescence activated cell sorter
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
Glu	Glucose
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HPLC	High performance liquid chromatography

IC ₅₀	Inhibition concentration of 50%
J	Kopplungskonstante in Hz
KG	Kieselgel
MCF-7	humane Brustadenokarzinomzelllinie
MDA MB 435 S	humane Brustkarzinomzelllinie
Me	Methyl-
MeOH	Methanol
mg	Milligramm [10^{-3} g]
ml	Milliliter [10^{-3} l]
mM	Millimolar [10^{-3} mol/l]
mmol	Millimol [10^{-3} mol]
MS	Massenspektrometrie
µg	Microgramm [10^{-6} g]
µl	Microliter [10^{-6} l]
µM	Micromolar [10^{-6} mol/l]
µmol	Micromol [10^{-6} mol]
n.d.	nicht durchgeführt
NMR	Nuclear magnetic resonance
p.a.	pro analysi
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
PMS	<i>N</i> -Methyl-dibenzopyrazin Methylsulfat
PBS	Phosphate buffered Saline
R _f	related to front
RT	Raumtemperatur
Saos-2	humane Osteosarkomzelllinie
SC	Säulenchromatographie
T _r	Retentionszeit
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl-
Triflat	Trifluormethansulfonat
U	unit [Einheit]
UV	Ultraviolett
XTT	Natrium-3'-[(Phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis-[4-methoxy-6-nitro]benzol Sulfonsäure hydrat

1 Einleitung

1.1 Tumorthherapie

Krebs ist eine gefürchtete Krankheit. Der Begriff Krebs steht im eigentlichen Sinne für viele Krankheiten, welches eines der hauptsächlichen Probleme der Krebsbehandlung darstellt. Es gibt verschiedene Auslöser, mehrere Kofaktoren und Promotern, als auch verschiedene zelluläre Schädigungen der körpereigenen Zellen. Diese transformierten Zellen wachsen und teilen sich immer wieder in einer unkontrollierten Art und Weise. Trotzdem unterscheiden sie sich anfänglich nur sehr wenig vom normalen Gewebe, aus dem sie entstehen. Somit ist die Biochemie und der molekulare Regulationsmechanismus des Krebs ähnlich zu denen der körpereigenen Zellen. Tumorzellen sind nicht wie eine bakterielle Infektion, die von dem Immunsystem als Fremdkörper identifiziert wird. Zwar gibt es eine Immunreaktion gegen Krebszellen, aber wenn ein Tumor etabliert ist, wird diese immer weniger effektiv. Mit dem Wort "Krebs" beschreibt man in der Umgangssprache bösartige Neubildungen. Häufig benutzt man auch das Wort Tumor, was ins Deutsche übersetzt "Verhärtung" bedeutet. Gutartige (benigne) Neubildungen bestehen aus Zellen, die in der Regel beim Wachstum das umgebende Gewebe nicht durchdringen d.h. sie wandern nicht aus und erzeugen damit keine Tochtergeschwülste. Die häufigsten sind die sogenannten Muttermale, die Fettgeschwülste (Lipome), die Gefäßgeschwülste (Hämangiome) und die Muskelzellgeschwülste (Myome). Die gutartigen Neubildungen können allerdings auch lebensbedrohlich werden, z.B. wenn sie durch ihr Wachstum auf lebenswichtige Organe wie das Gehirn oder das Rückenmark drücken oder wenn sie platzen und dabei eine starke Blutung entsteht. Bösartige (maligne) Neubildungen, also Krebs, bestehen aus entarteten Zellen, die anders als normale Zellen aussehen, sich anders und schneller teilen und dabei das gesunde Gewebe zerstören. Auch können Zellen, die im gesunden Gewebe zu keiner Zellteilung mehr fähig sind (wie zum

Beispiel Nervenzellen), im transformierten Zustand, also als Krebszelle, wieder in den Zellzyklus eintreten und sich teilen. Krebszellen wandern vom Ursprungsort aus über Blut oder das Lymphsystem in andere Organe und vermehren sich dort als Tochtergeschwülste (Metastasen) weiter. Es gibt zwei große Gruppen von bösartigen Neubildungen:

- Die soliden, also festen bzw. harten Tumore: *Karzinome*: Sie entstehen aus entarteten Epithelzellen, der Schleimhaut sowie Drüsenzellen, und *Sarkome*: sie entstehen aus entarteten Bindegewebszellen als Fibrosarkome, aus Muskelzellen als Myosarkome, aus Fettzellen als Liposarkome aus Knochenzellen als Osteosarkome u.a.
- Die bösartigen Hämoblastosen, wie z.B. Leukämien. Sie entstehen aus den Zellbestandteilen des Blutes und der Blutbildungsorgane.

Nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts in Berlin sind 1998 in Deutschland rund 168.000 Männer und 179.000 Frauen an bösartigen Neubildungen, also Krebs, erkrankt (zum Vergleich: 1998 lebten in der Bundesrepublik Deutschland rund 82 Millionen Einwohner) [Robert Koch Institut]. Nur etwa 30% dieser Menschen war jünger als 60 Jahre. Diese Tatsache zeigt eindrucksvoll, dass Krebs in erheblichem Maße eine Alterserkrankung ist. Rund 210000 Menschen erliegen jährlich ihrem Krebsleiden, was ungefähr ein Viertel aller Todesfälle pro Jahr ausmacht. Damit ist die Krebserkrankung die zweithäufigste Todesursache nach den Herz-Kreislauf-Krankheiten, die etwa die Hälfte der Todesfälle ausmacht. [Statistisches Bundesamt, 2000]. Allerdings wird ein Rückgang in der Sterblichkeit der Herz-Kreislauf-Erkrankungen beobachtet, so dass Krebs in den nächsten zehn Jahren zur häufigsten Todesursache in Deutschland werden könnte [Becker *et al.*, 1997]. Die Behandlung von Krebs stützt sich nach wie vor auf drei Methoden: Operation, Bestrahlung mit Röntgen- oder Gammastrahlung, sowie der antineoplastische Chemotherapie, die häufig parallel zu den anderen beiden Methoden eingesetzt wird. Jedoch konnte trotz vieler neuartiger Chemotherapeutika, verbesserter Strahlentherapie und neuester Operationstechniken die Heilungsrate maligner Tumore nicht entscheidend verbessert werden. Ungefähr 40% der Patienten werden chemotherapeutisch

behandelt, und bei ungefähr einem Dutzend Krebsformen lässt sich eine Remission erzielen. Dazu gehören akute lymphatische Leukämien, Morbus Hodgkin und Hodenkarzinome. Dies sind in der Regel schnell wachsende Tumore, die durch chemotherapeutische Maßnahmen gut zu behandeln sind. Allerdings konnte z.B. die Sterberate beim metastasierenden Mammakarzinom auch durch den Einsatz verschiedenster Chemotherapeutika wenig beeinflusst werden [Petru, 1987]. Die Mehrzahl der Tumore wächst relativ langsam, und hier liegt die Heilungschance hauptsächlich in der Früherkennung und der operativen Behandlung [Zeller, 2000]. Nachteilig an der Chemotherapie sind die oftmals schweren Nebenwirkungen durch die unselektive Wirkung der Therapeutika. Gesundes Gewebe wird dabei genauso vom Pharmakon erreicht, wie der Tumor. Die Entwicklung neuartiger Chemotherapeutika mit höherer Selektivität ist somit eine wichtige Aufgabe in der Wirkstoffsuche.

1.2 Apoptose und Krebstherapie

Sowohl Bestrahlung als auch antineoplastische Therapie haben das Ziel, Krebszellen zu töten. Der Zelltod kann nach zwei eindeutigen Mechanismen erfolgen: Nekrose oder Apoptose [Schwartzman, *et al.*, 1993; Vermes, *et al.*, 1994]. Nekrose, oder auch der zufällige Zelltod genannt, ist ein pathologischer Prozess, der eintritt, nachdem die Zellen schweren Schädigungen durch physikalische oder chemische Einflüsse ausgesetzt sind. Apoptose, oder der programmierte Zelltod, ist ein physiologischer Prozess, bei dem unerwünschte oder unnütze Zellen während der Entwicklung oder anderer biologischer Prozesse eliminiert werden. Die zwei Zelltod-Arten unterscheiden sich in einer Reihe von beobachtbaren morphologischen und biochemischen Veränderungen [Vermes, *et al.*, 1994]. Nekrose findet statt, wenn die Zelle extremen physikalischen Bedingungen ausgesetzt wird, wie z.B. Hypothermia oder Hypoxie, welche eine Beschädigung der Plasmamembran zur Folge haben kann. Nekrose beginnt mit der Beeinträchtigung der Fähigkeit der Zelle ihre Homöostase aufrechtzuerhalten, was zu der Aufnahme von Wasser und extrazellulären Ionen führt. Dabei schwellen die intrazellulären Organellen, vor

allen die Mitochondrien und die gesamte Zelle stark an, und es kommt zur Zellyse. Durch den endgültigen Zusammenbruch der gesamten Plasmamembran, wird der Inhalt des Cytoplasmas einschließlich der lysosomalen Enzyme in das extrazelluläre Medium abgegeben. *In vivo* führt Nekrose deswegen zur extensiven Beschädigung des Gewebes und hat somit Entzündungserscheinungen zur Folge.

Im Gegensatz dazu findet die Apoptose unter normalen physiologischen Bedingungen statt und die Zelle trägt selbst zu ihrem ‚Selbstmord‘ bei. Apoptose findet hauptsächlich bei normalen Zellumsatz, Gewebemöostase, Embryogenese, Induktion und Aufrechterhaltung des Immunsystems, der Entwicklung des Nervensystems, als auch bei endokrin-abhängigen Gewebeatrophie statt. Zellen, die Apoptose einleiten, zeigen charakteristische biochemische und morphologische Veränderungen [Cohen, 1993]. Dazu gehören die Verdichtung des Chromatins, die Kondensation des Zellkerns und des Cytoplasmas und letztendlich die Aufteilung des Cytoplasmas und des Zellkerns in Membran eingehüllte Vesikel (‚apoptotic bodies‘), die Ribosomen, morphologisch intakte Mitochondrien und Kernmaterial besitzen. *In vivo* werden diese ‚apoptotic bodies‘ sehr schnell erkannt und durch Makrophagen oder angrenzende Epithelzellen phagozytiert [Savill, *et al.*, 1989]. Wegen dieses effizienten Aufräum-Mechanismus finden keine Entzündungsprozesse statt. *In vitro* schwellen diese Vesikel und die verbleibenden Zellfragmente an und eine Lyse findet statt. Diese terminale Phase des *in vitro* Zelltodes wird somit auch oft als ‚sekundäre Nekrose‘ bezeichnet. Cytotoxizität ist die zelltötende Eigenschaft einer chemischen Substanz oder einer Vermittlerzelle wie z.B. cytotoxische T-Zellen. Im Gegensatz zum Begriff der Apoptose oder Nekrose spezifiziert Cytotoxizität nicht den Mechanismus des Zelltodes.

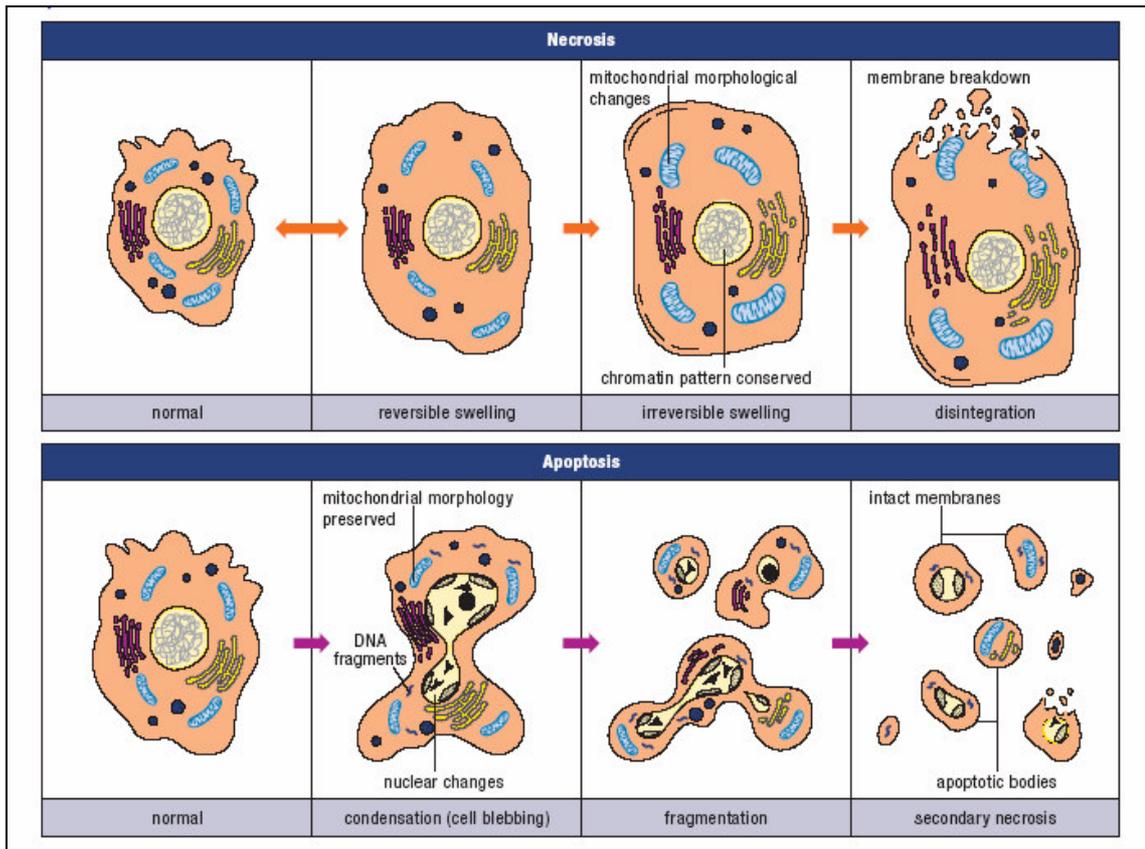


Abb. 1: Darstellung der Morphologischen Veränderungen bei der Nekrose bzw. Apoptose [Roche]

Die morphologischen und biochemischen Veränderungen einer Zelle, die entweder Nekrose oder Apoptose untergeht, sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Nekrose	Apoptose
Morphologische Veränderungen	
Schädigung der Membran	Membran-'blebbing', keine Membranschädigung
Zellkern bleibt intakt	Anhäufung des Chromatins an der Zellkernmembran
Beginnt mit dem Anschwellen des Cytoplasmas und der Mitochondrien	Beginnt mit dem Schrumpfen des Cytoplasmas und der Kondensation des Zellkerns
Endet mit der totalen Zellyse	Endet mit der Fragmentierung der Zelle in kleinere Einheiten
Keine Vesikel Bildung, komplette Zellyse	Bildet kleine Membrangebundene Vesikel („apoptotic bodies“)
Zerfall durch Anschwellen der Zellorganellen	Mitochondriale Membran formt Poren unter Einfluss von bcl-2 Proteinen

Biochemische Veränderungen	
Verlust der Ionenhomöostase	Streng regulierter Prozess, der Aktivierungs- und enzymatische Schritte involviert
Energieunabhängig; der Prozess kann auch bei 4 °C stattfinden	ATP-abhängig – findet nicht bei 4 °C statt
Nicht gesteuerter Verdau von DNA (Schmierbanden der DNA nach Agarose-Gel Elektrophorese)	Kein zufälliger Zerfall der DNA; Verdau in bestimmte Oligonukleotidlängen. DNA-Leitermotiv nach Agarose-Gel Elektrophorese
Post-lytische DNA-Fragmentierung ; Spätes Ereignis des Zelltodes	Pre-lytische DNA-Fragmentierung
	Abgabe von bestimmten Zellfaktoren (Cytochrom c, AIF) in das Cytoplasma durch die Mitochondrien
	Aktivierung der Caspasen-Cascade
	Änderung der Membranasymmetrie (z.B. Translokation von Phosphatidylserin vom Cytoplasma zur extrazellulären Seite der Membran)
Physiologische Bedeutung	
Beeinflusst Gruppierungen von angrenzenden Zellen	Beeinflusst individuelle Zellen
Induziert durch Nicht-physiologische Störungen z.B. lytische Viren, Hypothermie, Hypoxie, metabolische Gifte	Induziert durch physiologische Faktoren, z.B. Hormone und Wachstumsfaktoren
Phagocytose durch Makrophagen	Phagocytose durch benachbarte Zellen oder Makrophagen
Starke Entzündungserscheinungen	Keine Entzündungen

Tab.1: Unterschiede zwischen Nekrose und Apoptose

Die Ausgewogenheit der lebenden und sterbenden Zellen in einem Gewebe muss gewährleistet sein, wenn ein Gewebe die Homöostase aufrechterhalten will. Zuviel Wachstum und zuwenig Zelltod kann zu erheblichen Störungen im Gewebe und schließlich zu Krebs führen [Hanahan, *et al.*, 2000; Krammer, *et al.*, 1998]. Wie zuvor erwähnt, ist die Apoptose ein wichtiger Regulationsmechanismus während der Entwicklung und des Aufrechterhaltens des Gleichgewichts in Geweben. Störungen in den Apoptose-induzierenden ‚Pathways‘ führen letztendlich zu der Anhäufung von neoplastischen Zellen. Die Resistenz gegenüber Apoptose bietet den Tumorzellen die Möglichkeit der Überwachung durch das Immunsystems zu entgehen. Da Chemotherapie und

Bestrahlung meist immer über apoptotische Regulationswege wirken, können Defekte in Tumorzellen zu Resistenzen in der Therapie führen. Prinzipiell existieren zwei alternative Wege, wie Apoptose induziert werden kann. Eine Initiierung erfolgt über die Stimulation von ‚death‘-Rezeptoren, die an der Zelloberfläche exprimiert werden, der so genannte ‚äußere‘ Regulationsweg. Die ‚Death‘-Rezeptoren sind eine Untergruppe der Tumor Nekrose Faktor (TNF) Rezeptor Überfamilie, die durch eine intrazelluläre Domäne, der ‚death-domain‘ gekennzeichnet ist. Diese Rezeptoren werden durch ihre natürlichen Liganden den TNF’s aktiviert. Bindet einer der Liganden an die entsprechenden Rezeptoren, so wie an CD95, TRAIL-R1 (TNF-related apoptosis inducing ligand R1) oder TRAIL-R2, wird das intrazelluläre Adapter Protein FADD rekrutiert, welches dann wiederum die inaktive Form der Caspasen (**c**ystein-**a**sparatyl-**s**pecific **p**roteases) aktiviert. Die andere Möglichkeit Apoptose zu induzieren erfolgt von den Mitochondrien aus und wird deswegen als der ‚innere‘ Regulationsweg bezeichnet [Krammer,1999; Schmitz, 2000]. Dieser Weg wird durch Stimulanzen, welche bis heute noch nicht näher definiert sind, an der Mitochondrienmembran eingeleitet. Dabei werden Cytochrom-c und andere apoptotische Faktoren vom Intermembranraum der Mitochondrien ausgeschüttet [Zamzami et al., 2001; Martinou et al., 2001]. Im Cytosol bildet Cytochrom-c einen Komplex mit APAF1 (**a**poptotic **p**rotease **a**ctivating **f**actor 1), ATP und der inaktiven Proform der Initiator Caspase 9. Dieser Komplex wird als Apoptosome bezeichnet und aktiviert die Proform zur aktiven Caspase 9. Das heißt, dass in beiden Fällen Caspasen aktiviert werden, die zelluläre Substrate schneiden, welche dann die biochemischen und morphologischen Veränderungen der Zelle, die charakteristisch für die Apoptose sind, hervorrufen. Abbildung 2 stellt die beiden Initiierungswege der Apoptose dar, und die Abfolge der benötigten Schritte zur Einleitung des programmierten Zelltodes.

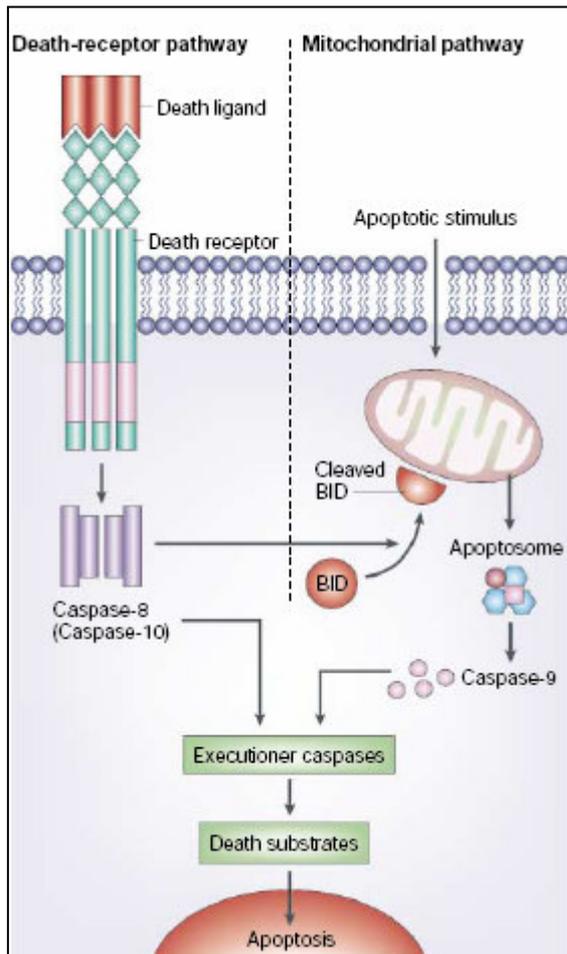


Abb. 2: Die zwei hauptsächlichen apoptotischen Regulationswege: Apoptose kann durch zwei verschiedene Aktivierungen eingeleitet werden: entweder durch die Stimulation der ‚death‘-Rezeptoren an der Zelloberfläche (äußerer Regulationsweg) oder durch die Mitochondrien (innerer Regulationsweg). Beide Induktionswege führen zur Aktivierung einer Initiator Caspase: Caspase 8 und möglicherweise Caspase 10 für den äußeren Regulationsweg; Caspase 9 wird durch das Apoptosom in dem mitochondrialen Weg aktiviert. Die Initiator Caspase aktiviert dann die exekutiven Caspasen, welche die zellulären ‚Todessubstrate‘ schneiden, die dann letztendlich zur Apoptose führen. Es konnte festgestellt werden, dass eine Art Crosstalk zwischen den beiden Regulationswegen besteht. So kann z.B. Caspase 8 das der BCL-2-Familie zugehörige Protein BID schneiden, welches dann zusätzlich den mitochondrialen Regulationsweg aktiviert. Dieser Mechanismus kann somit zur Verstärkung des Apoptosesignals führen. [Igney et al., 2002]

In der Krebstherapie wird in den meisten Fällen durch den Einfluss von Chemotherapeutika oder durch γ -Strahlung Apoptose in Tumorzellen eingeleitet. Jedoch sind nur wenige Tumore sensitiv gegenüber den angewandten Therapien und oft werden Resistenzen festgestellt, was ein großes klinisches Problem in der Krebsbehandlung darstellt. Das Versagen einer Zelle, das apoptotische Programm einzuleiten, repräsentiert einen wichtigen Faktor in der Resistenz von Tumorzellen gegenüber Antitumorwirkstoffen. Antikrebsmittel werden in verschiedene Wirksamkeitsbereiche klassifiziert: DNA-schädigende Verbindungen, Antimetaboliten, Mitoseinhibitoren, Nukleotidanaloga oder Topoisomeraseinhibitoren. Behandlung mit diesen Chemotherapeutika oder γ -Strahlung übt Stress auf die Zelle aus und führt letztendlich zu deren Tod [Herr, *et al.*, 2001; Stahnke, *et al.*, 2001]. In stressinduzierter Apoptose nimmt p53 eine

Schlüsselrolle ein [Ryan, *et al.*, 2001; Sherr, 2001]. Die schnelle Aktivierung der Funktion von p53 wird von den meisten Stressformen durch einen post-translationalen Mechanismus induziert. p53 ist ein Tumorsuppressorprotein, das das Zellwachstum reguliert [siehe auch Kapitel 1.3]. p53 wird durch die Inaktivierung von MDM2 stabilisiert und aktiviert. Dies geschieht entweder durch die Bindung von MDM2 an ARF oder durch die direkte Phosphorylierung von MDM2. Zusätzlich können viele post-translationale Modifikationen von p53 die transkriptionale Aktivität steigern, als Reaktion auf Stresssignale, als auch auf Phosphorylierung und Acetylierung. Die transkriptionale Aktivität von p53 ist sehr wichtig für die pro-apoptotische Aktivität. Die Expression von Proteinen, die in den mitochondrialen Apoptoseweg involviert sind, wie z.B. BAX [Miyashita, *et al.*, 1995] NOXA [Oda, *et al.*, 2000 - a], PUMA [Nakano, *et al.*, 2001] und p53AIP1 [Oda, *et al.*, 2000 - b], als auch die Expression von ‚Death‘-Rezeptoren, wie z.B. CD95 [Muller, *et al.*, 1998-a] , TRAIL-R1 und TRAIL-R2 [Guan B. *et al.*, 2001; Wu, *et al.*, 1997] wird von p53 induziert. Außerdem vermittelt p53 durch seine von der Transkription unabhängige Aktivität bestimmte pro-apoptotische Effekte, wie Protein-Protein Interaktionen. Es wurden auch Effekte auf die Mitochondrien und dem Rücktransport von ‚Death‘-Rezeptoren zur Zelloberfläche beobachtet [Caelles, *et al.*, 1994; Bennett, *et al.*, 1998].

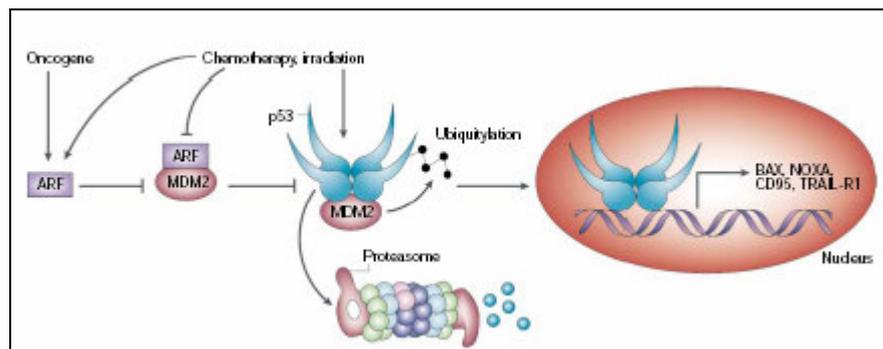


Abb.3: p53 und Apoptose in Tumoren. MDM2, eine Ubiquitin Ligase, inhibiert p53 und vermittelt den Abbau durch das Proteasom. MDM2 wird durch Bindung an ARF inaktiviert. Durch zellulären Stress, Chemotherapie oder Bestrahlung, wird p53 entweder direkt aktiviert, durch Inhibition von MDM2 oder indirekt durch die Aktivierung von ARF. ARF kann ebenso durch proliferative Onkogene, wie z.B. RAS, induziert werden. Aktives p53 transaktiviert pro-apoptotische Gene – einschließlich BAX, NOXA, CD95 und TRAIL-R1, und induziert damit Apoptose. [Igney, *et al.* 2002]

Es existieren noch andere Regulationswege als Reaktion auf Chemotherapeutika, z.B. über SAPK (**s**tress-**a**ctivated **p**rotein **k**inase; auch bekannt unter dem Namen JUN-N-terminal kinase oder JNK). SAPKs sind Mitglieder der Familie von Mitogen-aktivierten Protein Kinasen, welche die Aktivität von AP-1 Transkriptionsfaktoren regelt. Bekannte pro-apoptotische Zielgene von AP-1 sind die Death-Rezeptoren Liganden *CD95L* und *TNF- α* [Herr et al., 2001].

Der am besten untersuchte Mechanismus, bei dem die Tumorzelle durch Chemotherapie induzierten Stress abstirbt – vor allem in Leberzellen – involviert das CD95 System [Friesen et al., 1996; Fulda et al., 1998]. Chemotherapeutika, wie z.B. das Nukleosidanalogen 5-Fluoruracil, induzieren CD95 durch einen p53 abhängigen, transkriptionellen Mechanismus. [Muller, et al, 1998-a, Muller, et al., 1998-b]. Sie induzieren jedoch auch den SAPK/JNK Mechanismus, was letztendlich zu der Überexpression von CD95L führt [Eichhorst, et al., 2000]. Die Überexpression von CD95 und CD95L leitet dann den Selbstmord der Zelle ein oder aber initiiert die Apoptose an benachbarten Zellen.

Natürlich sind dies nicht die einzigen Mechanismen, die zum Tod einer Zelle durch Chemotherapeutika führen. [Newton, et al., 2000; Yeh, et al., 1998; Wesselborg, et al., 1999]. Viele der Substanzen scheinen den mitochondrialen Regulationsweg direkt zu stimulieren. Außerdem kann es sein, dass der Zelltod nicht immer von der Aktivierung der Caspasen abhängt. Es stellt sich nach wie vor die Frage, ob ein einzelner Regulationsweg der Apoptose identifiziert werden kann, sobald die Tumorzelle Stress erleidet. Der Mechanismus, der schließlich zum Tod der Zelle führt, hängt sicherlich von einigen Faktoren, wie z.B. dem Stresssignal an sich, dem Zelltyp oder der Umgebung des Tumors ab. Da sowohl Chemotherapeutika als auch die Bestrahlung ihre Effekte hauptsächlich durch Einleitung von Apoptose entwickeln, ist es jedoch denkbar, dass die Modulation der Schlüsselproteine der Apoptose direkt einen Einfluss auf den Therapie-induzierten Tumorzelltod hat.

1.3 p53 und Krebstherapie

p53 Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der die Transkriptionsrate für bestimmte Gene in einer Zelle beschleunigt. Das Protein, wirkt sequenz-spezifisch und bei seiner Aktivierung sind eine Reihe von Signalen involviert. Dazu gehören DNA Schädigungen [Nelson *et al.*, 1994], Hypoxie [Graeber 1996] und Onkogenaktivierung [Lowe *et al.* 1993]. p53 triggert somit verschiedene zelluläre Reaktionen. Dazu zählt hauptsächlich Wachstumshemmung durch das Anhalten des Zellzyklus oder die Apoptose. Zusätzlich spielt p53 eine Rolle in der zellulären Differenzierung [Almog N. *et al.* 1997], der DNA-Reparatur und somit der Genomstabilität [Tanaka H. *et al.* 2000], der Inhibierung von Angiogenese [el-Deiry W.S. 1998], als auch bei der Wachstumsunterdrückung von Tumoren [Zhu K. *et al.* 1999]. Damit ist p53 ein wichtiges Kontrollprotein der Zelle, das auf DNA-Schädigungen reagiert, in dem es das Weiterwachsen der geschädigten Zelle verhindert [Levine A.J. 1997]. Das humane p53 Protein besteht aus 393 Aminosäuren und kann strukturell und funktionell in 4 verschiedene Domänen unterteilt werden. Die ersten 42 Aminosäuren am N-Terminus bilden eine transkriptionale Aktivierungsdomäne, welche mit der basalen Transkriptions- Maschinerie interagiert und die Expression von Genen reguliert. Die Sequenz-spezifische DNA-Bindungsdomäne von p53 befindet sich zwischen den Aminosäuren 102 und 292. Diese Domäne ist proteaseresistent und benötigt zur Ausbildung seiner Tertiärstruktur ein Zn^{2+} Ion, welches auch für die Sequenz-spezifische Bindung an die DNA erforderlich ist. Diese Domäne faltet sich in vier- bzw. fünf -strängige antiparallele ‚ β -Sheets‘, welche wiederum das Gestell für zwei ‚ α -Helices‘ bilden, die direkt mit der DNA interagieren [Cho *et al.*, 1994]. Das native p53 liegt in Lösung als Tetramer vor und die Aminosäuren 324-355 sind notwendig um die Oligomerisierung des Proteins zu gewährleisten. Diese Tetramerisierungsdomäne ist mit der DNA-Bindungsdomäne über einen flexiblen Linker von 37 Aminosäuren (287-232) verbunden [Jeffrey *et al.*, 1995]. Der C-Terminus wird von 26 Aminosäuren gebildet und stellt eine offene, proteasensensitive Domäne dar. Diese bindet bereitwillig ebenfalls an DNA und RNA und zeigt dabei Sequenz oder strukturelle Präferenzen [Lee *et al.*, 1995]. Außerdem katalysiert diese Domäne

die Reassoziation von Einzelstrang DNA bzw. RNA zum Doppelstrang. Der C-Terminus reguliert somit sterisch oder allosterisch die Fähigkeit von p53, zu bestimmten DNA Sequenzen durch die Zentrale oder Core-Domäne zu binden [Levine, 1997].

1979 wurde p53 als 53 k-Da großes Protein entdeckt, das an das `große T-Antigen des ‚Sacroma-associated Virus SV40‘ bindet. Erst 10 Jahre später wurde das Protein als Tumorsuppressorprotein erkannt, das durch den onkogenen Komplex mit dem `großen T-Antigen` inaktiviert wird. Das virale Protein maskiert die DNA-Bindungsfläche von p53 und verhindert somit seine regulatorische Funktion. Die Transkription von Genen die an DNA-Reperatur, Wachstumsstopp der Zellen und Einleitung von Apoptose beteiligt sind, kann somit nicht mehr erfolgen [Lane, *et al.*, 1990]. Die folgende Abbildung stellt die p53 gesteuerten Tumorsuppressorwege dar.

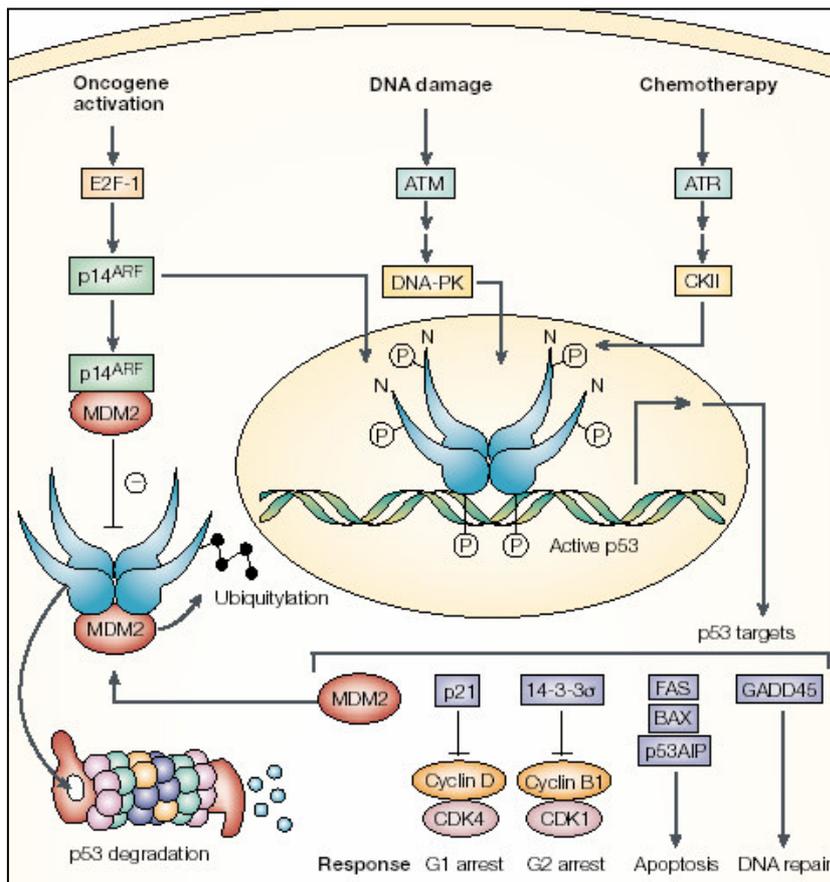


Abb. 4 : Eine negative Rückkopplungsschleife kontrolliert den zellulären Gehalt von p53. In gesunden Zellen stimuliert die p53-abhängige Transkription von MDM2 den Abbau von p53. Wenn die Zelle unter Stress steht, wenn zum Beispiel ein Onkogen aktiviert wird, trennt sich p14ARF von MDM2. Ausserdem aktivieren DNA-Schäden und Chemotherapeutika Protein Kinasen, z.B. ATM und ATR, die dann DNA-abhängige Protein Kinasen (DNA-PK), beziehungsweise durch Casein-Kinase II (CK II) aktivieren. Diese

phosphorylieren sowohl den Amino-terminus von p53, um eine Bindung von MDM2 zu verhindern, als auch den Carboxyterminus um die sequenzspezifische Bindung an DNA zu erhöhen. Diese Ereignisse in einer Zelle erhöhen den Level von p53 und aktivieren somit die Transkription von p53 Target-genen. p21 und 14-3-3 σ fördern den Wachstumsstopp in der G1

bzw. G2 Phase durch Inhibition der Cyclin abhängigen Protein-Kinasen (CDK). FAS, BAX und p53AIP leiten Apoptose ein, falls eine DNA Reparatur nicht mehr möglich ist; GADD45 hingegen aktiviert DNA-Reperaturmechanismen. [Bullock et al.,2001]

Wenn das Proto-onkogen MDM2 überexprimiert wird, dann wird natives p53 abgebaut. MDM2 reguliert im Normalfall den Gehalt von p53 in der Zelle, um ein unkontrolliertes Einleiten von Apoptose durch p53 zu verhindern. Dies ist eine notwendige Regulation, da eine zu geringe Mengen an p53 die Proliferation von Tumorzellen fördert und zu hohe Mengen letal wirken [Jones, *et al.*, 1995]. p53 ist somit im Mittelpunkt eines ausgedehnten Netzwerks von Effektoren und Regulatoren, die mit den G1 und G2 Zellzyklusphasen in Verbindung stehen.

In 1989 wurden die ersten Mutationen in TP53 (dem Gen, das p53 im Menschen codiert) gefunden [Nigro J.M., *et al.*, 1989]. Inzwischen sieht es erstaunlicherweise danach aus, dass in über der Hälfte aller Tumore die Aktivität von p53 durch Mutationen verloren gegangen ist. Mutationen des p53-Tumorsuppressorgenes sind somit eine der häufigsten Veränderungen im Genom bei humanen Krebsarten [Hollstein *et al.* 1994].

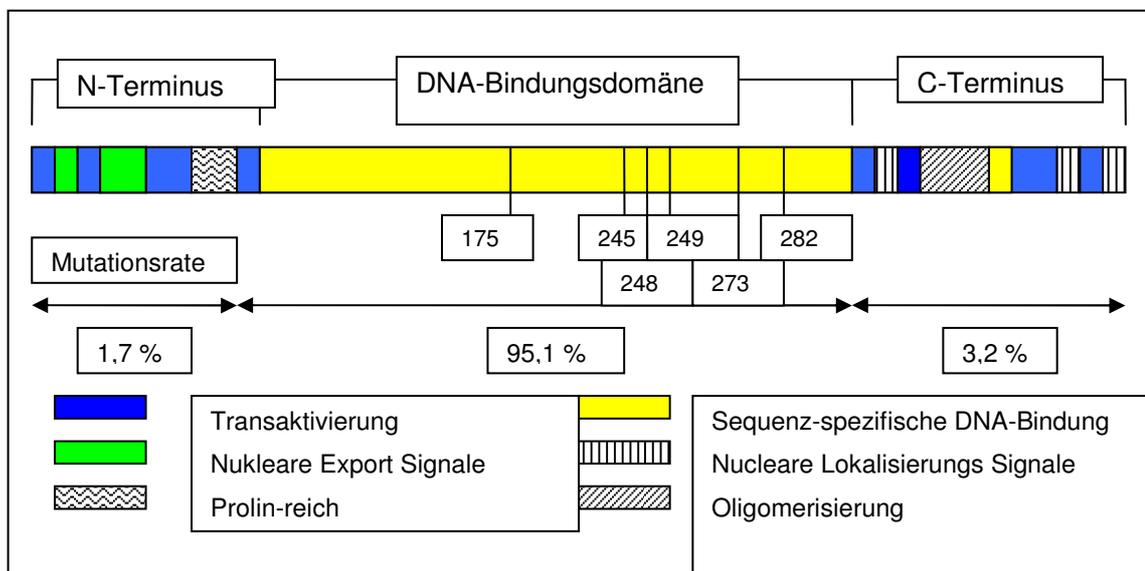


Abb. 5: p53 – ein Transkriptionsfaktor mit wohl definierten Domänen; der Amino-Terminus mit seiner Transaktivierungsdomäne, der zentralen sequenzspezifischen DNA-Bindungsdomäne und dem Carboxy-Terminus, welcher die Oligomerisierungsregion und nukleare Lokalisierungs-signale beinhaltet. Fast alle Punktmutationen, die in Krebsarten identifiziert worden sind, liegen in der DNA-Bindungsdomäne. Die Verteilung der Mutationen in den verschiedenen Regionen ist in Prozent angegeben. Ungefähr 40% der Mutationen sind hierbei in den 6 angezeigten Aminosäuren zu finden.

Über 95% der ‚Missense‘-Mutationen in p53 befinden sich in der DNA-Bindungsdomäne und können im Allgemeinen in zwei verschiedene Klassen eingeteilt werden. Zum einen führen Mutationen, wie z.B. die der Aminosäuren R248 und R273 (diese zwei Mutationen sind mit 28 % diejenigen, die am häufigsten auftreten) zu einem Kontaktverlust zur DNA, was wiederum zum Verlust der Fähigkeit, Transkription zu aktivieren, führt. Die anderen Mutationen bedingen eine Instabilität in der Tertiärstruktur. Dabei wird ein Motiv in den ‚ β -Sheets‘ oder dem ‚Loop-sheet-Helix‘ gestört und somit liegt das Protein, das für die DNA-Bindungsdomäne essentiell ist, strukturell verändert vor. Diese Mutationen führen dazu, dass das Protein an den monoklonalen Antikörper PAb240 binden kann. Das Epitop des Antikörpers ist der Abschnitt zwischen Aminosäure 214-217, der in der nativen oder Wildtypform nicht zur Bindung zugänglich ist. Die häufigsten Mutationen (40%) in der Bindungsdomäne betreffen die in Abb. 5 angezeigten 6 Aminosäuren R175, G245, R248, R249, R273 und R282. [Cho, et al., 1994; Hollstein, et al., 1994].

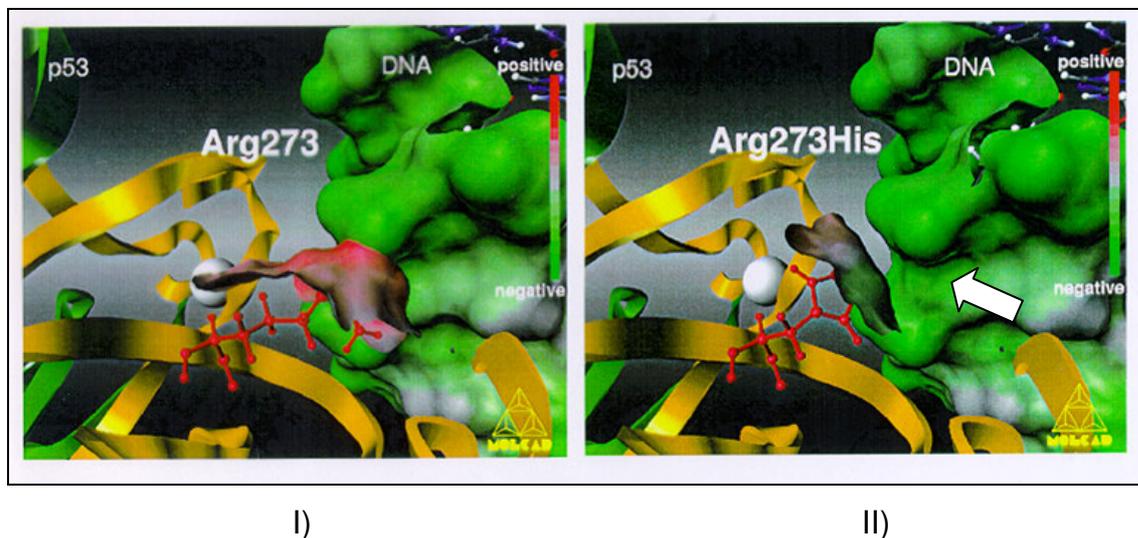


Abb 6.: Bindung von p53 an DNA. I) zeigt den Bindungskontakt von R273 zur DNA beim Wildtyp. II) zeigt den Verlust des Kontaktes der durch den Austausch von R273 durch H273 hervorgerufen wird (weisser Pfeil)

Kann sich das p53 Tetramer nicht mehr gut an die DNA binden, so verliert das Tumorsuppressor Protein seine Funktion, und die Gene die von p53 reguliert werden, werden nicht mehr exprimiert.

Zu der hohen Mutationsrate von p53 kommt zusätzlich hinzu, dass selbst in Krebsarten mit Wildtyp p53, ein anderer „Mitspieler“ des p53-„Pathways“ nicht mehr funktionstüchtig ist. So können z.B. Proteine, die p53 inhibieren oder abbauen (wie z.B. MDM2) überexprimiert sein, oder p53 ins Cytoplasma delokalisiert werden, wo es inaktiv ist [Levine A.J., 1997; Vogelstein B, et al. 2000; Ko L.J. et al (1996)].

Traditionelle Krebstherapien bedienen sich meist Verbindungen, die den zellulären Stress in Tumorzellen so verstärken sollen, dass sich diese geschädigten Zellen selbst zerstören. Bei dieser Strategie sind jedoch zwei wesentliche Nachteile zu beobachten: Nebenwirkungen dieser Therapie beeinträchtigen gesundes Gewebe [Komarov P.G., *et al.*, 1999], hinzu kommt, dass in den meisten Tumoren die Tumorsuppressorregulatoren nicht mehr in der Lage sind, Apoptose einzuleiten, und deshalb die Therapie nicht erfolgreich verläuft [Sherr C.J., 2000]. In den meisten der bösartigen Krebsgeschwüren ist p53 inaktiviert, so dass diese Zellen Stress aushalten können. Deswegen stellt p53 ein potentiell vielversprechendes Target für die Krebsheilung dar.

Dabei ist von einem krebstherapeutischen Standpunkt aus die Rolle von p53 für die Apoptose wesentlich wichtiger, als die der Wachstumshemmung und Zellzyklusregulierung. Dies beruht teilweise auf der Tatsache, dass die meisten zytotoxischen Antitumormittel durch die Induktion von Apoptose wirken [Karr, *et al.* 1994]. Wenn sich ein Tumor entwickelt, und einen Apoptoseweg ausschaltet, dann ist es sehr wahrscheinlich, dass dieser Tumor auch resistent gegenüber Behandlungen ist, die auf Apoptoseeinleitung beruhen. Krebs mit mutiertem und somit inaktivem p53 ist oft resistent gegenüber Bestrahlungs- oder Chemotherapie. Die schlechten Prognosen für diese Krebsarten liegen an der Unfähigkeit der Zellen Apoptose einleiten zu können. Somit gehört die Suche nach Therapeutika, die trotz mutiertem p53, Zellen in die Apoptose treiben können, zu einer der wichtigen klinischen Ziele bei der Heilung von Krebs.

Eine Art der Behandlung von Krebsarten, bei denen p53 mutiert ist, beruht deswegen auf der Wiederherstellung der Funktionstüchtigkeit von p53 durch Gentherapie. Es handelt sich hierbei um die Wiederherstellung von natürlichen

zellulären Regulationswegen, die die Zelle in die Apoptose treiben können. Diese apoptotischen Regulationswege sind in gesunden Zellen latent, werden aber durch Tumorsuppressor Proteine aktiviert, sobald verschiedene Stressfaktoren auf die Zelle einwirken, so wie DNA-Schädigung oder Onkogenaktivierung [Hanahan D., *et al.*, 2000].

In der aktuellen Literatur wurde von verschiedenen kleinen Molekülen berichtet, die die Funktion von mutiertem, und somit inaktivem p53 wiederherstellen können und somit Apoptose in Tumorzellen einleiten, ohne dass die traditionellen, aggressiven Chemotherapeutika verwendet werden müssen [Bykov, *et al.*, 2003].

Die Suche nach kleinen Molekülen, die an mutiertes p53 binden und somit dessen Funktion wiederherstellen können zieht großes Interesse auf sich.

1.3.1 Mechanismen zur Wiederherstellung der p53 Funktion durch neue Therapeutika:

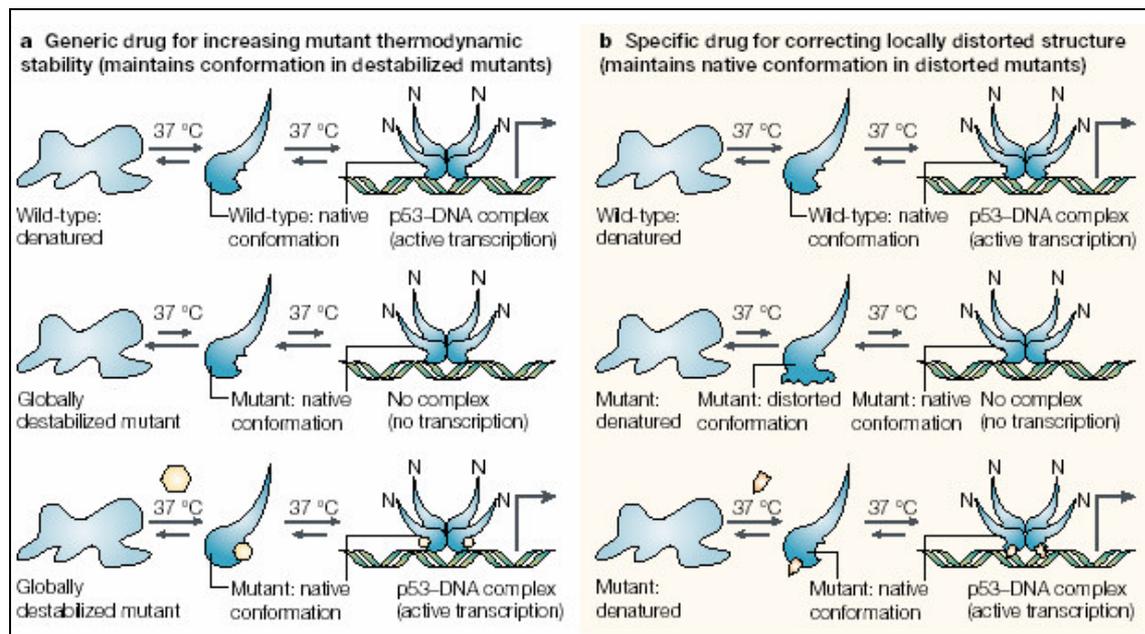


Abb.: 7: Wirkmechanismen zur Herstellung von p53

a) Zwischen denaturierter und nativer Konformation der p53 Core-Domäne, sowie zwischen dem DNA-gebundenen und dem ungebundenen nativen Zustand, besteht ein Gleichgewicht. Für destabilisierte β -Sandwich Mutanten liegt dieses Gleichgewicht auf der linken Seite, und somit ist der denaturierte Zustand favorisiert. Liganden, die bevorzugterweise an die native Konformation binden, stabilisieren diesen Zustand und verschieben damit das Gleichgewicht nach rechts um die DNA-Bindung wiederherzustellen. Einige dieser Liganden sind Pab1620, DNA und Heparin.

b) Mutationen in der DNA-Bindungsfläche können die native Struktur so verzerren, dass ihre Bindungsaffinität verringert wird. Durch eine Mutation kann zum Beispiel eine DNA bindende Schleife den Kontakt zum Core des Proteins verlieren, da die ursprünglichen Interaktionen nicht mehr gewährleistet sind. Ein kleines Molekül kann diese Interaktionen durch Bindung wiederherstellen in dem es den Kontakt des Loops an die DNA vermittelt. Dadurch können dann die nativen Funktionen wieder übernommen werden. [Bullock, *et al.*, 2001]

1.3.2 CP-31398

Die ersten Verbindungen, die die Funktion von mutiertem p53 wiederherstellten, wurden in einer Bibliothek aus 10,000 Verbindungen identifiziert [Foster *et al.*, 1999]. Dieses Screening der Moleküle richtete sich zuerst nach der Fähigkeit, die DNA-Bindungsdomäne des Wildtyps gegenüber thermischer Denaturierung zu stabilisieren. Dazu wurden die Proben in Gegenwart der Testsubstanzen erhitzt und die Konformation des Proteins durch die Bindung an konformationsspezifische Antikörper überprüft. Dabei bindet PAb1620 die native, gefaltete Form des Proteins, PAb20 bindet wie zuvor beschrieben an die denaturierte Form (Epitope sind As 214-217, die in der nativen Form für den Antikörper nicht zugänglich sind). In diesem Screen wurde eine Untergruppe von synthetisch hergestellten Molekülen identifiziert, die p53 positiv in diesem Assay stabilisiert haben. Diese Moleküle hatten einen ähnlichen Aufbau: über eine Brücke ist ein polycyclischer hydrophober Rest mit einer zweiten ionisierbaren Gruppe (normalerweise ein sekundäres Amin) verbunden. Zwei der aktivsten Verbindungen dieser Untergruppe sind CP-257042 und CP-31398, wobei CP-31398 die vielversprechenderen Eigenschaften besaß.

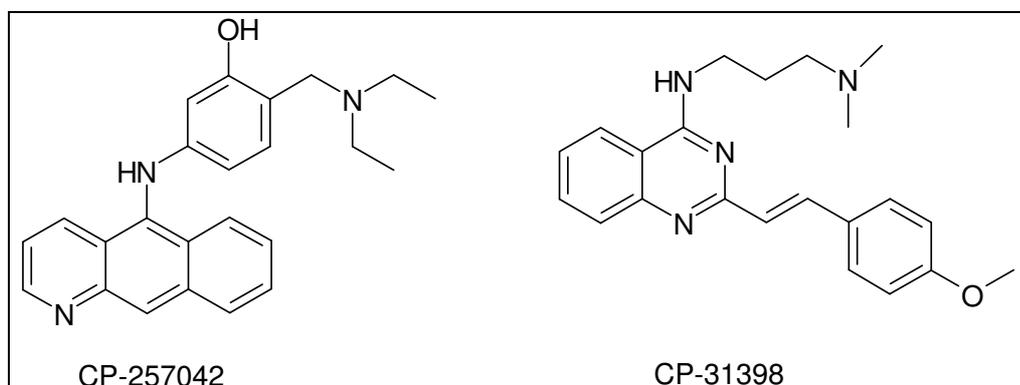


Abb.8: Strukturen von CP 257042 und CP31398

Dabei stabilisierte CP31398 die native Konformation der zwei Mutanten der DNA-Bindungsdomäne A-173 und H-273 *in vitro*, stellte die native Konformation und die transkriptionelle Transaktivierungsaktivität des A-173 mutierten p53 in lebenden Zellen wieder her und initiierte die Induktion des von p53 regulierten Genes *p21*. Desweiteren inhibierte die Verbindung in Nacktmäusen das Wachstum von humanen Melanoma- und Colonkarzinom Zellen, die eine Mutation von p53 an der Position 249 oder 241 besaßen. Dabei konnte keine Toxizität bei den therapeutischen Verabreichungsmengen *in vivo* festgestellt werden.

Der genaue Mechanismus für diese Interaktion ist bis heute nicht geklärt. Die Verbindung könnte zum einen direkt mit dem bereits fertig synthetisierten p53 Protein interagieren oder den Aufbau der Tertiärstruktur des Proteins während der Biosynthese vermitteln. Der erste Versuch eine physikalische Interaktion zwischen dem Protein und der Verbindung zu detektieren, war nicht erfolgreich. NMR-Untersuchungen zeigten, dass CP-31398 nicht in der DNA-Bindungsdomäne von rekombinantem Wildtyp oder mutiertem p53 bindet. Gel-shift-assays und NMR-Daten weisen eher auf eine Bindung der Substanz an DNA hin. Des weiteren zeigten einige experimentelle Daten, dass CP-31398 nur die Faltung eines neu synthetisierten Proteins beeinflusst, was die negativen NMR-Bindungsstudien erklären würde [Rippin, *et al.*, 2002].

Weitere Studien mit dieser Verbindung zeigten, dass die Behandlung mit CP-31398 die Induktion von p53 regulierten Genen, wie p21, MDM2 und Bax, sowie Apoptose-bezogene Veränderungen auf der Proteinebene, wie den Verdau von Poly ADP-Ribose Polymerase (PARP), verursacht. Diese Effekte von CP-31398 scheinen Zelllinien abhängig zu sein, da nur die SKOV-Zellen mit dem mutiertem H-175 p53 die Induktion von MDM2 und Bax zeigten, aber andere Zelllinien mit dieser Mutation in p53 keine Induktion aufweisen konnten. Dazu gehörten u.a. die Zellen DLD1, SW480 und SKBr3. [Rippin, *et al.*, 2002, Takimoto, *et al.*, 2002]. Dabei beeinflusste die Verbindung die Zellen eher unabhängig von ihrem p53-Status und konnte keine Apoptose in den Zelllinien mit mutiertem p53 einleiten. [Takimoto, *et al.*, 2002]. Apoptose wurde in der HCT116-Zelllinie mit dem Wildtyp p53 durch CP-31398 eingeleitet, aber nicht in

der isogenetischen p53-null Linie, bei der der Wildtyp ausgeknockt wurde [Luu, *et al.*, 2002].

Die Wiederherstellung der Funktionstüchtigkeit von mutiertem p53 durch CP31398 kann in Kombination mit bereits bekannten Chemotherapeutika, die eine höhere Wirksamkeit in Tumoren mit Wildtyp p53 zeigen, verwendet werden. Die Kombination der Verbindung mit Cisplatin, Doxorubicin oder VP-16 hatte einen additiven Effekt in der Zellkultur, was darauf hindeutet, dass CP-31398 eine wichtige Ergänzung in der Behandlung von Tumoren mit Wildtyp p53 sein könnte [Takimoto, *et al.*, 2002].

Die Verbindung zeigt vielversprechende Aktivitäten *in vitro* gegenüber mutiertem und Wildtyp p53. Jedoch kann die p53-unabhängige Toxizität die Anwendung in der Klinik deutlich limitieren.

1.3.3 WR1065

Das Aminothiols WR1065 (Abb. 9) ist der aktive Metabolit von Amifostine, eine Verbindung die in der Klinik zur Reduzierung der Nebenwirkungen von Chemotherapeutika und Bestrahlungen verwendet wird. Amifostine schützt die Zellen vor strahlungsinduzierter DNA-Schädigung und zeigt dabei eine starke Spezifität für normale Zellen, behindert aber nicht das Abtöten von Tumorzellen. Es konnte gezeigt werden, dass WR1065 die native Konformation des p53 im temperaturempfindlichen Mutanten M-272 in der Karzinom Zelllinie TE-1 wiederherstellen konnte und eine DNA-Bindung in den Konzentrationen von 1-4mM stimulieren konnte. Dabei konnte eine Aktivierung der Transkription der Gene p21, GADD45 und MDM2, sowie die Arretierung des Zellzyklus in der G1 Phase beobachtet werden [North *et al.*, 2002]. Nachfolgende Studien zeigten, dass WR1065 zu einer Anhäufung von Wildtyp p53 in MCF-7 Zellen führt. Der Mechanismus erfolgte durch einen JNK-abhängigen und DNA-Schädigungs-unabhängigen Weg, der eine Phosphorylierung von p53 zur Folge hatte und somit eine Degradierung des Proteins durch Proteasome verhinderte. [Pluquet, *et al.*, 2003-a]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass p53 durch WR1065 reduziert wurde und somit die Redox-abhängige Bindung an DNA verstärkt.

[Pluquet, et al., 2003-b]. Bisher wurde WR1065 jedoch noch nicht auf die Wirksamkeit auf andere Mutanten untersucht.

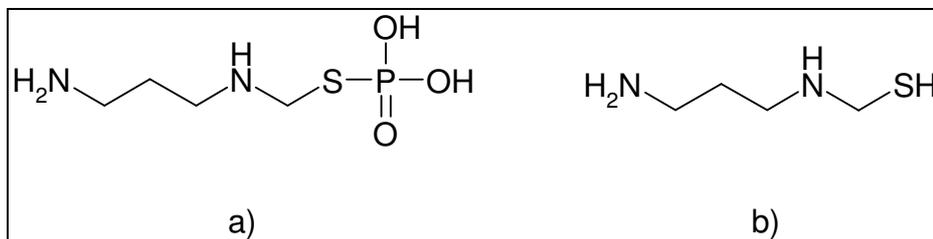


Abb.9: Strukturen von a) Amifostine und b) WR1065

1.3.4 PRIMA-1 und MIRA-1

Die Verbindung PRIMA-1 wurde durch ein zelluläres Screening einer Chemischen Substanzbibliothek am National Cancer Institute an der Saos-2-His-273 Osteosacrom Zelllinie identifiziert [Bykov, *et al.*, 2002-a]. PRIMA-1 konnte Apoptose in verschiedenen Zelllinien mit verschiedenen p53 Mutanten einleiten und DNA-Bindungen stabilisieren. Eine Ausnahme war die Mutante Phe-176, bei der die Aminosäure der nativen Form ein Cystein ist und dies essentiell zur Bindung des Zn²⁺-Ions ist. Da dieser Kofaktor benötigt wird, um die DNA-Bindungsdomäne zu falten [Cho, *et al.*, 1994], ist dieser Mutant wahrscheinlich zu verzerrt, als dass eine Wiederherstellung der nativen Konformation möglich war.

PRIMA-1 und MIRA-1 wurden auf ihre Fähigkeit, die DNA-Bindung einer großen Bandbreite von p53 ‚hot-spot‘ Mutanten wiederherzustellen, getestet. Dabei wurden Zellextrakte von humanen Tumorzelllinien als Quelle für das endogene p53 Protein benutzt. PRIMA-1 konnte, wie in den Gel-shift-assays gezeigt, die spezifische DNA-Bindung von 13 der 14 getesteten Mutanten wieder herstellen. MIRA-1 hingegen nur 3 von 14. Desweiteren konnten beide Verbindungen rekombinantes p53 stabilisieren [Bykov, et al 2002-b].

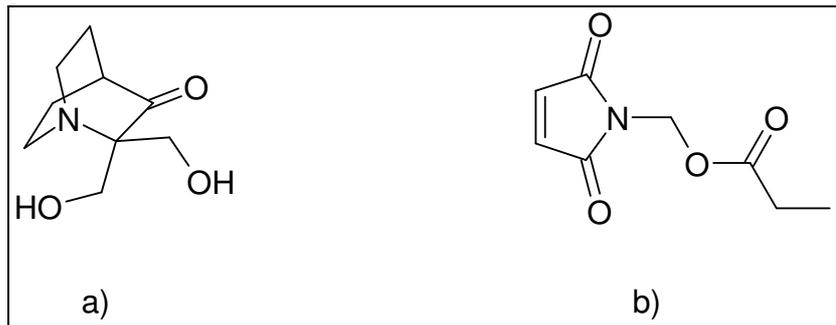


Abb.10: Strukturen von a) PRIMA-1 [2,2-Bis(hydroxymethyl)-1-azabicyclo[2.2.2]octan-3-on] und b) MIRA-1 [1-(Propanoyloxymethyl)-maleinimid]

PRIMA-1 zeigte außerdem eine Spezifität für Zelllinien, die mutiertes p53 exprimierten. Im Gegensatz dazu besitzen die meisten in der Klinik verwendeten Antitumormittel, wie 5-Fluorouracil, Methotrexat und Doxorubicin eine Affinität zu Krebszelllinien, die den Wildtyp von p53 besitzen. Nur Paclitaxel zeigte ähnliche Präferenzen für Zelllinien mit mutiertem p53.[Bykov, et al, 2002-c]

1.3.5 Peptide

Kurze synthetische Peptide, die von der p53 C-terminalen Region oder von monoklonalen Antikörpern, die ein C-terminales Epitop von p53 erkennen, abgeleitet sind, stimulieren die spezifische Bindung von Wildtyp p53 an DNA. Interessanterweise konnten diese Peptide auch die DNA-Bindungsfähigkeit und die transkriptionelle Transaktivierung von mutiertem p53 *in vitro* und in lebenden Zellen erhöhen. Ein Peptid, welches den Aminosäuren 361-382 des humanen p53 entspricht, induzierte Apoptose in humanen Tumorzellen mit mutiertem Protein [Selivanova, *et al.*, 1997]. Das Peptid bindet direkt an der Core-domäne des Proteins, was darauf hinweist, dass es direkt die native Konformation und/oder DNA-Bindung herstellt. [Selivanova, *et al.*, 1999]. Weitere Studien haben ein Peptid identifiziert, welches ebenfalls mit der DNA-Bindungsdomäne interagiert und die Faltung von mutiertem p53 Protein stabilisiert. Dieses Protein, 53BP2 oder ASPP, verstärkt dabei die Transaktivierung und stimuliert ganz spezifisch die apoptotische Funktion von p53 [Samuels-Lev, *et al.*, 2001]. Ein Peptid, das aus 9 Aminosäuren besteht,

wurde ausgehend von einer Kristallstruktur des Komplexes p53-53BP2 entwickelt (. CDB3 (**C**ore-**d**omain-**b**inding peptide 3) stabilisiert die Bindung von mutiertem p53 an die DNA, was durch NMR-Studien nachgewiesen werden konnte. [Gorina *et al.*, 1996]. Die Wirkungsweise dieses Peptides beruht dabei auf der Verschiebung des Gleichgewichtes von der denaturierten Form zur aktiven Wildtyp-Konformation, da die Affinität des Peptides zum richtig gefalteten Protein wesentlich höher ist, als zur ungefalteten Form. Obwohl das Peptid nahe der DNA-Kontaktstelle bindet, interagiert es nicht mit der DNA-Bindung oder behindert die Interaktion zwischen Protein und Oligonucleotiden [Friedler, et al., 2002]. CDB3 konnte nicht nur bei dem sehr instabilen Mutanten T-195 sondern auch bei den zwei ‚hot-spot‘ Mutationen H-175 und H-273 die transkriptionelle Aktivität wiederherstellen.

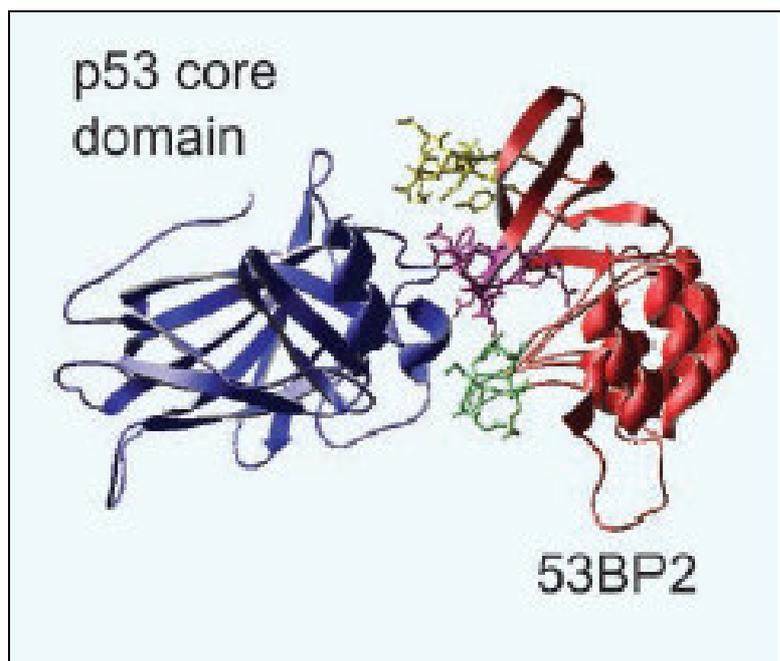


Abb.11: Kristallstruktur von p53(blau)-53BP2(rot) mit 3 Testpeptiden. CDB3 welches von den As 490-498 hergeleitet wurde, ist in lila eingezeichnet [Friedler, et al., 2002] (REDEDIEW-NH₂ : Sequenz des Nona-peptides CDB3)

1.4 Glucose: Drug-targeting für Tumorzellen

Glucose ist von essentieller Bedeutung sowohl bei der Energielieferung der Zellen, als auch zum Aufbau von Zellbestandteilen. Der Transport ins Zytoplasma wird dabei von verschiedenen membranständigen Transporterproteinen vorgenommen [Alberts et al 1995]. In tierischen Zellgeweben konnten bisher zwei verschiedene Familien von Transporterproteinen identifiziert werden, die auf die unterschiedlichen Bedürfnisse der jeweiligen Zellen ausgerichtet sind [Baldwin, 1993]. Die eine Gruppe GLUT (glucose transport proteins) [Saier 2000] gehört zu den Proteinen, die einen erleichterten Glucosetransport in Richtung des Konzentrationsgefälles ermöglichen. Die andere Klasse gehört zu den aktiven natriumabhängigen Glucosecotransportern, den SGLT (sodium-coupled glucose transport) Proteinen. Diese sogenannten Symporter, können Glucose auch entgegen des Konzentrationsgefälles transportieren. Von den SGLT sind bislang drei Vertreter näher untersucht, während aus der Gruppe der GLUT derzeit fünf human expremierte Proteine bekannt sind. SGLT1 und GLUT1 können auch das Einschleusen anderer Monosaccharide wie z.B. Galactose oder Fructose ins Zytoplasma ermöglichen.

Jedoch werden nicht nur Monosaccharide in die Zelle durch die Glucosetransporter eingeschleust, sondern auch Glycoside. Diese werden dann jedoch von Glycosidasen gespalten, bevor die Saccharide in den Zellstoffwechsel eintreten. Diese Enzyme befinden sich hauptsächlich im Golgi-Komplex, in den Lysosomen und sind Bestandteil von Zellmembranen. Sie konnten dort histochemisch nachgewiesen werden [Bernacki et al, 1985], z.B. in Zellen von entzündeten Geweben (Herzinfarkt, rheumatische Arthritis), sowie in bestimmten Karzinomzellen und deren Vorstufen (Leukämie, Mamma-, Ovarial-, Colon-Karzinom) [Calvo et al., 1982; De Martines et al., 1984]. In malignen Effusionen konnten erhöhte Werte an Mannosidasen, Galactosidasen und N-Acetylneuramidase nachgewiesen werden [McCormack, 1976].

Schon 1923 wurde durch die Arbeiten von Warburg bekannt, dass es bei schnellwachsenden Tumorgeweben zu einer erhöhten Aufnahme und Metabolisierung von Glucose kommt. [Warburg 1923, Hatanaka M., 1974] Die

Metabolisierungsweg von Glucose sowie die molekularen Unterschiede in den Normal- und Tumorzellen konnte inzwischen aufgeklärt werden. Zwar konnten auf den Tumorzellmembranen keine tumorspezifischen Transportproteine gefunden werden, die die Aufnahme von Glucose erleichtern, jedoch sind je nach Tumorgewebe die Transportproteine stärker exprimiert als im Normalgewebe. So fand Yamamoto eine erhöhte Expression für die m-RNAs der gewebespezifischen Glucosetransporter. Hinzu kommt auch der Konzentrationsunterschied an Glucose innerhalb und außerhalb der Zelle, was zu einer erhöhten Glucoseaufnahme führt, und dieses Phänomen wird sonst bei keinem anderen Zelltyp beobachtet [Sharpot, 1979]

Für die Tumorzelle ergeben sich, aufgrund der hohen glycolytischen Aktivität, ideale Bedingungen für die stärkere Synthese von Makromolekülen und damit einer immer schnelleren Vermehrung. Hierbei besitzen extrazelluläre Signale (z.B. Sauerstoff) keinen Einfluss mehr auf die Steuerung der glycolytischen Aktivität [Newsholme, et al., 1986]. Ein Eingriff in diesen Regelkreis, sowie die Ausnutzung der erhöhten Glucoseaufnahme könnte z.B. bei der Entwicklung von neuen Chemotherapeutika ausgenutzt werden.

Hierfür eignen sich vorwiegend Cytostatika, die glycosidisch mit Sacchariden verknüpft werden können. Zum einen kann durch die erhöhte Wasserlöslichkeit eine erhöhte Bioverfügbarkeit erreicht werden. Außerdem würde durch die größere Anzahl an Transportproteinen eine vermehrte Aufnahme in die Tumorzellen gewährleistet sein. Andererseits könnten in der Zelle, aufgrund der höheren Glycosidaseaktivität, die eingeschleusten Verbindungen schnell in das Saccharid und das aktive Chemotherapeutikum gespalten werden. Somit würde hierbei eine selektivere Vermittlung an die Tumorzelle erreicht werden. Ein Beispiel für dieses neue Drug-targeting Konzept ist das Glufosamid. Es wird durch spezifische Transportmechanismen in Tumorzellen transportiert [Veyhl et al, 1998; Brock et al. 2000]. Die Substanz wurde 1986 in der Abteilung für Molekulare Toxikologie des DKFZ synthetisiert, und es handelt sich um das 1- β -D-Glucosid des Ifosfamid Mustard (IPM).

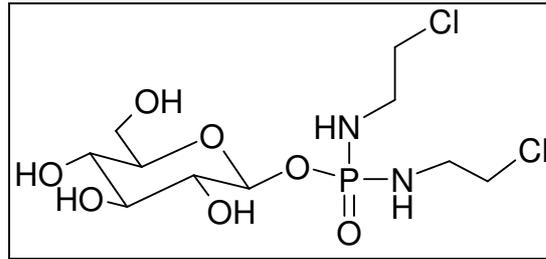


Abb.12: Strukturformel von Glufosamid

In präklinischen Untersuchungen an tumortragenden Ratten mit vier verschiedenen transplantablen Tumoren hat Glufosamid im Vergleich zu Ifosamid bei geringerer Toxizität eine höhere therapeutische Wirkung gezeigt.

1.5 Kombinatorische Chemie und Wirkstoffsuche

Die kombinatorische Chemie und die Synthese von Substanzbibliotheken umfassen einen breiten Bereich sehr variabler chemischer Techniken mit einem außerordentlich weiten Anwendungsbereich. Das wachsende Interesse an den unterschiedlichen Umsetzungen dieser Technologie rührt von der Erkenntnis her, dass sie im Gegensatz zu vielen anderen chemischen Verfahren tatsächlich signifikante und wirtschaftliche Vorteile bietet. Die Technologie kommt gegenwärtig sowohl im akademischen als auch im industriellen Kontext zum Einsatz und wird hauptsächlich zur Wirkstoffsuche eingesetzt.

Die Grundlagen der kombinatorischen Chemie stammen aus der Festphasensynthese von Peptiden. Merrifield erhielt für die Erfindung, Peptide unter gleichbleibenden und zuverlässigen Reaktionsbedingungen an einer polymeren Festphase zu synthetisieren, den Nobelpreis [Merrifield, 1963]. Der Vorteil gegenüber der klassischen Chemie bestand in der einfachen Abtrennung der Produkte von den Reagenzien. Die Festphasentechniken wurden über die Jahre beträchtlich verfeinert und erlauben die Erzeugung praktisch jedes Peptidmoleküls mit gleichbleibend hoher Ausbeute. In den 80iger Jahren wurden die Synthesereaktionen so zuverlässig, dass auch mehrere Peptide simultan im gleichen Reaktionsgefäß hergestellt wurden. Die Verwendung von „Teebeuteln“ durch Houghten, als poröse Behältnisse für

Festphasen-Harzkörner, erlaubte es, den gleichen Peptidkopplungsschritt simultan auf viele Beads anzuwenden und zwar unabhängig davon, welche Sequenz schon an dem Bead angehaftet war [Houghten, 1985]. Die Split & Mix-Prozedur nach Furka, Houghten [Houghten *et al.*, 1991] und Lam [Lam, *et al.*, 1991] erlaubte dann die Herstellung einer riesigen Zahl von Peptiden mit einer nur geringen Zahl von chemischen Schritten. Dies wird heute als die Geburtsstunde der kombinatorischen organischen Chemie bezeichnet.

Somit beruht die kombinatorische Chemie auf einer effizienten Parallelsynthese, wobei weit mehr chemische Substanzen in Form einer Bibliothek erzeugt werden können, als Arbeitsschritte notwendig sind. Dies wird zum einen durch die Automatisierung und Miniaturisierung der Synthese erreicht. Auch die Steigerung der Effizienz der Synthese, die z.B. durch Wegfallen von aufwendigen Reinigungsschritten von Zwischenstufen erreicht wird, trägt zu der erfolgreichen Herstellung einer Substanzvielfalt bei. Dies steht im Gegensatz zur traditionellen organischen Synthese, wie sie seit den letzten 100 Jahren angewendet worden ist, da diese gewöhnlich mehrere Synthesestufen zur Erzeugung nur einer Substanz notwendig macht. „Kombichem“ wird nun von vielen Gruppen benutzt, um sowohl Mischungen als auch Einzelsubstanzen für biologische Anwendungen wie die Wirkstoffsuche oder Rezeptor-Liganden-Studien herzustellen. Der Umfang der involvierten Synthesechemie ist mittlerweile weit über die Peptidsynthese hinaus gewachsen und schließt andere chemische Schlüsselreaktionen und Strukturklassen ein. Der Einsatz von Reaktionen in Lösung (sogenannte Lösungsphasensynthesen) zur Darstellung von Bibliotheken werden ebenso genutzt wie die Herstellung von Substanzbibliotheken an Festphasen. Harze sind immer noch der bevorzugte Träger, aber aufgepfropfte Polymer-„Nadeln“, Papier oder Polymerblätter und selbst Glasstückchen wurden schon verwendet. Wie schon erwähnt ist das Wesentliche der kombinatorischen Synthese die Fähigkeit, sehr schnell eine große Zahl chemischer Substanzen zu erzeugen. Dabei rührt die Geschwindigkeit in der Herstellung der Bibliotheken daher, dass einige konventionelle Richtlinien der organischen Synthese verworfen worden sind, z.B., die Aufreinigung und vollständige Charakterisierung aller

Verbindungen und deren Zwischenstufen. Dabei erlaubt die kombinatorische Chemie durch die Verwendung von verlässlichen Methoden und einfachen aber effektiven Reinigungsschritten eine hohe Produktivität. Dies kann zuweilen auf Kosten der Qualität der Produkte geschehen. Zuvor wurde stets nur eine Verbindung pro Reaktion hergestellt. Zum Beispiel ließ man Verbindung A mit Verbindung B zum Produkt AB reagieren, das nach dem Aufarbeiten durch Reinigungsschritte wie Kristallisation, Destillation oder Chromatographie gewonnen wurde. Im Gegensatz dazu bietet die kombinatorische Chemie das Potential, jede Kombination der Verbindungen A_1 bis A_n mit den Verbindungen B_1 bis B_n zu erzeugen.

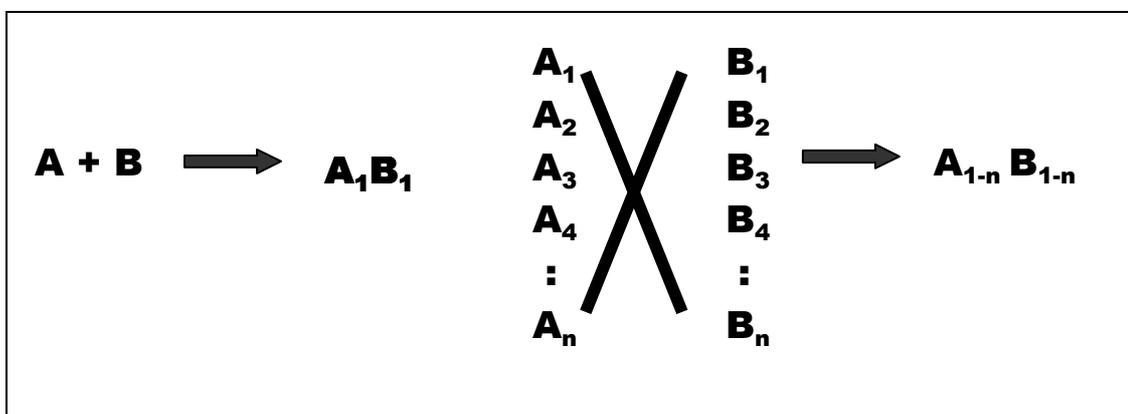


Abb.13: Der Unterschied zwischen herkömmlicher Chemie, bei der Produkte individuell erzeugt werden, und kombinatorischer Chemie, die das Potential zu Erzeugung aller Produkte mit einer Reihe von Edukten bietet. Mit Hilfe der Parallelsynthese können diese Produkte gleichzeitig hergestellt werden.

Mit der wachsenden Produktivität, die durch die neuen kombinatorischen Techniken geschaffen wurde, verschob sich die Herausforderung bei der Wirkstoffsuche auf das effiziente Screening all dieser Produkte. Somit wurden neue Assays entwickelt, die ein schnelles Screening von neuen Substanzen ermöglicht. Mit Entwicklung dieser sogenannten **High Throughput Screenings** (HTS), konnte die Vielzahl der Bibliotheken auf ihre biologische Wirksamkeit untersucht werden.

Das Ergebnis des Prozesses der Wirkstofffindung ist die Identifizierung einer chemischen Struktur, die sowohl die erwünschte Potenz gegenüber dem gewählten biologischen Ziel als auch eine angemessene Bioverfügbarkeit und

Effizienz in einem geeigneten Tiermodell der anvisierten Krankheit besitzt. Dies ist ein sehr langwieriger Prozess, wobei normalerweise die Synthese des zu erforschenden Stoffes meist zum zeitlimitierenden Faktor wird. Dabei ist es wichtig, eine richtige Leitstruktur zu definieren.

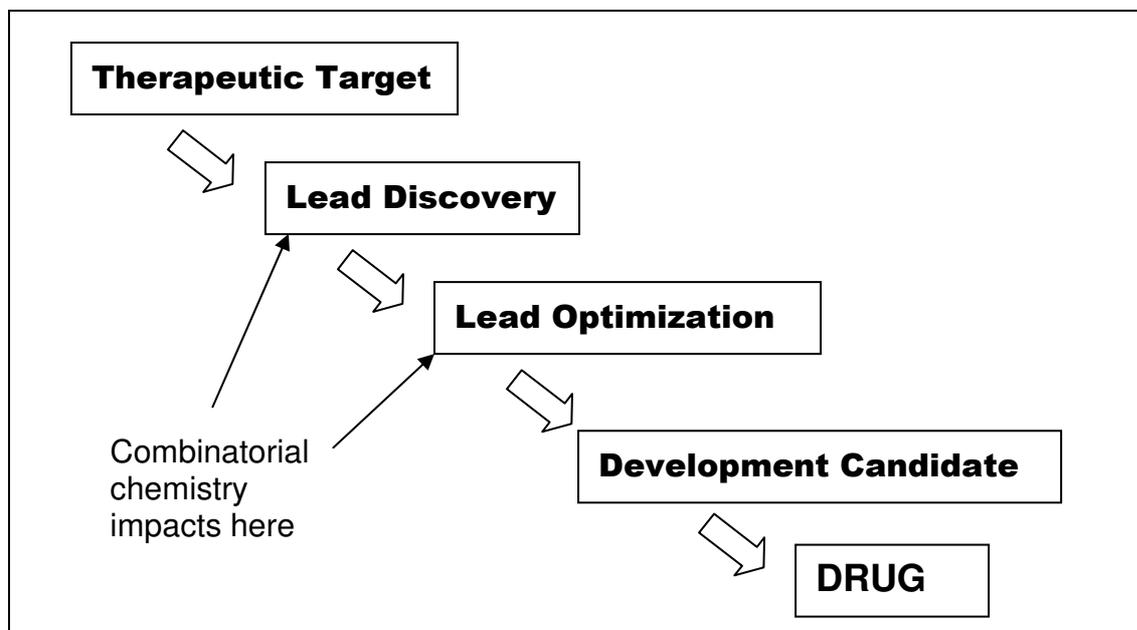


Abb.14: Die Schlüsselschritte im Prozess der Wirkstofffindung und die Schritte die durch den Einsatz der kombinatorischen Chemie beeinflusst werden können. [Terrett,1998]

1.5.1 Was ist eine Leitstruktur ?

Viele Versuche wurden bisher gestartet, die Eigenschaften einer Leitstruktur zu definieren. Zuallererst muss die Verbindung eine gewünschte biologische Aktivität besitzen, wobei diese durchaus schwach und sogar nicht sehr selektiv sein muss. Verwandte Analoga sollen demonstrieren, dass strukturelle Modifikationen sowohl die biologische Aktivität als auch die physikalischen Eigenschaften der Verbindung beeinflussen. Die Leitstruktur sollte nicht extrem polar oder lipophil sein. Letzteres könnte ein Problem für die Bioverfügbarkeit bedeuten. Sie sollte keine toxischen Gruppen oder Gruppen die durch metabolische Umsetzung toxisch werden, besitzen. Die Verbindung sollte nicht irreversibel mit dem biologischen Target reagieren, wobei erwähnt werden

sollte, dass einige der wirksamsten Arzneimittel, wie Acetylsalicylsäure, Penicillin oder Omeprazole irreversible Enzyminhibitoren sind. [Mutschler, 1995]

Sehr wichtig für die erfolgreiche Optimierung einer Leitstruktur zu einem aktiven, selektiven, oralverfügbaren und nicht-toxischen Arzneimittel scheint das Molekulargewicht und die Löslichkeit zu sein. Leitstrukturoptimierung ist ein evolutionärer Prozess, in welchem jede kleine oder große Veränderung zu einem neuen Analogon führt, welches neue Eigenschaften besitzt, bis die finale Verbindung gefunden wird. Diese besitzt dann alle gewünschten Charakteristika und kann in die klinischen Untersuchungsphase eingehen. Die Erfahrung zeigt, dass Arzneimittelkandidaten in diesem Prozess sehr oft lipophiler und größer werden [Oprea et al., 2001; Hann et al., 2001; Proudfoot, 2002]. Eine Empfehlung für Leitstrukturen wurde so definiert, dass diese nicht größer als 350 g/mol sind und einen Log P kleiner als 3 besitzen (wobei hier P der n-Octanol-Wasser Verteilungskoeffizient ist) [Teague et al., 1999]. Im Gegensatz dazu steht Lipinski's 'Rule of five', die von einem Wirkstoff fordert, dass dieser nicht mehr als 500 g/mol Molekulargewicht besitzt, der Log P < 5 ist, nicht mehr als fünf Wasserstoffbrückendonoren hat und die Anzahl der Stickstoff und Sauerstoffatome im Molekül 10 nicht überschreitet (welches ungefähr die Anzahl der möglichen Wasserstoffbrückenakzeptoren wiedergibt) [Lipinski, et al., 1997].

Werden mehr als zwei dieser Regeln verletzt, besteht ein hohes Risiko, dass die Verbindung die verlangte Bioverfügbarkeit verliert. Zusätzlich wurden polare Oberflächenstrukturen des Moleküls als Maß der Bioverfügbarkeit untersucht [Kelder, et al., 1999; Bergström et al., 2003]. Eine weitere Eigenschaft, die sich auf die ADME-Eigenschaften (**A**dmistration, **D**istribution, **M**etabolism and **E**xcretion) der Verbindung auswirkt, ist die Flexibilität des Moleküls, welche durch die freie Rotationsmöglichkeit der einzelnen Bindungen gekennzeichnet ist. [Veber, et al., 2002].

Mit diesen Definitionen einer erfolgreichen Leitstruktur veränderte sich auch der Anspruch der kombinatorischen Chemie. In den Anfängen wurden riesige Bibliotheken mit meist zu lipophilen und zu grossen Molekülen hergestellt. Hann et al. [Hann, et al., 2001; Carr, et al., 2002] konnten nachweisen, dass die

Trefferquote einer Bibliothek im Allgemeinen mit der Zunahme an ‚Überdekoratation‘ der Verbindung abnimmt. Dies bedeutet, dass je größer und komplexer die Moleküle wurden, desto weniger biologische Aktivität konnte festgestellt werden. Ausserdem schlugen sie vor, die Synthesestrategie einer Bibliothek so zu verändern, dass nur noch 100 R₁-modifizierte Analoga mit konstantem R₂- und R₃-Rest synthetisiert werden, dann 100 Modifikationen von R₂ mit konstantem R₁ und R₃, usw., anstatt die Synthese von Millionen von Verbindungen mit allen möglichen Variationen von R₁, R₂ und R₃. Somit entwickelte sich die kombinatorische Chemie zur automatisierten Parallelsynthese von viel kleineren Bibliotheken aus einzelnen genau definierten oder aufgereinigten Substanzen mit dem gewünschten biologischen Effekt. Somit liegt die Anwendung der Kombinatorik nicht so sehr in der Suche nach einer Leitstruktur, sondern vielmehr in der Validierung und Optimierung der Leitstruktur.

1.5.2 Virtuelles Screening und Modelling in der Wirkstoffsuche

In der klassischen medizinischen Chemie fing die Wirkstoffsuche meist mit einer Leitstruktur an. Mit diesem Ansatz konnte man davon ausgehen, dass eine Verbindung aus 10.000 neuen Molekülen ein neues Arzneimittel darstellte. Durch die kombinatorische Chemie und das HTS (**H**igh-**t**roughput-**s**creening) hat sich jedoch dieses Verhältnis verschoben. Inzwischen sind es Hunderttausend bis hin zu einer Millionen neue Testverbindungen aus denen ein neues Arzneimittel hervorgeht. Relativ oft werden gar keine ‚Hits‘ in den HTS identifiziert und somit wird das entsprechende biologische Ziel als ‚non-druggable‘ bezeichnet. Auch bei einer positiven Identifizierung einer Verbindung in einem Screen, kann diese nicht immer durch die Synthese von Analoga validiert werden, oder nicht alle validierten Treffer sind als Leitstruktur geeignet, da sie nicht die erforderlichen physikochemischen Eigenschaften besitzen [Weber, 2000]. Virtuelles Screening bietet eine Reihe verschiedener Methoden die helfen können, richtige Kandidaten für eine Sammlung von Verbindungen oder Substanzbibliotheken zu identifizieren [Kubinyi, 2001, Klebe, 2000; Bleicher, *et al.*, 2003]. Die einzigen Voraussetzungen für diese Technik sind die

chemische Struktur und die daraus berechneten Eigenschaften der Verbindungen. Mit Hilfe dieser Parameter können sowohl bestehende, als auch virtuelle Bibliotheken auf potentielle Leitstrukturen hin untersucht werden. Wichtig dabei ist eine gute Vorprozessierung der Datenbanken, z.B. das Entfernen von Duplikaten oder Gegenionen einer Verbindung. Die Definition des richtigen Protonierungsgrades einer Verbindung, die Festlegung des dominanten Tautomers oder aller Tautomeren einer Substanz sind wichtige Parameter in der virtuellen Suchen nach Wirkstoffen. Vor allem bei der Suche nach strukturell ähnlichen Substanzen, dem ‚Übereinanderlegen‘ von Molekülen, der Suche nach dem Pharmakophor und Bindungsstudien an das biologische Zielmolekül, ist es sehr wichtig, dass die Wasserstoffbrücken-Akzeptoren und Donoren korrekt definiert werden [Ajay, *et al.*, 1998]. Lipinski's ‚rule of five‘ wird dabei für die Auswahl von oral verfügbaren Wirkstoffen verwendet. Andere virtuelle Screening Methoden wurden entwickelt, um ‚frequent hitters‘, welche Moleküle sind, die in verschiedenen biologischen Assays als ‚Hit‘ identifiziert wurden, zu erkennen [Roche, *et al.*, 2002]. Filter für Cytotoxizität, Toxizität, Mutagenität, und Cancerogenität wurden ebenfalls in die Programme eingebaut. Jedoch haben diese Filter immer wieder zu unzuverlässigen Voraussagen über die Verbindung geführt, so dass diese Filter nur noch mit großer Vorsicht in das virtuelle Screening mit aufgenommen werden.

2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Die unselektive Wirkung von Chemotherapeutika, die sowohl Normalgewebe als auch Tumorgewebe angreifen, ist eines der Hauptprobleme bei der Pharmakotherapie von Tumoren. Die dadurch verursachten Nebenwirkungen beim Patienten erweisen sich als dabei oft als limitierender Faktor in der Krebsbehandlung. Ein Konzept zur Erhöhung der Selektivität gegenüber neoplastischem Gewebe wurde von Wießler und Mitarbeitern entwickelt und basiert auf der Konjugation von Tumortherapeutika mit Monosacchariden [Mier 1998, Sorg 2001, Reinhard 2000]. Die Verknüpfung organischer Moleküle mit Zuckerstrukturen eröffnet eine Reihe von Vorteilen. Die Verbesserung der Wasserlöslichkeit und der Bioverfügbarkeit, als auch die Anwendung in Drug-Targeting Konzepten kann durch die Glycokonjugation erreicht werden. Aufgrund der erhöhten Zuckeraufnahme von Tumorgewebe gegenüber Normalgewebe bietet sich ein Drug-Targeting durch Zuckerverknüpfte Arzneistoffe an. Im Idealfall zeigen die Glycokonjugate optimale biologische Aktivität und reichern sich im Tumorgewebe spezifisch an.

Mit der Entwicklung der kombinatorischen Chemie ist die Wirkstoffsuche in eine neue Ära eingetreten. Jedoch überzeugen die meisten Substanzbibliotheken mehr durch ihre Größe als durch ihre strukturelle Diversität. Der Mangel an Diversität und die geringe Wirkqualität der generierten Substanzen soll durch die Einbeziehung neuartiger Verbindungen und Reaktionen behoben werden. Dabei geht der Trend zur Generierung von kleineren Bibliotheken und eine sorgfältige Auswahl der einzusetzenden Komponenten. Cycloadditionen zur Generierung von Bibliotheken sind bisher nur sehr wenig eingesetzt worden. Die Diels-Alder Reaktion ist eine Cycloadditionsreaktion, bei der zwei geeignete Komponenten, in der Regel unter milden Bedingungen, so miteinander reagieren, dass keine Nebenprodukte gebildet werden. Ziel der chemisch-synthetischen Arbeit war es daher, eine Substanzbibliothek mit Hilfe der Diels-Alder Reaktion zu generieren. Durch die Verwendung von saccharidhaltigen Komponenten sollte zum einen eine erhöhte Wasserlöslichkeit in den Zielmolekülen selbst enthalten sein, und zum anderen durch die

Glycokonjugation das Drug-targeting Konzept für Tumorgewebe realisiert werden. Des weiteren sollte durch die Einführung verschiedener pharmakophorer Strukturen an den an der Diels-Alder Reaktion teilnehmenden Komponenten, eine funktionelle Diversität generiert werden.

Mit Hilfe von Molekular Modelling und Docking-studien an p53 sollten zuerst mögliche Bindungstaschen identifiziert werden, die literaturbekannte Moleküle, so wie CP31398 binden, die eine Konfirmationsänderung bei den Mutanten erzeugen. Aus diesen Studien sollten dann in einem weiteren Schritt Substanzen abgeleitet und synthetisiert werden, die optimal an das Tumorsupressorprotein p53 binden können und im Idealfall ebenfalls eine Konformationsänderung bei den Mutanten erzeugen.

Die so generierten Substanzen sollten im zweiten Teil der Arbeit auf ihr Potential die Apoptose in Tumorzellen einzuleiten, getestet werden. Durch die Auswahl der Tumorzelllinien mit unterschiedlichem p-53 Status sollte ebenfalls die Abhängigkeit des Zelltodes vom endogenen Status des Proteins untersucht werden. Dazu sollten die Substanzen erst auf ihre cytotoxischen Eigenschaften an den Zelllinien und dann auf ihren genauen Wirkmechanismus untersucht werden.

3 Ergebnisse

3.1 Chemische Synthese

Im Folgenden wird die Synthese der saccharidhaltigen Substanzbibliothek beschrieben. Das Konzept zur Generierung einer Vielzahl neuartiger Moleküle basiert auf der Diels-Alder (DA) Reaktion. Die Diels-Alder Reaktion, die Cycloaddition eines konjugierten Diens mit einer Doppel- oder Dreifachbindung (Dienophil), stellt eine der bedeutendsten und interessantesten Reaktionen der Organischen Chemie dar [Diels *et al.*, 1928; Norton, 1942; Martin *et al.*, 1961]. Im allgemeinen wird ein elektronenreiches Dien (**1**) mit einem elektronenarmen Dienophil (**2**) (elektronenziehender Substituent Z) zu einem ungesättigten Sechsring (**3**) umgesetzt

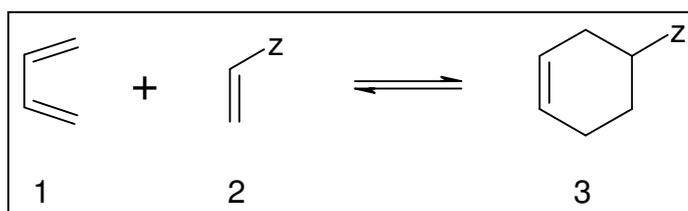


Abb.15: Diels-Alder Reaktion

Die Anwendungsbreite ist beachtlich, da nicht alle am Ringschluss beteiligten Atome Kohlenstoff sein müssen. Dies kann zur Synthese von Heterocyclen genutzt werden. [Weinreb *et al.*, 1989]. Die DA-Reaktion ist eine Gleichgewichtsreaktion und die Reversibilität, die Retro-DA-Reaktion, stellt ebenfalls ein interessantes präparatives Verfahren dar [Ichihara, 1987; Lasne *et al.*, 1985]. Die Nützlichkeit der DA-Reaktion wird des weiteren durch die hohe Regio- und Stereoselektivität begründet [Craig, 1987; Sauer *et al.*, 1980; Oppolzer, 1984]. Bei der Diskussion des Mechanismus sind vielfältige Aspekte zu berücksichtigen. So stellt die cisoide Konformation des Diens eine Voraussetzung für die DA-Reaktion dar. Besonders begünstigt sind Diene, bei denen die cisoide Geometrie durch einen Ring fixiert ist, wie zum Beispiel beim

Furan. Die hochgradige Stereoselektivität spricht für einen konzertierten Mechanismus bei dem simultan drei π -Bindungen gelöst und zwei σ - sowie eine π -Bindung geknüpft werden. Es handelt sich um eine pericyclische Reaktion, wobei ein aromatischer Übergangszustand durchlaufen wird. Dabei wird dieser Übergangszustand durch die Überlappung des HOMO (**h**ighest **o**ccupied **m**olecular **o**rbital) der einen Ausgangsverbindung mit dem LUMO (**l**owest **u**noccupied **m**olecular **o**rbital) der anderen Ausgangsverbindung stabilisiert. Die Anordnung der Substituenten im Dien und im Dienophil bleibt im Produkt erhalten (*syn*-Addition). Wird ein cyclisches Dien mit einem Dienophil umgesetzt, dann können zwei diastereomere Produkte entstehen, die mit den Präfixen *endo* bzw. *exo* bezeichnet werden. Das thermodynamisch stabilere *exo*-Produkt (**4**) wird nur in untergeordnetem Maße gebildet; kinetisch kontrolliert entsteht als Hauptprodukt das *endo*-Addukt (**5**), was auf die sekundären Orbitalwechselwirkungen zurückgeführt werden kann (*endo*-Regel). [Sauer, 1967]

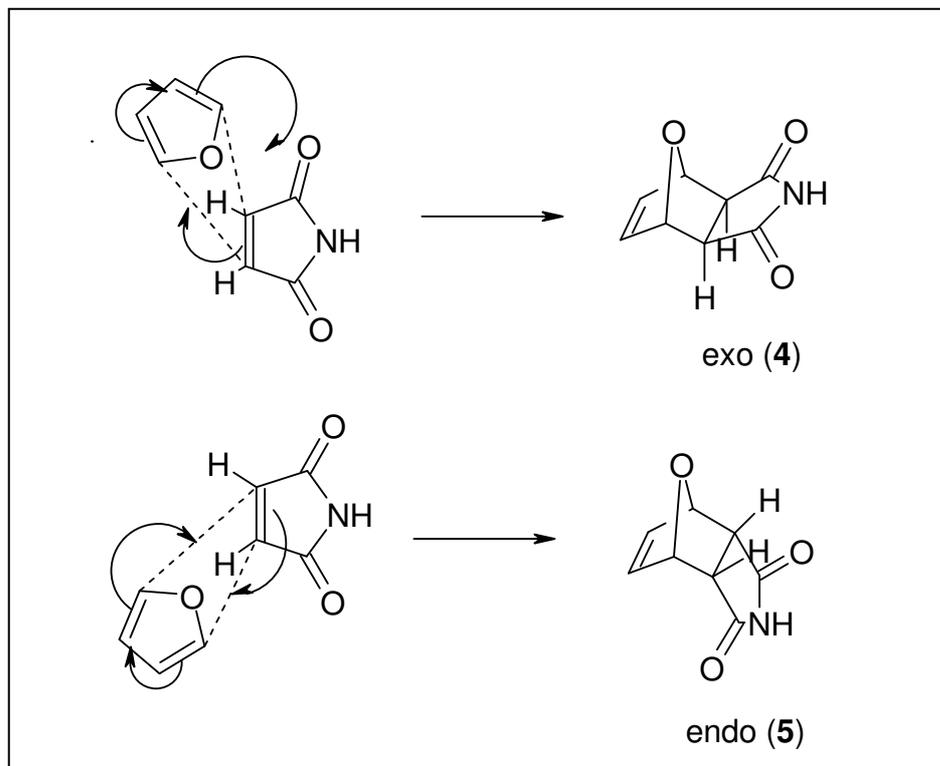


Abb.16: Entstehung des *exo*- bzw. *endo*- Diels-Alder Produktes

Als Komponenten für die Cycloaddition wurden als Diene Furane, und als Dienophile verschiedene Maleinimide ausgewählt. Beide Ausgangsverbindungen sind entweder in großer Vielfalt kommerziell erhältlich oder relativ einfach synthetisch darzustellen. Um eine größere Wasserlöslichkeit und somit eine erhöhte biologische Verfügbarkeit zu gewährleisten, wurden meistens bereits glycosilierte Bausteine für die Substanzbibliothek verwendet. Das erhaltene Diels Alder Produkt (**6**) (siehe Abb. 17) zwischen Furan und Maleinimid liefert dabei immer das gleiche Core : 7-Oxabicyclo[2.2.1]hept-2-en (**7**). Diese Struktur liegt ebenfalls bei den bicyclischen Naturstoffen wie Cantharidin (**8**), Norcantharidin (**9**) oder Endothall (**10**) vor. Diese Naturstoffe sind biologisch aktive Substanzen. Die Bioaktivitäten reichen von Phosphatase-inhibition [Tatlock, *et al.*, 1997] über zytotoxische Eigenschaften [Wang, *et al.*, 2000] bis zur Beeinflussung der Xanthinoxidase [Tsauer, *et al.*, 1997]. Ausserdem wurde ein Zusammenhang der Zytotoxizität von Norcantharidin und dem endogenen p-53 Status von Zellen nachgewiesen [Hong, *et al.*, 2000].

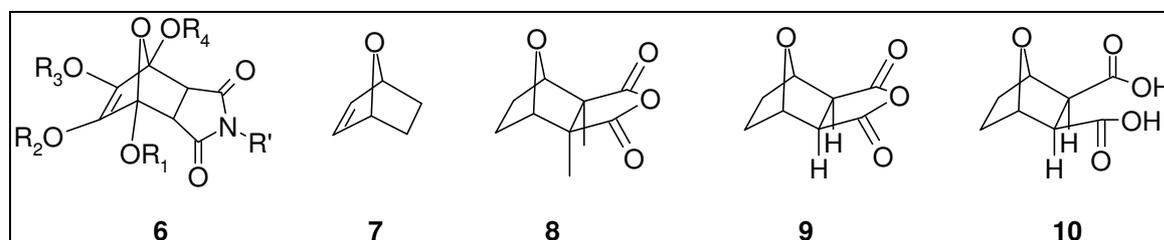


Abb.17: Strukturen von der Diels-Alder Leitstruktur (**6**), 7-Oxabicyclo[2.2.1]hept-2-en (**7**), Cantharidin (**8**), Norcantharidin (**9**) und Endothall (**10**)

Zur Derivatisierung der beiden DA-Edukte wurden u.a. Strukturen gewählt, die den Pharmacophoren verschiedener bekannter Antitumortheraeutika entsprechen. Diese wurden über unterschiedliche chemische Konjugationsreaktionen, die im folgenden besprochen werden, eingeführt. Zu den Strukturen gehört zum Beispiel 3,4,5-Trimethoxyphenyl, welches als Teilstruktur bei TMQ (**11**) (ein Dehydrofolatreduktase Inhibitor, welcher die S-Phase der Zellteilung stoppt) [Pratt, *et al.*, 1994], bei Colchicin (**13**) (eine Substanz die mit Microtubulie interagiert, und somit die Zellteilung in der

Mitosephase stoppt) [Pratt, *et al.*, 1994] und Combretastatin (**14**) [Pettit, *et al.*, 2000] (das die Anioyense eines Tumors inhibiert) vorkommt. Eine andere, immer wieder auftauchende Struktur ist 3,4-Methylenedioxyphenyl, die bei Etoposide (**12**) [Pratt, W.B., *et al.*, *The anticancer drugs*, 2nd edition, Oxford press (1994] (ein Topoisomerase II Inhibitor) und bei Pancratistatin (**15**) gefunden wird [Pettit, *et al.*, 1993] (Wirkungsmechanismus ist bis heute noch nicht bekannt, aber die Substanz besitzt antivirale, antimalaria und cytotoxische Aktivität. Sie befindet sich momentan in der Klinischen Phase I für die Behandlung von Hautkrebs – Melanoma).

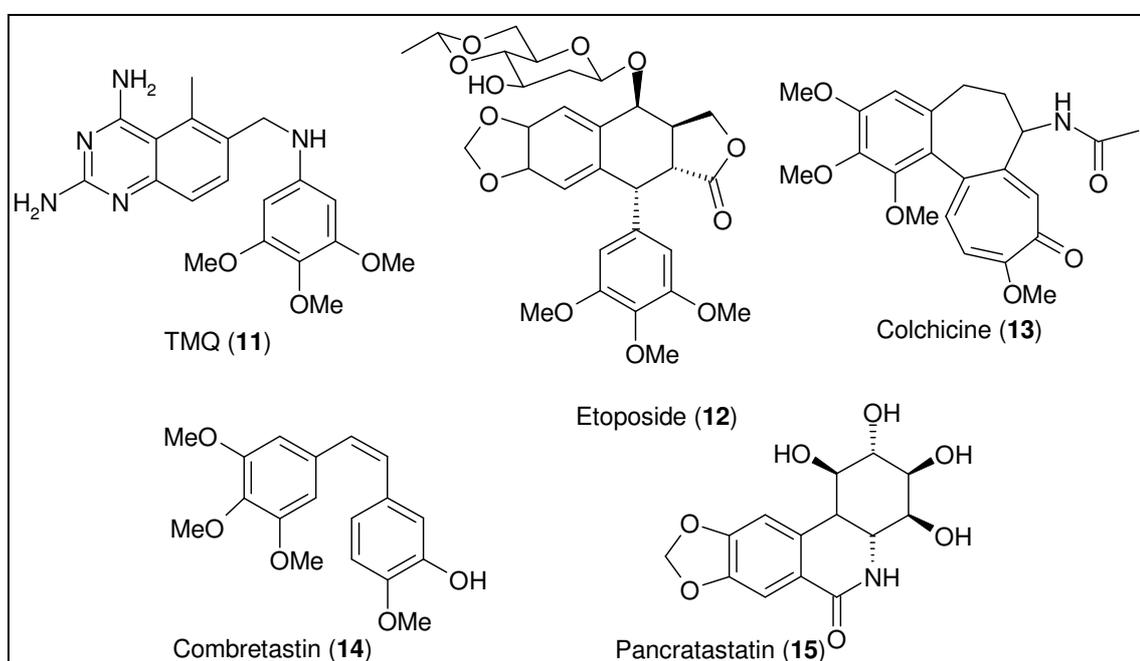


Abb.18: Strukturen bekannter Antitumortherapeutika, mit verschiedenen Wirkmechanismen

Im folgenden wird die Synthese der verschiedenen Diene und Dienophile beschrieben.

3.1.1 Darstellung der Furankomponenten

Wie zuvor erwähnt, sind verschieden substituierte Furane entweder kommerziell erhältlich oder synthetisch leicht zugänglich. Die gewünschte Vielfalt der Verbindungen kann hierbei durch unterschiedliche Substitution der

Positionen am Furanring und durch die Einführung verschiedenster Gruppen an das Dien erreicht werden. Für die Synthese wurden immer nur Di-substituierte Furane gewählt, wobei auch höher funktionalisierte Derivate für die anschließende DA-Reaktion geeignet sind. Abbildung 19 zeigt die verschiedenen Substitutionsmuster am Furanring

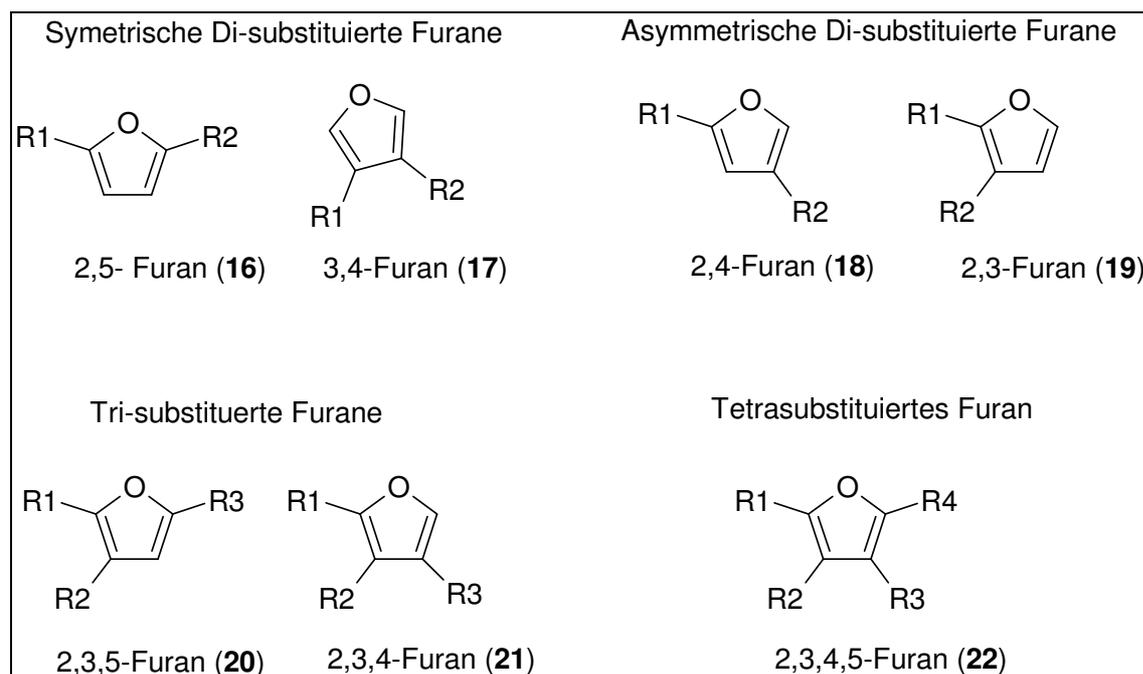
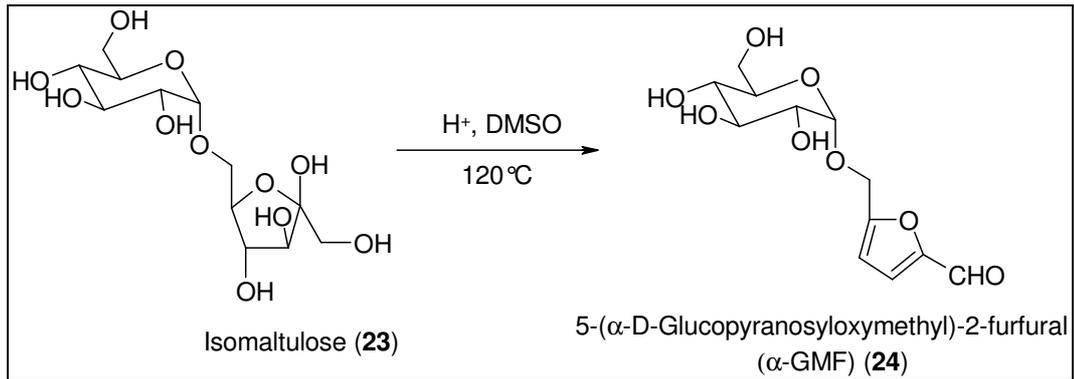
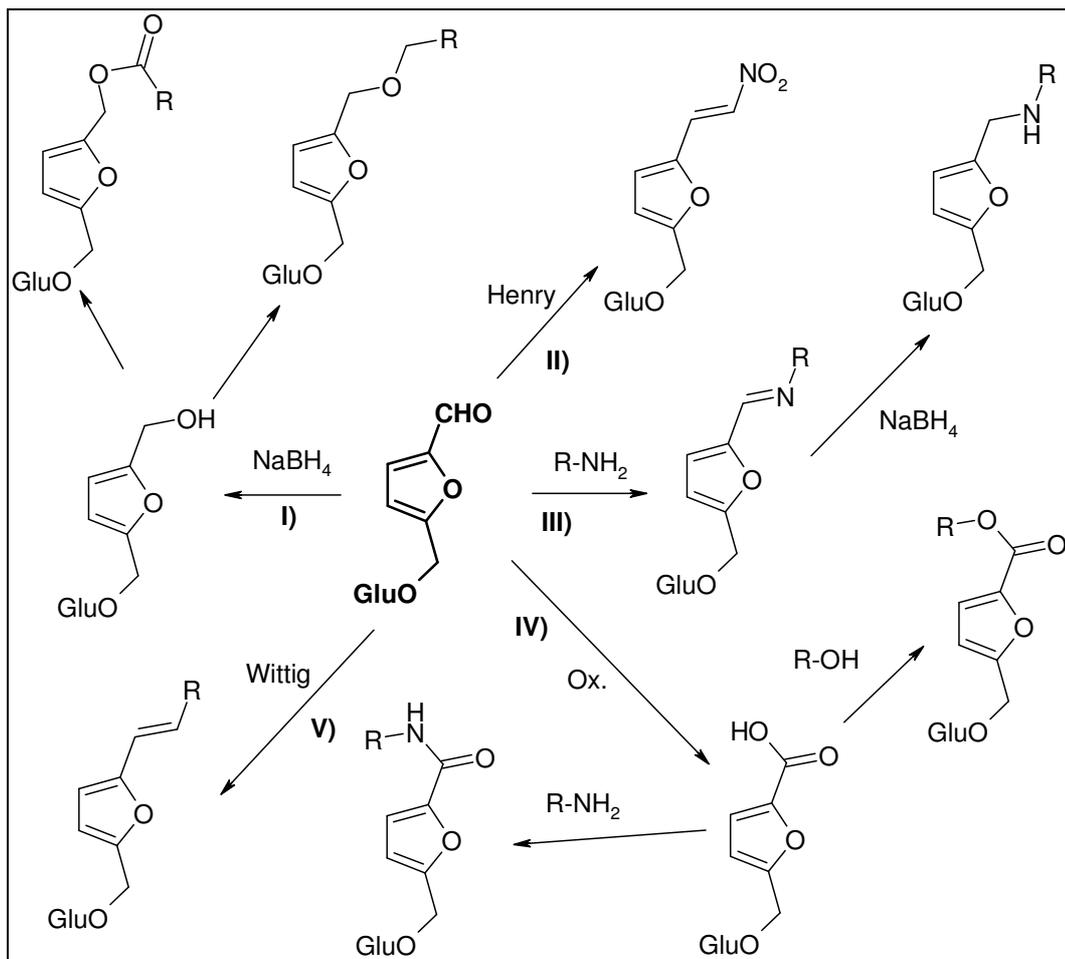


Abb.19: Strukturen der verschiedenen Substitutionsmuster am Furan

Die Möglichkeiten verschiedene Funktionalitäten am Ringsystem einzuführen, soll am Beispiel des 5- α -D-(Glucopyranosyloxymethyl)-2-furfural (oder kurz: α -GMF (**24**)) erläutert werden. Diese Substanz gehört zu den Verbindungen, die aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnen werden. Durch Dehydrierung von Isomaltulose (**23**) mit Dowex-H⁺ in DMSO bildet sich nach 2-3 Stunden das gewünschte Produkt [Lichtenthaler *et al.*, 1993].

Abb.20: Darstellung von α -GMF aus Isomaltulose

Die entstandene Verbindung ist dadurch interessant, dass das Furan schon glycosiliert vorliegt und die Aldehydfunktionalität in 2-Position unterschiedlich derivatisiert werden kann [Lichtenthaler *et al.*, 1993]. Abbildung 21 zeigt die Möglichkeiten der Funktionalisierung des Aldehyds

Abb. 21: Derivatisierungsreaktionen von α -GMF (nach Lichtenthaler)

Reaktionsweg **I)** wandelt die Aldehydfunktion durch Reduktion mit NaBH_4 in einen Alkohol um, der anschliessend entweder verestert oder aber durch die Williamson-Ethersynthese weiter derivatisiert werden kann. Es ist nicht bekannt, ob für diese weiteren Derivatisierungen Schutzgruppen am Zucker (hier Glucose) eingeführt werden müssen. Die ungeschützten Hydroxygruppen können zahlreiche ungewünschte Nebenreaktionen eingehen. Die Umsetzung mit Nitromethan führt zu dem in **II)** gezeigten Nitrostyren. Das Henry-Reaktionsprodukt kann nicht zum korrespondierenden aliphatischen Amin reduziert werden, da bei der Hydrierung auch der Furanring reduziert wird. Um Amine einzuführen, kann der Syntheseweg **III)** gewählt werden, bei dem zuerst der Aldehyd mit einem primären Amin kondensiert wird, und anschließend das gebildete Imin (Schiffbase) mit NaBH_4 reduziert wird. Lichtenthaler [Lichtenthaler *et al.*, 1993] hat die selektive Oxidation des Aldehydes **IV)** in Gegenwart des ungeschützten Zuckers durch Zugabe von Sulfamidsäure, Natriumchlorit und KH_2PO_4 durchgeführt. Die erhaltene Säure steht dann weiteren Derivatisierungen zu Verfügung, so zum Beispiel der bereits oben erwähnten Veresterung mit einem Alkohol oder der Amidierung durch Umsetzung mit einem Amin. Des weiteren lässt sich der Aldehyd in einer Wittig-Reaktion olefinieren **V)**, wobei hier die Schutzgruppenstrategie des ungeschützten Zuckers von dem eingesetzten Phosphonium-Ylid abhängt. [Lichtenthaler *et al.*, 1993].

Das nicht glycosilierte Equivalent zu α -GMF, das 5-Hydroxymehtyl-2-furfural ist kommerziell erhältlich und wurde über die Aldehydfunktion entsprechend derivatisiert. Andere di-substituierte Furane, wie z.B. 3,4-Bishydroxymethylfuran, konnten durch Oxidation mit MnO_2 in den entsprechenden Monoaldehyd überführt werden. Die zweifache Oxidation zum Dialdehyd war in diesen Fällen nur eine Nebenreaktion. Die Reaktion der Bishydroxymethylfurane mit Schwefeltrioxid Pyridin-Komplex war nicht erfolgreich, da auch die entsprechenden Säuren gebildet worden sind und jede Menge Nebenprodukte auftraten [Pettit, *et al.*, 2002]

Andere glycosilierte Furane, die für die Diels-Alder Reaktion benutzt wurden, wurden von Lorenz und Müller (Abteilung Wießler) über das Imidat-Verfahren

dargestellt. Diese Methode zur Glycosilierung [Schmidt, *et al.*, 1980] eignet sich auch zum Aufbau komplizierter Saccharidstrukturen [Paulsen *et al.*, 1993; Xio-Bing Han, *et al.*, 1993; Unverzagt, 1994].

Diese reaktiven Kohlenhydratimidate lassen sich leicht mit Alkoholen, hier den Hydroxymethylfuranen, umsetzen. Die Reaktion wird dabei durch Säurekatalyse induziert, und es entstehen meist unter Inversion am anomeren Zentrum die entsprechenden Glycoside. Zur Darstellung der benzoylgeschützten Monosaccharid-Trichloracetimidate werden als Ausgangsverbindung die entsprechenden Tetrabenzoylmonosaccharide verwendet. Die 1-OH freie Verbindung (**25**) bildet bei der Umsetzung von Trichloracetonitril unter Basenkatalyse das gewünschte Imidat. Das Anomerenverhältnis (α / β) kann dabei durch die Wahl der Base als Katalysator beeinflusst werden. Das kinetisch kontrollierte β -Imidat (**26**) wird bevorzugt bei Verwendung von Kaliumcarbonat gebildet. Diese Verbindung lagert sich sehr langsam in das thermodynamisch stabilere α -Imidat (**27**) um. Wird Natriumhydrid als Base verwendet, so bildet sich überwiegend das α -Imidat.

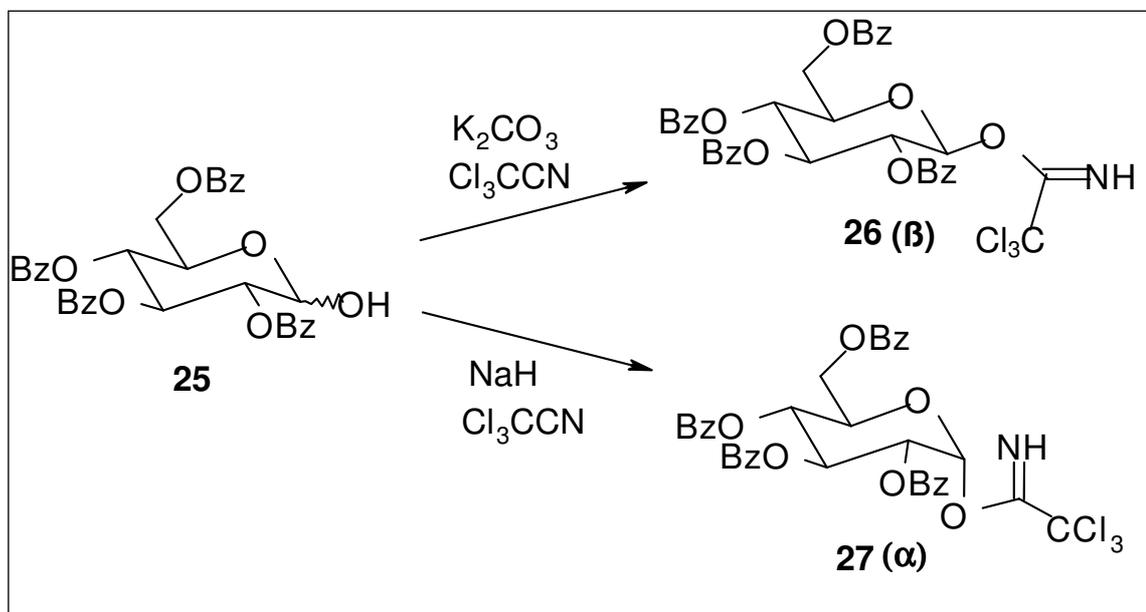


Abb. 22: Bildung der Tetrabenzoylglucopyranaosylimidat **26** (β) und **27** (α) aus Tetrabenzoylglucose und Trichloracetonitril durch Basenkatalyse (Kaliumcarbonat / Natriumhydrid)

Die Entschützung der Zucker-Furane erfolgt normalerweise mit Natriummethanolat in Methanol in quantitativem Umsatz [Lindhorst, 2000].

Zur übersichtlicheren Darstellung werden die Zucker der nachfolgenden Strukturen wie folgt abgekürzt:

Glu: Glucose (**28**), Gal: Galactose (**29**) und Fuc: Fucose (**30**). Es handelt sich hierbei im Fall der Glucose immer um das α -D-Pyranosid, da die verwendeten Furane vom 5(α -D-Glucosyloxymethyl)furfural abgeleitet worden sind. Im Fall der Galactose handelt es sich um die β -D-Verbindung, Fucose bildete die β -L-Verbindung, die bei der Verknüpfung des Imidats mit dem entsprechenden Hydroxymethylfuran gebildet wurde.

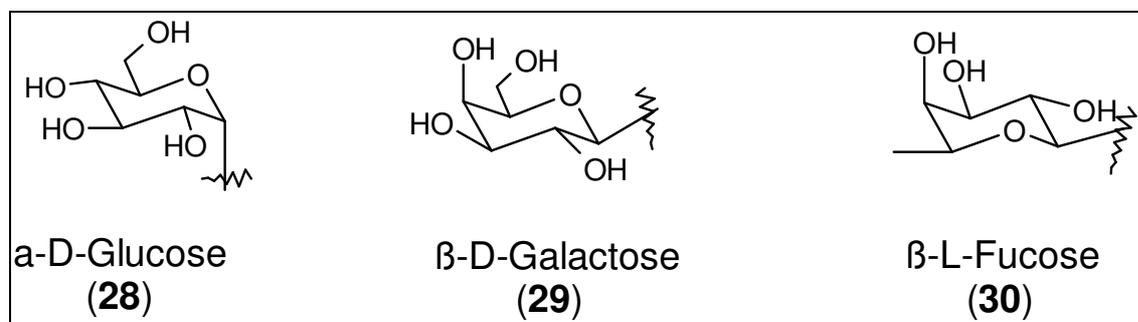


Abb.23: Strukturen der verwendeten Zucker

Abbildung 24 zeigt die später bei der Diels-Alder Reaktion verwendeten Zucker-Furanderivate:

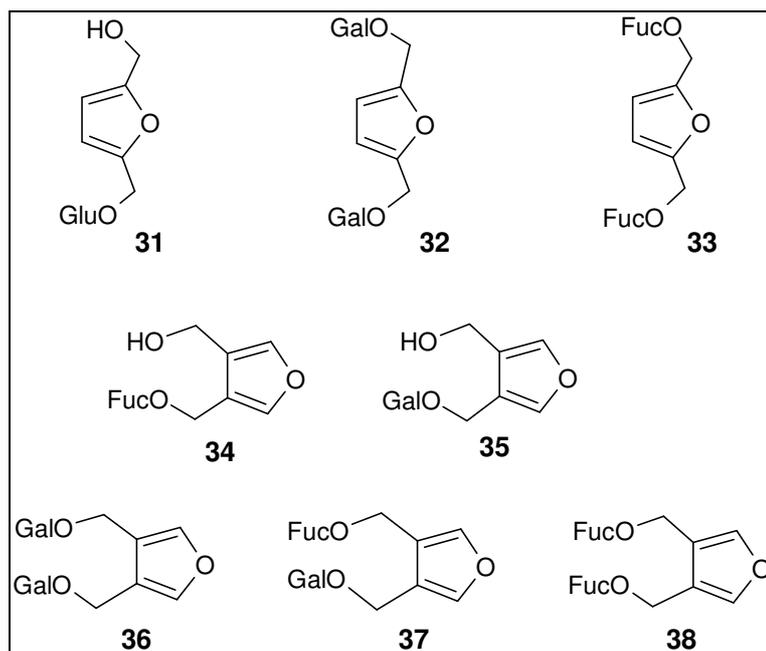


Abb.24: Mono-und Di-glycolisierte Furane, die für die Diels Alder Reaktion verwendet wurden. Im folgenden wird die Derivatisierung weiterer Furankomponenten diskutiert.

3.1.2 Synthese sekundärer Aminderivate

Im Allgemeinen wurde das Furfural (**39**) mit dem entsprechenden Amin in einem Toluol-Methanol Gemisch umgesetzt. Das durch die Iminbildung freigesetzte Wasser wurde durch Abziehen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer aus dem Reaktionsgemisch entfernt. Durch Wiederholung dieses Vorganges konnte der Aldehyd meist quantitativ zum Imin (**40**) umgesetzt werden. Diese Umsetzung konnte mittels DC verfolgt werden, und bei quantitativer Reaktion zum Imin, wurde das Amin (**41**) durch Reduktion mit NaBH_4 hergestellt werden. Die Umsetzung des Aldehyds zum Imin mit Titanisopropylat und des entsprechenden Amins, und der *in-situ* Reduktion durch Natriumcyanoborhydrid, war bei den Furfuralen keine Alternative zu der zuvorbeschriebenen Reaktionsführung. Obwohl die Methode für die wesentlich unreaktiveren Ketone entwickelt wurde um tertiäre Amine darzustellen, konnte hier die Ausbeute nicht verbessert werden. (Mattson, et al., 1990)

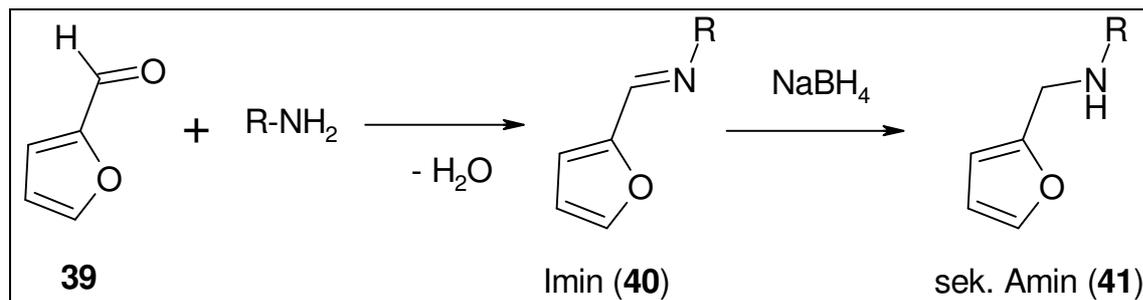


Abb. 25: Darstellung der sekundären Aminderivate über die Iminzwischenstufe

Die folgenden Furane wurden über diese Synthesemethode dargestellt::

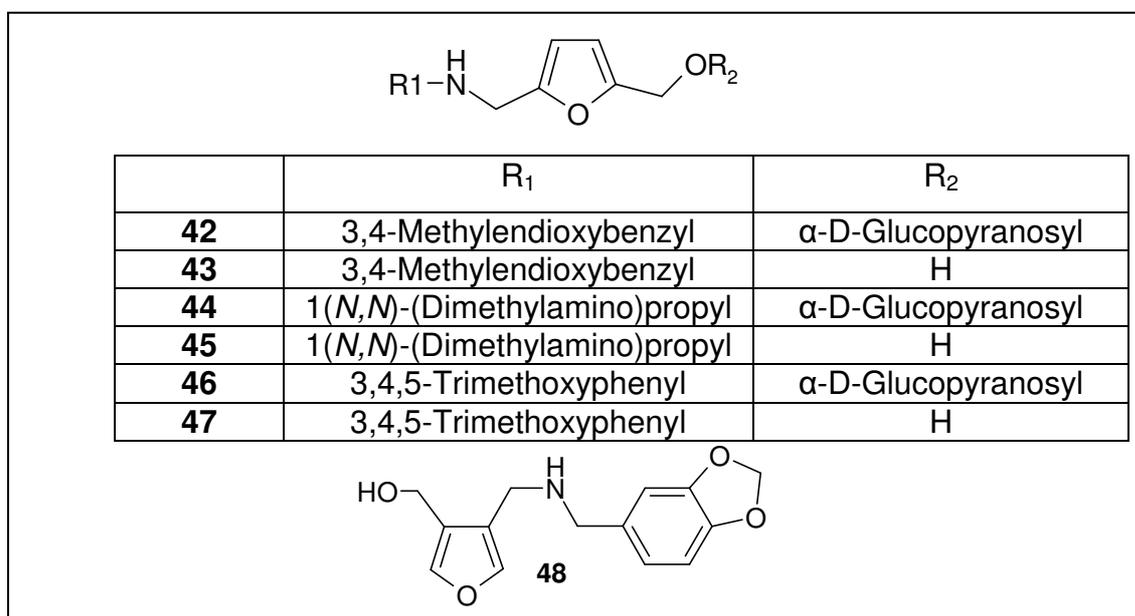


Abb.26: Dargestellte sekundäre Amine

Die Ausbeuten der Verbindungen nach der Aufreinigung auf Kieselgel variierten beträchtlich. In manchen Syntheseansätzen wurden nur Ausbeuten von 10-20% erreicht, in anderen Ansätzen konnten über 90% isoliert werden.

3.1.3 Synthese weiterer Furanderivate:

Die selektive Oxidation der CHO-Funktion von α-GMF (**24**) zur Carboxy-Gruppe wurde mit Natriumchlorit durchgeführt. Die erhaltene Säure wurde dann, wie von Lichtenthaler beschrieben, verestert. [Lichtenthaler, *et al.*, 1993]. Gereinigte

Substanz (**50**) konnte mittels normaler Säulenchromatographie nicht erhalten werden. Die Ausbeute war ebenfalls sehr gering (<5%), so dass die Verbindung nicht weiter in der Diels-Alder Reaktion verwendet werden konnte.

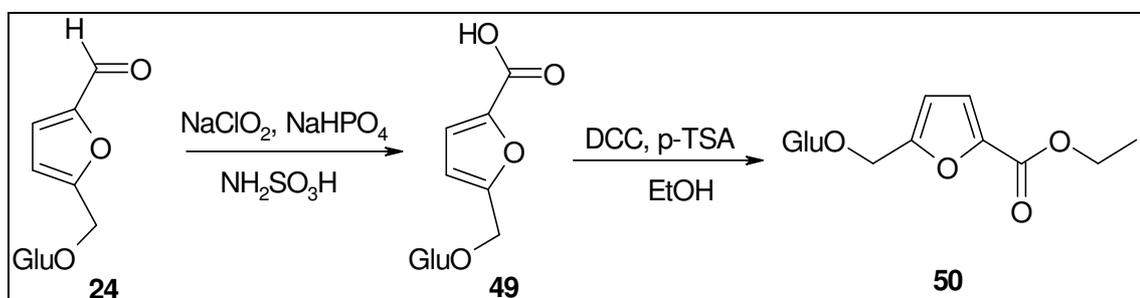


Abb. 26: Darstellung von 5- α -D-Glucopyranosylmethyl-2-carboxyethylester-furan (**50**)

Eine weitere Reaktionsklasse, die zur Derivatisierung der Furane untersucht wurde, waren die Säureamide. Dazu wurden kommerziell erhältliche Carboxy-Furane derivatisiert. Die Amidbildung des 4-Carboxy-2-hydroxymethyl-furans mit 3,4-Methylenedioxybenzylamin konnte unter klassischen Bedingungen mit verschiedenen Carbodiimiden nicht erreicht werden. Versucht wurde diese Reaktion mit EDC, DCC und wie gezeigt mit DIC. In allen Fällen konnte nur der aktivierte Ester isoliert werden, der aber nicht wie erwartet mit dem Amin abreagierte. Nur durch Zugabe von HOBt konnte das gewünschte Produkt isoliert werden (Ausbeute etwa 50% nach Säulenchromatographie).

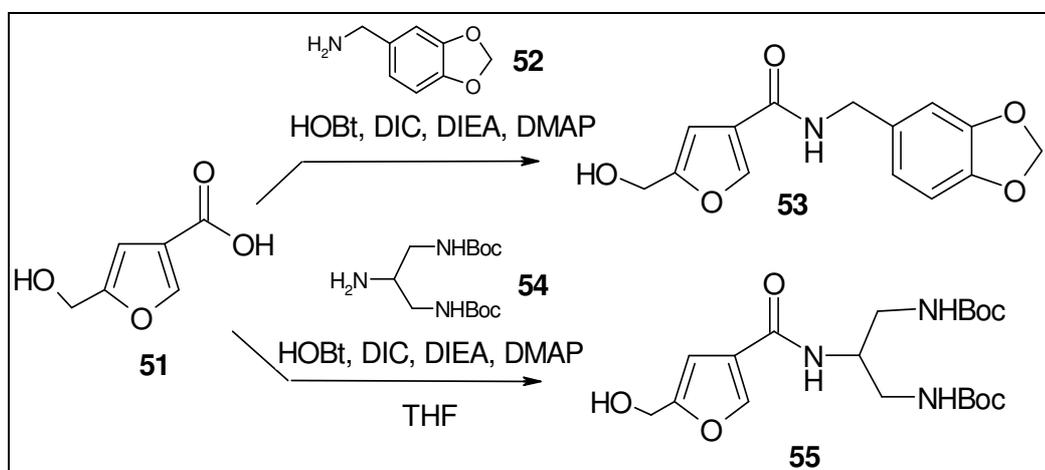


Abb. 28: Darstellung von Furan-Amidderivaten

Eine weitere Umsetzung der 2-Hydroxymethyl-furan-4-carbonsäure mit 1,3-*N,N*-bis(*t*-boc)2-amino-1,3-diaminopropan [Die Synthese dieser Verbindung wurde nach Literaturvorschriften ausgehend vom 1,3-Diamino-2-propanol durchgeführt – siehe Synthesevorschriften] führte ebenfalls nur durch Zugabe von HOBT zu dem gewünschten Produkt.

3.1.4 Darstellung der Maleinimidkomponenten

Unterschiedlich funktionalisierte Maleinimide sind in großer Vielzahl kommerziell erhältlich oder relativ leicht synthetisch zugänglich. Als Ausgangsmaterial wurde entweder Maleinimid (**56**) oder Maleinsäureanhydrid (**59**) verwendet. Durch Umsetzung mit Methylchloroformat und *N*-Methylmorpholin als Base wurde Maleinimid zuerst zum *N*-Carboxymethylmaleinimid (**57**) umgewandelt [O.Keller, *et al.*, 1975]. Das entstandene Produkt konnte dann direkt mit dem Amin zum gewünschten Maleinimid umgesetzt werden. Dabei war darauf zu achten, dass der pH-Wert der Lösung (pH = 9) konstant blieb, um die Imidbildung zu gewährleisten. [Chirons *et al.*, 1992]

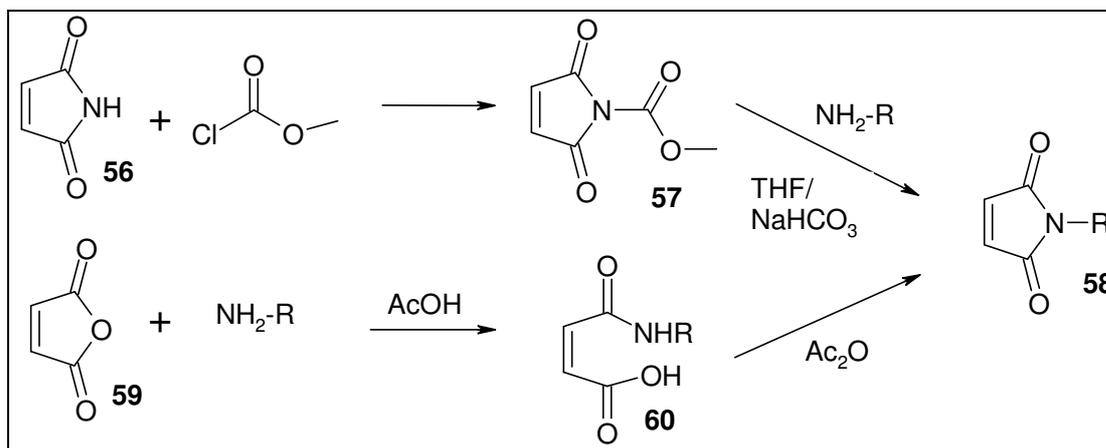


Abb.29: Darstellungsmethoden der Maleinimiderivate

Die Ausbeute variierte von Amin zu Amin – Im Allgemeinen konnte festgestellt werden, dass die Synthese mit phenylischen oder benzylichen Aminen kein Problem darstellte und Ausbeuten bis zu 90% lieferte. Wurde jedoch versucht, ein aliphatisches Amin zur Reaktion zu bringen, führten beide Reaktionswege

zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen. Die Ausbeuten hierbei waren sehr gering –zwischen 10-20 %- und in manchen Ansätzen ließen sich die gewünschten Verbindungen gar nicht isolieren. Auch andere Synthesemethoden, wie die Umsetzung von N-halogenierten Maleinimiden mit den entsprechenden Bromiden unter Zugabe von Silbernitrat führte nicht zu den gewünschten Verbindungen [Schwartz, *et al*, 1974]. Die folgenden Maleinimide wurden in dieser Arbeit dargestellt, bzw. kommerziell erstanden (**71**) oder von Hoffmann [Abt. Wießler] [(**63**), (**74**)] im Rahmen eines anderen Projektes synthetisiert.

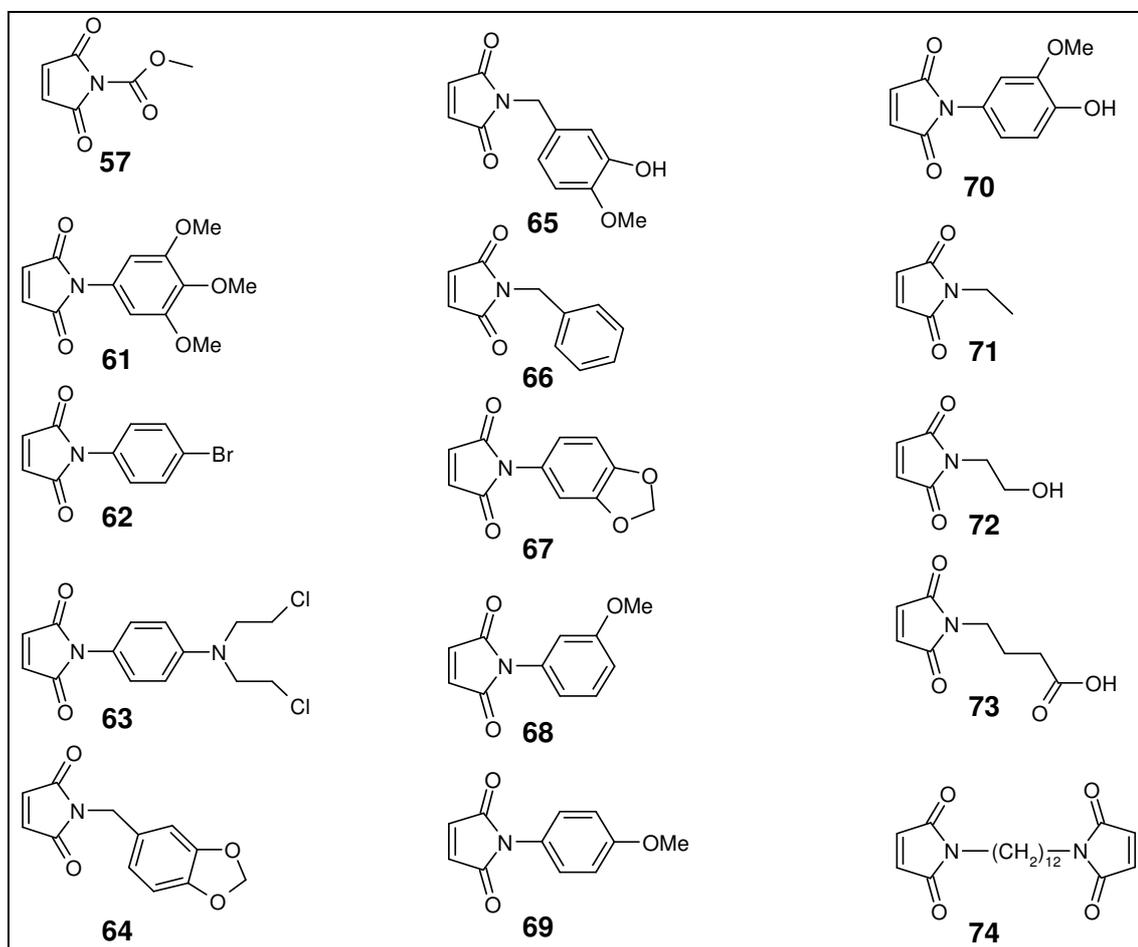


Abb.30: Strukturen der synthetisierten Maleinimide

Die Maleinimide und Furane wurden in einem parallelsynthetischen Ansatz in der Diels-Alder Reaktion umgesetzt.

3.1.5 Diels-Alder Reaktionen:

Die Diels-Alder Reaktionen wurden alle im wässrigen Medium durchgeführt. Dazu wurde im Allgemeinen 1 Äquivalent des Diens mit 1.2 Äquivalenten des Dienophiles bei 50 °C zur Reaktion gebracht. Da die Maleinimid Komponente meist nicht gut wasserlöslich war, musste THF zugesetzt werden, um eine Reaktionslösung zu erhalten. Die Reaktionszeit variierte zwischen 16 und 48 h, und die gewünschten Diels-Alder Addukte wurden in einer Ausbeute von 40-80% d.Th. gebildet. Die Reaktion wurde meist durch HPLC-Analyse des Reaktionsgemisches kontrolliert. Meistens wurde die Reaktion nach der Umsetzung von 70% des Diens abgebrochen (siehe auch S. 69f, Kapitel 3.1.11: Stabilitätsuntersuchungen). Dazu wurde die Reaktionsmischung direkt mit flüssigen Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet. Die Aufreinigung erfolgte in der Regel durch HPLC, da diese Aufreinigung auch eine Trennung der verschiedenen Stereoisomere ermöglichte. Je nach Substitution war hier nicht nur die Trennung von den *Exo*- und *Endo*-Produkten möglich, sondern auch die Trennung der verschiedenen Diastereomere.

Wie in der Einleitung beschrieben, war durch den parallelsynthetischen Ansatz die Darstellung einer großen Substanzvielfalt möglich. Um eine Vielzahl von Reaktionen parallel zu ermöglichen, wurde ein „ChemSpeed Synthesizer“ verwendet (Abb. 31). Die Reaktionskolben wurden hierbei von Hand mit den Edukten und dem Lösungsmittel befüllt, und dann bei konstanter Temperatur (50 °C) geschüttelt.

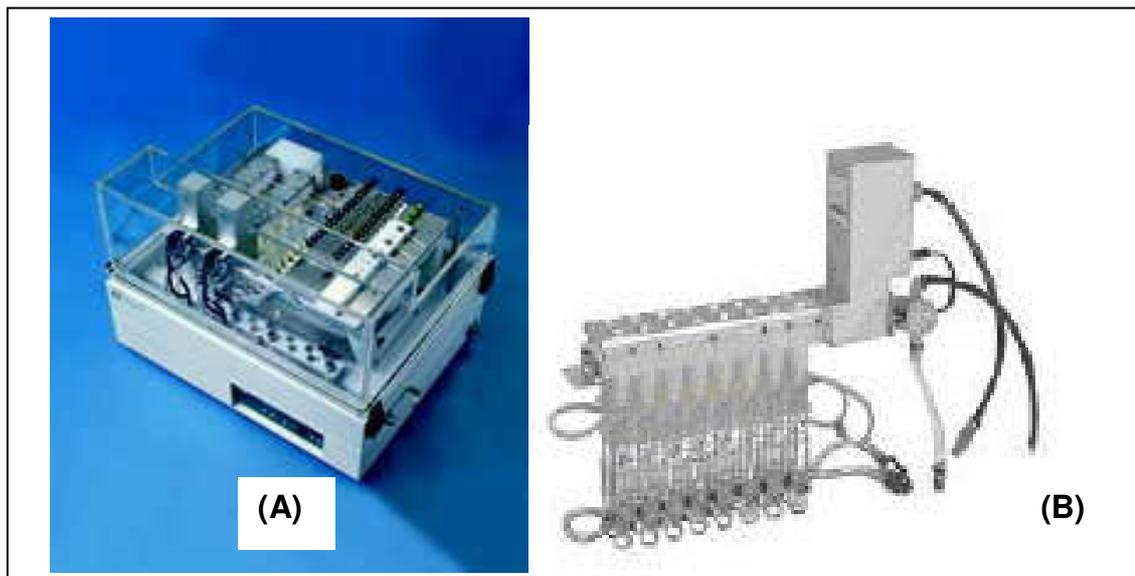


Abb.31: Chemspeed Synthesizer (A) und Reaktionskolben pro Anschlusseinheit (B)

Auf Grund der Vielzahl an Verbindungen, wurde nur ein Teil der hier aufgeführten Substanzen vollständig analytisch charakterisiert. In allen Fällen wurden die Substanzen Massenspektrometrisch und durch HPLC –Analyse nachgewiesen.

Die erhaltenen Diels-Alder Addukte können in die folgenden Kategorien eingeteilt werden: Nicht-glycosilierte, Mono-und Di-Glycosilierte Diels-Alder Addukte.

3.1.6 Nicht-Glycosilierte DA-Produkte:

Um die Vielzahl an generierten Substanzen zu erhöhen, wurde zur Darstellung der Nicht-Glycolisierten Verbindungen zusätzlich zwei kommerziell erhältliche Furane gewählt: 5-(*N,N*-Di-methylaminomethyl)-2-hydroxymethyl-furan und *N*-Acetylaminomethylfuran.

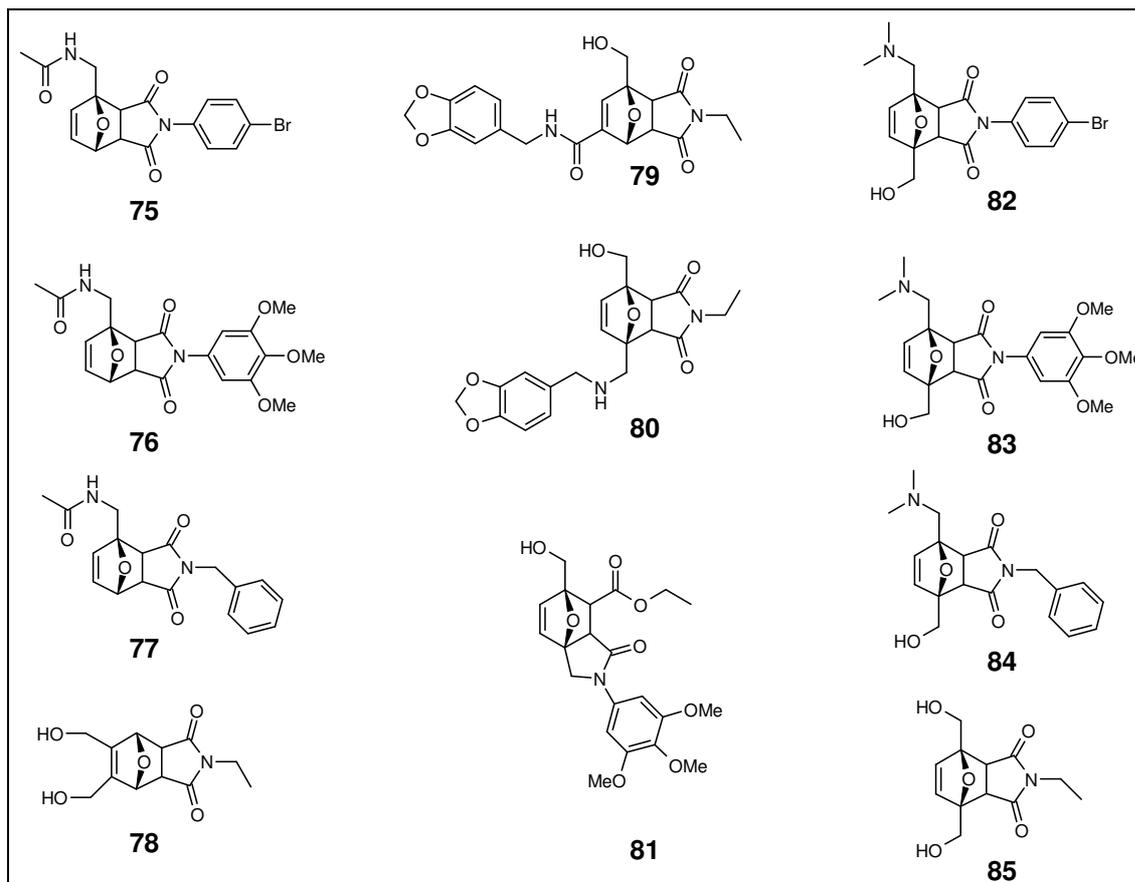


Abb.32: Strukturen der nicht-glycosilierten Diels-Alder Produkte

Durch Amidkopplung von 5-[*N*-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)aminomethyl]-2-hydroxymethyl-furan (**47**) mit Monoethylmaleinsäureester und anschließender intramolekularer Diels-Alder Reaktion konnte Verbindung (**81**) dargestellt werden [Paulvannan, *et al.*, 1999].

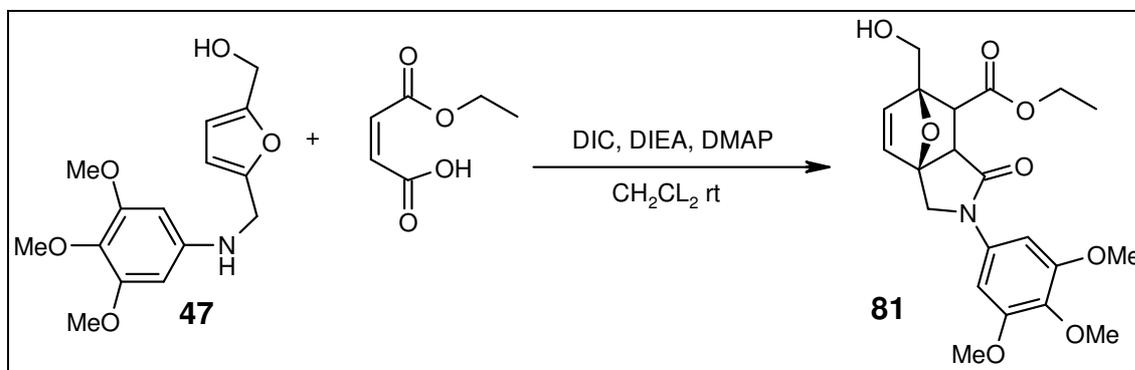


Abb.33: Synthese von 7-Hydroxymethyl-3-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-4-oxo-10-oxa-3-azatricyclo-[5.2.1.0^{1,5}] dec-8-en-6-carboxylsäure-ethylester (**81**)

Die Reaktionsprodukte waren mit Ausnahme von 4-Ethyl-8,9-bis-hydroxymethyl-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0.^{2,6}]dec-en-3,5-dion (**78**) und 4-Ethyl-1,7-bis-hydroxymethyl-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0.^{2,6}]dec-en-3,5-dion (**85**) schlecht bzw. gar nicht wasserlöslich. Durch die Einführung eines Kohlenhydrates oder von Disacchariden konnte die Wasserlöslichkeit erheblich gesteigert werden. Dies machte sich auch schon bei der Synthese der Diels-Alder Produkte bemerkbar, da nicht mehr so große Mengen an THF für die Synthese benötigt wurden.

3.1.7 Darstellung der Monoglycosilierten Diels-Alder Produkte:

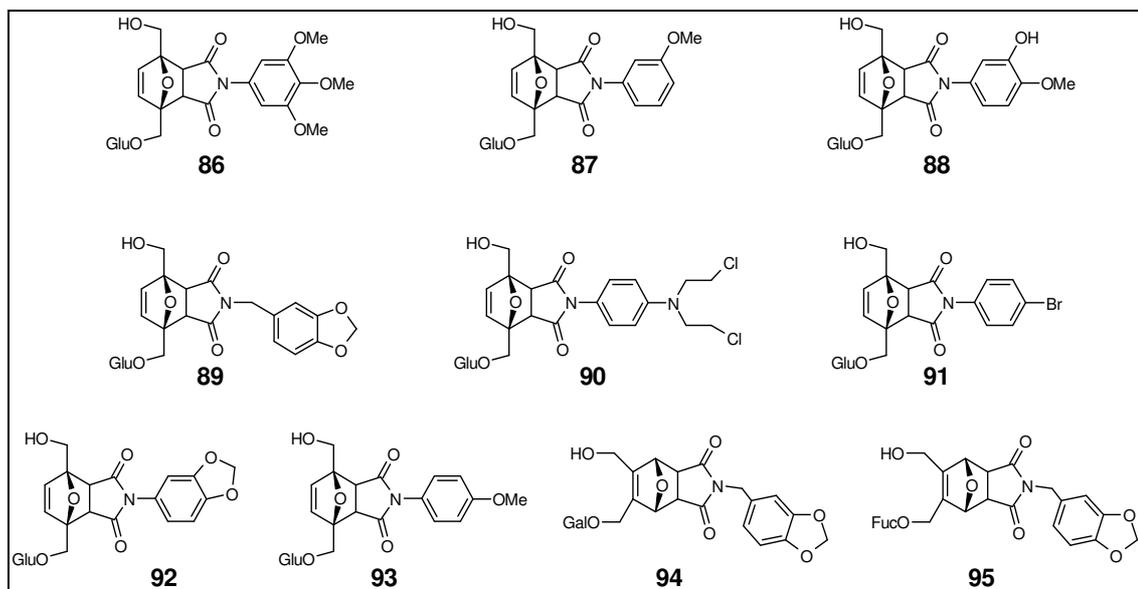


Abb.34: Strukturen der monoglycosilierte Diels-Alder Addukte

Die Diels-Alder Reaktion mit α -GMF (**24**), welches noch die Aldehydfunktionalität in der 2-Position besitzt gelingt nicht. Die Orbitalwechselwirkungen des Aldehydes in direkter Nachbarschaft stören beträchtlich die erforderlichen Wechselwirkungen zwischen HOMO und LUMO des Diens bzw. des Dienophils, die erforderlich für den konzertierten Mechanismus der Diels-Alder Reaktion sind.

3.1.8 Darstellung von Di-glycosilierten Diels-Alder Addukten:

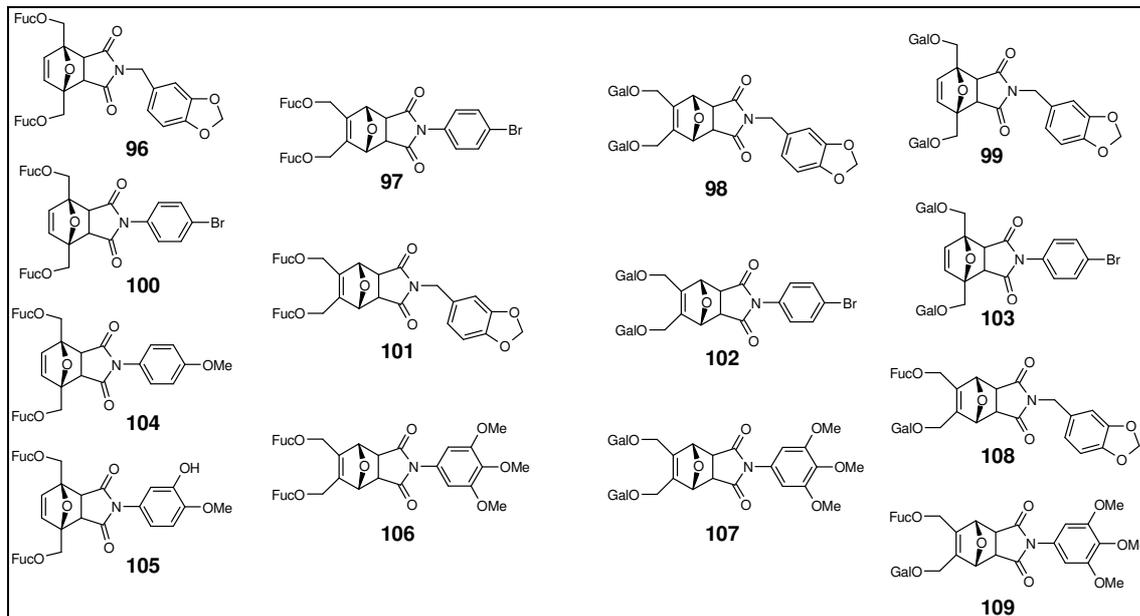


Abb.35: Strukturen der Di-glycosilierten Diels-Alder Verbindungen

Die diglycosilierten Diels-Alder Addukte zeichnen sich durch hohe Wasserlöslichkeit aus.

3.1.9 NMR-Untersuchungen der Diels-Alder Addukte

Abhängig von der Substitution am Furan, besitzen die verschiedenen Diels-Alder Produkte eine Symmetrie, eine Pseudosymmetrie oder sind assymmetrisch. Abhängig von der Substitutionsposition und dem Substituenten kann es deswegen zu verschiedenen Stereoisomeren bei der Produktbildung in der Diels-Alder Reaktion kommen. Es bilden sich neben den *exo*- und *endo*-Stereoisomeren auch die jeweiligen Diastereomere (Abb. 36)

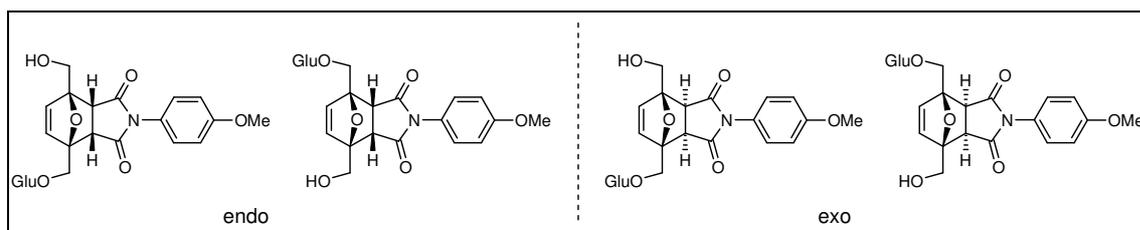


Abb. 36: Strukturen der möglichen Diastereomeren von 4-(4'-Methoxyphenyl)-7-(hydroxymethyl)-1-(α -D-glycopyranosyloxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0.2,6]dec-8-en-3,5-dion (**93**)

Im Fall von 4-Ethyl-8,9-bis-hydroxymethyl-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0.^{2,6}]dec-en-3,5-dion (**78**) und 4-Ethyl-1,7-bis-hydroxymethyl-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0.^{2,6}]dec-en-3,5-dion (**85**), liegt eine Symmetrieebene vor, die durch die Mitte des jeweiligen Moleküls, und somit durch den Sauerstoffbrückenkopf und den Maleinimidstickstoff, geht. Diese Moleküle sind symmetrisch und es existieren nur die zwei Stereoisomere *exo* und *endo*.

Eine Zuordnung der *exo*- und *endo*-Konformation des DA-Adduktes konnte mit Hilfe der NMR Daten erfolgen. Dabei ist eine charakteristische Verschiebung der zwei Brückenkopf H-Atome zu beobachten, die im Falle von ‚*exo*‘ Tieffeldverschoben sind, und im Falle von ‚*endo*‘ Hochfeld. Des weiteren gibt das Kopplungsmuster der Brücken-H- atome bzw das Aufsplitten der Hydroxymethyl-Gruppen am Ring einen Hinweis auf die vorliegende Konformation.

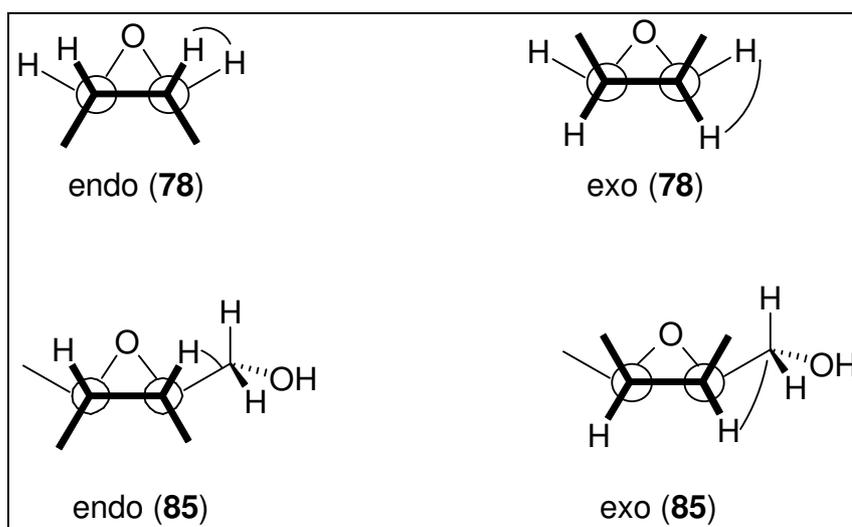
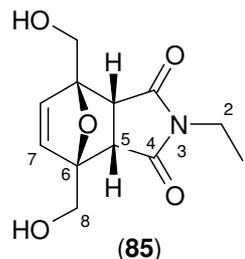
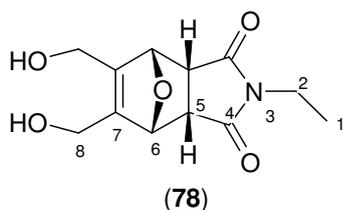


Abb.37: Newmann Projektion der *endo* und *exo* Verbindungen von 4-Ethyl-8,9-bis-hydroxymethyl-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0.^{2,6}]dec-en-3,5-dion (**78**) und 4-Ethyl-1,7-bis-hydroxymethyl-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0.^{2,6}]dec-en-3,5-dion (**85**).

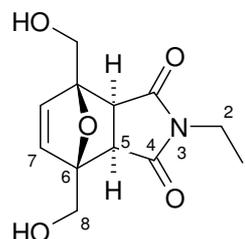
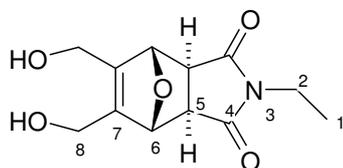
Abbildung 36 zeigt die Newmann Projektion der *endo*- und *exo*- Verbindungen von (**78**) und (**85**). Im Fall von *endo*-4-Ethyl-8,9-bis-hydroxymethyl-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0.^{2,6}]dec-en-3,5-dion (**78**) liegt ein kleiner Diederwinkel zwischen den beiden Brücken-H-Atomen vor. Im Fall der *exo*-Verbindung liegt ein grösserer Winkel vor. Diese Tatsache erklärt das unterschiedliche H-

Kopplungsmuster (siehe unten). Im Fall der *endo*- bzw. *exo*-Verbindung von 4-Ethyl-1,7-bis-hydroxymethyl-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0.^{2,6}]dec-en-3,5-dion (**85**) sind am „Oxa“-brückenkopf keine H-Atome, sondern CH₂-Gruppen, mit denen die *endo*- bzw. *exo*-H-Atome interagieren können.

EXO-ENDO Zuordnung der ¹H-NMR Spektren von (**78**) bzw. (**85**) [(250 Mhz, CD₃OD, δ in ppm)]:



ENDO	3,4- substituierte Diels-Alder Produkte	ENDO	2,5- substituierte Diels-Alder Produkte
Brücken H's (6)	δ = 5.32 (dd, 2H J = 3.6 Hz)	Vinyl H's (7)	δ = 6.35 (s, 2H)
CH ₂ -OH (8)	δ ₈ = 4.36 (d, 2H, J= 13.6 Hz) δ _{8'} = 4.02 (d, 2H, J= 13.6 Hz)	CH ₂ -OH (8)	δ ₈ = 4.36 (d, 2H, J=13.6 Hz) δ _{8'} = 4.02 (d, 2H, J= 13.6 Hz)
Exo/endo H (5)	δ = 3.65 (dd, 2H, J=3.6 Hz)	Exo/endo H (5)	δ = 3.54 (s, 2H)
N-CH ₂ (2)	δ = 3.39 (q, 2H, J=7.1 Hz)	N-CH ₂ (2)	δ = 3.35 (q, 2H, J=7.2 Hz)
-CH ₃ (1)	δ = 1.03 (t, 3H, J= 7.1 Hz)	-CH ₃ (1)	δ = 1.02 (t, 3H, J=7.2 Hz)



EXO	3,4- substituierte Diels-Alder Produkte	EXO	2,5- substituierte Diels-Alder Produkte
Brücken H's (6)	δ = 5.21 (s, 2H)	Vinyl H's (7)	δ = 6.6 (s, 2H)

CH ₂ -OH (8)	$\delta_8 = 4.41$ (d, 2H, J=13.4 Hz) $\delta_{8'} = 4.28$ (d, 2H, J=13.4 Hz)	CH ₂ -OH (8)	$\delta_8 = 4.16$ (d, 2H, J= 12.6 Hz) $\delta_{8'} = 3.91$ (d, 2H, J= 12.6 Hz)
N-CH ₂ (2)	$\delta = 3.54$ (q, 2H, J=7.1 Hz)	N-CH ₂ (2)	$\delta = 3.48$ (q, 2H, J=7.1 Hz)
Exo/endo H (5)	$\delta = 3.09$ (s, 2H)	Exo/endo H (5)	$\delta = 3.07$ (q, 2H J= 5.2 Hz)
-CH ₃ (1)	$\delta = 1.15$ (t, 3H, J= 7.1 Hz)	-CH ₃ (1)	$\delta = 1.10$ (t, 3H, J= 7.1 Hz)

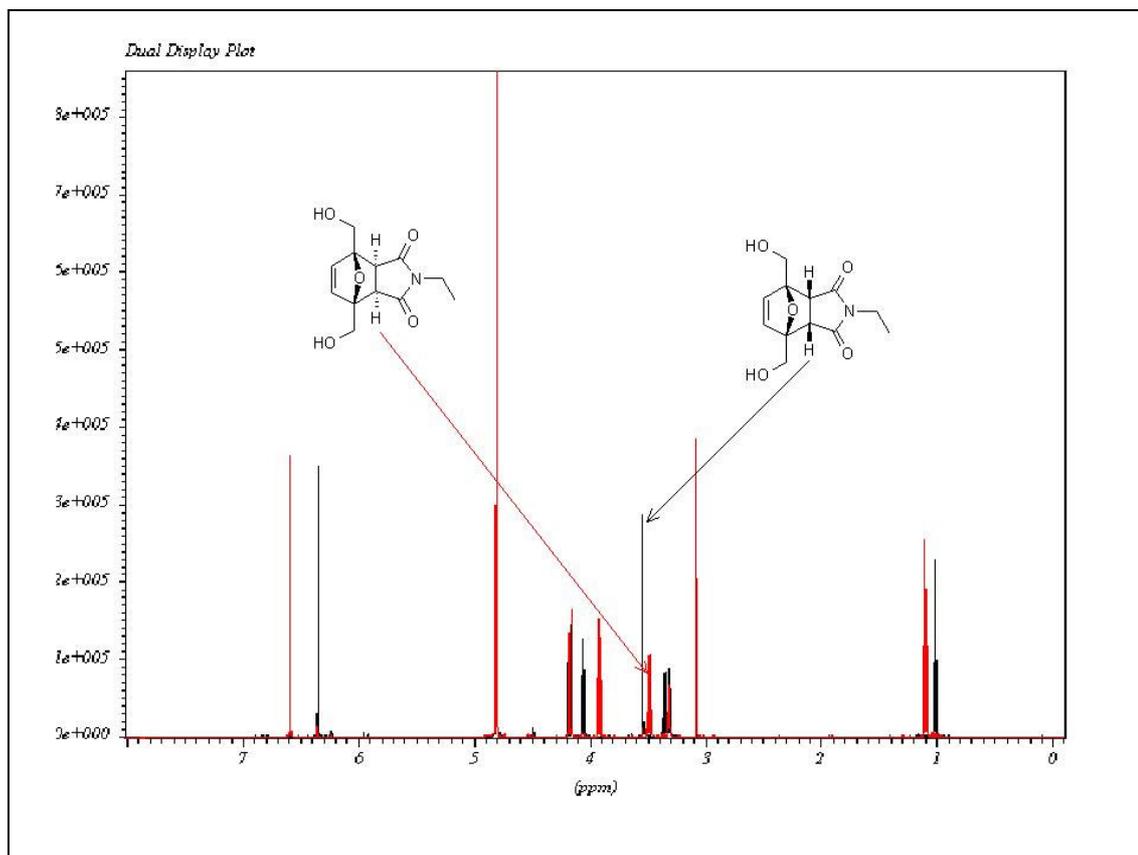


Abb.38: ¹H NMR (250 MHz) der 2,5 substituierten DA-Addukte

Die symmetrisch am Oxabicyclo-core substituierten und mit dem gleichen Zucker di-glycosilierten Verbindungen besitzen eine Pseudosymmetrie. Deswegen konnten hier im ¹H-NMR-Spektrum nur die unterschiedlichen *exo*- und *endo*-Strukturen nachgewiesen werden und keine weiteren Unterschiede bei den jeweiligen Diastereomeren waren zu beobachten.

3.1.10 Weitere Synthesen

Für die biologischen Untersuchungen wurden die folgenden Maleinimide und Diels-Alder Produkte hydriert, die aufgrund der biologischen Aktivität (siehe Abschnitt 3.2: Biologische Wirksamkeit *in vitro*) ihrer nicht-hydrierten Ausgangsverbindungen ausgewählt wurden. Die Verbindungen wurden dazu im Allgemeinen in Methanol gelöst, mit Palladium auf Kohlenstoff (Pd/C 10%) versetzt und in einer Wasserstoffatmosphäre hydriert. Nach dem Abfiltrieren des Katalysators und anschließender Aufreinigung mittels HPLC konnten die Produkte in guten Ausbeuten (54 - 90%) erhalten werden.

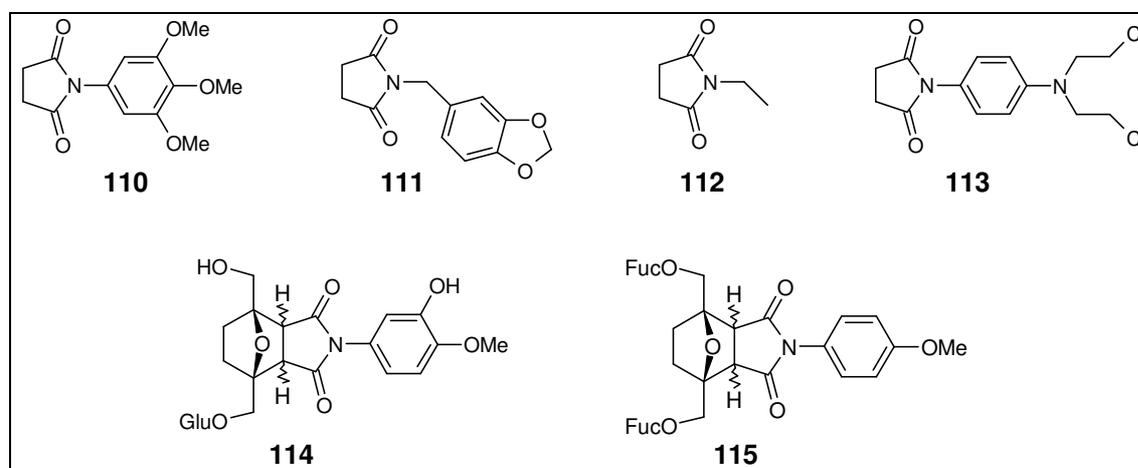


Abb.39: Strukturen der dargestellten Succinimide und hydrierten Diels-Alder Produkte

Für die Zellversuche und die Überprüfung der Substanzen auf ihr Potential, Apoptose in p53 mutierten Zellen einzuleiten, wurden außerdem die folgenden Substanzen nach Literaturvorschriften bzw. Standardmethoden synthetisiert (siehe auch Synthesevorschriften).

Um eine positiv-Kontrolle zur Aktivierung von mutiertem p53 zu erhalten, wurde CP-31398 (**120**) synthetisiert [Jiang, *et al.*, 1990; Lee, *et al.*, 1995].

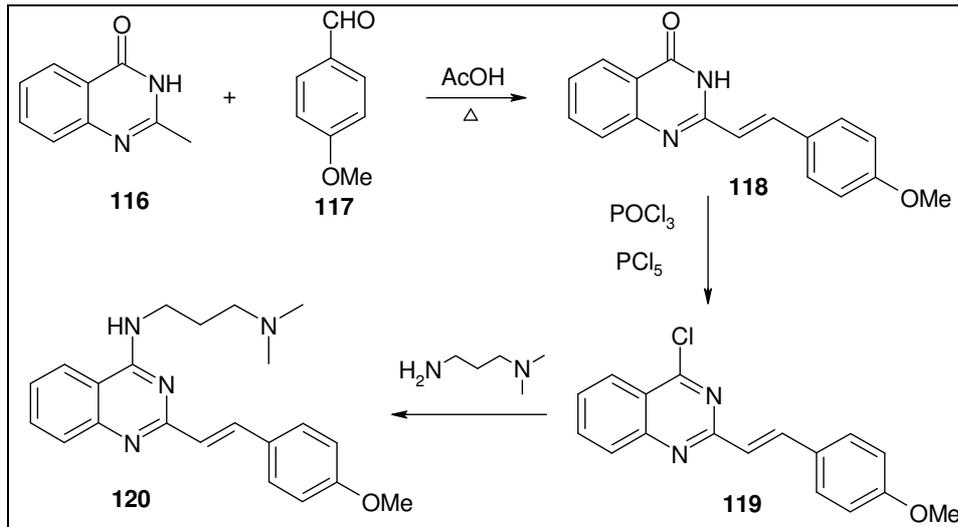


Abb.40: Synthese von CP-31398

Des weiteren wurde das Peptid REDEDEIW (**121**) in Kooperation mit der Gruppe von Mier (Universität Heidelberg) synthetisiert. Damit das biologisch aktive Peptid auch in einer Diels-Alder Reaktion eingesetzt werden kann, wurde durch Ankoppeln von N-(Capronsäure)-maleinimid ein weiteres Derivat dargestellt (**122**).

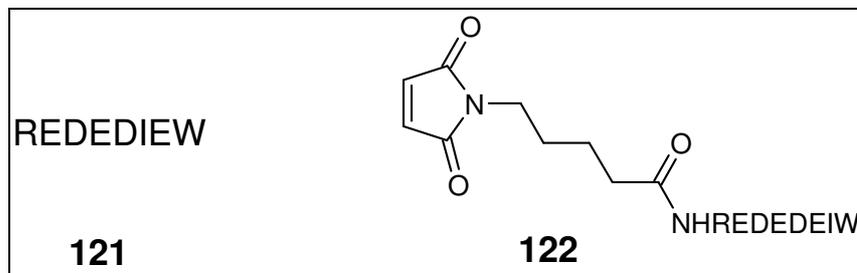


Abb.41: Peptid REDEDEIW und das korrespondierende Maleinimidderivat

3.1.11 Stabilitätsuntersuchungen in wässrigen Lösungen

Das Anwendungspotential von Wirkstoffen wird maßgeblich durch deren Stabilität geprägt. Aus diesem Grund wurden sowohl 3 Diels-Alder Produkte, als auch 4 Maleinimide auf deren Haltbarkeit in wässrigen Lösungen untersucht. Es sollte demonstriert werden, dass die Substanzen unter den Bedingungen der verwendeten *in vitro* Testsysteme und der Zellkultur ausreichend stabil sind.

Auch wenn die Versuche nicht die Komplexität eines biologischen Systems widerspiegeln, liefern solche Daten erste Anhaltspunkte für das Verhalten *in vivo*.

Die Stabilitätsuntersuchungen wurden mittels HPLC-Analytik nach einem vorgegebenen Zeitschema durchgeführt. Dazu wurden alle Substanzen nach der Aufreinigung durch präparative HPLC in wässrigem 0,2M $\text{KH}_2\text{PO}_3 / \text{K}_2\text{HPO}_3$ Puffer (pH: 7,4) aufgenommen, bei 37°C inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten vermessen. Da bei einer Wellenlänge von 210 nm detektiert wurde, konnten auch immer die Einspritzpeaks des Systems sehr gut beobachtet werden.

Stabilitätsuntersuchung der Diels Alder Produkte:

3 mg der Verbindung **(104)** (endo-/exo-Gemisch) wurden in 1 ml des wässrigen Puffers gelöst, und direkt nach dem Aufnehmen in die Flüssigkeit und nach 8 h, 24 h und 48 h mittels HPLC vermessen. Die Werte wurden nach den Messungen jeweils korrigiert, in dem die nichtrelevanten Peaks von der gesamten integrierten Fläche abgezogen worden sind, und dann die Edukt- und Produkt-Peaks prozentual umgerechnet worden sind.

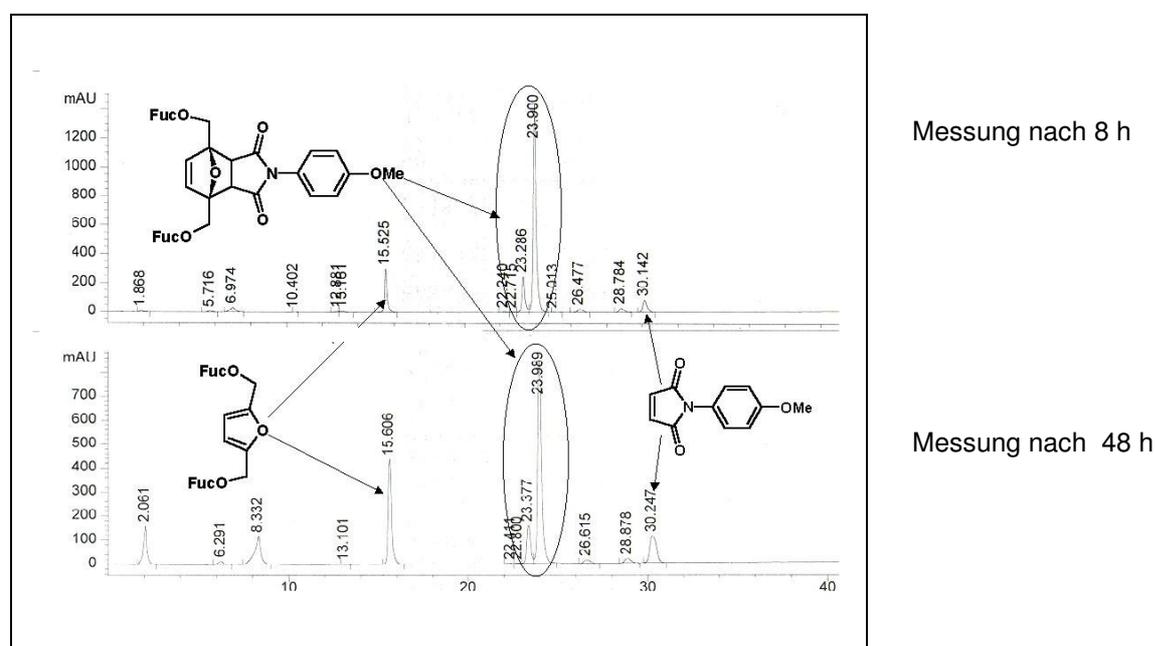


Abb.42: HPLC-Chromatogramme von **(104)** nach 8 h bzw. 48 h in $\text{K}_2\text{HPO}_3/\text{KH}_2\text{PO}_3$ Puffer bei 37°C [HPLC Bedingungen: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ M) 210 nm; 1ml/min; Gradient: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (100% / 0%) in 40 min. auf $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (50% / 50 %)]

Die Messung wurde 2 mal durchgeführt und der Mittelwert aus beiden Messungen aufgetragen.

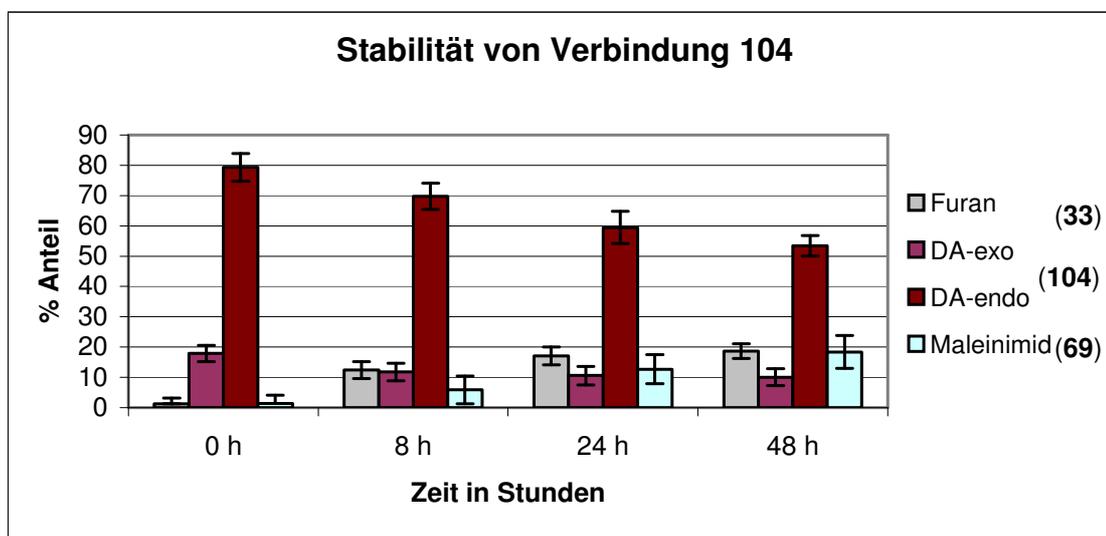


Abb.43: Stabilitätsuntersuchung von (104): Prozentuale Zunahme der Edukte [3,4-(Bis- β -L-fucosyloxy)methylfuran (33) und N-(4-Methoxyphenyl)maleinimid (69)] und Abnahme der beiden Diels-Alder Addukte exo- bzw endo- 4-(4'-Methoxyphenyl)-8,9-bis-(β -L-fucosyloxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0.^{2,6}]dec-en-3,5-dion (104)

Eine prozentuale Abnahme der Diels Alder Verbindung von knapp 98 % vom Zeitpunkt des Aufnehmens in den Puffer auf 63% nach 48 Stunden konnte beobachtet werden. Die Zunahme von Furan und Maleinimid korrelieren dabei mit der Abnahme des Diels-Alder Produkte (insgesamte Zunahme von Furan und Maleinimid entsprechen 37 %). Da hier jedoch eine Gleichgewichtsreaktion vorliegt, bei der die neu gebildete Diels-Alder Verbindung wieder in die Edukte zerfallen kann und diese wieder eine [4+2]-Cycloaddition miteinander eingehen können, kann hier nicht von einer Halbwertszeit gesprochen werden, da ein dynamischer Prozeß betrachtet wird, der nicht unbedingt auf 50% Verfall der betrachteten Substanz zurückgehen muss. Eine Verschiebung des exo-endo Verhältnis während der Einstellung des Gleichgewichtes konnte nicht beobachtet werden.

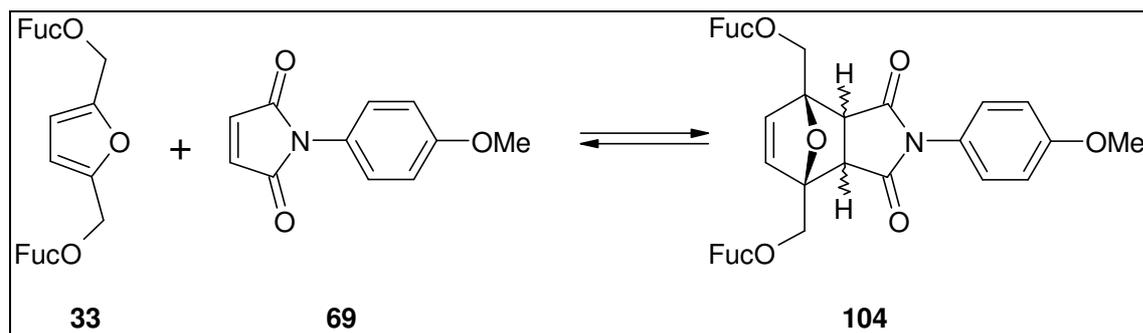


Abb. 44: Gleichgewichtsreaktion der Diels-Alder Reaktion.

Die anderen zwei Verbindungen deren Stabilität untersucht wurde, sind 4-Ethyl-1,7-bis-hydroxymethyl-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0.^{2,6}]dec-en-3,5-dion (**85**) und 4-Ethyl-8,9-bis-hydroxymethyl-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0.^{2,6}]dec-en-3,5-dion (**78**), beide Vertreter der nicht-glycosilierten Diels-Alder Verbindungen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die aufgereinigte Verbindung (**78**) schon innerhalb von 30 min. bei 37° in dem Puffersystem das Reaktionsgleichgewicht wieder eingestellt hatte. Die Mischung von Ausgangsprodukten und DA-Addukt wie vor der Aufreinigung, war exakt wiederzufinden. Die 1,7-Verbindung (**85**) war wesentlich stabiler, da sich hier das Ausgangsgleichgewicht von Edukten und DA-produkt erst nach 4 Stunden eingestellt hatte.

Das Verhalten in anderen (organischen) Lösungsmitteln wurde nicht näher untersucht, trotzdem konnte festgestellt werden, dass die Stabilität bei tieferen Temperaturen oder in MeOH wesentlich höher ist. Die beiden aufgereinigten Substanzen (**78**) und (**85**), die für analytische Zwecke in MeOH oder THF gelöst und bei Raumtemperatur gelagert worden sind, zeigten bei Analysen nach 72 Stunden ein anderes Chromatogramm wie das Reaktionsgemisch. Dies deutet darauf hin, dass in diesen Lösungsmitteln das DA-Produkt stabiler ist, und somit das ursprüngliche Reaktionsgleichgewicht noch nicht erreicht worden ist.

Stabilitätsuntersuchungen der Maleinimide

Entsprechend den Untersuchungen Diels-Alder Addukten wurden die Maleinimide (**57**), (**72**), (**61**) und (**64**) in dem Phosphatpuffer gelöst. Um eine komplette Löslichkeit der untersuchten Substanzen zu gewährleisten, mussten (**61**) und (**64**) in einer 1:1 Mischung aus Puffer und THF aufgenommen werden.

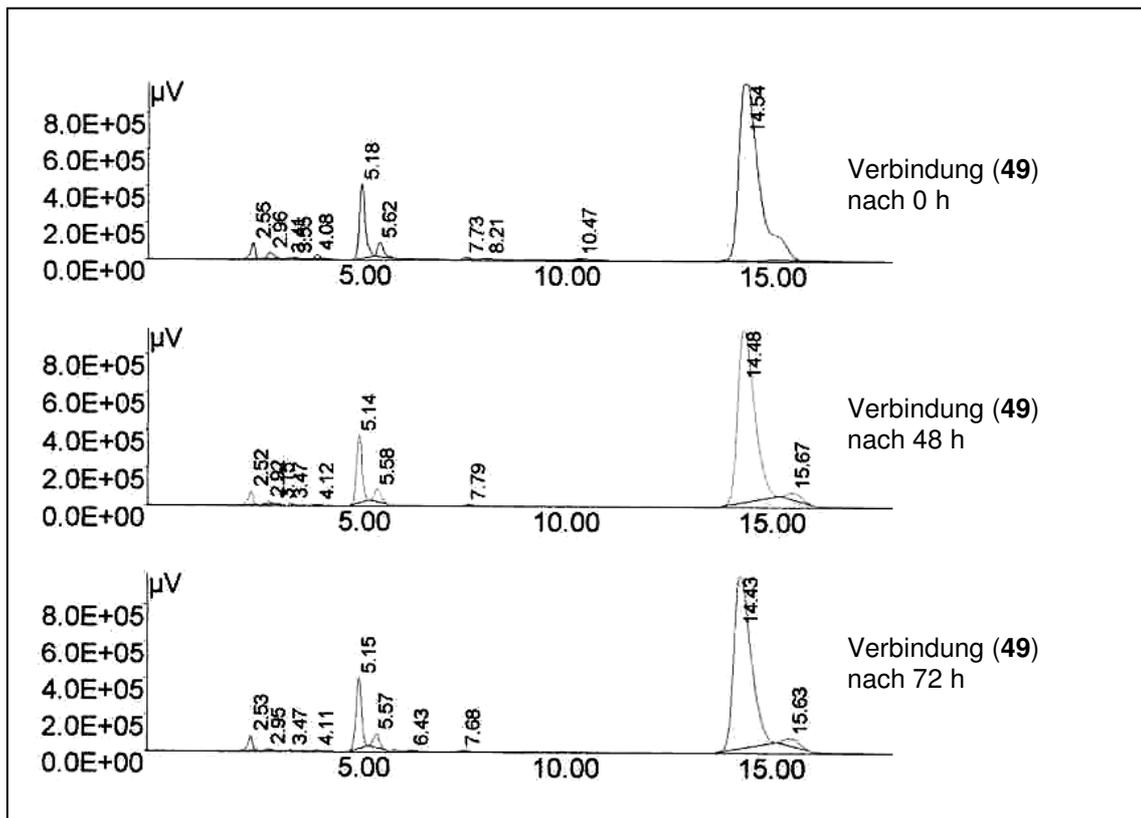


Abb.45: HPLC-Chromatogramme von (**57**) nach 0 h, 48 h und 72 h. $T_R = 14,48$ min. Peaks zwischen 2 und 7 min entsprechen den Einspritzpeaks des Puffers in diesem System ((**57**) in 0,2M Phosphatpuffer – Hypersil Säule von Keystone: Bds C18 (5 μ m), 250x4.6 mm, Laufmittel: 5mM Tetrabutylammonium Phosphat pH 7,4 – 90% mit 10% Acetonitril)

Alle vier untersuchten Maleinimide zeigten das gleiche Stabilitätsverhalten unter diesen Bedingungen.

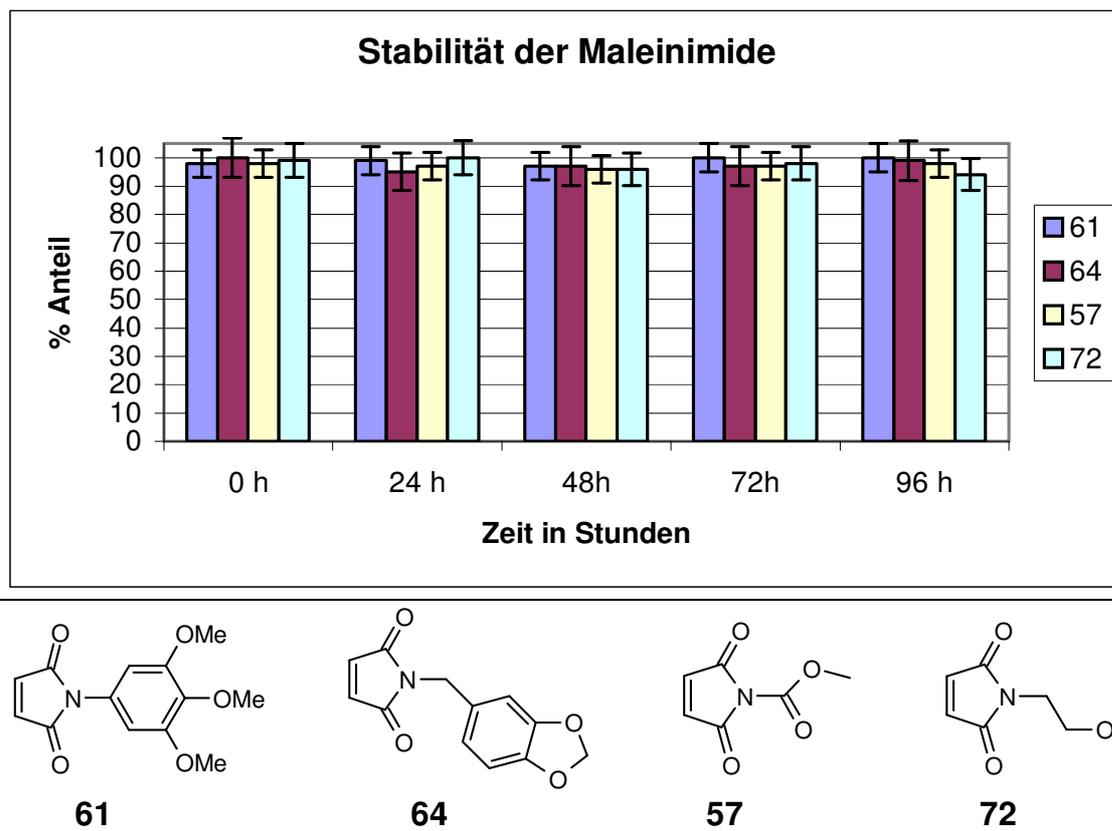


Abb.46: Prozentualer Anteil von den entsprechenden Maleinimiden nach 0h, 24h, 48 h, 72 h und 96 h, und die zugehörigen Strukturen der Verbindungen: *N*-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)-maleinimid (**61**), *N*-(3,4-Methylenedioxybenzyl)-maleinimid (**64**), *N*-Methoxycarbonylmaleinimid (**57**) und *N*-Hydroxyethylmaleinimid (**72**).

Maleinimide werden häufig in der Zellkultur für Cystein spezifisches labeln eingesetzt [Smyth *et al.*, 1964; Jose *et al.*, 2003]. Deswegen, um die Reaktionsfähigkeit der Maleinimide in dem Puffersystem zu untersuchen, wurden dann jeweils zwei Proben der Verbindung (**49**) und (**57**) mit Ethanthiol versetzt, welches die olefinische Doppelbindung nukleophil angreift und in einer Michael-Addition abreagiert.

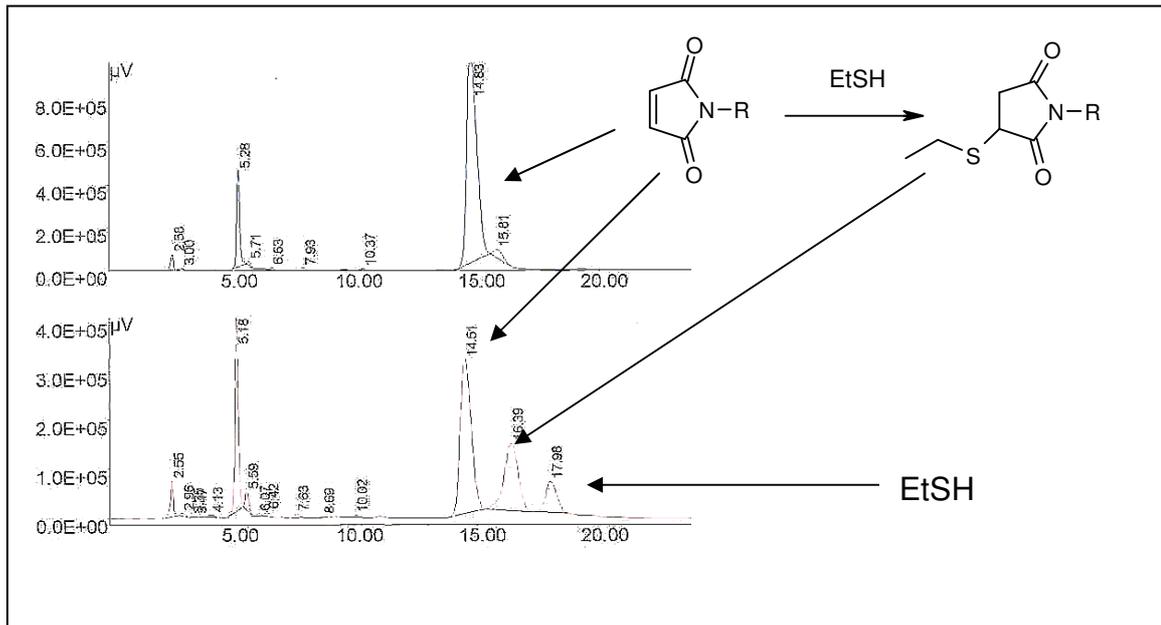


Abb.47: HPLC-Chromatogram von (49) versetzt mit Ethanthiol. I) Chromatogram des Maleinimids nach 96 h in dem Phosphatpuffer bei 37°C vor Zugabe des Thiols. II) zeigt das Chromatogram nach Zugabe (8 min.) von EtSH. Die Analyse der Reaktionsmischung nach 30 min zeigte, dass die Reaktion bereits beendet und das gesamte Maleinimid zum Thioether umgesetzt war.

3.2 Molecular Modeling der p-53 Rescue Molekülen

Die Molecular Modeling Rechnungen wurden von Dr. von der Lieth (Zentrale Spektroskopie - Molecular Modeling, DKFZ) durchgeführt.

Die Simulation von Interaktionen zwischen Pharmakon, Rezeptor und dem daraus entstehenden Komplex ist eine wichtige Technik beim rationellen Drug Design und virtuellen Screening neuer Substanzen. Eine große Anzahl von 3D-Protein Strukturen sind über die Brookhaven PDB-Datenbank (protein data bank) zugänglich (22823 Eintragungen am 1. August 2003 [PDB, 2003]). Mit Hilfe dieser Datenbank ist es prinzipiell möglich, eine de novo Konstruktion von Liganden, die von ihrer Struktur und physikalischen Eigenschaften in bestimmte Bindungstaschen passen, durchzuführen [Babine, *et al.*, 1997; Kubinyi, 1998]. Um ein gezieltes Wirkstoffdesign durchzuführen, wurde die Core-Domäne von p53 nach einer möglichen Bindungsstelle für CP-257042 und CP-31398 abgesucht.

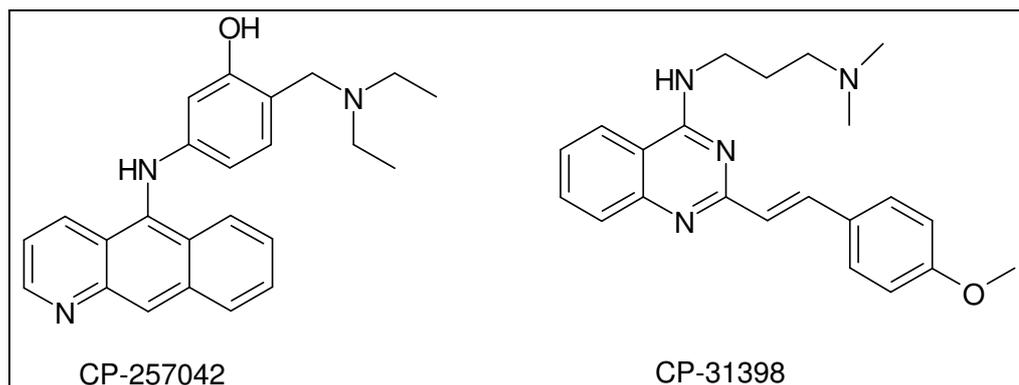


Abb. 48: Strukturen von CP-257042 und CP-31398

Diese Arbeit sollte einen Anhaltspunkt über die Lage der funktionellen Gruppen, die an einer Bindung zum Protein beteiligt sind, liefern. Wenn die Interaktionen zwischen Protein und der Verbindung definiert werden können, kann ein gezielter Aufbau von Leitstrukturen erfolgen. Mit Hilfe der Diels-Alder Reaktion und der Möglichkeit eine große Diversität in den Verbindungen darzustellen, könnte ein idealer Ligand für p53 konstruiert werden. Die Kristallstruktur von der DNA-Bindungsregion des Proteins wurde 1994 von Cho in einer Auflösung von 2,2 Å gelöst [Cho, *et al.*, 1994]. Da bis heute keine genauen Daten über die Dockingstelle der Verbindung bekannt sind, wurde als erster Screen die Oberfläche der Core-Domäne von p53 nach möglichen Bindungstaschen abgesucht, die groß genug sind, eine der CP-Verbindungen zu binden. Dazu wurde die Wasser zugängliche Oberfläche (water accesible surface) untersucht. Das Prinzip hinter dieser Technik wurde schon 1973 von Lee und Richards entwickelt [Lee, *et al.*, 1973]. Die einfachen Molekülmodelle stellen hierbei die Van-der-Waals Radien der beteiligten Atome und stellen diese als Verbund von Kugeln dar. Diese Darstellung kann bei kleineren Molekülen zur Abschätzung der Molekülgröße dienen, ist jedoch eine ungenaue Darstellung bei größeren oder makromolekularen Strukturen. Zur Betrachtung der Zugänglichkeit aller Oberflächen in solchen komplexeren Systemen wird deshalb auch die Lösungsmittel-zugängliche Oberfläche verwendet. Dazu werden Lösungsmittelmoleküle als Kugeln mit einem bestimmten Radius dargestellt und über das zu untersuchende Molekül „gerollt“. Die Kugeln dringen entsprechend ihrer Größe bis zu einer gewissen Tiefe in das Molekül ein, wodurch sich

anhand der Lage des Kugelzentrums eine neue Oberfläche definieren lässt. Ist das Lösungsmittel Wasser, so besitzt die Kugel einen Radius von 1,4 Å und die Oberfläche wird als Wasser zugänglich bezeichnet (water accesible surface) [Böhm, *et al.*, 1996]. Die Sequenz und 3-D Struktur des Proteins p53 wurde aus der PDB-Datenbank entnommen und auf ihre Wasser-zugängliche Oberfläche untersucht. Dieser Prozess ermöglicht es, potentielle Bindungstaschen mit der Größe des zu untersuchenden Liganden zu identifizieren.

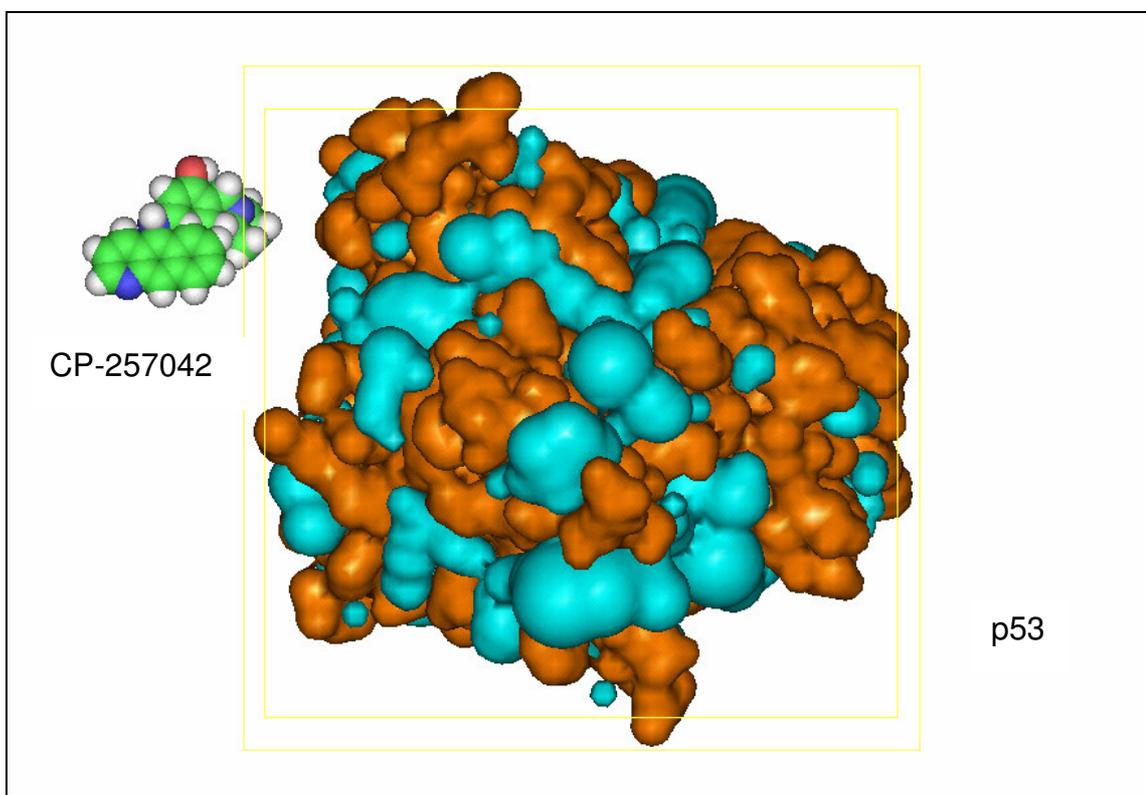


Abb.49: Wasser-zugängliche Oberfläche (orange) der DNA-Bindungsregion von p53 und die entstehenden ‚Lücken‘ (cyan). Im Größenvergleich dazu CP-257042

Das Abtasten der Oberfläche nach möglichen Bindungsstellen für die CP-Verbindungen zeigte, dass über 13 potentielle Bindungstaschen existieren, die beide Verbindungen ihrer Größe und physikalischen Eigenschaften nach binden können. Somit war eine genaue Docking-Studie der Substanzen nicht möglich, da für genauere Aussagen über Protein-Ligand Interaktionen mindestens eine

bindungsbeteiligte Aminosäure bekannt sein muss. NMR-Daten zeigten weiterhin, dass CP-31398 wahrscheinlich an DNA bindet und keine direkte Interaktion an der Core-Domäne besitzt [Rippin, *et al.*, 2002]. Genaue Aussagen über den Mechanismus können daher erst durch eine Röntgenstrukturanalyse nach einer Co-Kristallisation von p53 mit einem Rescue- Molekül getroffen werden.

3.3 Biologische Wirksamkeit *in vitro*

Neue Substanzen können am einfachsten durch *in vitro* Zellkulturen auf ihre anti-tumorale Potenz getestet werden. Dabei liefern diese Untersuchungen einen ersten Hinweis auf die cytostatische oder cytotoxische Wirksamkeit der getesteten Verbindung und je nach Assay-system auf die Art des Wirkmechanismus. Die *in vitro* Versuche können jedoch die *in vivo* nicht ersetzen, da die pharmakokinetischen und pharmakologischen Aspekte nur am ganzen Organismus voll zum Tragen kommen. Da die synthetisierten Substanzen auf ihre Wirksamkeit Apoptose einzuleiten und die Abhängigkeit des p53-Pathways untersucht werden sollten, wurden die Verbindungen zuerst auf ihre cytotoxischen Eigenschaften an drei Zelllinien getestet, welche einen unterschiedlichen p53-Status besitzen. Bei allen drei Zelllinien handelte es sich um etablierte humane Krebszelllinien, die adhärent wachsen:

- MCF-7 ist eine humane Mammaadenokarzinomzelllinie, welche den Wildtyp von p53 exprimiert
- MDA MB 435 S, ist ebenfalls eine humane Mammakarzinomzelllinie, mit mutiertem p53, bei dem die Aminosäure Glycin 266 in der DNA-Bindungsregion gegen Valin ausgetauscht ist (in dieser Region sind die häufigsten Mutationen bei Krebsarten beobachtet worden – siehe Abschnitt 1.3: p53 und Krebstherapie).
- Saos-2 ist von einem humanen Osteosacrom etabliert worden und exprimiert kein p53.

3.3.1 Allgemeine Wachstumskurve

Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte in 75 cm² Flaschen mit jeweils 20-25 ml des entsprechenden Mediums. Um das Wachstumsverhalten der Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen nach dem Ablösen mit Trypsin/EDTA zuerst in 6 Wellplatten ausgesät und die Zellzahl alle 24 h nach erneutem Ablösen der Zellen des entsprechenden Wells durch Trypanblaubestimmung in einer Neubauerzählkammer bestimmt. Die dargestellte Wachstumskurven zeigen,

dass alle drei Zellen die Anlaufphase (Lagphase) durchlaufen. Nach 48 h gehen die MCF-7 Zellen und die MDA MB 435 S Zellen in die logarithmische Wachstums Phase (Logphase) über. Die Saos-2 Zellen wuchsen wesentlich langsamer und es konnte keine Logphase innerhalb von 120 h beobachtet werden. Die Verdopplungszeiten in der Logphase liegen bei MCF-7 Zellen bei etwa 21 h, bei MDA MB 435 S bei ca. 19 h und bei den Saos-2 Zellen bei ca. 48 h.

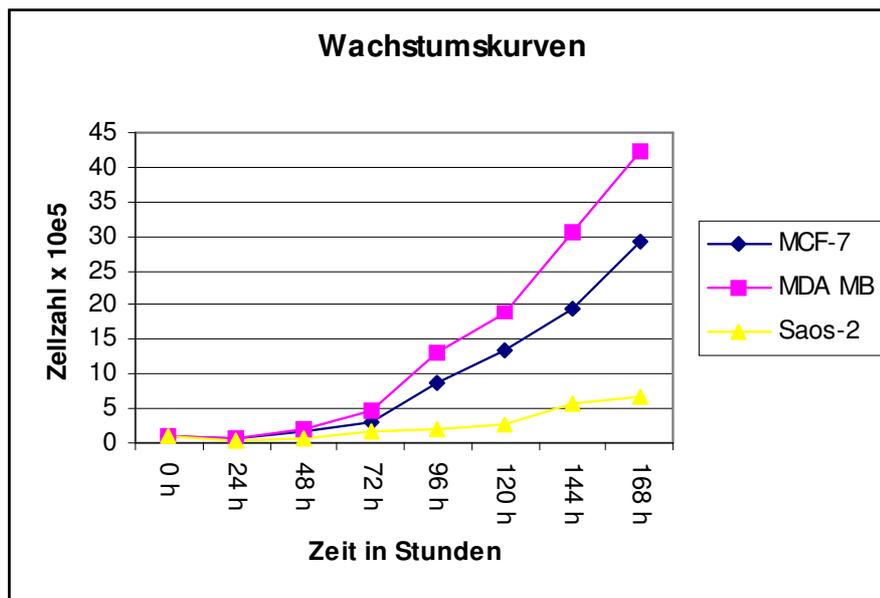


Abb.50: Wachstumskurven der Zelllinien MCF-7, MDA MB 435S und Saos-2, in 6 Well-Platten (Start: 1×10^5 Zellen bei $t = 0$)

3.3.2 Wachstumsverhalten auf der 96-Well Platte

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens der Zellen auf der 96-Well Platte wurde ein spektrometrisches Verfahren als indirekte Methode zur Bestimmung der Zellzahl für alle drei Zelllinien etabliert. Dazu wurde das XTT-Assay ausgewählt, der sich zur quantitativen Bestimmung der Zellproliferation und deren Aktivierung durch z.B Wachstumshormone als auch zur Messung des Einflusses von Antitumorverbindungen auf das Wachstum von Krebszelllinien eignet [Scudiero, *et al.*, 1988]. Der Assay basiert dabei auf der Spaltung des gelben Tetrazoliums Salzes XTT (Natrium-3'-[1-[phenylaminocarbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis-(4-methoxy-6-nitro]-benzol Sulfon-säure Hydrat) zu einem

orangefarbenem Formazan Farbstoff durch metabolisch aktive Zellen. Diese Umwandlung erfolgt durch Reduktasen in den Mitochondrien lebender Zellen [Gerlier, *et al.*, 1986]. Das so gebildete Formazan ist wasserlöslich und kann so direkt mit Hilfe eines Multiwell-Platten Spectrophotometers (ELISA-Reader) quantifiziert werden. Eine Zunahme der lebenden Zellen bedingt ebenfalls die Gesamtzunahme der mitochondrialen Dehydrogenase, welche die Umsetzung zum Formazan katalysiert. Damit ist die Anzahl der lebenden Zellen proportional zur Menge des gebildeten orangenen Farbstoffes, der durch die Absorption gemessen werden kann. Um die optimalen Bedingungen dieses Assays zu etablieren, wurde die Ausgangszellzahl der jeweiligen Zelllinie pro Well, und die Inkubationszeit mit XTT variiert. Dabei konnte in einer ersten Optimierungsreihe die Inkubationszeit von XTT auf 3 Stunden festgelegt werden. Höhere Inkubationszeiten zeigten eine Zunahme in der Extinktion über den Wert von 2.5, was bei dem verwendeten ELISA-Reader keine zuverlässigen Absorbtionswerte mehr bietet.

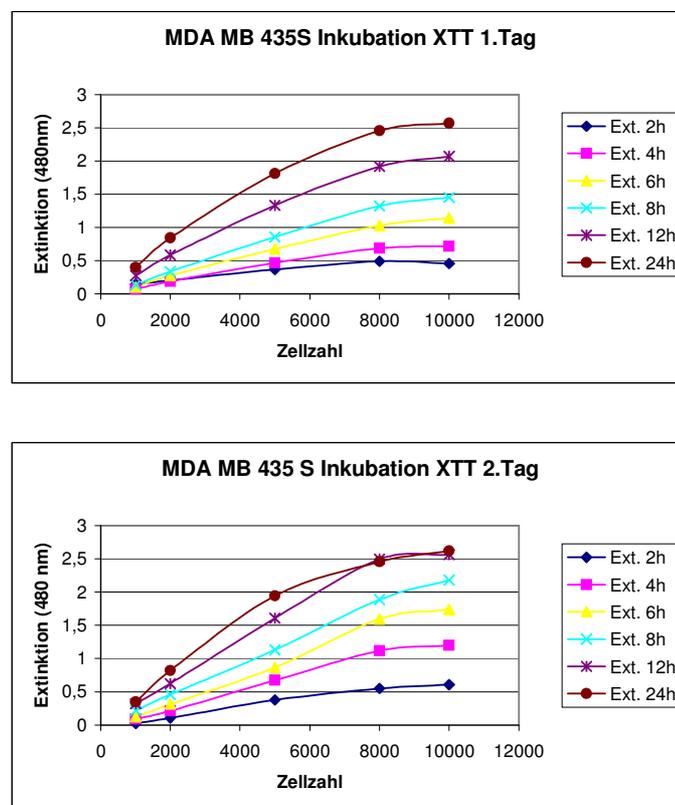


Abb.51: Vergleich der Inkubationszeiten von XTT auf MDA MB Zelllinie – Extinktion von XTT nach 2h,4h, 6h, 8h, 12h und 24h, bei zunehmender Zellzahl pro Well.

Durch Aussäen von verschiedenen Zellzahlen (1×10^3 – 2×10^4) der jeweiligen Zelllinie, konnte die optimale Wachstumsdichte ermittelt werden. Der Wachstumsverlauf wurde unter den oben beschriebenen Bedingungen mittels XTT ermittelt. Dabei konnte beobachtet werden, dass MCF-7 Zellen das Formazan schneller bilden, als die MDA MB 435 S oder die Saos-2 Zellen, wenn die Inkubationszeit mit XTT bei 3 Stunden konstant gehalten wird.

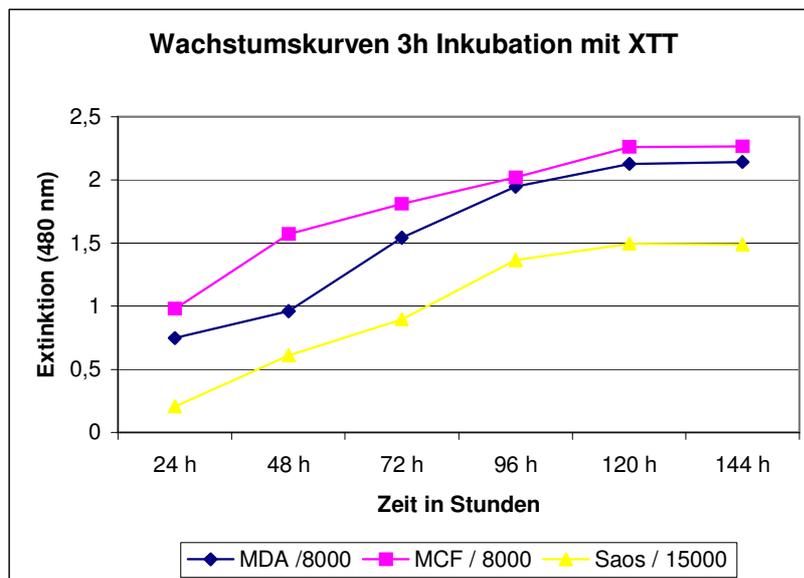


Abb.52: Wachstumskurven der Zelllinien in ihrer optimalen Wachstumsdichte. MCF-7 und MDA MB 435S: 8×10^3 Zellen/Well; Saos-2: 15×10^3 Zellen/Well

3.3.3 Toxizitätsuntersuchungen

In den ersten Untersuchungen wurden die Zellen mit den (aufgereinigten) Substanzen der Bibliothek inkubiert, um das cytotoxische Potential der neuen Verbindungen herauszufinden. Dabei wurden die Verbindungen in den Konzentrationen von 1000, 100, 10 und 0,1 μM über 24 h, 48 h und 72 h Stunden inkubiert und jeweils das Wachstumsverhalten der mit der Testsubstanz exponierten Zelllinie gegenüber der unbehandelten Kontrolle verglichen. Nach den ersten Versuchen wurden, aufgrund des hohen XTT Verbrauchs, die Substanzen nur nach 48 h Dauerinkubation auf ihr

cytotoxisches Potential untersucht. Auf diese Weise kann jedoch eine cytostatische Wirkung der Substanzen nicht festgestellt werden.

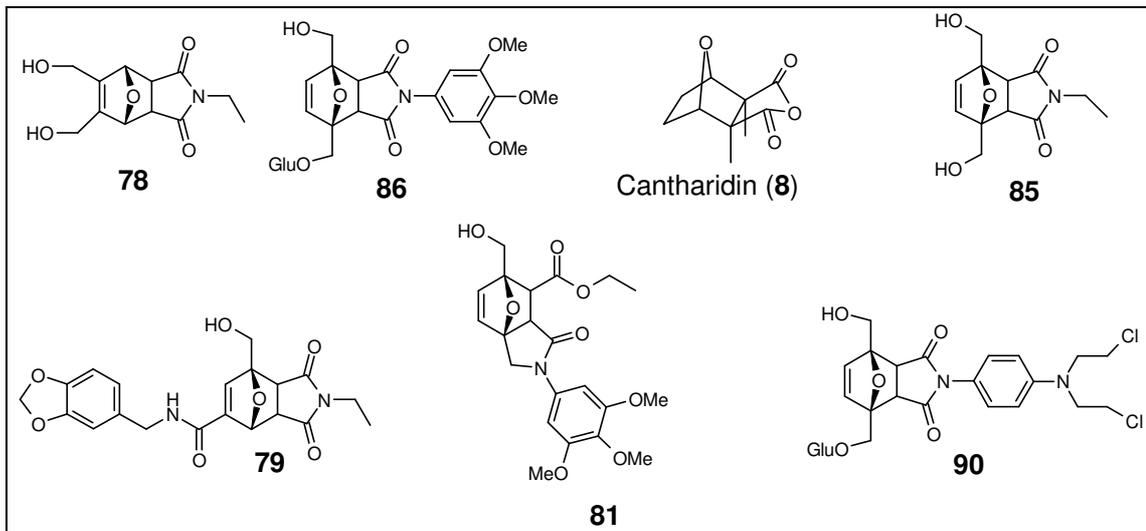
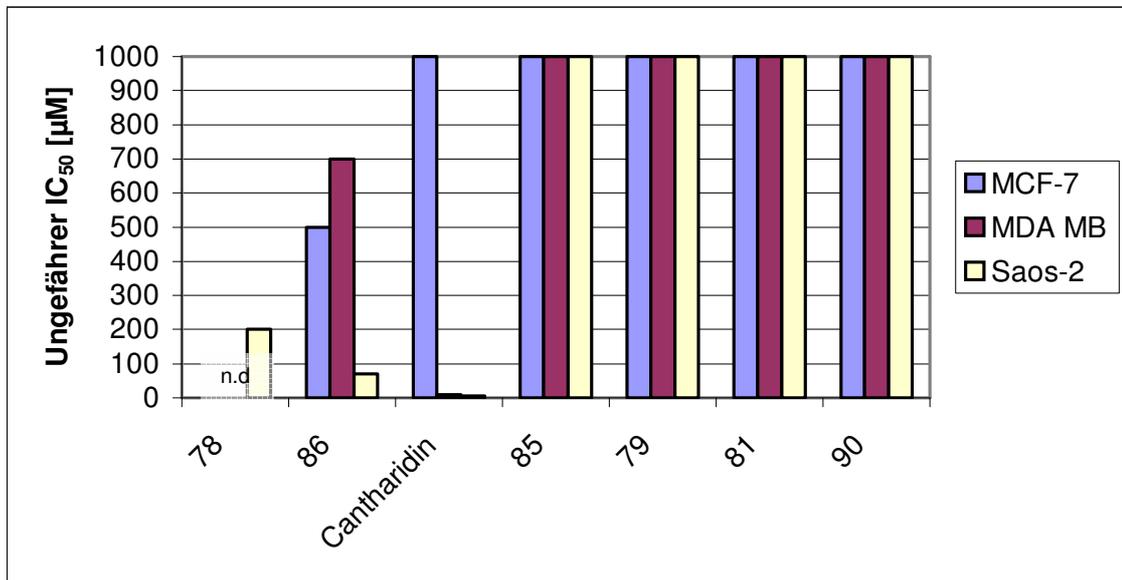
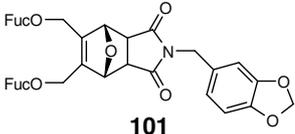


Abb.53: Erste Cytotoxizitätstests mit verschiedenen Diels-Alder Verbindungen und Cantharidin als Vergleichssubstanz – Ungefähre IC_{50} -Werte und Strukturen der Verbindungen

In den ersten Tests konnte keine signifikante Cytotoxizität festgestellt werden. Alle getesteten Substanzen mit Ausnahme des Cantharidins zeigten entweder gar keine biologische Wirkung in dem untersuchten Wirkungsbereich wie (**85**), (**79**), (**81**), (**90**) oder aber geringe biologische Wirksamkeit. (**78**) und (**85**)

zeigten einen Effekt auf das Wachstum der Zellen im Vergleich zu den Kontrollen. Die Konzentration, die die Anzahl der Zellen im Vergleich zur Kontrolle um 50 % inhibierte (von nun an als IC_{50} bezeichnet = inhibition concentration 50 %), konnte zwischen 200 μM und 700 μM , abhängig von der Zelllinie bestimmt werden. Um das Screening zu beschleunigen, wurden in den nächsten Tests die Rohprodukte der Diels-Alder Reaktionen eingesetzt. Nach der HPLC-Analyse wurden die Verbindungen direkt auf die Zellen gegeben. Hierbei wurde die Konzentration nur auf den Gehalt an DA-Produkt berechnet. Dabei zeigte sich, dass die nicht aufgereinigten DA-Produkte eine wesentlich niedrigere IC_{50} besaßen, als die Verbindungen der ersten Testreihe. Die Konzentrationen bei dem nur noch 50% Zellen im Vergleich zur Kontrolle nach 48 Stunden wuchsen, waren hier zwischen 75 μM und 10 μM zu finden, nachdem die Testkonzentrationsreihe auf 100 μM , 50 μM , 25 μM und 10 μM verändert wurde. Um die genaue IC_{50} zu bestimmen wurden einige Substanzen aufgereinigt und in kleineren Dosierungsabständen auf die Zellen gegeben. Diese Cytotoxizitätstests zeigten keine biologische Aktivität.

Zelllinie	(93) Rohprodukt	(93) HPLC gereinigt
MCF-7	~ 25 μM	> 150 μM
MDA MB 435 S	~ 40 μM	> 150 μM
Saos-2	~ 55 μM	> 150 μM



101

Abb.54: Ungefähre IC_{50} Werte von (93) als Rohprodukt und als aufgereinigte Substanz.

Da die sauberen Verbindungen nicht die erwartete Aktivität zeigten wurden, in einer nächsten Testreihe die Ausgangsverbindungen der Diels-Alder Reaktion getestet. Die getesteten glycosilierten Furane waren in den untersuchten Konzentrationen von 10-150 μM nicht cytotoxisch und zeigten keinerlei biologische Aktivität. Die verwendeten Maleinimide jedoch zeigten eine signifikante cytotoxische Wirkung bei allen drei Zelllinien, abhängig von der

N-Substitution. Die Verbindungen wurden zuerst in den Konzentrationen von 100 μM , 50 μM , 25 μM und 10 μM untersucht, um dann in einer zweiten Testreihe den genauen Bereich der IC_{50} zu bestimmen. Zu jeder Konzentration wurden 6 Werte gemessen und die erhaltenen Daten mit Hilfe von ADAM, einem biostatistischem Programm ausgewertet. Dazu wurden die untersuchten Konzentrationen logarithmisiert (zur Basis 2) und gegen die relativen Zellzahlen aufgetragen. Die Kontrollen wurden dabei als 100 Prozent gesetzt, erscheinen jedoch nicht in der Graphik. Das Programm erstellte dann eine Regressionsgerade durch die ermittelten Werte und zwei Konfidenzbänder mit einem Konfidenzbereich von 95%. Die IC_{50} konnte dann direkt aus dem Graphen oder aus den Daten ermittelt werden. Aufgrund der Streuung der 6 Werte pro Konzentration sind die Konfidenzbänder vom oberen Bereich und dem unteren Bereich unterschiedlich gelegt (Abb.52)

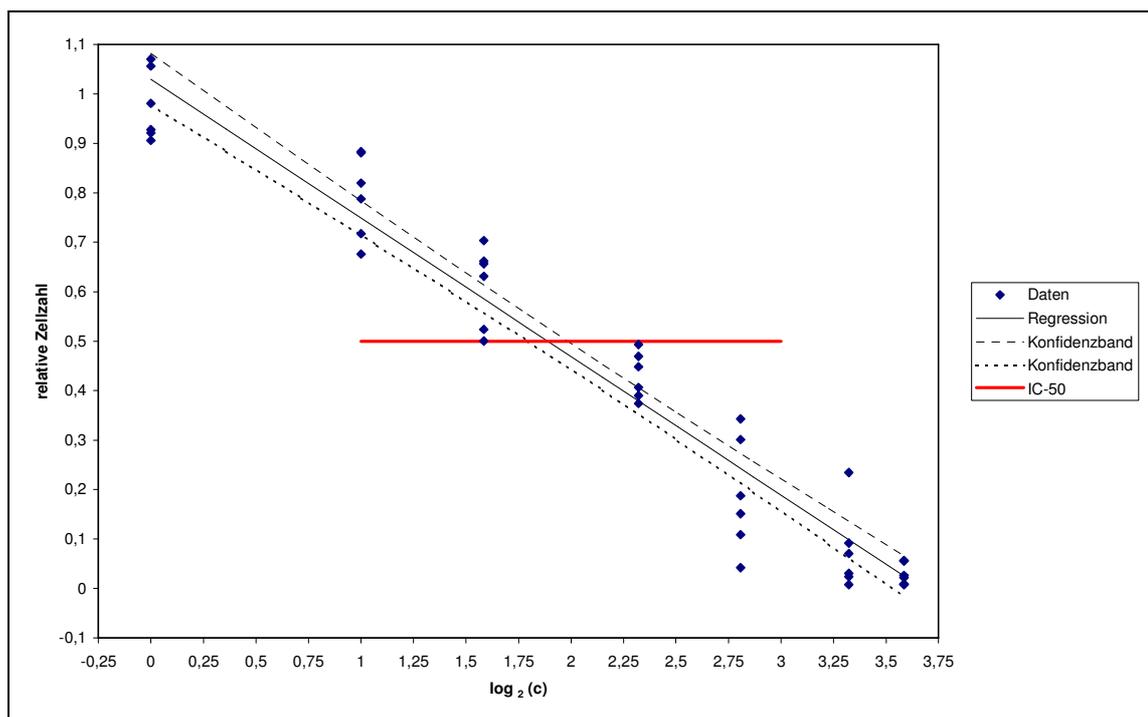


Abb.55: Bestimmung der IC_{50} : Die einzelnen Messwerte pro Konzentration (logarithmisch zur Basis 2) werden gegen die Prozentzahl der Zellen zur Kontrolle aufgetragen. Die IC_{50} lässt sich aus der Schnittstelle bei 0,5 (entspricht 50%) und der Regressionsgeraden und den entsprechenden Konfidenzbändern ablesen. Die Konzentration der IC_{50} muss dann noch umgerechnet werden.

Somit ergaben sich die IC_{50} Werte der folgenden Maleinimide für die entsprechenden Zelllinien:

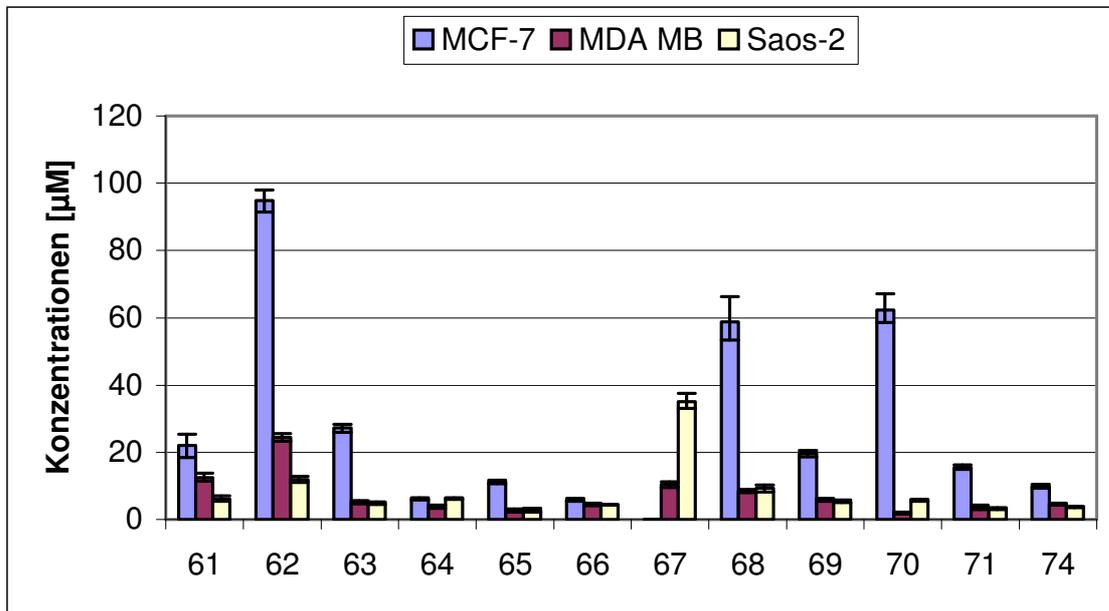


Abb.56: IC_{50} der Maleinimide an den drei Zelllinien

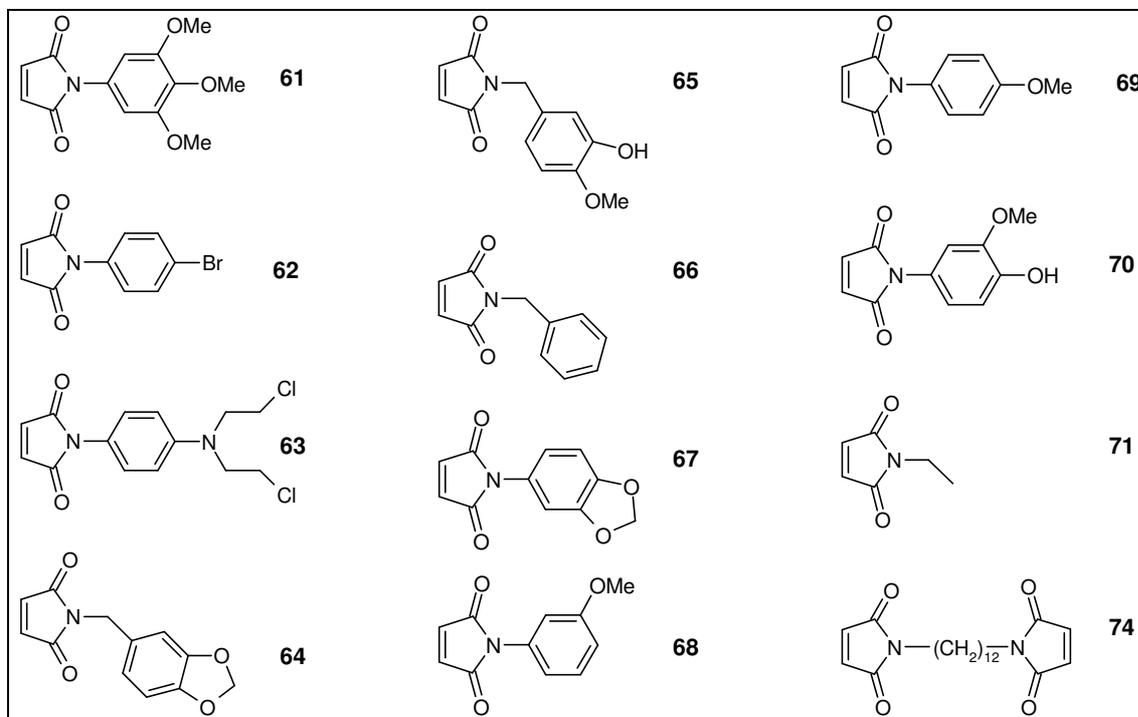


Abb.57: Strukturen der biologisch aktiven Maleinimide

A) MCF-7 Zellen

Verbindung	IC ₅₀ (µM)	Untere Grenze (µM)	Obere Grenze (µM)	Anzahl der Dosierungen	Korrelation
(61)	22,11	18,46	25,45	7	0,84
(62)	94,72	91,45	97,96	7	0,94
(63)	27,21	25,94	28,39	8	0,94
(64)	6,133	5,77	6,53	8	0,96
(65)	11,24	10,64	11,81	7	0,94
(66)	5,87	5,39	6,34	6	0,93
(67)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(68)	58,87	53,399	66,34	8	0,83
(69)	19,65	18,71	20,55	7	0,94
(70)	62,39	58,68	67,25	8	0,81
(71)	15,54	14,85	16,22	5	0,97
(74)	9,85	9,28	10,39	8	0,96

B) MDA MB 435 S Zellen

Verbindung	IC ₅₀ (µM)	Untere Grenze (µM)	Obere Grenze (µM)	Anzahl der Dosierungen	Korrelation
(61)	12,56	11,47	13,90	4	0,89
(62)	24,49	23,28	25,63	7	0,95
(63)	5,08	4,66	5,01	4	0,93
(64)	3,82	3,38	4,32	5	0,94
(65)	2,67	2,24	3,09	5	0,91
(66)	4,52	4,13	4,89	4	0,94
(67)	10,41	9,50	11,23	8	0,91
(68)	8,59	8,03	8,99	8	0,96
(69)	5,89	5,37	6,37	5	0,94
(70)	20,6	1,76	2,331	4	0,94
(71)	3,59	3,06	4,32	7	0,89
(74)	4,58	4,21	4,92	7	0,96

C) Saos-2 Zellen

Verbindung	IC ₅₀ (µM)	Untere Grenze (µM)	Obere Grenze (µM)	Anzahl der Dosierungen	Korrelation
(61)	6,21	5,33	7,01	6	0,92
(62)	11,93	10,99	12,81	7	0,93
(63)	4,89	4,52	5,22	5	0,95
(64)	6,28	5,99	6,59	8	0,98
(65)	2,79	2,31	3,31	4	0,88
(66)	4,39	4,21	4,54	3	0,98
(67)	35,08	33,05	37,45	9	0,88
(68)	9,26	8,21	10,27	9	0,90
(69)	5,16	5,00	5,76	6	0,91
(70)	5,70	5,35	6,01	6	0,97
(71)	3,29	3,06	3,54	4	0,97
(74)	3,71	3,64	3,97	7	0,97

Tab.2: Genaue Daten der IC₅₀ Werte der biologisch aktiven Maleinimide für A) die MCF-7, B) die MDA MB 435 S und C) die Saos-2 Zelllinie. Die Obere und Untere Grenze gibt dabei die Schnittstelle der 50% Marke an den jeweiligen Konfidenzbändern mit 95% Konfidenzbereich an. Die Anzahl der Dosierungen gibt die Zahl der für den IC50 verwendeten Konzentrationen an; jede Dosierung setzt sich dabei aus 6 Werten zusammen.

Nicht alle getesteten Maleinimide zeigten die gleiche Bioaktivität. Die folgenden Maleinimide [(57),(71),(72),(122)] sowie Succinimide [(110),(111),(112),(113)] besaßen keine cytotoxischen Eigenschaften in dem untersuchten Konzentrationsbereich bis 150 µM.

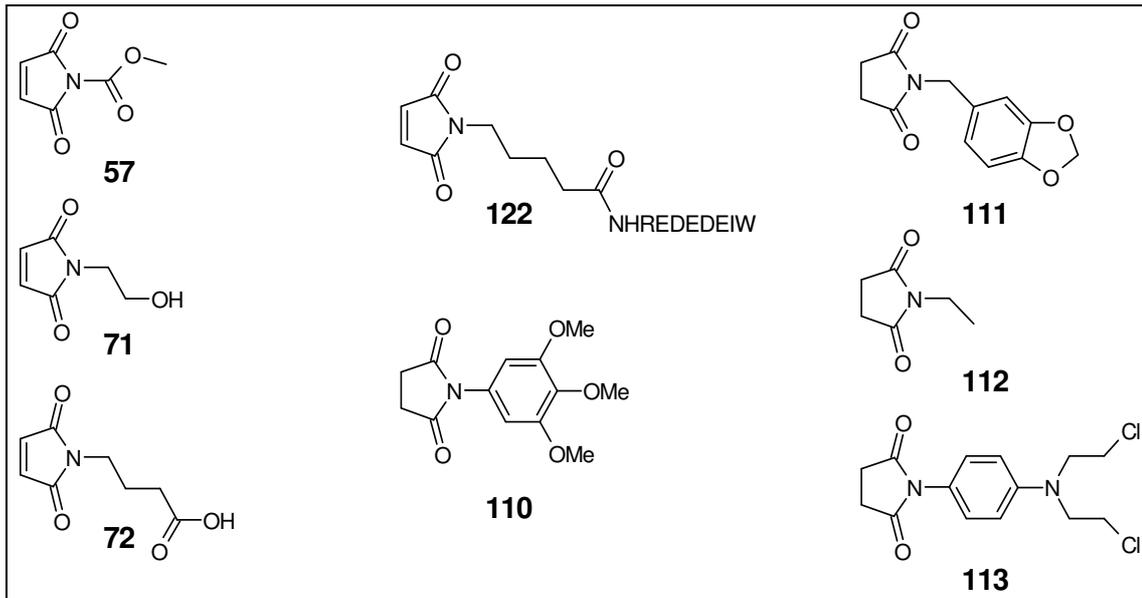


Abb.58: Strukturen der biologisch inaktiven Maleinimide und Succinimide. Die Substanzen wurden unter den gleichen Bedingungen wie die anderen Testsubstanzen für 48 h auf die Zellen gegeben und zeigten keine toxischen Effekte ($IC_{50} > 150 \mu M$).

Ebenfalls inaktiv war das Referenzprotein REDEDEIW (**121**). Des weiteren wurde die Verbindung CP-31398 (**120**) auf ihr cytotoxisches Potential getestet. Die Verbindung war jedoch schwer löslich im DMSO/Medium-Gemisch. Es konnte ein Absterben der Zellen, und somit eine Cytotoxizität beobachtet werden. Der genaue IC_{50} -Wert., konnte jedoch nicht bestimmt werden, da die Substanz auch auf den Zellen auskristallisierte. Die Versuche mit (**120**) wurden dann abgebrochen.

Da einige der untersuchten Diels-Alder Verbindungen eine biologische Aktivität bis zu $200 \mu M$ besaßen, wurden auch hier genauere IC_{50} Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden mehrere Konzentrationen in dem Bereich von $1000 \mu M$ bis $200 \mu M$ getestet. Da die reversible Diels-Alder Reaktion jedoch wieder Maleinimid freisetzen kann [Ichihara 1987; Lasne, *et al.*, 1985], d.h. die Wirkung von dem Maleinimid und nicht von der Diels-Alder Verbindung kommen könnte, wurden in dieser Test-Reihe auch die aufgereinigten, hydrierten Diels-Alder Produkte eingesetzt, um einen Effekt der Retro-Reaktion auszuschließen. Diese Untersuchung wurde nur an den MDA MB 435 S Zellen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die hydrierten Verbindungen nur im Bereich von $1000 \mu M$

einen Effekt auf die Zellen haben; hier sind nur 70% der Zellen im Vergleich zur Kontrolle gewachsen. Bei niedrigeren Konzentrationen kann dieser Effekt nicht mehr beobachtet werden. Die nicht hydrierten Verbindungen zeigen hingegen einen deutlichen Einfluss auf das Wachstum der Zellen. Hier sind beide Verbindungen im Bereich von 200 μM so aktiv, dass über eine Wachstumshinderung von über 60% (für **(88)** sogar 90%) beobachtet werden kann.

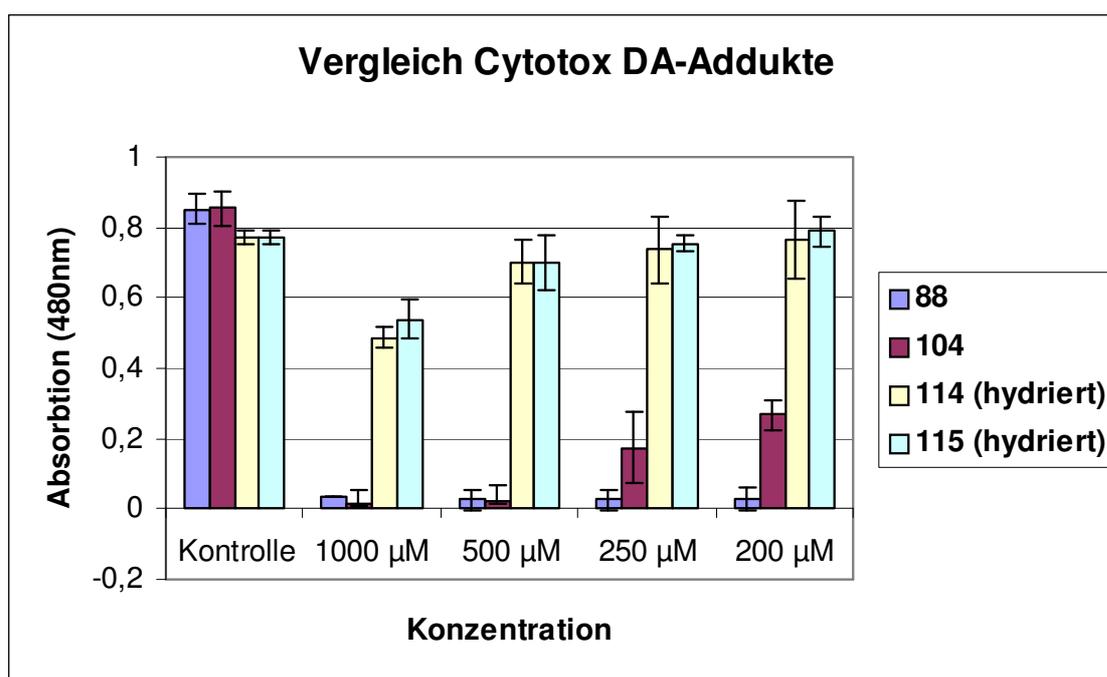


Abb.59: Die Abbildung zeigt die unterschiedliche Toxizität der Diels-Alder Verbindungen im Vergleich zu den hydrierten DA-Verbindungen. Die nicht hydrierten DA-Substanzen zeigen eine deutliche Bioaktivität: **(88)** inhibiert bei 200 μM immer noch das Wachstum der Zellen bis zu 90%; **(104)** immer noch 60 %. Die hydrierten Verbindungen zeigen nur eine biologische Aktivität im Bereich von 1000 μM , in dem nur 70 % der Zellen im Vergleich zu der Kontrolle leben, ansonsten kann kein Einfluss auf das Zellwachstum festgestellt werden.

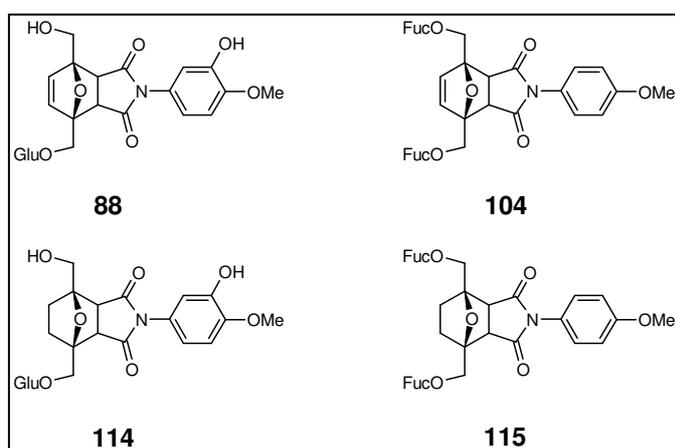


Abb.60: Strukturen der untersuchten Diels-Alder Verbindungen

3.3.4 Morphologische Veränderungen der Zellen

Während der Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen für den Cytotoxizitätsassay konnten in manchen Fällen morphologische Veränderungen bei den verschiedenen Zelllinien beobachtet werden. Dabei korrelierte die biologische Aktivität mit der Fähigkeit, die Zellstruktur zu verändern. Im Allgemeinen konnte ein Abrunden und Zusammenziehen der Zellen nach bereits 24 Stunden beobachtet werden, wenn sie mit den in der Zellkultur aktiven, nicht hydrierten Diels-Alder Verbindungen behandelt wurden. Die Veränderungen entsprachen denen, die bei der Behandlung der Zellen mit Cantharidin auftraten.

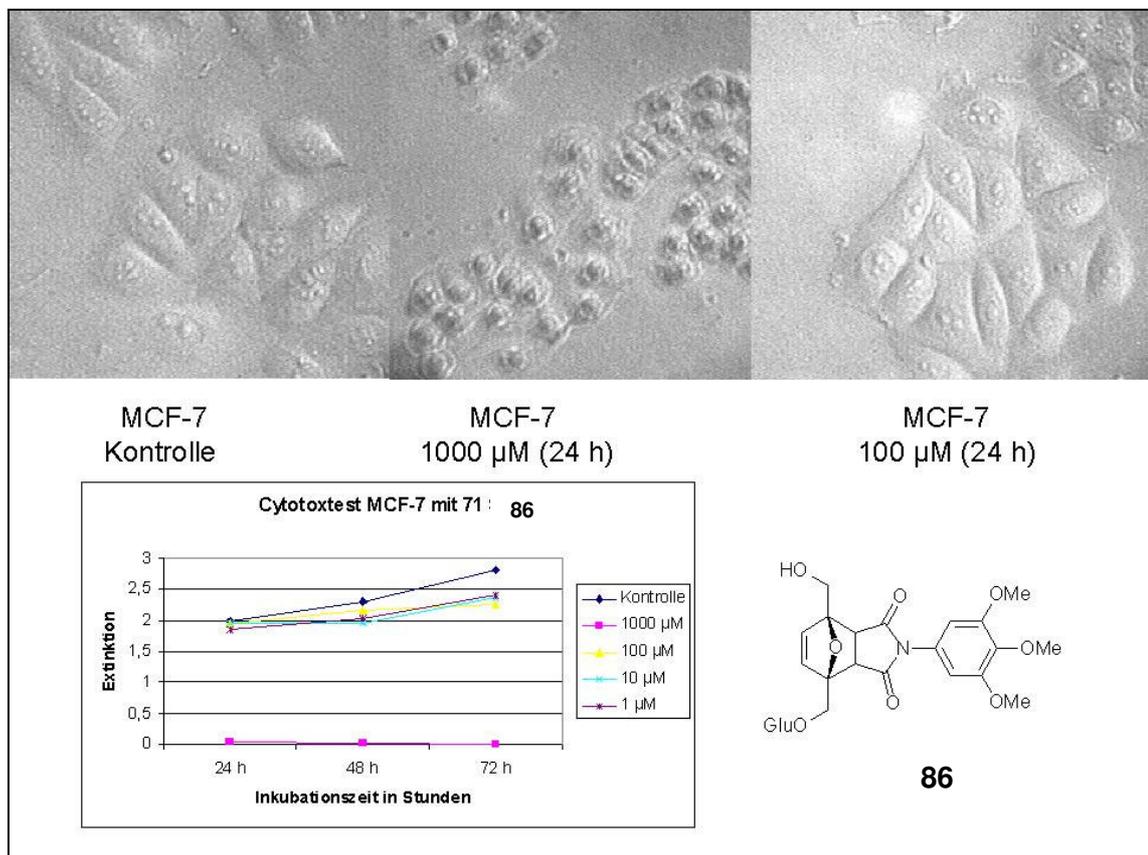


Abb.61: MCF-7 Zellbilder: Kontrolle, nach 24-stündiger Behandlung mit 1000 µM (**86**), und 24-stündiger Behandlung von (**86**) mit 100 µM; XTT-Assay der Verbindung mit den Konzentrationen der ersten Cytotoxizitätstestreihe von 1000 µM, 100 µM, 10 µM und 1 µM. Ab 100 µM konnte keine Auswirkung auf das Wachstumsverhalten der Zellen gegenüber der Kontrollen beobachtet werden.

Dem XTT-Assay entsprechend waren keine lebenden Zellen nach 24 Stunden bei 1000 μM mehr im Well, bei 100 μM konnten weder morphologische Veränderungen noch toxische Effekte festgestellt werden. Hier entsprach das Wachstumsverhalten sowie die Zellstruktur der Kontrolle.

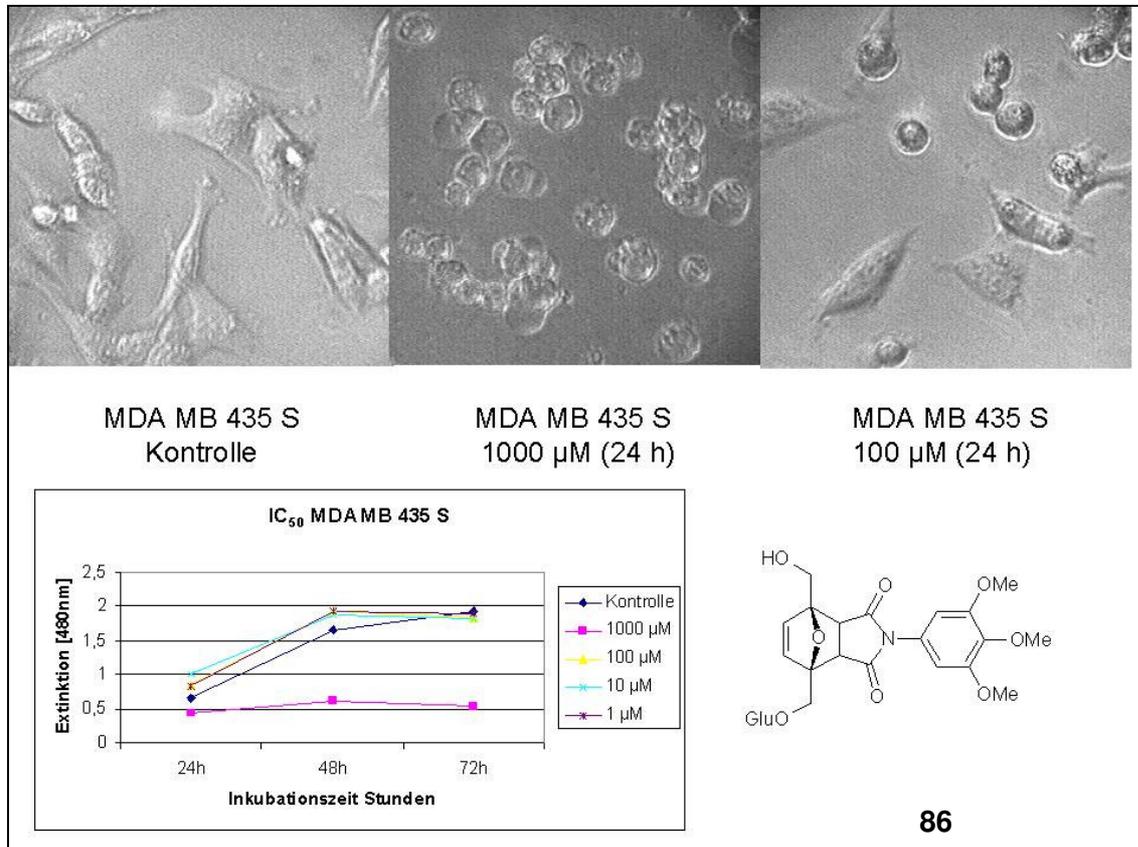


Abb.62: MDA MB 435 S Zellen: Kontrollen, 1000 μM und 100 μM (**86**) nach je 24 Stunden Inkubationszeit und XTT-Assay. in den Konzentrationen 1000 μM , 100 μM , 10 μM und 1 μM . Hier konnte eine cytotostatische Wirkung in der Konzentration von 1000 μM festgestellt werden, und morphologische Veränderungen beobachtet werden.

Bei der Inkubation mit Cantharidin konnten ebenfalls morphologische Veränderungen festgestellt werden.

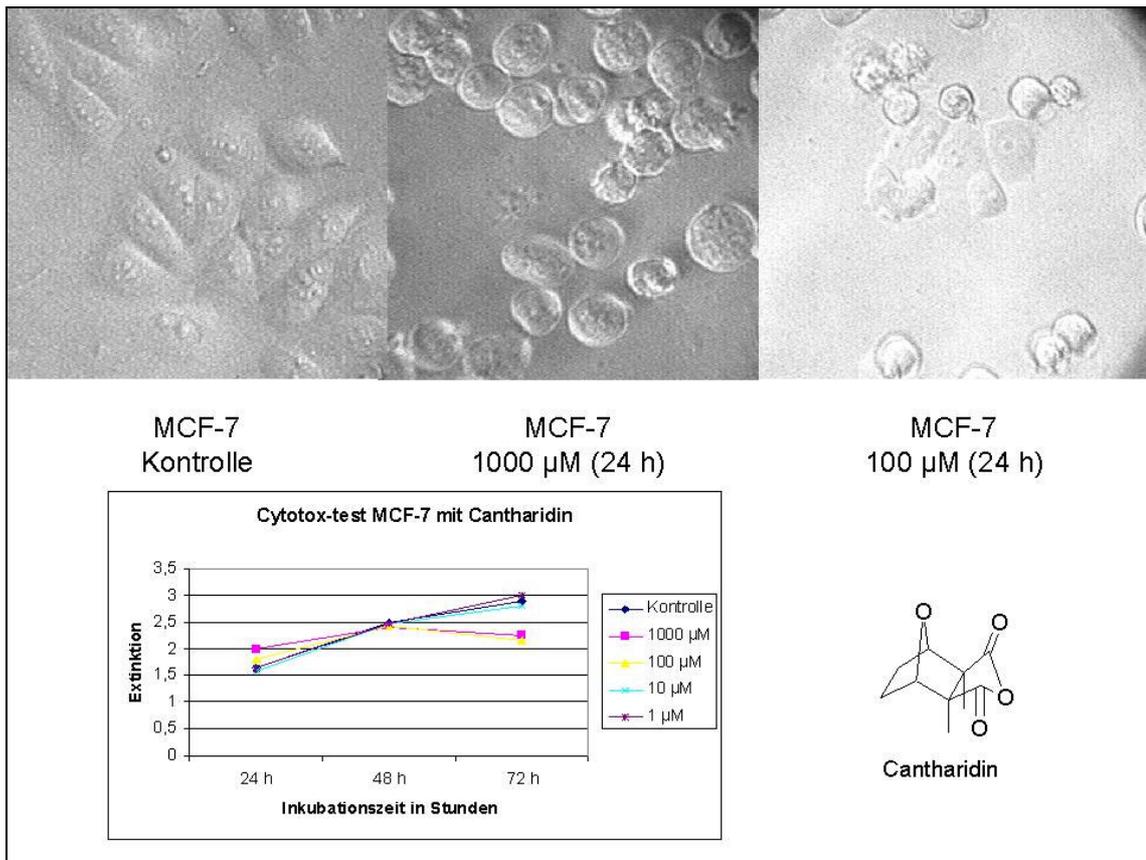


Abb.63: MCF-7 Zellen mit Cantharidin (**8**) behandelt: Kontrollen, 1000 μM und 100 μM . XTT-Assay in den verschiedenen Konzentrationen zeigt jedoch keinen cytotoxischen Effekt.

Die Zellen die mit 100 μM inkubiert wurden zeigten auch noch das Abrunden, dass auch bei den höheren Konzentrationen beobachtet wurde. Hier korreliert jedoch die biologische Aktivität nicht mit den Veränderungen, die bei den Zellen beobachtet werden konnten.

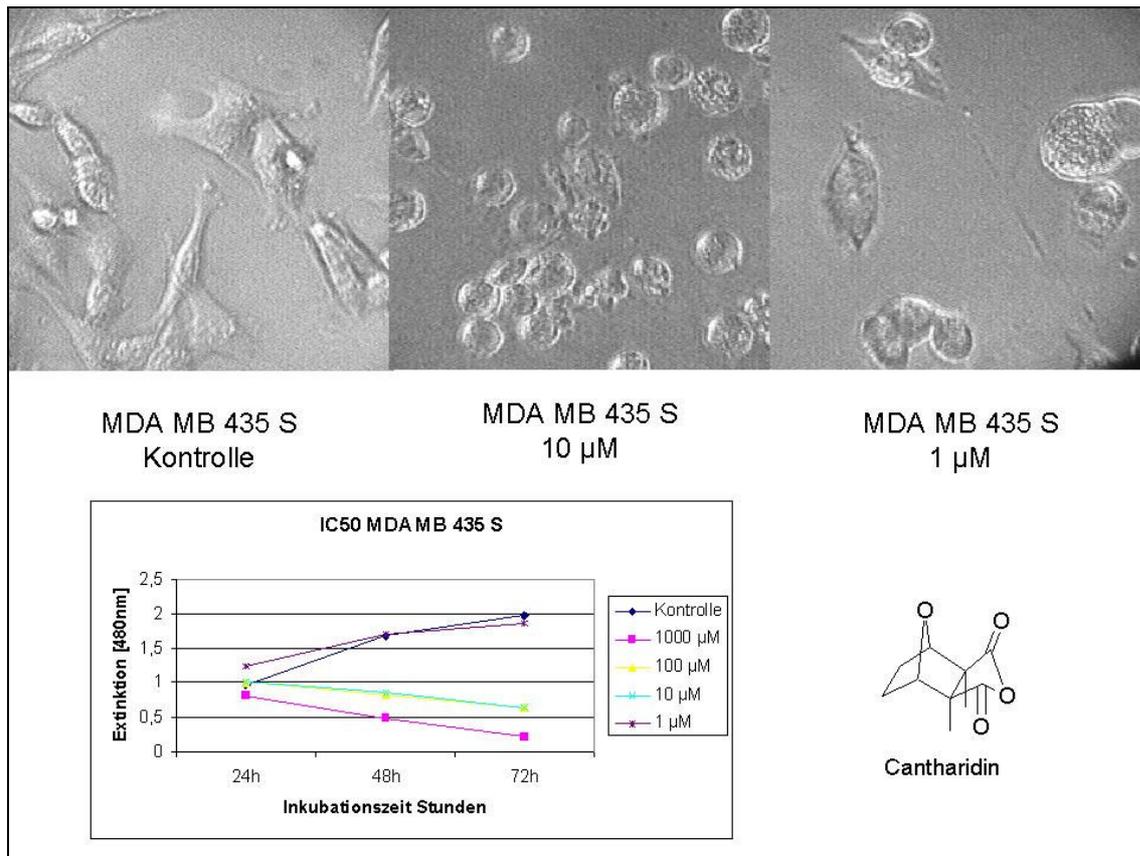


Abb.64: Zellbilder von MDA MB 435S Zellen, die 24 Stunden mit 10 µM bzw. 1 µM Cantharidin (8) inkubiert wurden. XTT-Assay korreliert hierbei mit den morphologischen Veränderungen.

Auch bei der Testung der Maleinimide konnten morphologische Veränderungen festgestellt werden. Dabei wurde das Abrunden der Zellen bereits nach 2 Stunden beobachtet. Bei den Cytotoxizitätstests entsprach die biologische Wirkung den strukturellen Veränderungen, d.h. in den Konzentrationen, in denen eine cytotoxische oder cytotostatische Wirkung auftrat, rundeten sich die Zellen ab. Nach 24 Stunden konnte die Bildung von kleinen Abschnürungen an der Zellmembran und sogenanntes ‚blebbing‘ beobachtet werden. Das Zellinnere erschien im Mikroskop wesentlich granulärer als bei den Kontrollen. Mit 40-facher Vergrößerung konnten kleine Vesikel erkannt werden. Mit dem Abrunden verloren die Zellen auch die Fähigkeit zur Adhäsion. Über 90% der Zellen schwammen nach 24 h Inkubationszeit mit Konzentrationen über dem jeweilig ermittelten IC₅₀ im Medium. Eine Färbung mit Trypanblau nach 48 h

(was der Zellzahlbestimmung mittels XTT entsprach) zeigte an, dass die schwimmenden Zellen abgestorben waren.

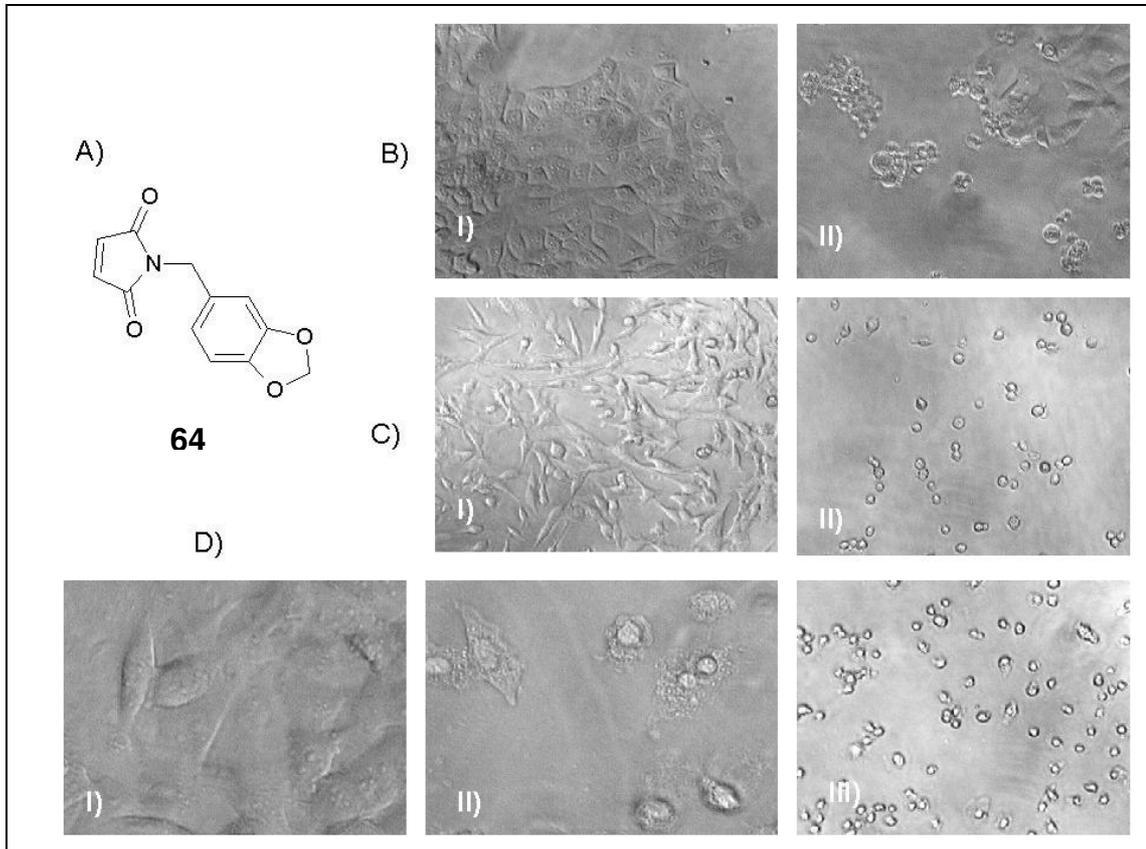


Abb.65: Morphologische Veränderungen an den drei Zelllinien. A) Struktur von *N*-(3,4-Methylenedioxybenzyl)-maleinimid (**64**). B) MCF-7 Zellen : I) Kontrollen und II) 24 h inkubiert mit 20 μM (**64**). C) MDA MB 435 S Zellen: I) Kontrollen und II) 24 h inkubiert mit 20 μM (**64**). D) Saos-2 Zellen: I) Kontrollen 40-fach vergrößert, II) Zellen nach 24 h mit 20 μM (**64**) 40-fach vergrößert und III) Zellen von II) in normaler 10-facher Vergrößerung (gleiche Vergrößerung wie in B & C).

Bei Inkubation der Zellen mit (**63**) *N*-(4-[Bis-2-(chloro-ethyl)-amino]phenyl)maleinimid wurden andere morphologische Veränderungen festgestellt. Bei dieser Verbindung rundeten sich die Zellen nicht so stark ab wie bei z.B. (**64**). Die granulitäre Zellstruktur wurde ebenfalls beobachtet jedoch keine Abschnürungen.

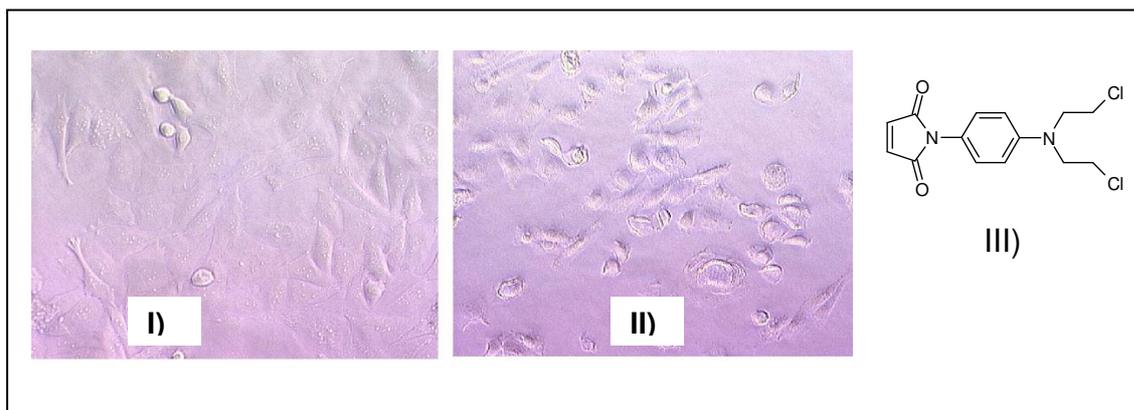


Abb.66: Saos-2 Zellen I) Kontrollen, II) nach 24 Stunden Inkubation mit 20 μM (**63**). III) Struktur von (**63**)

3.4 Untersuchungen zum Zelltod

Aufgrund der cytotoxischen Daten und der Veränderung der Zellmorphologie wurde der Einfluss der Maleinimide auf den Zelltod untersucht. Durch den Einfluss von Chemotherapeutika, die Stress auf die Tumorzelle ausüben, sollte Apoptose eingeleitet werden. Da bei stressinduzierter Apoptose p53 eine Schlüsselrolle einnimmt [Ryan, *et al.*, 2001 ; Sherr, 2001], sollte nun der Fragestellung nachgegangen werden, welchen Zelltod die Maleinimide einleiten. Für die im folgenden beschriebenen Assays wurden drei Maleinimide [(**61**), (**63**) und (**64**)] von den zuvor beschriebenen toxische Verbindungen exemplarisch ausgewählt.

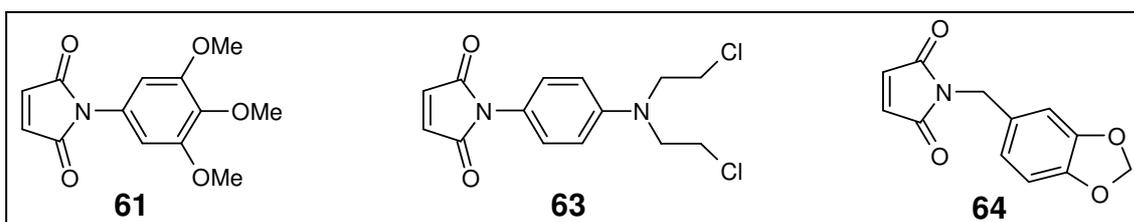


Abb. 67: Strukturen der Maleinimide: *N*-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)-maleinimid (**61**), *N*-(4-[Bis-(chloro-ethyl)-amino]phenyl)-maleinimid (**63**), *N*-(3,4-Methylenedioxybenzyl)-maleinimid (**64**).

3.4.1 DNA-Fragmentierungs-Assays

Gel-Elektrophorese

Die DNA des Zellkerns von apoptotischen Zellen zeigt ein charakteristisches Leiternmuster aus oligonuklearen Fragmenten. Dieser DNA-Verdau ist das Resultat der Zerstückelung des inter-nukleosomalen Chromatins durch endogene Endonukleasen in Vielfache von 180 Basenpaaren (bp = base pairs) [Telford, et al., 1991]. Diese Fragmentierung wird als typisches Merkmal und Kennzeichen für Apoptose angesehen und kann relativ einfach mittels Gel-Elektrophorese nachgewiesen werden. Die Isolation von apoptotischer DNA kann entweder aus isolierten Zellkernen [Nicoletti, et al., 1991] oder ganzen Zellen [Danescu, et al., 1992] erfolgen.

Es wurde die Methode von Herrmann angewandt, um die apoptotische DNA zu erhalten. [Herrmann, et al., 1994]. Dazu wurden die Zellen in ihrer entsprechenden Wachstumsdichte (genau Werte siehe Abschnitt 6: Material und Methoden) in 75cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit den Testsubstanzen in den gewünschten Konzentrationen inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen abgeerntet, mit PBS gewaschen und für 10-30 Sekunden lysiert. Der Vorgang wurde nach dem erneuten Abzentrifugieren wiederholt. Die vereinigten Überstände des abgenommenen Lysis-puffers wurden mit 1% SDS behandelt und anschließend zuerst mit RNase A für 2 Stunden bei 56 °C, dann mit Proteinase K für weitere 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 10 M Ammoniumacetat und eiskaltem 100%-igen Ethanol konnte die DNA gefällt werden. Nach der Zentrifugation wurde der weiße Niederschlag mit 70%-igen Ethanol gewaschen. Die gefällte DNA wurde dann im Elektrophoresepuffer über Nacht gelöst und am nächsten Tag mit einem 1%-igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe von Ethidiumbromid visualisiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit Paclitaxel [Sigma, 10 mM Stammlösung in Wasser] inkubiert. In Saos-2 Zellen induziert dieses antimitotische Agens Apoptose und die DNA Fragmentierung wurde bereits mehrfach elektrophoretisch nachgewiesen [Pucci, et al., 1999].

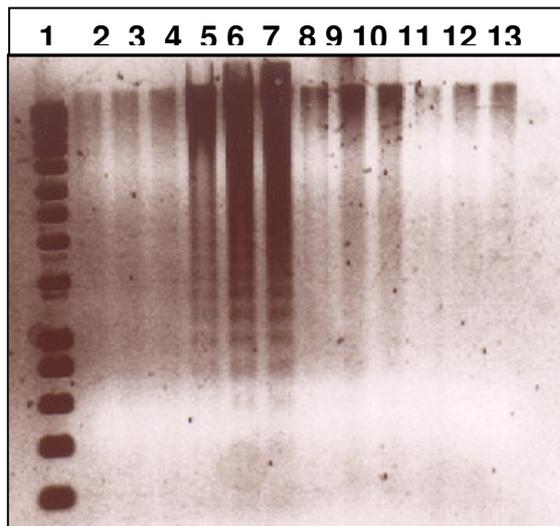


Abb.68: Agarose Gel der apoptotischen DNA-Fragmentierung. DNA wurde aus Saos-2 Zellen isoliert 1) DNA Marker [Bioline, Luckenwalde, D] – Hyperladder 1 mit 200 bis 10000 bp. 2-4) Kontrolle: Zellen ohne Testsubstanz. 5-7) Positivkontrolle: Zellen mit 1 μM Paclitaxel. 8-10) Probe1: Zellen mit 20 μM (**63**). 11-13) Probe2: Zellen mit 20 μM (**64**).

Alle Zellen wurden 48 Stunden mit den jeweiligen Substanzen inkubiert. Nach der Fällung wurde die DNA in 120 μl Elektrophorese-Puffer aufgenommen. Jede Probe wurde jeweils in den 3 verschiedenen Konzentrationen von 10 μl , 20 μl und 30 μl von links nach rechts aufgetragen. Aufgrund der größeren Deutlichkeit ist hier die inverse Aufnahme des Gels dargestellt.

Das Gel zeigt nur die charakteristische DNA-Leiter bei den Proben die mit Paclitaxel inkubiert wurden (Spur 5-7). Die Proben, die mit Maleinimiden behandelt worden sind, beinhalteten nur größere DNA-Stücke, die nicht elektrophoretisch aufgetrennt werden und somit an der Eingabetasche des Gels zu finden sind. Der Versuch wurde in verschiedenen Inkubationskonzentrationen der Maleinimide wiederholt. Auch hier konnten keine DNA-Leitern gefunden werden. Ein weiterer Versuch, apoptotische DNA über die klassische DNA-Extraktion mit Chloroform-Phenol zu erhalten, zeigte keine besseren Ergebnisse. Hier waren die DNA-Banden der mit Maleinimiden behandelten Zellen deutlich intensiver, aber auch hier konnten keine DNA-Bruchstücke gefunden werden. Bei dieser Aufarbeitung schmierten die Banden wesentlich mehr, da genomische DNA aufgetragen wurden, und die kleinen apoptotischen DNA-Fragmente können somit leicht von der genomischen DNA und dem Schmier bei der Elektrophorese überdeckt werden. Eine Aufarbeitung mit kleinen Viva-spin Filtern, die ein Ausschlussvolumen von 100,000 DA besaßen, zeigten keine besseren Ergebnisse. Die Versuche

wurden auch an der MCF-7 Zelllinie und den MDA MB 435 S Zellen wiederholt. Auch hier zeigten sich keine charakteristischen Leitern – selbst Paclitaxel leitete in beiden Fällen keine DNA-Fragmentierung ein.

ELISA-DNA-Fragmentierungsassay

Da die Elektrophorese-Experimente keinen Aufschluss über die Art des Zelltodes lieferten, wurden die Zellen nach Inkubation mit den Testsubstanzen mittels eines ELISA (**E**nzyme-linked **I**mmuno**S**orbent **A**ssay) untersucht. Dabei wird in die DNA der noch intakten Zellen BrdU (5' **B**romo-2'-**d**eoxy-**U**ridin) eingebaut, das später mit Hilfe eines Antikörpers nachgewiesen werden kann. Unter Anwendung dieser Methode kann zwischen Nekrose und Apoptose unterschieden werden. Nekrotische Zellen geben ihre DNA in einem relativ frühen Stadium des Zelltodes in das überstehene Medium ab, wohingegen apoptotische Zellen erst eine postlytische Fragmentierung der DNA einleiten, deren Fragmente dann in den sogenannten ‚apoptotic bodies‘ gefunden werden kann. Nach Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen wird dann der Überstand der Zellen, sowie das entsprechende Lysat analysiert. Wird zuerst DNA im Überstand gefunden, so handelt es sich um Nekrose, findet sich die DNA zuerst in dem Lysat, wurden die apoptotischen Körper verdaut, und somit handelt es sich um Apoptose. Aufgrund des milden Detergenz und der kurzen Inkubationszeit des Lysepuffers, wird die Kernmembran nicht geschädigt, so dass nur DNA im Cytoplasma nachgewiesen wird. Die DNA wird anschließend an einen DNA-erkennenden Antikörper, der an den entsprechenden Wells immobilisiert wurde, gebunden. Ein zweiter Antikörper – mit Peroxidase Aktivität - bindet dann spezifisch an BrdU, und setzt das zugegebene Substrat TMB um, was einen pH-abhängigen blauen Farbstoff bildet. Nach Zugabe einer sauren Stopplösung wandelt sich der blaue Farbstoff in gelb um, und kann photometrisch bei 450 nm gemessen werden.

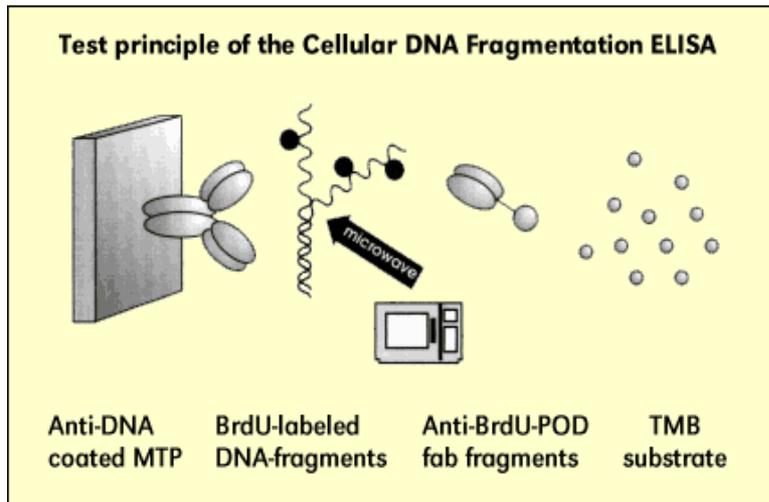


Abb.69: Testprinzip des zellulären DNA-Fragmentierungs ELISA: Anti-DNA Antikörper wird im Well einer MTP (**M**ulti-**t**itter-**p**late) immobilisiert und bindet die isolierte DNA, die mittels Mikrowellen denaturiert wird. Anti-BrdU-Peroxidase bindet and BrdU-gelabelte DNA und setzt zugegebens TMB Substrat in einer Oxidationsreaktion zu einem photometrisch bestimmbaren Farbstoff um.

Die Verbindungen **(61)**, **(63)** und **(64)** wurden in diesem Assay verwendet. Als Positivkontrolle wurde auch hier Paclitaxel gewählt und die Zelllinie Saos-2, da bei diesen Zellen das ‚Blebbing‘ deutlicher zu beobachten war, als bei den MCF-7 oder den MDA MB 435 S Zellen. Der Test wurde insgesamt 10 mal durchgeführt. Die Konzentrationen der Testsubstanzen, sowie die Menge an BrdU, das in die zelluläre DNA eingebaut wird, und die Inkubationszeiten wurden während diesen Versuchen variiert.

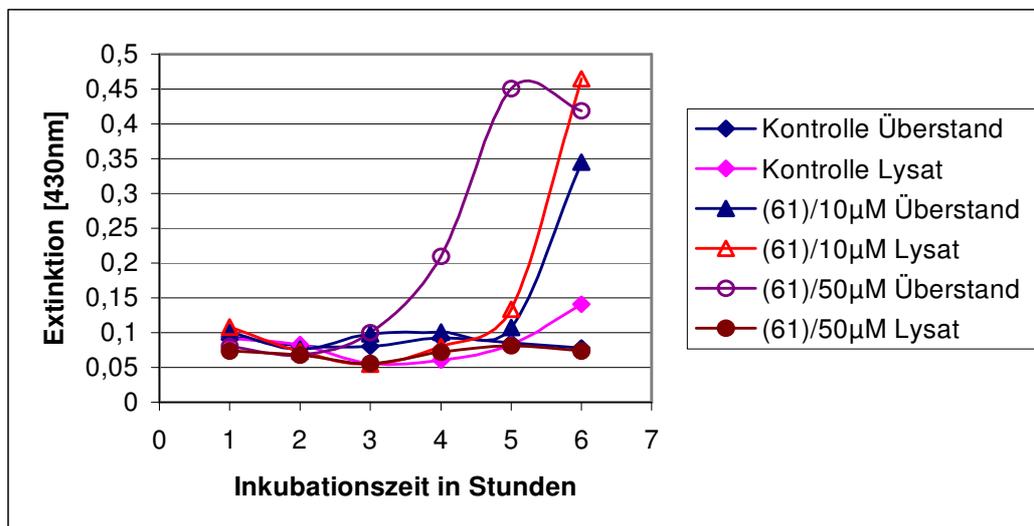


Abb.70: ELISA von **(61)** auf Saos-2 Zellen.

Sowohl der Überstand als auch das Lysat der Kontrollzellen enthielten keine DNA. Nach 4 Stunden Inkubation mit 50 µM **(61)** zeigt sich ein deutlicher Anstieg des DNA-Gehalts im Überstand. Das korrespondierende Lysat enthält

keine DNA. In dieser Konzentration, die um das 8-fache höher ist, als der bestimmte IC_{50} -Wert, findet somit Nekrose statt. In der Konzentration von 10 μM kann eine Zunahme des DNA-Gehalts im Überstand als auch im Lysat nach 5 Stunden Inkubationszeit festgestellt werden. Eine eindeutige Bestimmung des Zelltodes konnte hier nicht getroffen werden, da sowohl Nekrose als auch Apoptose in diesem Zeitraum aufgetreten sind. Die weiteren Experimente gaben ebenfalls keine eindeutigen Ergebnisse. Wurde die Konzentration von BrdU zu hoch gewählt ($> 30 \mu\text{M}$) stellten die Zellen das Wachstum und somit den Einbau des brominierten Nukleotids ein. Ein weiteres Problem war die unzuverlässige Beschichtung der Multiwellplatten mit dem DNA-Antikörper, da es zu extremen Schwankungen innerhalb einer Testreihe kam. Der Versuch, die Induktion von Apoptose durch Paclitaxel mit diesem Assay nachzuweisen, verlief ebenfalls nicht erfolgreich. Die Peroxidasereaktion fand in allen Wells statt, so dass keine Zunahme der DNA in dem Lysat nachgewiesen werden konnte. Nach diesen nicht eindeutigen Versuchen wurde eine weitere Methode zur Bestimmung des Zelltodes angewandt.

3.4.2 Bestimmung des Zelltodes mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Im Gegensatz zur Nekrose findet Apoptose ohne Entzündungserscheinungen statt. In den letzten Stadien der Apoptose werden die gebildeten ‚apoptotic bodies‘ *in vivo* von Makrophagen oder phagozytierenden Zellen verdaut [Vermes, *et al.*, 1994]. Die apoptotischen Zellen werden somit von dem betroffenen Gewebe entfernt, bevor sie den Zellinhalt ausschütten und damit eine Entzündung hervorrufen. Der genaue Mechanismus, wie apoptotische Zellen Makrophagen rekrutieren, ist nicht geklärt. Jedoch konnten eine Vielzahl von Membranveränderungen nachgewiesen werden, die eventuell als Marker an der Zelloberfläche gesehen werden können. Zu diesen Membranveränderungen gehören unter anderen:

- Der Verlust der terminalen Sialinsäuren an den Seitenketten der Glycoproteine der Zelloberfläche und somit die Exponierung neuer Zuckerreste [Duvall, *et al.*, 1985; Savill, *et al.*, 1993].

- Expression und Exposition von neuen Glycoproteinen an der Zelloberfläche, die als Rezeptoren für Adhäsionsmoleküle der Makrophagen dienen, so wie Thrombospondin [Asch, *et al.*, 1987].
- Der Verlust der Phospholipid-Asymmetrie in der Zellmembran. Dadurch wird die Hydrophobie und die Ladung der Zelloberfläche verändert [Fadock, *et al.*, 1992].

In normalen Zellen ist die Verteilung der Phospholipiden asymmetrisch, wobei die innere Membran anionische Phospholipide, wie Phosphatidylserin und die äußere Membran hauptsächlich neutrale Phospholipide besitzt. In apoptotischen Zellen nimmt die Menge an Phosphatidylserin an der Zelloberfläche zu und exponiert das Phospholipid somit an der äußeren Membran. [Vermees, *et al.*, 1995] (siehe Abb. 70).

Annexin-V, ein Calcium-abhängiges Protein, bindet spezifisch an Phosphatidylserin. Es kann somit nur an die Zelloberfläche von apoptotischen Zellen aber nicht an die Membran intakter Zellen binden. Aufgrund dieser Eigenschaft wird Annexin-V als Apoptosemarker in verschiedenen Assays verwendet. [Homburg, *et al.*, 1995 ; Verhoven, *et al.*, 1995] In den meisten Fällen wird das Protein mit einem Fluoreszenzmarker gelabelt, der dann mittels Fluoreszenzmikroskopie bzw. Durchflusscytometrie /FACS (**F**luorescence **A**ctivated **C**ell **S**orter) weiter analysiert werden kann.

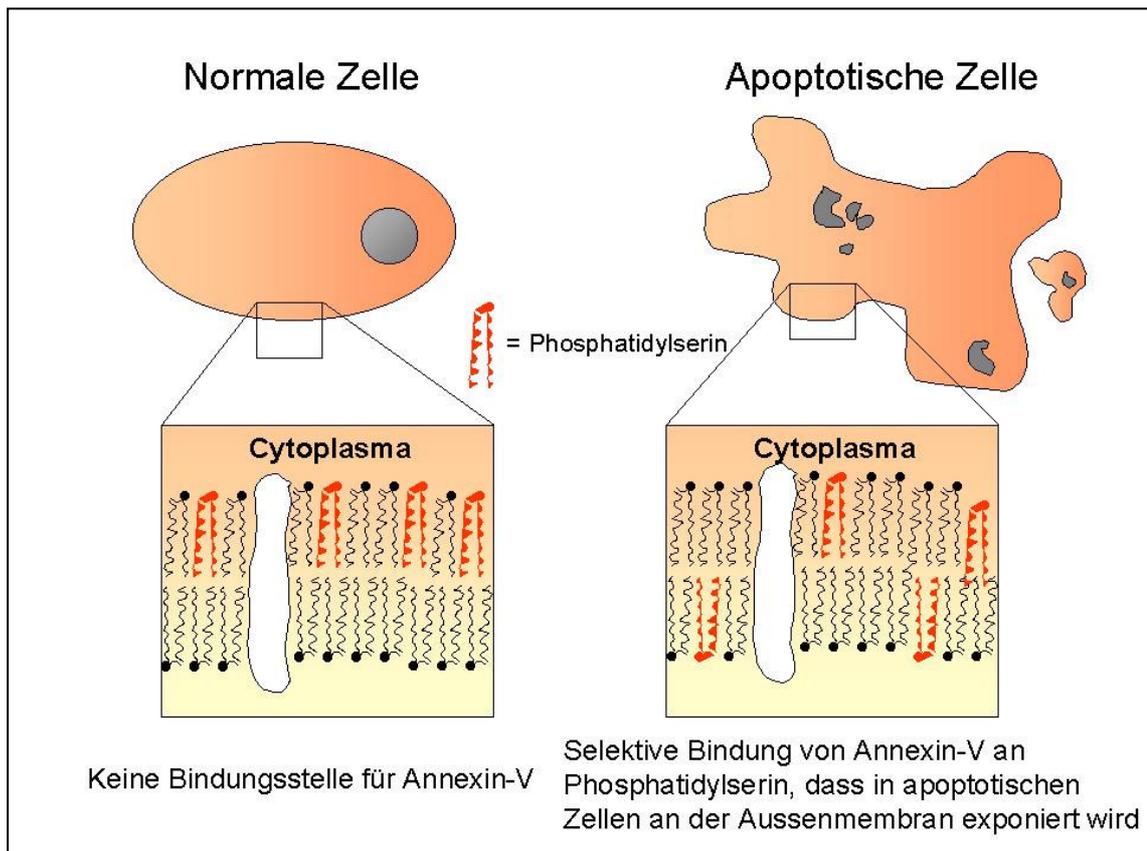


Abb. 71: Detektion der morphologischen Veränderungen während der Apoptose. Die Verteilung von neutralen Phospholipiden und anionischen Phospholipiden in der Zellmembran verändert sich. Phosphatidylserin wird an der äußeren Membran von apoptotischen Zellen exponiert, aber nicht an normalen Zellen. Ein exogen zugefügtes Molekül, das spezifisch an Phosphatidylserin bindet, kann somit nur an die Membran von apoptotischen Zellen binden, aber nicht an gesunde Zellen.

Dabei ist die Durchflusszytometrie ein Verfahren, mit dem simultane Messungen mehrerer physikalischer und biochemischer Charakteristiken (spezifische Fluoreszenzmarkierung intrazellulärer Inhaltsstoffe oder extrazellulärer Strukturen) an der einzelnen Zelle im Durchfluss durchgeführt werden können. Bis zu 6 Parameter können gleichzeitig an einer Zelle im Mikrosekundenbereich gemessen werden:

- Größe der Zelle (Surface Area – Forward Scatter)
- Granularität der Zellen (Complexity – Side Scatter)
- Drei verschiedene Fluoreszenzen
- Zellzahlbestimmung

Die schnelle Analytik gewährleistet die Untersuchung von großen Zellpopulationen, in kurzer Zeit und liefert aufgrund der Datenmenge eine statistisch zuverlässige Werte.

Die Zellen (1×10^6) wurden für diesen Assay in 25 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und für 24 Stunden nicht weiter manipuliert. Danach wurden die Testsubstanzen in den jeweiligen Konzentrationen auf die Zellen gegeben und nach den gewünschten Inkubationszeiten abgeerntet. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 15 min mit Annexin-V [Alexa Fluor 488 annexin V von Vybrant™, USA] im Dunkeln inkubiert. Direkt vor der FACS-Analyse wurden die Zellen mit Propidiumiodid versetzt. Dieser Farbstoff kann nicht durch intakte Zellmembranen diffundieren. Um in die DNA zu interkalieren, muss die Membran durch Nekrose geschädigt sein.

Die Zellen wurden ebenfalls mit den Verbindungen **(61)**, **(63)**, **(64)** und Paclitaxel in verschiedenen Konzentrationen und Zeiten inkubiert. Leider erwiesen sich die MCF-7 Zellen als untauglich für dieses Assay, da sie nach dem Abernten zu sehr miteinander verklumpten und sich nicht mehr vereinzeln ließen. Die Ansaugkapillare des FACS-Gerätes wurde bei der Analyse der MCF-7 Zellen verstopft.

Da in den Saos-2 Zellen die durch Paclitaxel induzierte Apoptose mittels DNA-Fragmentierung nachgewiesen werden konnte, wurden als erstes Saos-2 Zellen mit Hilfe der Durchflußcytometrie untersucht.

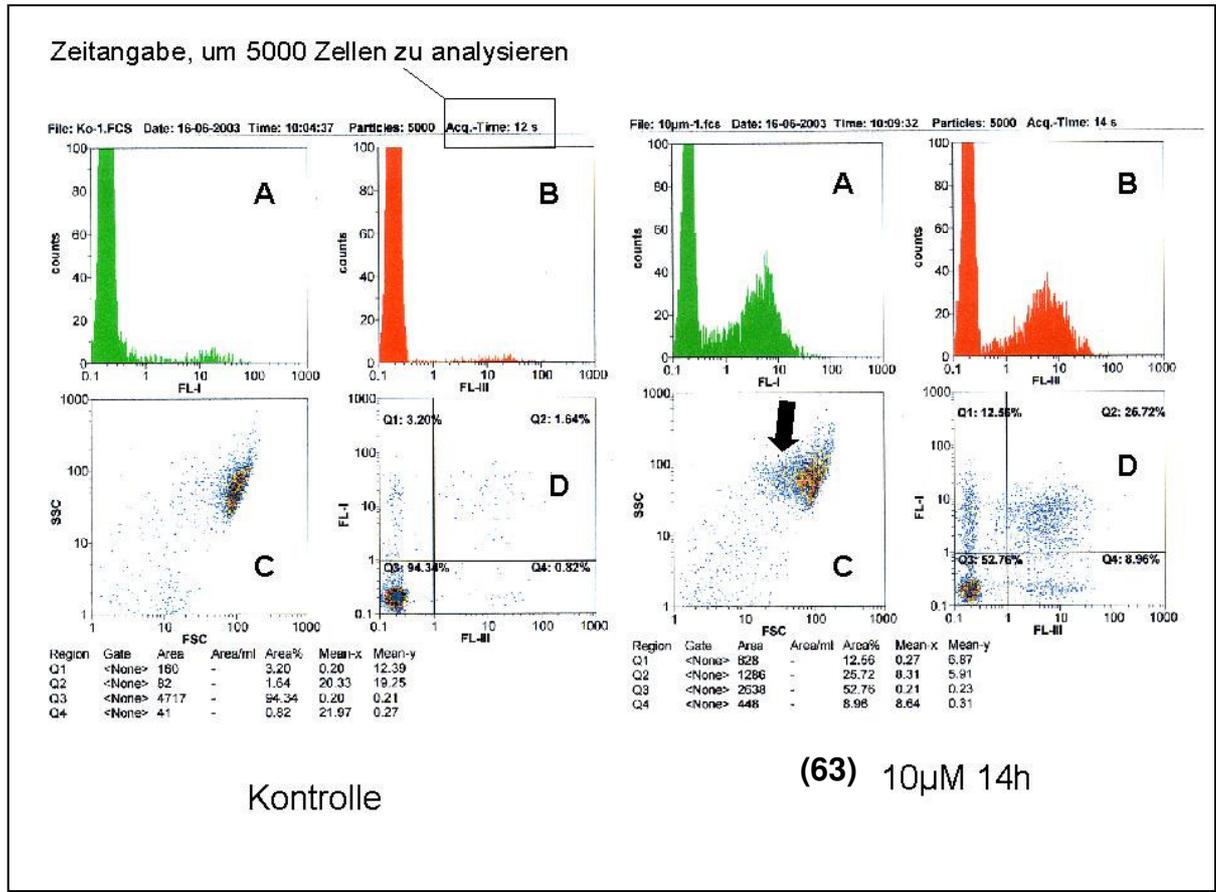


Abb. 72: FACS-Analyse von Saos-2 Zellen, die mit Annexin-V und Propidiumiodid angefärbt wurden.

Linker Plot: Unbehandelte Kontrollzellen. Rechter Plot: Zellen die 14 Stunden lang mit 10µM (63) inkubiert wurden. A) zeigt jeweils den ‚grünen‘ Fluoreszenzkanal (FL-I), der Annexin-V anregt. Dabei wird die Fluoreszenzintensivität gegen die Zellzahl aufgetragen. B) bildet jeweils den ‚roten‘ Fluoreszenzkanal (FL-III) ab. Hier wird Propidiumiodid, das in zellulärer DNA interkaliert ist angeregt, und ebenfalls gegen die Zellzahl aufgetragen. In Diagramm C) wird der Forward-Scatter gegen den Sidescatter aufgetragen und Diagramm D) ist eine Auftragung von FL-I gegen FL-III.

Die Auftragung der Fluoreszenzintensität der jeweiligen Kanäle gegen die Zellzahl, liefert die Anzahl der Zellen, die bei der jeweiligen Anregung den untersuchenden Farbstoff tragen. Der erste Peak, der zwischen 0,1 und 1 relativer Fluoreszenzeinheiten zu finden ist, geht auf unspezifische Anregungen oder Verunreinigungen, zurück. Die Fluoreszenz, die eine Intensität höher als 1 besitzt, kann auf eine spezifische Bindung des Farbstoffes mit dem Zielmolekül zurückgeführt werden [siehe Abb.68: Diagramm A) und B)]. Durch das Auftragen des Forward-Scatters (Messung der Zellgröße) gegen den Side-Scatter (Granulität der Zellen) konnte eine Aussage über die Zellpopulation

getroffen werden. Ein deutlicher Shift der Zellpopulation nach Inkubation mit **(63)** konnte beobachtet werden (schwarzer Pfeil). Bei Diagramm D) wurden die zwei Fluoreszenzkanäle gegeneinander aufgetragen. Damit kann eine Aussage getroffen werden, wie viel Prozent der Zellen ein grünes Signal (Q1 - apoptotische Zellen, da Bindung an Annexin-V stattfindet), ein rotes Signal (Q2 – nekrotische Zellen, Membran so geschädigt, dass Propidiumiodid in DNA interkalieren kann), beide Signale (Q2) oder kein spezifisches Signal (Q3) besitzen. Die Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen und einer Inkubationszeit von 4 Stunden führte zu keinem Ergebnis. Um einen Anhaltspunkt über diese zwei Variablen zu bekommen, wurden die Zellen mit hohen Konzentrationen für kurze Zeit (8 h), als auch mit niedrigeren Konzentrationen für längere Inkubationszeiten (48 h) den Testsubstanzen ausgesetzt.

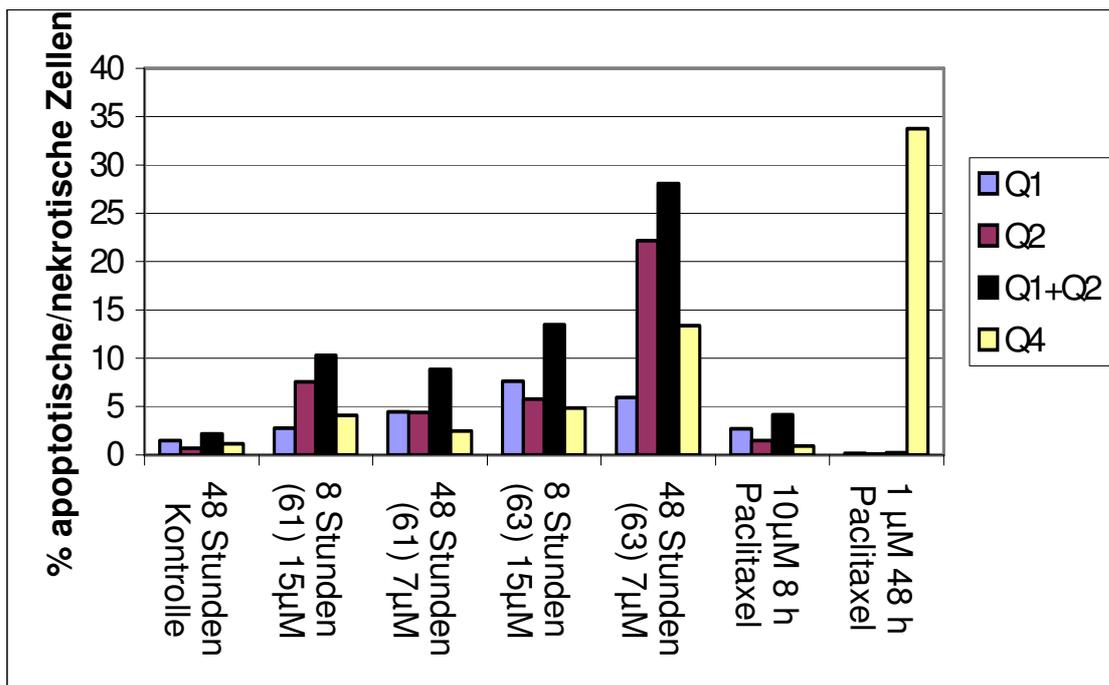


Abb. 73: Facs-Versuch mit **(61)**, **(63)** und Paclitaxel mit verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiten an Saos-2 Zellen.

Weder **(61)** noch **(64)** (Daten hier nicht gezeigt) zeigten eine signifikante apoptotische oder nekrotische Wirkung. Die Zellen, die mit Paclitaxel inkubiert

wurden, zeigten erstaunlicherweise nur noch nekrotische Signale (Q4 = 34%), jedoch keine Apoptose. (63) leitete Apoptose in 13 % der Zellen nach 8 Stunden mit einer Konzentration von 15 μM bzw. 27% nach 48 Stunden mit einer Konzentration von 7 μM , ein. Aufgrund dieser Daten und aus Zeitgründen, wurde nur noch (63) weiter auf die Wirkung an den Zellen untersucht. Der nächste Versuch demonstrierte die Konzentrationsabhängigkeit der Einleitung von Apoptose und Nekrose bei konstanter Inkubationszeit.

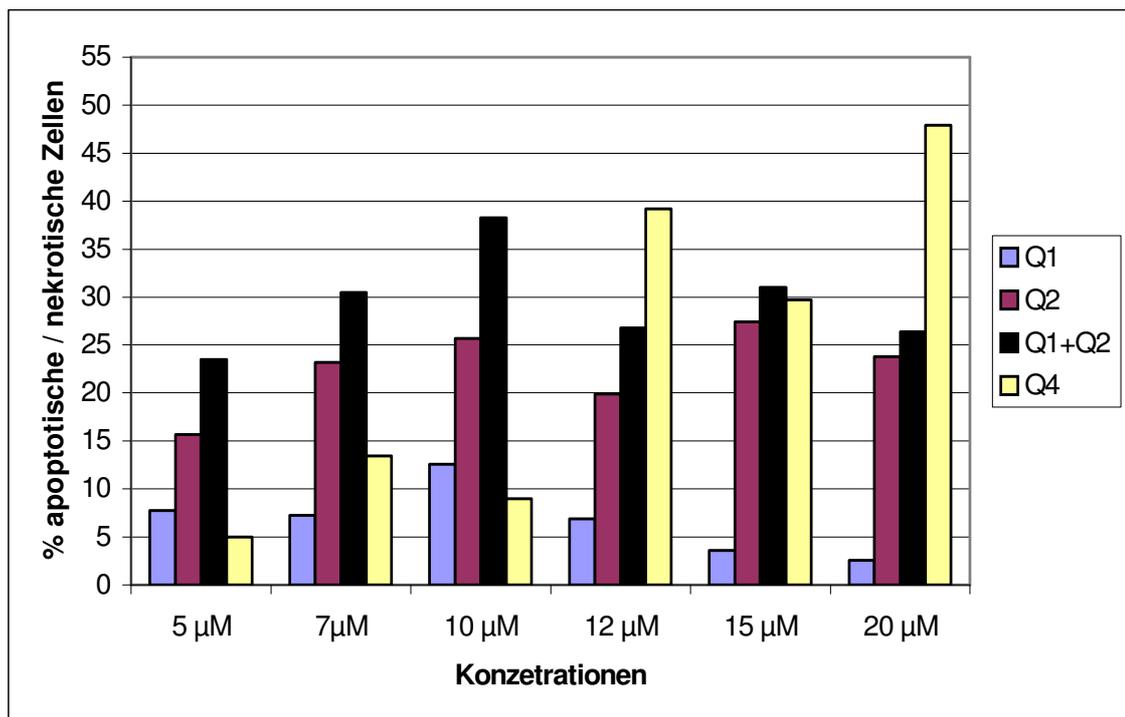


Abb.74: Konzentrationsabhängigkeit von Apoptose bzw. Nekrose bei konstanter Inkubationszeit. Saos-2 Zellen wurden für 14 Stunden mit (63) in den angegebenen Konzentrationen inkubiert und dann mit Annexin-V bzw. PI versetzt.

Die Fähigkeit der Zellen Apoptose einzuleiten lässt mit steigender Konzentration der Substanz nach. Ab einer Konzentration von 12 μM ist die Anzahl der nekrotischen Zellen deutlich höher als die der apoptotischen (38% Zellen in Q4 und nur 27 % in Q1+Q2).

Aufgrund mangelnder Zeit konnten diese Versuche nicht mit MDA MB 435 S Zellen wiederholt werden.

4 Diskussion und Ausblick

Diese Arbeit baut auf zwei neuen Konzepten der Krebstherapie auf. Das erste Konzept basiert auf der Aktivität des Tumorsupressorproteins p53. In den meisten bösartigen Krebsgeschwüren ist p53 inaktiviert, so dass diese Zellen den Stress einer Chemotherapie oder Bestrahlung aushalten. In der aktuellen Literatur wurde von verschiedenen niedermolekularen Molekülen berichtet, die die Funktion von mutiertem, und somit inaktiven p53 wiederherstellen können. Somit können Tumorzellen Apoptose wieder einleiten, ohne dass die traditionellen, aggressiven Chemotherapeutika verwendet werden müssen [Bykov *et al.*, 2003, Foster *et al.*, 1999].

Zum anderen basiert diese Arbeit auf dem Konzept, dass bei Verwendung von zuckergekoppelten Tumortheraeutika eine Drug-targeting Strategie möglich ist, die zu einer selektive Anreicherung dieser Wirkstoffe im Tumor führt. Der bisherige Erfolg der klinischen Entwicklung des neuen Tumortheraeutikums Glufosamid als Prototyp zuckerverknüpfter Chemotherapeutika, belegt das Potential dieser Drug-targeting Strategie [Briasoulis *et al.*, 2000]. Des weiteren ist für glycosidische Verbindungen bekannt, dass sie zumeist Wasserlöslichkeit vermitteln, was pharmakokinetische Vorteile bieten kann.

Vor diesem Hintergrund bestand die Aufgabenstellung und Zielsetzung dieser Arbeit darin:

- zunächst, mit Hilfe der Diels-Alder Reaktion eine saccharidhaltige Substanzbibliothek herzustellen und
- im zweiten Teil der Arbeit diese Substanzen auf ihr Potential hin zu untersuchen, Apoptose in Tumorzelllinien mit unterschiedlichem p53 Status einzuleiten.

4.1 Chemische Synthese

Zur Herstellung der saccharidhaltigen Substanzbibliothek wurde die Diels-Alder Reaktion gewählt. Als Dien-Komponenten der Cycloaddition dienten Furane und als Dienophile Maleinimide. Beide Gruppen von Ausgangsverbindungen

waren entweder kommerziell erhältlich oder relativ einfach synthetisch darzustellen. Ein weiterer Vorteil der Diels-Alder Reaktion besteht darin, dass sie kontrolliert abläuft und in der Regel keine Nebenprodukte entstehen. Zur Generierung einer Vielfalt von Edukten wurden verschiedene Zuckermoleküle ausgewählt, die eine gute Wasserlöslichkeit und zusätzlich eine selektive Anreicherung in Tumoren gewährleisten sollten. Des Weiteren wurden unter anderem Strukturen für die Derivatisierung der Ausgangsverbindungen gewählt, die sich von Pharmakophoren verschiedener Antitumortheraeutika ableiten. Zu diesen Strukturen gehörten 3,4,5-Trimethoxyphenyl und 3,4-Methylenedioxyphenyl [Pratt *et al.*, 1994].

4.1.1 Synthese der Furankomponenten

Für die Derivatisierung der Furane wurden meistens Di-substituierte Furane gewählt, besonders die 2,5- oder 3,4-disubstituierten Furane. Ausgangspunkt der ersten Derivatisierungen war α -GMF (5- α -D-(Glucopyranosyloxymethyl)-2-furfural (**24**)). Die Substanz kann durch Dehydrierung aus Isomaltulose gewonnen werden. Erste Versuche die Substanz aus Isomaltulose zu gewinnen schlugen fehl, da sich die Aufreinigung als schwierig gestaltete. Die Nebenprodukte der Reaktion konnten nicht durch herkömmliche Säulenchromatographie auf Kieselgel abgetrennt werden und auch unter Verwendung des in der Literatur beschriebenen Ionentauschers konnte die Substanz nicht rein gewonnen werden. Erfreulicherweise stellte uns die Firma Südzucker diese Verbindung zur Verfügung.

Die Aldehydfunktion des Moleküls wurde zum einen mit Hilfe von NaBH₄ reduziert und lieferte in guten Ausbeuten den korrespondierenden Alkohol (**31**). Die Darstellung von sekundären Aminderivaten verlief sowohl über die Aldehydfunktion von α -GMF als auch über die Aldehydfunktion des nicht glycolisierten Derivates, dem HMF (2-Hydroxymethyl-5-furfural). Dabei reagierte der Aldehyd mit dem Amin unter Wasserabspaltung zu dem entsprechenden Imin, das *insitu* mit NaBH₄ zum sekundären Amin reduziert werden konnte. Es zeigte sich, dass die Reaktion mit phenylischen oder benzylichen Aminen mit höheren Ausbeuten ablief als mit aliphatischen Aminen.

Die selektive Oxidation der Aldehydfunktion von α -GMF (**24**) zur Carboxygruppe mit Natriumchlorit sowie die anschließende Veresterung der Säure mit Ethanol verlief nicht mit den in der Literatur beschriebenen Ausbeuten. Die Ausbeute betrug weniger als 5% (74% - Lichtenthaler *et al.*, 1993). Auch gestaltete sich die Aufreinigung von 5-(α -D-Glucopyranosyloxymethyl-2-carboxyethyl-esterfuran (**50**), wie die bei der Herstellung von α -GMF, besonders schwierig. Die Nebenprodukte konnten nicht von der Zielsubstanz abgetrennt werden.

Eine weitere Reaktion, die zur Derivatisierung der Furane untersucht wurde, war die Amidierung. Die Peptidbindung zwischen 4-Carboxy-2-hydroxymethyl-furans und 3,4-Methylenedioxybenzylamin oder 1,3-*N,N*-Bis(*t*-boc)-2-amino-1,3-diaminopropan konnte unter klassischen Bedingungen mit verschiedenen Carbodiimiden nicht dargestellt werden. Zuerst wurde vermutet, dass die Reaktion aufgrund der sperrigen Cyclohexylgruppen von DCC nicht erfolgte. Deswegen wurden EDC als auch DIC für die Kopplung verwendet. In beiden Fällen konnte nur der aktivierte Ester isoliert werden, der aber nicht wie erwartet mit dem Amin abreagierte. Nur durch Zugabe von HOBt konnte das gewünschte Produkt isoliert werden (Ausbeute etwa 50% nach Säulenchromatographie). Dabei reagierte HOBt mit dem aktivierten Ester und spaltete das entsprechende Harnstoffderivat ab. HOBt ist also eine bessere Abgangsgruppe bei der Amidbildung als der Harnstoff.

Die erfolgreiche Darstellung von 5-Hydroxymethyl-furan-3-carboxylsäure-(1',3'-*N,N*-bis(*t*-boc)-2-amino-1',3'-diamino-propan)-amid (**55**) zeigte die Möglichkeit auf, mit Hilfe dieser Furanderivatisierung neue Verbindungsklassen zu generieren. In Vorversuchen wurden die Aminofunktionen entschützt und mit Kaliumtetrachloroplatinat (II) ($K_2Pt(Cl)_4$) versetzt.

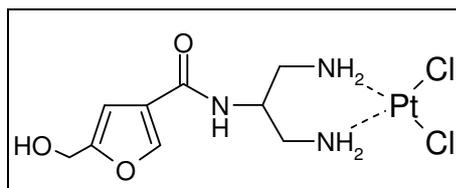


Abb.75: Vorversuch zur Darstellung möglicher, neuer Wirkstoffe

Der Diamino-dichloro-Platinkomplex konnte durch Massenspektroskopie nachgewiesen werden, war aber unter den untersuchten Bedingungen nicht stabil. Jedoch zeigte dieser Vorversuch, dass über die Furanderivatisierung neue Wirkstoffe geniert werden können, die ein anderes biologisches Target als p53 haben.

Die Vielseitigkeit der Derivatisierungsmöglichkeiten an den Furanen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht voll ausgeschöpft. Weitere Umsetzungen des Aldehyds zu unterschiedlichen Funktionalitäten, wie zum Beispiel zu Ethern, Nitroverbindungen, oder Olefinen, sind möglich. Auch wurden in dieser Arbeit hauptsächlich die symmetrischen disubstituierten Furane untersucht. Die Verwendung von Furanen mit anderen Substitutionsmustern (siehe Abbildung 19 – Abschnitt 3.1.1) bietet sich an.

4.1.2 Synthese der Maleinimide

Die synthetisierten Maleinimide wurden entweder ausgehend von Maleinimid (**56**) oder Maleinsäureanhydrid (**59**) dargestellt. Die Umsetzung von Maleinimid mit Methylchloroformat lieferte in guten Ausbeuten *N*-Carboxymethylmaleinimid (**57**) [O.Keller, *et al.*, 1975], welches dann direkt mit dem Amin zum gewünschten Maleinimid umgesetzt werden konnte. Die Reaktion von Maleinsäureanhydrid mit Aminen in Eisessig zur entsprechenden Carbamoylacrylsäure (**60**) und die anschließende Umsetzung zum Maleinimid in Acetanhydrid lieferte ebenfalls gute Ausbeuten vom gewünschten Maleinimid. Dies galt wenn das Edukt der Synthese entweder ein phenylisches oder ein benzyliches Amin war. Versuche mit aliphatisches Aminen führten bei beiden Reaktionswegen zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen. Die Ausbeuten waren gering – zwischen 10-20% - und in manchen Ansätzen ließen sich die gewünschten Verbindungen gar nicht isolieren. Auch andere Synthesemethoden, wie die Umsetzung von N-halogenierten Maleinimiden mit den entsprechenden Bromiden unter Zugabe von Silbernitrat, führte nicht zu den gewünschten Verbindungen [Schwartz, *et al*, 1974].

4.1.3 Diels-Alder Verbindungen

Die Synthese der Diels-Alder Verbindungen wurden in einem Wasser-THF Gemisch als Lösungsmittel durchgeführt. Im Allgemeinen wurde 1 Äquivalent des Diens mit 1.2 Äquivalenten des Dienophiles bei 50°C zur Reaktion gebracht. Die Reaktionszeit variierte zwischen 16 und 48h. Durch die Verwendung des „Chemspeed Synthesizers“ konnten parallel bis zu 16 verschiedene Kombinationen von Maleinimiden mit Furanen zur Reaktion gebracht werden. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels HPLC-Analyse des Reaktionsgemisches. Die Ausbeuten lagen zwischen 40-80% d.Th. Wegen des möglichen Auftretens der Retro-Diels-Alder Reaktion, wurde die Reaktionsmischung nicht am Rotationsverdampfer (Wasserbadtemperatur 40°C unter Vakuum) eingengt, um eine mögliche Rückreaktion zu den Edukten zu vermeiden. Deshalb wurde die Reaktionsmischung direkt mit flüssigen Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet. Die Aufreinigung erfolgte wiederum durch HPLC, da diese Methode auch eine Trennung der verschiedenen Stereoisomere ermöglichte. Je nach Substitution gelang nicht nur die Trennung von *exo*- und *endo*-Produkten, sondern auch die Auftrennung in die verschiedenen Diastereomere (siehe Kapitel 7.3: Synthesevorschriften der Diels Alder Verbindungen). Die Zuordnung der jeweiligen *exo*- und *endo*-Verbindungen war mit Hilfe von ¹H-NMR-Spektroskopie möglich. Dabei ist zum einen eine charakteristische Verschiebung der zwei Brückenkopf H-Atome zu beobachten, die im Falle von ‚*exo*‘ Tieffeld-verschoben sind, und im Falle von ‚*endo*‘ Hochfeld. Ausserdem geben die Kopplungskonstanten der Brücken-H-atome Auskunft über die Stereomere. Im Fall der *exo*- und *endo*- Verbindung von 4-Ethyl-8,9-bis-hydroxymethyl-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0.^{2,6}]dec-en-3,5-dion (**78**) interagieren die jeweiligen Brücken-H-atome. Dabei liegt bei *endo*-4-Ethyl-8,9-bis-hydroxymethyl-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0.^{2,6}]dec-en-3,5-dion (**78**) ein kleiner Diederwinkel zwischen den beiden Brücken-H-atomen vor. Entsprechend der Karpluskurve führt dieser Winkel jeweils zu einem Duplett-Signal, mit einer Kopplungskonstante von $J = 3.6$ Hz. Im Fall der *exo*-

Verbindung liegt ein grösserer Winkel vor ($\sim 90^\circ$), der für das Singulett-Signal der jeweiligen Brücken-H-atome verantwortlich ist.

Im Fall der *endo*- bzw. *exo*-Verbindung von 4-Ethyl-1,7-bis-hydroxymethyl-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0.^{2,6}]dec-en-3,5-dion (**85**) sind am „Oxa“-brückenkopf keine H-Atome, sondern CH₂-Gruppen, mit denen die *endo*- bzw. *exo*-H-Atome interagieren können. Auch hier geben bestimmte Aufsplittungsmuster der *endo*- bzw. *exo*-H-Atome sowie die der Hydroxymethyl-Gruppen am Ring einen Hinweis auf die vorliegende Konformation. Im Fall der *endo*-H atome tritt ein Singulett auf. Aufgrund des kleinen Diederwinkels ist eine Wasserstoffbrückenbildung des *endo*-H-atoms mit dem Sauerstoffatom der Hydroxymethylgruppe begünstigt. Im Fall der *exo*-Verbindung, ist der Winkel grösser und somit auch der Abstand zwischen dem *exo*-H-Atom und dem Sauerstoffmolekül der Hydroxymethylgruppe. Für das *exo*-H-Atom kann ein Quartett mit der Kopplungskonstante $J = 5.2$ Hz beobachtet werden.

Die symmetrisch am Oxabicyclo-core substituierten und mit dem gleichen Zucker di-glycosilierten Verbindungen besitzen eine Pseudosymmetrie. Im ¹H-NMR-Spektrum konnten nur die unterschiedlichen *exo*- und *endo*-Strukturen nachgewiesen werden und keine weiteren Unterschiede bei den jeweiligen Diastereomeren zu beobachten werden. Diese Beobachtung ist auf die Rotation der Kohlenstoff-Sauerstoffbindungen zwischen den Zuckern und der Oxabicyclo-corestruktur zurückzuführen. Eine vollständige NMR-Charakterisierung der erhaltenen Verbindungen wurde jedoch nicht durchgeführt, da immer nur sehr kleine Mengen in reiner Form isoliert wurden.

Durch Einführung der Kohlenhydrate über die Furankomponente konnte die Wasserlöslichkeit der Diels-Alder Produkte gesteigert werden. Die Di-glycolisierten DA-Addukte waren komplett wasserlöslich, wohingegen die nicht-glycolisierten Verbindungen (mit Ausnahme von (**78**) und (**85**)) ohne Zusatz von THF oder DMSO nicht in Lösung gebracht werden konnten.

4.2 Biologische Wirksamkeit in vitro

Die im chemisch-synthetischen Teil dieser Arbeit dargestellten Substanzen wurden auf ihre biologische Wirksamkeit an Tumorzelllinien untersucht. Zunächst sollte geprüft werden, ob die Verbindungen in der Lage sind, die Bindungsfähigkeit von mutiertem p53 an DNA wiederherzustellen. Dazu wurden die Verbindungen zuerst auf ihre cytotoxischen Eigenschaften an drei Zelllinien mit unterschiedlichen p53 Status getestet. Anschliessend wurden die Verbindungen, die cytotoxische Eigenschaften aufwiesen, auf ihre Fähigkeit, Apoptose einzuleiten, überprüft.

4.2.1 Zelllinien

Es wurden drei humane, adhärent wachsende Tumorzelllinien ausgewählt: MCF-7, MDA MB 435 S und Saos-2 Zellen. MCF-7 (Mammaadenokarzinom) exprimiert den Wildtyp von p53, wohingegen Saos-2 Zellen (Osteosacrom) kein p53 Protein exprimiert. Als dritte Zelllinie wurde MDA MB 435 S (Brustkarzinom) ausgewählt, die mutiertes p53 exprimiert. Dabei ist bei dem Protein die Aminosäure Glycin 266 in der DNA Bindungsregion durch Valin ausgetauscht. Durch diese Mutation ist das Protein in seiner Fähigkeit, an DNA zu binden, gehemmt. In den Versuchen dienten MCF-7 und Saos-2 Zellen als Kontrollen, um den Einfluss der synthetisierten Verbindungen auf mutiertes p53 zu untersuchen.

Wachstumsverhalten in der 6 Well-Platte

Zur Bestimmung des allgemeinen Wachstumsverhaltens wurden die 3 Zelllinien auf 6-Well Platten in einer Dichte von 1×10^5 Zellen pro Well ausgesät. Der Wachstumsverlauf wurde durch Zellzahlbestimmung verfolgt. Nach einer 48-stündigen lag-Phase gingen die MCF-7 und die MDA MB 435S Zellen in eine 6-täge log-Phase über. Nach 7 Tagen hatten beide Zelllinien die Plateauphase ihres Wachstums erreicht. Dieses Wachstumsverhalten entspricht dem für kontinuierliche Zelllinien angestrebten Verlauf. Die Saos-2 Zellen zeigten unter diesen Wachstumsbedingungen innerhalb von 120 Stunden keine typische log-

Phase. Die Verdopplungszeit der Saos-2 Zellen betrug ca. 48 h. Nach ECACC wird diese Zelllinie als eine langsam wachsende Kultur eingestuft. In weiteren Versuchen (Wachstum in den 96-Well Platten) zeigte sich ausserdem, dass diese Zelllinie eine höhere Wachstumsdichte und die Zugabe von Wachstumsfaktoren benötigt, um in eine reguläre log-Phase überzugehen. Der Anteil an toten Zellen lag bei allen drei Zelllinien bis zum fünften Tag der Kultur bei etwa 12%. Danach stieg der Anteil der abgestorbenen Zellen auf 16-17% an. Aufgrund der nachlassenden Viabilität der Zellen sowie die Schwierigkeiten bei der Zellernte und der Vereinzelung der Zellen (insbesondere bei der MCF-7 Zelllinie) wurden die Zellen nach spätestens 5 Tagen für die Experimente (Cytotoxizitätstests, FACS-Analyse) verwendet.

Wachstumsverhalten in der 96-Well Platte

Aufgrund der vielen synthetisierten Verbindungen, die auf ihr cytotoxisches Potential hin getestet werden sollten, wurde ein spektrometrisches Verfahren zur Bestimmung der Zellzahl ausgewählt. Der XTT-Assay basiert auf der Spaltung des gelben Tetrazoliumsalzes XTT zu einem orangefarbenem Formazan, das anschliessend in einem ELISA-Reader quantitativ bestimmt werden kann. Da diese Spaltung durch Reduktasen in Mitochondrien lebender Zellen vermittelt wird, kann über die Menge des umgewandelten Formazans die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt werden. Der XTT-Assay wurde aufgrund seiner leichten Durchführbarkeit gewählt. Das gebildete Formazan ist wasserlöslich und die dadurch entstehende Absorption kann direkt im Spektrometer ausgewertet werden. Bei der Verwendung von MTT muss das Formazan, das ebenfalls durch metabolisch aktive Zellen gebildet worden ist, in weiteren Schritten gelöst werden und kann dann erst im ELISA-Reader ausgewertet werden. Die optimalen Bedingungen des Assays wurden ausgearbeitet, in dem die Inkubationszeit von XTT und die Wachstumsdichte der jeweiligen Zelllinie variiert wurden. Die Inkubationszeit von XTT wurde auf 3 Stunden festgelegt und die Wachstumsdichte für MCF-7 und MDA MB 435 S Zellen auf 8×10^3 Zellen pro Well und für Saos-2 Zellen auf 15×10^3 Zellen pro Well bestimmt. Die Wachstumsverläufe der drei Zelllinien in der 96-Well

Platte verhielten sich unterschiedlich zu dem Wachstumsverhalten in der 6-Well Platte. Alle drei Zelllinien befanden sich nach 24 Stunden in der log-Phase und erreichten nach 5 Tagen das Wachstumsplateau. Dieses veränderte Wachstumsverhalten kann auf die höhere Zelldichte bei der Aussat, als auch auf das veränderte Verhältnis von Mediumvolumen zu Zellzahl und Wachstumsfläche zurückgeführt werden. Hier zeigte sich wieder, dass Saos-2 Zellen eine höhere Wachstumsdichte bei der Aussat als MCF-7 und MDA MB 435 S Zellen benötigen, um ein ideales Wachstumsverhalten aufzuweisen.

4.2.2 Cytotoxizität und Zelltod

Zur Bestimmung der biologischen Aktivität der synthetisierten Diels-Alder Verbindungen wurden die drei Zelllinien jeweils auf 96-Well Platten kultiviert und nach 24 Stunden Zellwachstum mit den Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Der Wachstumsverlauf der behandelten Zellen sowie unbehandelter Zellen als Kontrolle wurde mit dem XTT-Assay kontrolliert. Die ersten Substanzen wurden auf ihr Potential, das Wachstumsverhalten der Zelllinien zu beeinflussen, über 24, 48 und 72 h Dauerinkubation getestet. Dabei kann neben der cytotoxischen auch eine cytotostatische Wirkung festgestellt werden. p53 ist nicht nur an der Einleitung von Apoptose, sondern auch an der Transkription von Genen beteiligt die DNA-Reparatur und Wachstumsstopp der Zellen einleiten [Lane, *et al.*, 1990]. Dadurch kann auch eine cytotostatische Wirkung einer Substanz auf die MDA MB 435 S Zelllinie einen ersten Hinweis auf die Interaktion der zu testenden Substanz mit mutiertem p53 liefern. Trotzdem wurden die cytotostatischen Untersuchungen aufgrund des hohen Verbrauchs von XTT nach den ersten Screenings abgebrochen. Die Substanzen wurden nach 48 h Dauerinkubation nur auf ihr cytotoxisches Potential untersucht.

Aufgrund der unterschiedlichen cytotoxischen Aktivität der aufgereinigten Diels-Alder Verbindungen zu der Aktivität der korrespondierenden Rohprodukte, wurden auch die Edukte auf ihr Potential, das Wachstum von Tumorzellen zu

beeinflussen, getestet. Bei dieser Untersuchung zeigte sich, dass die Furane keine, die Maleinimide jedoch eine signifikante cytotoxische Aktivität besaßen.

Biologische Aktivität der Maleinimide

Die Wirkung der Maleinimide war dabei abhängig von der N-Substitution. Die hydrophilen aliphatischen Maleinimide [*N*-Methoxycarbonyl-maleinimid (**57**), *N*-Hydroxyethyl-maleinimid (**71**), *N*-Maleinimido-4-butansäure(**72**) und das Maleinimidderivat des Peptides REDEDIEW(**122**)], zeigten keine biologische Wirksamkeit. Die anderen benzylisch-, phenylisch- oder hydrophoben aliphatisch-substituierten Maleinimide besaßen eine cytotoxische Wirkung mit IC₅₀-Werten zwischen 2 und 95 µM. Die korrespondierenden Succinimide der aktiven Maleinimide waren jedoch nicht mehr aktiv. Dies ist ein Hinweis, dass die Doppelbindung der Maleinimide für die Cytotoxizität bedeutend ist. Weiterhin, kann spekuliert werden, dass die Verbindungen erst durch die Zellmembran gelangen müssen (entweder durch aktiven Transport, oder durch Diffusion), um ihre Wirksamkeit zu entfalten. Die Inaktivität der hydrophilen aliphatischen Maleinimide spricht gegen die Hypothese, dass die Maleinimide mit ihrer aktivierten olefinischen Doppelbindung mit einem Nukleophil an der Zelloberfläche abreagieren und somit eine Signaltransduktion an die Zelle vermitteln, die Nekrose oder Apoptose einleitet.

Die Zelllinie MCF-7, die den Wildtyp p53 exprimiert, zeigte sich gegenüber den aktiven Maleinimiden nicht so sensitiv, wie die MDA MB 435S Zellen (mutiertes p53) und die Saos-2 Zellen (null-p53). Diese unterschiedliche Sensitivität, vorallem die Toxizität gegenüber den Saos-2 Zellen, ist ein Hinweis dafür, dass p53 nicht das eigentliche Target dieser Verbindungen ist. Trotzdem ist genau diese Eigenschaft, Affinität gegenüber Zellen mit mutiertem p53 und Zellen, die kein p53 exprimieren, interessant für die Tumorthherapie. Die meisten in der Klinik verwendeten Antitumormittel, wie 5-Fluorouracil, Methotrexat und Doxorubicin besitzen eine Affinität zu Krebszelllinien, die den Wildtyp von p53 besitzt. Bisher sind nur wenige Verbindungen bekannt, die eine Affinität für Zelllinien mit mutiertem p53, wie z.B. Paclitaxel, besitzen [Bykov, *et al.*, 2002-c].

Ein weiterer Hinweis, dass die Verbindungen nicht nur oder auch gar nicht mit p53 interagieren, wurde durch die Untersuchungen zum Zelltod geliefert. Aufgrund der cytotoxischen Daten und der Veränderung der Zellmorphologie (die durch ihre Einschnürungen – „blebbing“, auf Apoptose hinwiesen) wurde der Einfluss der Maleinimide auf den Zelltod untersucht. Durch das Einwirken von Chemotherapeutika, die Stress auf die Tumorzellen ausüben, sollte Apoptose eingeleitet werden. Da bei stressinduzierter Apoptose p53 eine Schlüsselrolle spielt [Ryan, *et al.*, 2001], wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, welcher Zelltod durch die Maleinimide eingeleitet wurde: Nekrose oder Apoptose. Mit Hilfe von Gel-Elektrophorese Versuchen und dem ELISA-DNA Fragmentierungsassay konnte keine Apoptoseeinleitung an MDA MB 435 S oder Saos-2 Zellen nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS), konnten apoptotische Saos-2 Zellen nach der Inkubation von *N*-(4-(Bis-(2-chloro-ethyl)-amino)-phenyl)-maleinimid (**63**) nachgewiesen werden. Während dieser Versuchsreihe konnte festgestellt werden, dass die Inkubationszeit und die Konzentration der Verbindung zwei kritische Größen bei dem Nachweis von Apoptose sind. Ist die Konzentration zu hoch oder die Inkubationszeit zu lang, können nur noch nekrotische Zellen nachgewiesen werden. Da nur apoptotische Saos-2 Zellen nach einer 14-stündigen Inkubation von 10 µM (**63**) nachgewiesen werden konnten, liegt auch hier die Vermutung nahe, dass die Maleinimide keine direkte Interaktion mit p53 hatten.

Um diese Hinweise, dass die Maleinimide ein anderes Target in der Zelle als p53 haben, zu bestätigen, sollten noch weitere Experimente durchgeführt werden, was aus Zeitgründen jedoch nicht möglich war.

Bykov *et al.*, fanden heraus, dass das Maleinimid MIRA-1 die spezifische DNA-Bindung von 3 aus 14 verschiedenen „hot-spot“ Mutanten von p53 wiederherstellen konnte [Bykov, *et al.*, 2002-b]. Zum einen kann dies bedeuten, dass die Mutation der MDA MB 435 S Zelllinie nicht zu den Mutanten gehört, die durch die getesteten Maleinimide zur DNA-Bindung aktiviert werden kann. Durch Testung weiterer Mutanten könnte dies herausgefunden werden. Des weiteren zeigten Studien von der Verbindung CP-31398, dass die Behandlung von Zellen mit CP-31398 die Induktion von p53 regulierten Genen, wie p21,

MDM2 und Bax, sowie Apoptose-bezogene Veränderungen auf der Proteinebene, wie den Verdau durch Poly ADP-Ribose Polymerase (PARP), verursacht. Diese Effekte waren jedoch Zelllinien abhängig. SKOV-Zellen mit mutiertem H-175 p53 zeigten die Induktion von MDM2 und Bax, aber andere Zelllinien mit dieser Mutation zeigten keine Induktion. Dazu gehörten die Zelllinien DLD1, SW480 und SKBr3 [Rippin, *et al.*, 2002; Takimoto, *et al.*, 2002]. Somit könnte auch eine andere Zelllinie ausgewählt werden, um den Einfluss der Maleinimide auf p53 zu untersuchen.

Zum anderen können auch andere Assays einen besseren Aufschluss über die Interaktion von p53 mit den verschiedenen Verbindungen geben. Foster *et al.* identifizierten CP-31398 zuerst über ein Antikörperbindungsassay, bei dem der Antikörper nur spezifisch an die Konformation des Wildtyp p53 bindet [Foster *et al.*, 1999]. Die Wirkung der Testverbindungen auf die Transaktivierungsaktivität von mutiertem p53 in lebenden Zellen wurde mit Hilfe eines Plasmides nachgewiesen, das in Zellen mit mutiertem p53 transfiziert wurde.

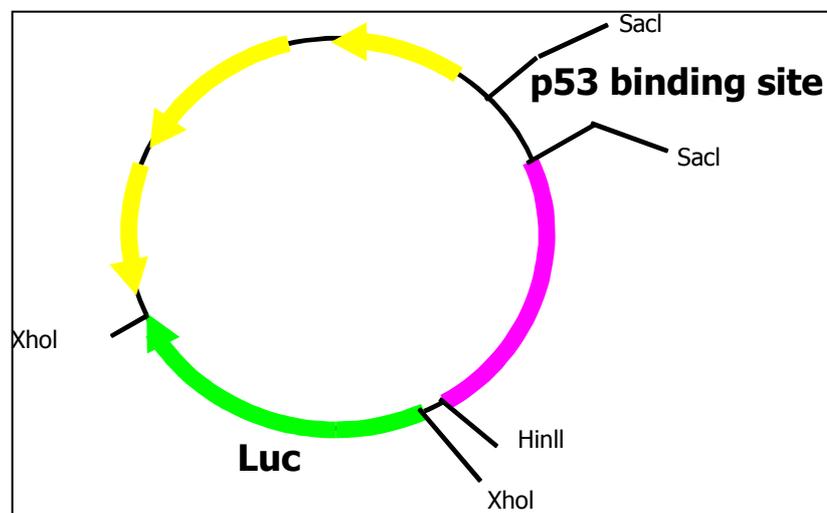


Abb. 76: Schematische Zeichnung des Plasmids: Bindet funktionelles p53 an die p53 Bindungsdomäne, wird Luziferase (Luc) exprimiert, dass dann durch Zugabe von Luziferol und die somit entstehende Fluoreszenz nachgewiesen wird.

Eine weitere Möglichkeit die Maleinimide auf ihre Wirkung an p53 zu testen, sind die Gel-shift assays, die Bykov *et al* zur Identifizierung von PRIMA-1 und MIRA-1 verwendet haben [Bykov *et al.*, 2002-b].

Biologische Wirksamkeit der Diels-Alder Verbindungen

Im Allgemeinen konnte bei den Diels-Alder Verbindungen nur eine geringe cytotoxische Aktivität festgestellt werden. Die aktiveren Verbindungen zeigen einen Einfluss auf das Zellwachstum bei Konzentrationen von ~ 200 μ M (z.B. 4-(3'-Hydroxy-4'-methoxy-phenyl)-1-(hydroxymethyl)-7-(α -D-glucopyranosyloxy-methyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-3,5-dion (**88**)), bei der MDA MB 435 S Zelllinie.

Die Stabilitätsuntersuchungen der Diels-Alder Produkte zeigten, dass die [4+2]-Addukte abhängig von ihrer Substitution am Furan eine unterschiedliche Stabilität besitzen. Die Rückreaktion zu den Edukten, sowie die „Neubildung“ von Diels-Alder Produkt ist dabei ein dynamischer Prozess.

Durch die Stabilitätsuntersuchungen der Diels-Alder Verbindungen, sowie die Toxizitätsuntersuchung von nicht-hydrierten und den korrespondierenden hydrierten Produkten, zeigte sich dass die biologische Aktivität der Diels-Alder Addukten auf der Freisetzung von Maleinimid beruht. Dabei ist nicht bekannt, ob die Rückreaktion zu den Diels-Alder Edukten in der Zelle oder ausserhalb, im Medium, stattfindet. Jedoch spricht zum einen die erhöhte glycolytische Aktivität von Tumorzellen, als auch die größere Anzahl an Transportproteinen für eine vermehrte Aufnahme der saccharidhaltigen Substanzen in die Tumorzellen. Genauso könnte die erhöhte Glycosidaseaktivität der Zelle, die eingeschleusten saccharidhaltigen Verbindungen schnell in das Saccharid und das instabilere Di-hydroxymethyl Diels-Alder Äquivalent gespalten werden, welches wiederum Maleinimid in der Zelle freisetzt. Diese selektivere Vermittlung an die Tumorzellen kann in weiteren Versuchen untersucht werden. Ebenso sollte auch der Einfluss der Diels-Alder Verbindungen auf p53 in den oben erwähnten Assays untersucht werden, da die Cytotoxizität und die Apoptose nur Anhaltspunkte für eine Interaktion mit p53 lieferten.

5 Material und Methoden

5.1 Materialien zur chemischen Synthese und Analytik

Lösungsmittel und Trocknungsmittel

Alle Reaktionen wurden in wasserfreien, käuflich erworbenen p.A. Lösungsmitteln durchgeführt. Die polaren Lösungsmittel Acetonitril, DMF, DMSO, Ethanol und Methanol wurden über Molekularsieb 3 Å getrocknet, alle anderen Lösungsmittel über Molekularsieb 4 Å. Die Lösungsmittel für die HPLC wurden von der Firma Merck, Lichrosolv®, und der Firma Roth (Karlsruhe, D), *Gradient Grade*, bezogen. Das Milipore-Wasser wurde 10 min im Ultraschallbad entgast.

Reagenzien

Soweit nicht anders angegeben wurden alle kommerziell erhältlichen Edukte über die Firmen Sigma-Aldrich (Taukirchen, D), Merck (Darmstadt, D), oder Fluka (Neu-Ulm, D) bezogen.

Kernresonanzspektroskopie

- ¹H-NMR: Bruker AM 250 (250 MHz) Bruker, Rheinstetten, D
Bruker Am 500 (500 MHz) Bruker, Rheinstetten, D
- ¹³C-NMR: Bruker AM 250 (63 MHz) Bruker, Rheinstetten, D
Bruker Am 500 (125 MHz) Bruker, Rheinstetten, D

Abteilung Zentrale Spektroskopie des DKFZ, Heidelberg

Massenspektrometrie

Elektrospray-Ionisation (ESI) Finnigan MAT TSQ

Abteilung Zentrale Spektroskopie des DKFZ, Heidelberg

Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtfolien Polygram Sil G/UV₂₅₄ Macherey-Nagel, Düren, D

Sprühreagenzien für die Dünnschichtchromatographie

- *Vanillin-Schwefelsäure-Sprühreagenz* (Stahl 1967)
 - Zusammensetzung 0,1 % Lösung von Vanillin in 50% H₂SO₄
 - Anwendung insbesondere bei höheren Alkoholen/Sacchariden
- *Cer-Molybdän-Sprühreagenz*
 - Zusammensetzung 24 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·2 H₂O mit 1 g Ce(SO₄)₂
in 500 ml 10 % H₂SO₄ gelöst
 - Anwendung bei allen oxidierbaren Substanzen
(Universalreagenz)
- *N,N-Dimethylaminobenzaldehyd*
 - Zusammensetzung 10% ige Lösung in Ethanol
 - Anwendung bei Amiden und primären / sekundären Aminen

Alle Reagenzien wurden im Heißluftstrom bis zum Erreichen ihrer spezifischen Anfärbung erhitzt.

Säulenchromatographie

Kieselgel KG 60, 0.063-0.02 mm	Macherey-Nagel, Düren, D
Kieselgel KG 60, 0.04-0.063 mm	Macherey-Nagel, Düren, D

Geräte und Materialien für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

- | | |
|---------------------------|---------------------------------|
| • Hewlett-Packard HP 1090 | Hewlett Packard, Bad-Homburg, D |
| • Gilson Abimed | Langenfeld, D |

Sonstige Geräte

Fraktionsammler LKB Super Frac	Pharmacia, Hilter, D
Gefriertrockner Beta 1-8	Christ, Osterode, D
Rotationsverdampfer R-114/Wasserbad B480	Büchi, Flawil, CH
Trockenschrank T 6120	Heraeus, Hanau, D
Vakuumpumpe RD 4	Vacuubrand, Wertheim, D
Chemspeed Syntesizer	Chemspeed, CH

5.2 Zellkultur

Materialien für Zellkultur, Toxizitätsbestimmungen und Apoptoseassays

Chemikalien

- Phosphate Buffered Saline (PBS) ohne Mg^{2+}/Ca^{2+} Pan Systems,
Aidenbach
- XTT (Natrium 3-[1-phenylaminocarbonyl]-3,4- Sigma, Steinheim
tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzolsulfon
säure) in RPMI 1640 ohne Phenolrot (1mg/ml)
- PMS (N-methyl-dibenzopyrazine methylsulfat) Sigma, Steinheim
(1,25 mM in PBS)
- Trypsin/ EDTA (10x) Biochrom, Berlin
- Tween 20 Sigma, Steinheim
- NP-40 (Ipegal CA-630) Sigma, Steinheim

Medium und Zusätze, steril

- Fötale Kälberserum (FCS) Pan Systems,
Aidenbach
- L-Glutamin 200 mM Pan Systems,
Aidenbach
- Penicillin/ Streptomycin (Penstrep) Gibco, Eggenstein
- RPMI 1640 (ohne L-Glutamin) Biochrom, Berlin
- DMEM (ohne L-Glutamin) Biochrom, Berlin

Verbrauchsmaterial

- Gewebekulturflaschen: 25 cm² / 50 ml Becton Dickinson
75 cm² / 250 ml Becton Dickinson
- Gewebekulturplatten: 6-Well Becton Dickinson,
96-Well Becton Dickinson
- Zentrifugenröhrchen Falcon: 15ml/50ml Becton Dickinson
- Cryovials NUNC, Wiesbaden

- | | |
|--|-------------------|
| • Serologische Pipetten: 5ml, 10ml, 25ml | Becton Dickinson |
| • Sterile Einmalspritzen Luer Lock | Terumo, Leuven, B |
| • Spritzenfilter 0,2µm | Renner, Darmstadt |

Geräte in der Zellkultur

- | | |
|-----------------------------|---------------------|
| • Zählkammer nach Neubauer | Renner, Darmstadt |
| • Brutschrank | Hereaus, Hanau |
| • Sterile Werkbank HERAsafe | Hereaus, Hanau |
| • Umkehrphasenmikroskop | Leica, Wetzlar |
| • Tisch-Kühl-Zentrifuge | Jouan, St. Herblain |

Material zur Kultivierung

Fötales Kälberserum (FCS)

Das Serum wurde 60 min. bei 56 °C inaktiviert und portionsweise bei -20 °C eingefroren.

DMEM für MCF-7

Das Medium enthielt die folgenden Zusätze:

FCS (inaktiviert)	10%
L-Glutamin	4 mM
Penstrep	1000 U/ml

RMPI 1640 für MDA MB 435 S

Das Medium enthielt die folgenden Zusätze:

FCS (inaktiviert)	10%
L-Glutamin	4 mM
Penstrep	1000 U/ml

RPMI 1640 für Saos-2

Das Medium enthielt die folgenden Zusätze:

FCS (inaktiviert)	0%
L-Glutamin	4 mM
Glucose	4.5 g/L
Penstrep	1000 U/ml

5.2.1 Allgemeine Methode für die laufende Kultivierung

Die Zellen wurden in den entsprechenden Medien in 75cm² Kulturflaschen kultiviert. Die adhärent wachsenden Zellen wurden kurz vor Erreichen der Konfluenz passagiert. Dazu wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums mit 10 ml PBS gewaschen und dann mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung bis zum Ablösen der Zellen wurde bei 37° C inkubiert. Trypsin/EDTA wurde mit 8 ml vorgewärmten Medium inaktiviert. Durch mehrmaliges Auf-und Abpipettieren mit einer 10, 5 oder 2 ml serologischen Pipette wurden die Zellen vereinzelt. Ein Aliquot wurde in einer 1:2 Verdünnung mit Trypanblau in der Neubauer Zählkammer ausgezählt und die Zellen anschließend in den entsprechenden Wachstumsdichten neu ausgesät. Das Gesamtvolumen des Mediums von 30 ml wurde in der 75 cm² Kulturflasche nicht überschritten. Die Zellen wurden in den Brutschrank überführt und bei 37°C, 5% CO₂- Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit bis zur nächsten Umsetzung gelagert.

Zelllinien :

- Bei der Zelllinie MCF-7 handelt es sich um ein humanes Mammaadenokarzinom, welches in Kultur adhärent wächst und von der Tumorbank des DKFZs erworben wurde. Die Zelllinie exprimiert wt-p53 und wurde mit dem oben beschriebenen DMEM-Medium kultiviert. Die Passagierung erfolgte alle 3-4 Tage in einer Verdünnung von 1:10.
- Die Zelllinie MDA MB 435 S ist ebenfalls ein adhärent wachsendes, humanes Mammakarzinom, das von der Tumorbank des DKFZs erworben wurde. Es wird mutiertes p53 exprimiert, hierbei ist die Aminosäure 266 Gly gegen Val ausgetauscht. Die Zelllinie wurde mit RPMI 1640 (s.oben) kultiviert und alle 3-4 Tage passagiert (Verdünnung von 1:10).
- Saos-2 ist eine Zelllinie, die aus einem humanen Osteosacrom etabliert wurde, adhärent wächst und von Dr.Tomassino (ATV) zur Verfügung gestellt wurde. Das Hauptmerkmal dieser Zellen ist, dass kein p53 exprimiert wird, und somit als Negativ-Kontrolle für den Einfluss der Testsubstanzen auf p53 verwendet werden kann.

Einfrieren der Zelllinien

Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben geerntet und ihre Viabilität wurde mittels Trypanblauzählung in einer 1:2 Verdünnung bestimmt. Bei einer Viabilität von > 90% wurden die Zellsuspension für 8-10 min. bei 1000 rpm zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium, das 40 % FCS enthielt, so resuspendiert, dass eine Zelldichte von 4×10^6 Zellen pro ml erhalten wurde. Die Zellen wurden dann auf Eis gestellt und vorsichtig mit dem gleichen Volumen an frischem Medium mit einem Gehalt von 20% DMSO gemischt. Jeweils 1 ml Zellsuspension wurde in ein Cryoröhrchen überführt, das in einer Isopropanol-Cryobaox der Firma Nalgene in einem – 80°C Gefrierschrank über Nacht oder durch kontrollierte Abkühlung bei 1°C/min in der Tumorbank des DKFZ eingefroren wurde. Die Langzeitlagerung erfolgte bei –196°C in der Gasphase über flüssigem Stickstoff.

Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden nach der Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff auf Eis gelagert und dann rasch bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut (innerhalb von 3 Minuten). Die Zellsuspension wurde dann langsam in 10 ml vorgewärmtes Komplettmedium getropft und anschließend 8 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml Medium vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurden dann in eine 25 cm² Kulturflasche überführt und die Viabilität der Zellen anhand eines Aliquots durch Trypanblauzählung bestimmt. Dann wurden die Zellen in einen Brutschrank bei 5% CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit und 37 °C überführt und für mindestens 24 h in Ruhe gelassen.

Mycoplasmentest

Zur Überprüfung, ob eine Kontaminierung mit Mycoplasmen vorlag, wurden zwei verschiedene Methoden angewendet:

1. Färbung mit Bisbenzimid:

Die Zellen wurden auf sterilisierten Glasplättchen (Ø 22 cm) in Petrischalen kultiviert, indem ungefähr 5×10^4 Zellen der Routinezellkultursuspension auf das Glasplättchen getropft und nach 10 min vorsichtig mit 3 ml Medium überschichtet wurden. Nach 5-7 Tagen wurden die Zellen mit Methanol/Eisessig (4:1) fixiert. Dazu wurde das Medium entfernt, Methanol/Eisessig Lösung auf die Zellen gegeben und nach 15 min Inkubation, wurde das Glasplättchen schnell im Luftstrom getrocknet. Anschließend wurden die Zellen für 15 - 30 min unter Lichtausschluss mit $0,1 \mu\text{g/ml}$ Benzimidin in PBS inkubiert. Die Plättchen wurden zweimal mit bidest H_2O gewaschen, anschließend getrocknet und dann mit Elanol auf Objektträgern fixiert. Die so erhaltenen Präparate wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop auf Mycoplasmen untersucht. Bei Kontamination sind im Cytoplasma der Zellen fluoreszierende Punkte zu beobachten. Diese werden durch die Interkalation des Bisbenzimidins in die DNA der Mycoplasmen hervorgerufen.

2. Nachweis mittels PCR(Venorgem®-Mycoplasmen Kit)

100 μl Zellkulturüberstand wurden in ein steriles Eppendorfreaktionsgefäß (mit safe-lock-Deckel) überführt und dann für 5 min im Wasserbad bei 100°C inkubiert. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (5 sec, 13000 Umdrehungen) und 2 μl des Überstandes wurden für den PCR-Test eingesetzt. Dazu wurden je Test 5 μl 10x PCR Reaktionspuffer, 10 μl Primer/ Nukleotid, 1 U Taq DNA Polymerase miteinander versetzt und mit sterilem Wasser auf 48 μl aufgefüllt. Der Reaktionsmix wurde dann mit 2 μl der Probe, bzw. 2 μl der Positivkontrolle oder 2 μl sterilem deionisiertes Wasser als Negativkontrolle versetzt. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt, kurz zentrifugiert, die Reaktionsgefäße in den Block des Thermocyclers gestellt und das Thermocycler-Programm gestartet

PCR-Thermocycler-Programm:	1 Zyklus	94 °C für 2 min
		55 °C für 2 min
		72 °C für 2 min
	34 Zyklen	94 °C für 30 sec
		55 °C für 1 min
		72 °C für 1 min
		72 °C für 4 min
		auf 4 bis 8 °C abkühlen

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden in einem 1.5% Agarosegel durch Elektrophorese aufgetrennt, wobei 5 µl jeder Probe aufgetragen wurden. Eine Mykoplasmenkontamination wurde durch eine Bande bei 280 bp angezeigt.

5.2.2 Zellzahlbestimmung mittels des XTT-Tests:

Mitochondrien lebender Zellen sind in der Lage XTT aufzunehmen und durch Reduktion in Formazan umzuwandeln. Die Menge des gebildeten Formazans ist proportional zu der Zahl an lebenden Zellen und kann durch den Gebrauch eines Photometers bei 480 nm quantifiziert werden. Dieser Test wurde verwendet, um Wachstumskurven in 96 Well-Kulturplatten zu erstellen, als auch um die Cytotoxizität der Diels-Alder Produkte zu bestimmen.

Dazu wurden 100 µl des Mediums abpipettiert und 50µl des XTT-PMS Gemisches (5ml XTT wurden mit 100 µl PMS direkt vor dem Versuch versetzt) zugegeben. Für jede Zelllinie wurde die optimale Inkubationszeit von 3 h bestimmt, nach der die Platten im ELISA-Reader bei 480 nm (Referenzwellenlänge: 680 nm) vermessen wurden. Aus dem Quotienten der Extinktion behandelter und unbehandelter Zellen wird die Überlebensrate berechnet, wobei die Eigenabsorption der Platte zu berücksichtigen ist.

5.2.3 Wachstumskurven:

Die Wachstumskurven wurden mit Hilfe des XTT-Tests erstellt. Es war notwendig, für jede Zelllinie die optimale Wachstumsdichte als auch die ideale Inkubationszeit von XTT zu ermitteln. Dazu wurden die Zellen in verschiedenen Konzentrationen (von 0.1×10^4 bis 4×10^4) in einem 96-Well in 200 μ l Medium ausgesät. Nach 24, 48, 72 oder 96 h wurde in die jeweilige Platte XTT zugegeben und die Extinktion nach 2, 3, 4, 6 und 12 h im ELISA-Reader gemessen.

5.2.4 Zytotoxizitätstest:

Die Zellen wurden in ihrer idealen Wachstumsdichte in einem 96-Well ausgesät (MCF-7: 8×10^3 , MDA MB 435 S: 8×10^3 , Saos-2: 15×10^3 pro Well). 24 Stunden später wurden 100 μ l des Mediums abpipettiert und die Zellen (von 1000 μ M bis 0,1 μ M) mit den entsprechenden Substanzen in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Dazu wurden die Substanzen in DMSO gelöst und mit Medium auf die gewünschte Konzentration verdünnt, so dass die Endkonzentration an DMSO 1% nicht überstieg. Die Zahl an lebenden Zellen wurde mit Hilfe von XTT nach 48 h Dauerinkubation bestimmt und mit der Kontrolle (Zellen, die nur mit 1% DMSO gleichzeitig kultiviert wurden) verglichen. Die erhaltenen Werte wurden mit Hilfe des Biostatistik Programms ‚ADAM‘ ausgewertet und der IC_{50} ermittelt.

5.2.5 Apoptosebestimmung mit Annexin V/ Propidiumiodid; Durchflusszytometrie

Die Zellen wurden in 25 cm² Flaschen ausgesät (1×10^6) und für 24 Stunden unter Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen mit den Testsubstanzen versetzt und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten geerntet. Dazu wurden sie mit Trypsin 0.25%/ EDTA 0.05% in PBS versetzt, abgelöst, zentrifugiert (8 min bei 120 g, 30 °C) und mit PBS gewaschen. Die Zelldichte wurde bestimmt und dann mit Annexin-

Bindungspuffer (5x: 50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12.5 mM CaCl₂, pH 7.4 – wurde 1:5 für die Versuche verdünnt) auf $1 \cdot 10^6$ Zellen/ 100µl eingestellt.

Die Zellen wurden dann im Dunkeln mit 1.5 µl Alexa Fluor 488 Annexin V-Lösung [Vybrant™, USA] versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Bis zur Analyse im FACS-Gerät wurden die Proben auf Eis gelagert.

Zur Analyse wurden die Proben nochmals mit 300 µl Annexin-Bindungspuffer verdünnt. 100 µl dieser Lösung wurden mit 2,5 µl Propidiumiodid (Lösung: 1mg/ml in PBS) und 900 µl Puffer versetzt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

5.2.6 DNA-Fragmentierungs ELISA

(Photometrische Bestimmung von BrdU-markierten DNA-Fragmenten in Zelllysaten oder in Mediumüberständen mit Hilfe von ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) [Hoffmann-LaRoche Kit])

- Markierung der Zellen

Saos-2 Zellen ($\sim 2 \cdot 10^6$) wurden in einer Zellkulturflasche (75 cm²) ausgesät. Die Zellen wurden in 13.5 ml Medium versetzt mit 1,5 ml BrdU (1000 µM) in PBS für 18 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen (10ml) und die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst. Nach Zugabe von 6 ml Medium wurde die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt und die Zellzahl auf $1 \cdot 10^5$ Zellen für die weitere Bestimmung eingestellt.

- Verfahren zur Charakterisierung des Zelltods

Dieses Verfahren besteht aus zwei Teilen. Der erste Teil analysiert den Überstand (Medium) der Zellen, welcher DNA-Fragmente aus der frühen Phase der Nekrose und/oder von der späten Phase der Apoptosis enthält. Im zweiten Teil des Tests werden die übriggebliebenen Zellen lysiert, um die im Cytoplasma lokalisierten apoptotischen Fragmente freizusetzen.

Dazu wurden jeweils 100 µl der BrdU-makierten Zellen ($1 \cdot 10^4$) in ein well einer 96-Well Platte pipettiert. Je Probe wurden jeweils 2 Wells belegt. Dann wurden

100 µl der zu testenden Substanz in der gewünschten Konzentration in Medium zugegeben (die Kontrollen wurden nur mit 100 µl Medium + 0,5% DMSO versetzt).

Die Zellen wurden für 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert, dann bei 250xg für 10 min abzentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden abpipettiert und zur Analyse bei -20°C in einem Eppendorfggefäß aufbewahrt. Der restliche Überstand wurde vorsichtig entfernt, und die Zellen dann mit je 200 µl des Inkubationspuffers (1x) für 30 min bei RT inkubiert. Die lysierten Zellen wurden dann wieder für 10 min bei 250xg abzentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden abpipettiert und zur Analyse bei -20°C in einem Eppendorftube aufbewahrt. Dieses Verfahren wurde 7 mal nach jeder Stunde für die längeren Inkubationszeiten wiederholt, so dass insgesamt 96 Proben erhalten wurden.

Um die Gesamtmenge von BrdU, das in die DNA der Zellen eingelagert wurde, zu bestimmen wurde eine Positiv-Kontrolle benötigt. Dazu wurden 500 µl der BrdU-markierten Zellen in ein Eppendorftube überführt und bei 250xg für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgehoben und verworfen. 125 µl 0,25 M NaOH wurden zugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Dann wurden 125 µl 0,25 M HCl zugegeben und 250 µl K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH7 Puffer zugegeben. Anschließend wurde wieder für 5 min bei 11 000xg abzentrifugiert. 400 µl des Überstandes wurden in ein Eppendorfggefäß überführt und bei -20°C bis zur ELISA-Analyse aufbewahrt.

- Beschichtung der 96-Well-Platte (MTP) mit anti-DNA-Antikörper

In jedes Well der 96-Wellplatte wurden 100 µl ‚anti-DNA coating solution‘ pipettiert. Die Platte wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Beschichtungslösung abpipettiert und die Platte durch leichtes Aufklopfen auf Zellstoff getrocknet.

- Blockierung der freien unspezifischen Bindungsstellen.

Hierzu wurden die Wells mit 200 µl Inkubationspuffer für 30 min bei RT inkubiert. Die Platte wurde mit Abdeckfolie verschlossen. Danach wurde der Puffer entfernt und die Wells 3 mal mit je 250 µl Waschlösung (sol.4) gewaschen (je Waschgang 2-3 min. Inkubationszeit). Nach dem Abpipettieren

der letzten Waschlösung wurde die Platte durch leichtes Aufklopfen auf Zellstoff getrocknet.

- ELISA und photometrische Bestimmung

Jeweils 100 µl der Proben wurde in je ein Well der beschichteten Platte pipettiert. Die MTP wurde mit Abdeckfolie gut versiegelt und für 90 min bei RT inkubiert. Die Lösungen wurden dann durch umdrehen der Platte und Abklopfen auf Zellstoff entfernt. Dann wurden die Wells erneut 3 mal mit je 250 µl Waschlösung gewaschen (2-3 min pro Waschgang). Die Flüssigkeit des dritten Waschgangs wurde in den Wells gelassen und die Platte wurde für 5 min bei 500 W in einer Mikrowelle erhitzt (Becherglas mit 300 ml H₂O wurde mit erhitzt). Nach dem Abkühlen (~10 min bei -20°C) wurden 100 µl anti-BrdU-POD-Lösung (sol.6) pro Well zupipettiert. Die MTP wurde wieder abgedeckt und für weitere 90 min bei RT inkubiert. Danach wurde wie zuvor beschrieben gewaschen. Nach dem Trocknen der Platte wurden 100 µl TMS (substrate solution) zupipettiert und im Dunkeln auf einem MTP-Rüttler inkubiert (~3 min.) Blaue Farbentwicklung war zu beobachten, die durch Zugabe von 25 µl Stopplösung (0,25 M H₂SO₄) beendet wurde. Es wurde eine weitere Minute auf dem MTP-Rüttler inkubiert und anschliessend die Platte sofort im ELISA-Reader (µ-Quant) bei 450 nm vermessen. (Referenzwellenlänge:690 nm).

5.2.7 Isolation von apoptotischen DNA-Fragmenten

Material:

- Lysis Puffer: 1% NP-40 (Ipegal CA-630 von Sigma), 20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) [für 500 ml: 20 ml 0,5 M EDTA Lsg, 25 ml 1M Tris-HCl, 5 ml NP-40 – mit bidest H₂O auf 500 ml auffüllen]
- 20% SDS-Lösung [5 g SDS +20 ml bidest. H₂O]
- 10 M Ammoniumacetat Lösung [38,5 g in 50 ml bidest. H₂O]
- 1 xTBE-Puffer für Elektrophorese [5 x Puffer Stammlösung: 54 g Tris, 27,5 g Borsäure und 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 – mit bidest. H₂O auf 1 l auffüllen]

Durchführung:

Die Zellen wurden in Kulturflaschen (75 cm²) ausgesät. Nach 24 Stunden Wachstum wurden die Zellen mit den entsprechenden Testsubstanzen inkubiert. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden die Zellen trypsiniert, und mit PBS gewaschen. Die Zellpellets wurden für 1 min mit 100µl Lysis Puffer inkubiert, dann bei 1600 g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Extraction wurde noch einmal mit dem gleichen Volumen Lysis Puffer wiederholt.

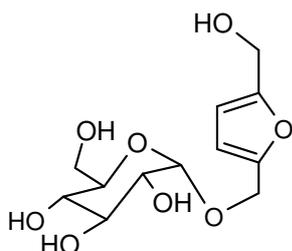
Die vereinigten Überstände (~ 200µl) wurden mit 10 µl 20% SDS versetzt (SDS End-Konzentration 1%) und dann mit 500 µl einer RNase A und RNase T Stammlösung (Endkonzentration von 5 µg/µl) versetzt. Die Lösungen wurden für 2 Stunden bei 56°C inkubiert. Dann wurden 100 µl Proteinase K (Stammlösung: 20 mg/ml) zugegeben (Endkonzentration 2.5 µg/µl) und für weitere 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

Durch die Zugabe von ½ Volumen 10 M (NH₄)OAc (400 µl) und dem 2,5-fachen Volumen an eiskaltem EtOH (3 ml) wurde die isolierte DNA gefällt. Wenn sich kein Niederschlag bildete, sondern nur eine leichte Schlierenbildung beobachtet werden konnte, wurden die Lösungen für 20 min bei –80°C gekühlt und dann für 10 min bei –5°C mit 5000 rpm zentrifugiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde dann mit 70% eiskaltem EtOH gewaschen, im Luftstrom getrocknet und anschließend mit Elektrophoresepuffer TBE (120µl) über Nacht gelöst. Die Proben wurden dann auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und bei 60 V aufgetrennt. Nach Inkubation der Gele mit Ethidiumbromid wurde das Gel in einem Transilluminator vermessen.

6 Synthesevorschriften

6.1 Synthese der Furanderivate

2-(α -D-Glucopyranosyloxymethyl)-5-hydroxymethylfuran (**31**)



Exact Mass =290
 Molecular Formula =C₁₂H₁₈O₈
 Molecular Composition =C 49.65%
 H 6.25% O 44.09%

500 mg (1,73 mmol; 1eq) 5-(α -D-Glucosyloxymethyl)furfural (α -GMF (**24**)) wurden in 30 ml Methanol gelöst und auf 0°C gekühlt. 66 mg (1,73 mmol; 1eq) wurden zugegeben und die Lösung weitere 2 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Wasser abgebrochen. Nach dem Einengen im Vakuum wurde der erhaltene Feststoff in Dichlormethan/Methanol (3:2) aufgenommen und durch Säulenchromatographie aufgereinigt.

Ausbeute: 93 % d.Th

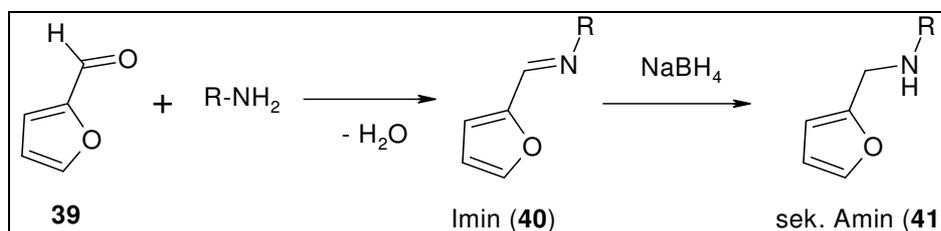
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.42 (d, 1H, J_{3,4} = 2,8 Hz; 3-H), 6.28 (d, 1H, J_{3,4} = 2,8 Hz; 4-H), 5.31-5.24 (m, 5H, 5OH), 4,83 (d, 1H, J_{1',2'} = 3,3 Hz, 1'-H), 4.63 (d, 1H, J_{gem(2-CH₂)} 12,8, 2-CH₂), 4.47 (s, 2H, 5-CH₂) 4.38 (d, 1H, J_{gem(2-CH₂)} 12,8, 2-CH₂), 3.40-3.73 (m, 4H, 3'-H, 5'-H, 6'-H₂), 3.31 (dd, 1H, J_{2',3'} = 9,4 Hz, 2'-H), 3.16 (dd, 1H, J_{3'4'} = J_{4'5'} = 9 Hz, 4'-H)

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 160.2 (C5), 151.9 (C2), 114.2 (C3), 107.5 (C4), 99.8 (C1'), 75.3, 74.9, 73.1 72.6 (C-2', C-3', C-4', C-5'), 61.3, 60.4, 56.9 (2-CH₂, 5-CH₂, C6')

ESI: M⁺ = 291 (M+H)⁺

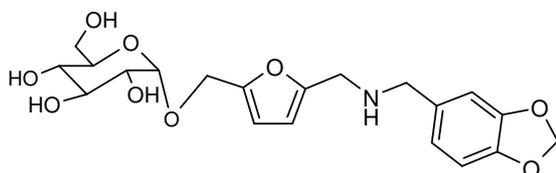
DC: Kieselgel; DCM/MeOH (3:1): R_f=0,35 ; Detektion: Seebach Reagenz

6.1.1 Allgemeine Synthesevorschrift zur Darstellung der sekundären Aminderivate



Ein Äquivalent des Aldehyds wurde in Toluol-Methanol (1:1) gelöst und mit 1,2 eq des entsprechenden Amins versetzt. Die Lösung wurde bei 80 °C am Rotationsverdampfer unter Rühren für eine halbe Stunde erhitzt, das Lösungsmittel dann im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde erneut in dem Toluol-Methanol Gemisch aufgenommen, 5 min gerührt, und erneut eingeeengt. Dieser Vorgang wurde bis zu 5 mal wiederholt (bis DC Kontrolle keinen Aldehyd mehr anzeigte). Der Rückstand wurde dann in Methanol aufgenommen, auf 0 °C gekühlt und mit 4 eq Natriumborhydrid versetzt. Nach der Umsetzung wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser gequenchet, und entweder durch Extraktion mit Essigsäureethylester aufgereinigt, oder sofort unter Vakuum eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie oder HPLC aufgereinigt.

5-((3,4 -Methylenedioxybenzylamino)-methyl)-2yl-(α -D-Glucopyranosyl)furan (42)



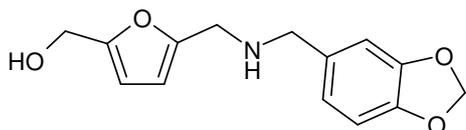
Exact Mass = 423
 Molecular Formula = C₂₀H₂₅NO₉
 Molecular Composition = C 56.73%
 H 5.95% N 3.31% O 34.01%

Ausbeute: 41 % d.Th

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.15 (m, 2H, ArH), 7.01 (d, 1H, ArH), 6.54 (d, 1H, J_{3,4} = 2,9 Hz; 3-H), 6.39 (d, 1H, J_{3,4} = 2,9 Hz; 4-H), 6.01 (s, 2H, O-CH₂-O), 5.33-5.24 (m, 5H, 5OH), 4,83 (d, 1H, J_{1',2'} = 3,4 Hz, 1'H), 4.76 (s, 2H, Benz-CH₂), 4.63 (d, 1H, J_{gem(2-CH₂)} = 12,8Hz, 2-CH₂), 4.38 (d, 1H, J_{gem(2-CH₂)} = 12,8Hz, 2-CH₂), 4.22 (d, 2H J_{gem(5-CH₂)} = 5.1 Hz, 5-CH₂), 3.40-3.73 (m, 4H, 3'-H, 5'-H, 6'-H₂), 3.31 (dd, 1H, J_{2',3'} = 9,4 Hz, 2'-H), 3.16 (dd, 1H, J_{3'4'} = J_{4'5'} = 9 Hz, 4'-H)

ESI: M⁺ = 446 (M+Na)⁺

DC: Kieselgel; DCM/MeOH (4:1): R_f=0,26 Detektion: Seebach Reagenz

5-((3,4-Methylenedioxybenzylamino)-methyl)-2-hydroxymethylfuran (43)

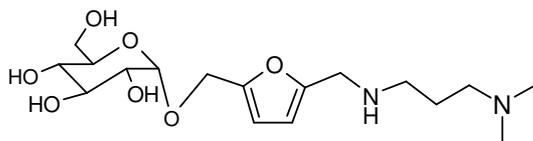
Exact Mass =261
 Molecular Formula =C₁₄H₁₅NO₄
 Molecular Composition =C 64.36%
 H 5.79% N 5.36% O 24.49%

Ausbeute: 93 % d.Th

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.81 (s, 2H, ArH), 6.73 (d, 1H, J = 3.09 Hz, ArH), 6.29 und 6.17 (je d, 1H, J= 3,09 Hz, H3, H4), 5.98 (s, 2H, O-CH₂-O), 4,65 (s, 2H, Benz-CH₂), 4.55 (s, 2H, CH₂-NH), 4.26 (s, 2H, CH₂-OH)

ESI: M⁺ = 262 (M+H)⁺

DC: Kieselgel; Chloroform:MeOH (98:2): R_f=0,19 ; Detektion: Seebach Reagenz

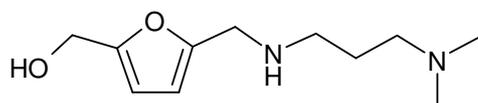
5-(1-(N,N)-(Dimethylamino)propylamino)-methyl)-2yl-(α-D-Glucopyranosyl)-furan (44)

Exact Mass =374
 Molecular Formula =C₁₇H₃₀N₂O₇
 Molecular Composition =C 54.53%
 H 8.08% N 7.48% O 29.91%

Ausbeute: 15 % d.Th

ESI: M⁺ = 375 (M+H)⁺

DC: Kieselgel; DCM/MeOH (4:1): R_f=0,35 , Detektion: Seebach Reagenz

5-(1-(N,N)- (Dimethylamino)propylamino)-methyl)-2-hydroxymethylfuran (45)

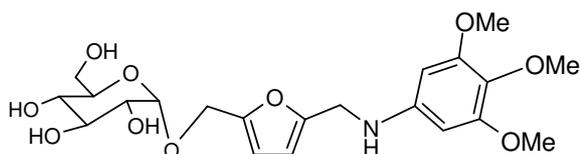
Exact Mass =212
 Molecular Formula =C₁₁H₂₀N₂O₂
 Molecular Composition =C 62.24%
 H 9.50% N 13.20% O 15.07%

Ausbeute: 19 % d.Th

ESI: M⁺ = 235 (M+Na)⁺

DC: Kieselgel; Chloroform/MeOH (98:2): R_f=0,22 , Detection: Seebach Reagenz

5-((3,4,5-Trimethoxy-phenylamino)-methyl)-2yl-(α -D-Glucopyranosyl)furan (46)



Exact Mass =455
 Molecular Formula =C₂₁H₂₉NO₁₀
 Molecular Composition =C 55.38%
 H 6.42% N 3.08% O 35.13%

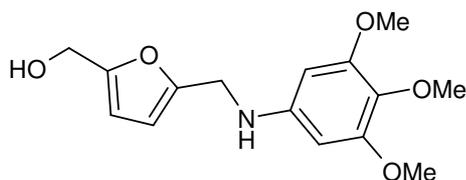
Ausbeute: 25 % d.Th.

ESI: M⁺ = 456 (M+H)⁺

DC: Kieselgel; DCM/MeOH (4:1): R_f=0,27 , Detektion: Seebach Reagenz

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ M)
 210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
 H₂O/CH₃CN (50% / 50 %) T_R = 22.4 min.

5-((3,4,5-Trimethoxy-phenylamino)-methyl)-2-hydroxymethylfuran (47)



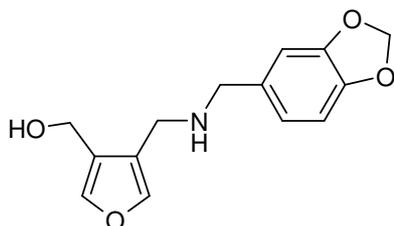
Exact Mass =293
 Molecular Formula =C₁₅H₁₉NO₅
 Molecular Composition =C 61.42% H 6.53%
 N 4.78% O 27.27%

Ausbeute: 59 % d.Th

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 6.20 (d,1H, J = 3,14 Hz), 6.17 (d,1H, J= 3,14 Hz), 4.55 (s, 2H, CH₂-NH), 4.26 (s, 2H, CH₂-OH), 3.79 (s, 6H, m-OCH₃), 3.75 (s, 3H, p-OCH₃)

ESI: M⁺ = 294 (M+H)⁺

DC: Kieselgel; Chloroform/MeOH (98:2): R_f=0,2,6; Detektion: Seebach Reagenz

5-((3,4-Metylendioxybenzylamino)-methyl)-2-hydroxymethylfuran (**48**)

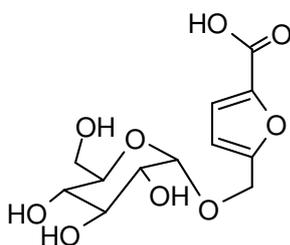
Exact Mass =261
 Molecular Formula =C₁₄H₁₅NO₄
 Molecular Composition =C 64.36%
 H 5.79% N 5.36% O 24.49%

Ausbeute: 46% d.Th

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.96 (s, 1H, H2), 6.89 (s, 1H, H3), 6.79 (s, 2H, ArH), 6.72 (d, 1H, J = 1Hz, ArH), 5.91 (s, 2H, O-CH₂-O), 4,52(s, 2H, Benz-CH₂), 4.41 (s, 2H, CH₂-NH) 4.29 (s, 2H, CH₂-OH).

ESI: M⁺ = 262 (M+H)⁺

DC: Kieselgel; Chloroform/MeOH (98:2): R_f=0,24; Detektion: Seebach Reagenz

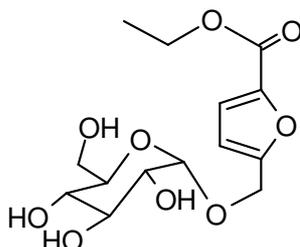
5-(α-D-Glucopyranosyloxymethyl)-2-furancarbonsäure (**49**)

Exact Mass =304
 Molecular Formula =C₁₂H₁₆O₉
 Molecular Composition =C 47.37%
 H 5.30% O 47.33%

Zu einer Lösung von 100 mg (0,34 mmol, 1eq) α-GMF (**24**) und 68 mg (0,69 mmol, 2 eq) Sulfamidsäure in 5 ml Wasser, wurde langsam ein Lösung von 32 mg (0,34 mmol, 1eq) Natriumchlorit und 30 mg Natriumhydrogenphosphat in 5 ml Wasser zugetropft. Nach 1 h rühren bei RT wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Das braune Öl wurde in einer Mischung Ethanol/Methanol (1:1) aufgenommen und über Celite filtriert. Das Rohprodukt wurde zur nächsten Umsetzung verwendet.

ESI: M⁺ = 305 (M+H)⁺

5-(α -D-Glucopyranosyloxymethyl)-2-carboxyethylfuran (50)

Exact Mass =332
 Molecular Formula =C₁₄H₂₀O₉
 Molecular Composition =C 50.60%
 H 6.07% O 43.33%

100 mg (0,33 mmol, 1 eq) 5-(α -D-Glucopyranosyloxymethyl)-2-furancarbonsäure (**49**), 200 mg (0,48 mmol, 1,3 eq) Ethanol, 10 mg p-Toloulsufonsäure und 1ml Pyridin wurden mit 50 mg Dicyclohexylcarbodiimid versetzt und die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur 12 h gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung filtriert, und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene braune Sirup wurde in Dichlormethan/Methanol (2:1) aufgenommen und auf Kieselgel absorbiert. Das Gemisch wurde dann mit Hilfe von Säulenchromatographie aufgereinigt:

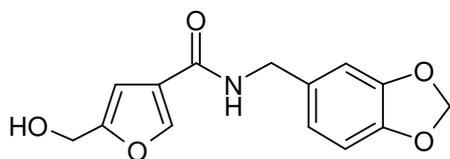
Ausbeute: 2,6%

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.21 (d, 1H, J_{3,4} = 3,0 Hz; 3-H), 6.89 (d, 1H, J_{3,4} = 3,0 Hz; 4-H), 4.83 (d, 1H, J_{1',2'} = 3,3 Hz, 1'-H), 4.73 (d, 1H, J_{gem(2-CH₂)} 12,8, 2-CH₂), 4.44 (q, 2H, Et-CH₂) 4.38 (d, 1H, J_{gem(5-CH₂)} 12,8, 5-CH₂), 3.56-3.80 (m, 4H, 3'-H, 5'-H, 6'-H₂) 3.48 (dd, 1H, J_{2',3'} = 9,6 Hz, 2'-H), 3.26 (dd, 1H, J_{3',4'} = J_{4',5'} = 9.4 Hz, 4'-H), 1.39 (t, 3H, Et-CH₃)

ESI: M⁺ = 355 (M+Na)⁺

6.1.2 Allgemeine Synthesevorschrift der Furanamidderivate

Im Allgemeinen wurde 4-Carboxy-2-hydroxymethylfuran (1 eq), in wasserfreiem THF gelöst und mit HOBt (1eq), DIEA (0.8eq) und 1eq des Amines versetzt. Die Lösung wurde auf 0°C gekühlt und anschließend mit 2 eq Diisopropylcarbodiimid versetzt. Die Reaktion wurde für 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Ethylacetat wurde zugegeben, und die organische Phase wurde dann mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, 20% Zitronensäurelösung und abschließend mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde die organische Phase im Vakuum eingedampft, und das Rohprodukt auf Kieselgel aufgereinigt.

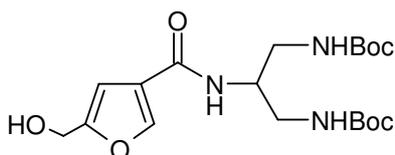
5-Hydroxymethyl-furan-3-carboxylsäure (3',4'-methylenedioxybenzyl)-amid (53)

Exact Mass = 275
 Molecular Formula = C₁₄H₁₃NO₅
 Molecular Composition = C 61.09%
 H 4.76% N 5.09% O 29.06%

Ausbeute: 80% d.Th.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.86(s, 1H, H2), 6.77 (m, 3H, ArH), 6.65 (s, 1H, H4) 5.95 (s, 2H, O-CH₂-O), 4.55 (d, 2H, CH₂-NH), 4.26 (s, 2H, CH₂-OH), 0.96 (broad s, 1H, NH)

ESI: M⁺ = 276 (M+H)⁺

5-Hydroxymethyl-furan-3-carboxylsäure-(1',3'-N,N-bis(t-boc)2-amino-1',3'-diamino-propan)-amid (55)

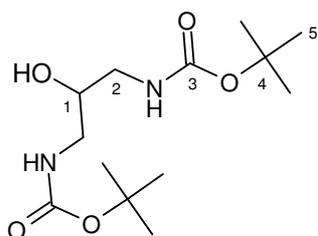
Exact Mass = 413
 Molecular Formula = C₁₉H₃₁N₃O₇
 Molecular Composition = C 55.19%
 H 7.56% N 10.16% O 27.09%

Ausbeute: 62% d.Th.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.86(s, 1H), 6.65 (s, 1H) 4.26 (s, 2H, CH₂-OH), 3.24 (m, 4H, 2-CH₂), 3.11 (m, 1H, 1-CH), 1.39 (s, 18H, 6 x 5'-CH₃)

ESI.: M⁺ = 436 (M+Na)⁺

- Synthese von 2-Amino-1,3-bis-(tert-butoxycarbonyl)diaminopropan (**54**) ausgehend von 2-Hydroxy-1,3-diaminopropan (Ramalingam, et al., 1995)

2-Hydroxy-1,3-bis-(tert-butoxycarbonyl)diaminopropan

Exact Mass = 290
 Molecular Formula = C₁₃H₂₆N₂O₅
 Molecular Composition = C 53.78%
 H 9.03% N 9.65% O 27.55%

1 g (11,1mmol; 1 eq) 2-Hydroxy-1,3-diaminopropan wurden in 150 ml Wasser gelöst und auf 0°C gekühlt. 5,33 (24,4 mmol; 2,2 eq) Boc₂O und 50 ml Aceton

wurden der Reaktionsmischung zugegeben, 2 min gerührt und dann portionsweise mit 2,9 g (27.7 mmol; 2,5 eq) Natriumcarbonat versetzt. Nach 1 ½ Stunden bildete sich ein weißer Niederschlag. Die Reaktion wurde Übernacht gerührt (dabei langsames Aufwärmen auf Raumtemperatur), anschließend mit weiteren 50 ml Wasser versetzt und mit Essigester ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt und 3.15 g weißes Pulver erhalten.

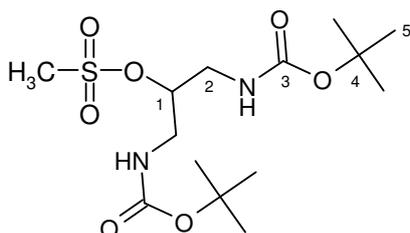
Ausbeute: 97 % d.Th.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4,8 (broad s, 1H, OH), 3.14 (m, 4H, 2- CH_2), 2.89 (m, 1H, 1-CH), 1.44 (s, 18H, 6 x CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 158.12 (3-C), 80.10 (4-C), 54.73 (1-C), 42.96 (2-C), 27.62 (5-C)

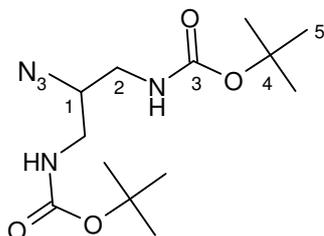
ESI: $\text{M}^+ = 291 (\text{M}+\text{H})^+$

2-Methansulfonsäure-1,3-bis(tert-butoxycarbonyl)diaminopropan



Exact Mass = 368
Molecular Formula = $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$
Molecular Composition = C 45.64%
H 7.66% N 7.60% O 30.40% S 8.70%

3 g (10,3 mmol; 1 eq) 2-Hydroxy-1,3-bis-(tert-butoxycarbonyl)diaminopropan wurden in 40 ml trockenem Dichlormethan unter Stickstoff gelöst. 2,15 ml (15,6 mmol; 1.5 eq) Triethylamin wurden zugetropft und die Lösung auf 0 °C gekühlt. 1 ml (12,4 mmol; 1,2 eq) Methylsulfonylchlorid wurde langsam zugetropft und die Reaktion für weitere 16 Stunden unter Stickstoff gerührt. Die Reaktionsmischung wurde dann durch Zugabe von 20 ml Wasser gequench, die organische Phase zweimal mit Wasser/Gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und dann über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Einengen im Vakuum wurden 3,4 g (89% d.Th.) gelbliches Rohprodukt erhalten, dass sofort weiter umgesetzt wurde

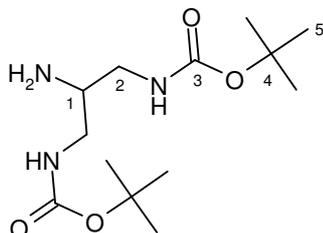
2-Azido-1,3-bis(tert-butoxycarbonyl)diaminopropan

Exact Mass =315
 Molecular Formula =C₁₃H₂₅N₅O₄
 Molecular Composition =C 49.51%
 H 7.99% N 22.21% O 20.29%

3,4g (9,24 mmol; 1 eq) 2-Methansulfonsäure-1,3-bis(tert-butoxycarbonyl)diaminopropan wurden in 50 ml trockenem DMF gelöst, mit 2,4 g (36,9 mmol; 4 eq) Natriumazid versetzt und für 48 Stunden bei 80°C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde dann auf 40 ml eiskaltes Wasser geschüttet. Nach 5 Stunden bildeten sich feine weisse Nadeln, die am nächsten Tag abfiltriert wurden.

Ausbeute: 2,8 g (96 % d.Th.)

M⁺ = 316 (M+H⁺)

2-Amino-1,3-bis-(tert-butoxycarbonyl)diaminopropan

Exact Mass =289
 Molecular Formula =C₁₃H₂₇N₃O₄
 Molecular Composition =C 53.96% H 9.40%
 N 14.52% O 22.12%

2,8 g (9,1mmol) 2-Azido-1,3-bis(tert-butoxycarbonyl)diaminopropan wurden in 20 ml Methanol gelöst und mit einer Spatelspitze Palladium auf Kohlenstoff (10%) versetzt. Die Mischung wurde über Nacht hydriert, abfiltriert und im Vakuum eingedunstet. Das erhaltene gelbe Öl wurde auf Kieselgel (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol : 95/5) aufgereinigt.

Ausbeute nach Aufreinigung: 1,9 g (72 % d.Th.) weisses Pulver

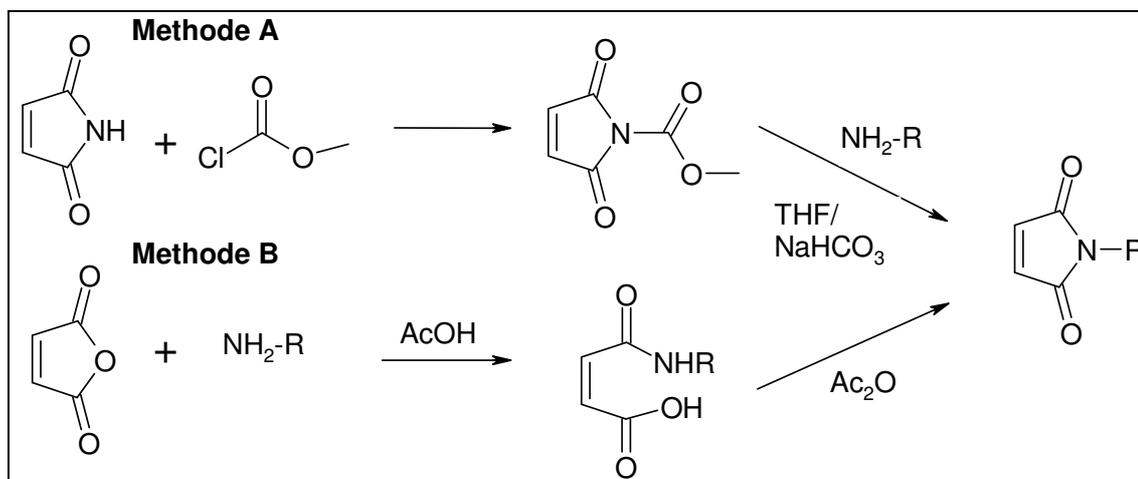
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.29 (broad s, 2H, NH₂), 3.08 (m, 4H, 2-CH₂), 2.92 (m, 1H, 1-CH), 1.44 (s, 18H, 6 x CH₃)

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 156.68 (3-C), 79.30 (4-C), 51.28 (1-C), 43.87 (2-C), 28.33 (5-C)

ESI: M⁺=290 (M+H⁺)

DC: R_f: 0,3 (DCM/MeOH: 95/5) – breite Bande ! Detektion: 4-Aminobenzaldehyd

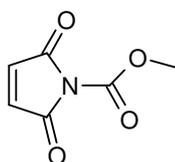
6.2 Darstellung der Maleinimide



Die synthetisierten Maleinimide wurden entweder über das N-methoxycarbonylmaleinimid dargestellt (Methode A), oder durch die Umsetzung von Maleinisäureanhydrid mit dem entsprechenden Amin (Methode B).

Methode A:

N-Methoxycarbonylmaleinimid (57) (NMM):



Exact Mass = 155
 Molecular Formula = $C_6H_5NO_4$
 Molecular Composition = C 46.46% H 3.25%
 N 9.03% O 41.26%

5g (51 mmol; 1 eq) Maleinimid und 5,7 ml (51 mmol, 1 eq) N-Methylmorpholin wurden in 150 ml EtOAc gelöst und auf 0°C gekühlt. 3.9 ml (51 mmol, 1 eq) Methylchloroformat wurden langsam zugetropft. Nach 30 min. wurde der leicht rosa Niederschlag abfiltriert und mit EtOAc gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen (2x 200 ml), über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum auf ein Viertel des Ausgangsvolumens eingeeengt. Die rosa Lösung wurde langsam tropfenweise mit Isopropanol versetzt, bis eine leichte Trübung der Flüssigkeit beobachtet werden konnte, und dann unter Kühlung zur Auskristallisation gebracht. Die erhaltenen leicht rosa Kristalle wurden direkt zur weiteren Umsetzung verwendet.

Ausbeute: 3.1 g (41 % d.Th)

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 6.89 (s, 2H, CH=CH), 3.97 (s, 3H, CH_3)

^{13}C -NMR (63 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 165.5 (C=O), 147.9 (C=O), 135.2 (CH=CH), 54.0 (CH_3)

ESI: $\text{M}^+ = 178 (\text{M} + \text{Na})^+$

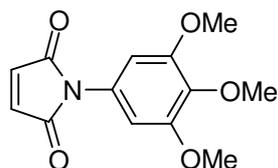
HPLC: Thermo Hypersil-Keystone[®] Bds Hypersil C18 (5 μM), 250*4,6
210 nm; 1ml/min; 5mM Tetrabutylammonium Phosphat pH 7,4 / CH_3CN
(90% / 10%) $T_R = 8,18$ min

6.2.1 Allgemeine Darstellungsvorschrift für Maleinimide mit NMM:

1 eq. des Amins wurden in gesättigter Natriumhydrogencarbonat-THF (1:1) Lösung suspendiert und auf 0 ° C gekühlt. 2,4 eq N-Methoxycarbonyl Maleinimid wurden portionsweise zugegeben (Farbumschlag zu gelb). Die Suspension wurde weitere 3-4 Stunden gerührt (bis komplette Umsetzung durch DC-Analyse festgestellt werden konnte). Die Reaktionsmischung wurde dann mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dann mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingeeengt. Die so erhaltenen Maleinimide wurden entweder mittels Säulenchromatographie oder auf der HPLC aufgereinigt.

Methode B:

Eine Lösung aus Maleinsäureanhydrid (1 eq) und des entsprechenden Amins (1 eq). wurden in Eisessig gelöst und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt und mehrmals mit H_2O gewaschen. Nach dem Trocknen im Exikator (über CaCl_2) wurde der Niederschlag mit Acetanhydrid verestert, eine Spatelspitze Natriumacetat zugegeben und die Reaktionslösung für 2 ½ Stunden bei 90 ° gerührt. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktion mit H_2O gequench, mit EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Das nach dem Einengen erhaltene Produkt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.

N-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)-maleinimid (61)

Exact Mass =263
Molecular Formula =C₁₃H₁₃NO₅
Molecular Composition =C 59.31% H 4.98%
N 5.32% O 30.39%

Darstellungsmethode A

Ausbeute: 93 % d.Th

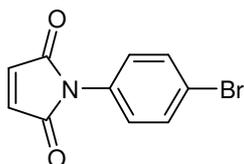
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 6.85 (s, 2H, ArH), 6.54 (s, 2H, H-3, H-4), 3.86 (s, 9H, 3 x OCH₃)

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 196.5 (C=O), 153.4 (ortho-C-OCH₃), 137.9 (para-C-OCH₃), 134.2 (CH=CH), 126.6 (ArC), 112.7 (ArC), 60.9 (OCH₃), 56.2 (OCH₃).

ESI: M⁺ = 264 (M+H)⁺

DC: Kieselgel; EtOAc/n-Hex (1:4): R_f=0,22 , Detektion: Seebach Reagenz

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5μm)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 18.34 min

N-(4-Bromophenyl)-maleinimid (62)

Exact Mass =252
Molecular Formula =C₁₀H₆BrNO₂
Molecular Composition =C 47.65% H 2.40%
Br 31.70% N 5.56% O 12.69%

Darstellungsmethode A

Ausbeute: 76 % d.Th.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.59 (d, 2H, J=9Hz, ArH), 7.26 (d, 2H, J=9Hz, ArH), 6.84 (s, 2H, CH=CH)

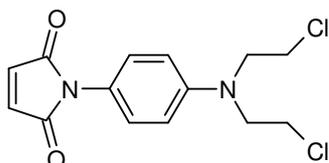
¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 168.9 (C=O) , 134.1 (CH=CH), 132.1 (ArC), 130.2 (ArC), 127.3 (ArC), 121.4 (ArC)

ESI: M⁺ = 253 (M+H)⁺

DC: Kieselgel; EtOAc/n-Hex (1:3): $R_f=0,26$, Detektion: Seebach Reagenz

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ m)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) $T_R = 24.3$ min

N-(4-(Bis-(2-chloro-ethyl)-amino)-phenyl)-maleinimid (63)



Exact Mass =312
Molecular Formula =C₁₄H₁₄Cl₂N₂O₂
Molecular Composition =C 53.69% H 4.51% Cl 22.64%
N 8.94% O 10.22%

Darstellungsmethode A

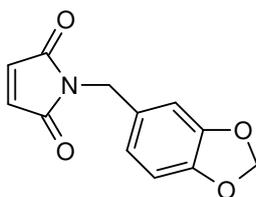
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.17 (d, 2H, J= 9.2 Hz, 2x ArH), 6.80 (s, 2H, CH=CH), 6.73 (d, 2H, J= 9.2 Hz, 2x ArH), 3.59-3.77 (m, 8H, 4x CH₂)

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 169.91 (C=O), 145.86 (ArC-N(CH₂)₂), 134.1 (CH=CH), 127.8 (ArC), 120.9 (ArC), 112.2 (ArC), 53.5 (CH₂-Cl), 40.2 (CH₂).

ESI: war nicht möglich

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ m)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) $T_R = 28.51$ min

N-(3,4-Methylenedioxybenzyl)-maleinimid (64)



Exact Mass =231
Molecular Formula =C₁₂H₉NO₄
Molecular Composition =C 62.34% H 3.92%
N 6.06% O 27.68%

Darstellungsmethode A:

Ausbeute: 69 % d.Th.

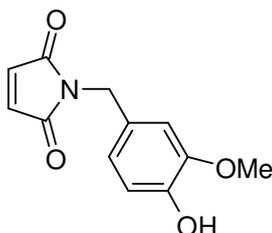
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.82 (m,2H, ArH) 6.71 (d, 1H, ArH), 6.68 (s,2H, CH=CH), 5.91 (s,2H, O-CH₂-O), 4.56 (s, 2H, N-CH₂)

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.3 (C=O), 147.7 (ArC), 147.2 (ArC), 134.0 (CH=CH), 129.9 (ArC) , 121.9 (ArC), 108.9 (ArC), 108.2 (ArC), 101.0 (O-CH₂-O), 41.1 (CH₂)

ESI: $M^+ = 232 (M + H)^+$

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ m)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 21,9 min

N-(4-Hydroxy-3-methoxybenzyl)-maleinimid (65)



Exact Mass =233
Molecular Formula =C₁₂H₁₁NO₄
Molecular Composition =C 61.80% H 4.75%
N 6.01% O 27.44%

Darstellungsmethode B

Ausbeute: 49% d.Th.

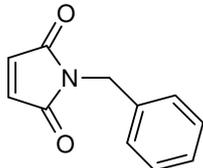
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.9 (s, 1H, ArH), 6.8 (m, 2H, ArH), 6.8 (s, 2H, CH=CH), 5.6 (s, 1H, OH), 4.6 (s, 2H, CH₂), 3.8 (s, 3H, OCH₃)

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.4 (C=O), 146.4 (C-OCH₃), 145.3 (C-OH), 134.2 (CH=CH), 128.2 (ArC), 121.8 (ArC), 114.4 (ArC), 112.8 (ArC), 111.4 (ArC), 55.94 (OCH₃), 41.4 (CH₂)

ESI: $M^+ = 256 (M+Na)^+$

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ m)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 18,1 min

N-Benzylmaleinimid (66)



Exact Mass =187
Molecular Formula =C₁₁H₉NO₂
Molecular Composition =C 70.58% H 4.85%
N 7.48% O 17.09%

Darstellungsmethode B

Ausbeute: 59% d.Th.

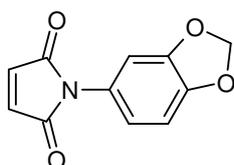
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.28 (m, 5H, ArH), 6.65 (s, 2H, CH=CH), 4.64 (s, 2H, N-CH₂)

^{13}C -NMR (63 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.2 (C=O), 136.1 (ArC), 134.0 (CH=CH), 128.5 (ArC), 128.2 (ArC), 127.7 (ArC), 41.2 (CH_2)

ESI: $\text{M}^+ = 210$ ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μm)
210 nm; 1ml/min; Gradient: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (100% / 0%) in 40 min. auf
 $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (0% / 100 %) $T_{\text{R}} = 22,29$ min

N-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-maleinimid (67)



Exact Mass =217
Molecular Formula = $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{NO}_4$
Molecular Composition =C 60.83% H 3.25%
N 6.45% O 29.47%

Darstellungsmethode B

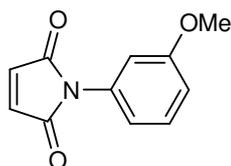
Ausbeute: 72% d.Th.

^1H -NMR (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.26 (m, 1H, ArH), 6.92 (m,2H, ArH), 6.81 (s,2H, CH=CH) 5.96 (s,2H, O- CH_2 -O)

^{13}C -NMR (63 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 168.1 (C=O), 149.7 (ArC), 147.90 (ArC), 135.2 (CH=CH), 128.1 (ArC), 122.3 (ArC), 109.0 (ArC), 108.3 (ArC), 101.0 (O- CH_2 -O)

ESI: $\text{M}^+ = 218$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μm)
210 nm; 1ml/min; Gradient: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (100% / 0%) in 40 min. auf
 $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (0% / 100 %) $T_{\text{R}} = 18,83$ min

N-(3-methoxyphenyl)-maleinimid (68)

Exact Mass =203
Molecular Formula =C₁₁H₉NO₃
Molecular Composition =C 65.02% H 4.46%
N 6.89% O 23.62%

Darstellungsmethode B

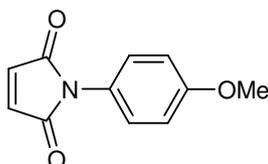
Ausbeute: 79 % d.Th.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.35 (m, 1H, ArH), 6.90 (m, 3H, ArH), 6.81 (s, 2H, CH=CH), 3.80 (s, 3H, OCH₃)

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 169.3 (C=O), 160.1 (C-OCH₃), 134.1 (CH=CH), 129.7(ArC), 123.7 (ArC), 118.2 (ArC), 114.5 (ArC), 113.7 (ArC), 55.3 (OCH₃)

ESI: M⁺= 226 (M+Na)⁺

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5μm)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 18,66 min

N-(4-Methoxyphenyl)-maleinimid (69)

Exact Mass =203
Molecular Formula =C₁₁H₉NO₃
Molecular Composition =C 65.02% H 4.46%
N 6.89% O 23.62%

Darstellungsmethode B

Ausbeute: 72 % d.Th.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.22 (dd, 4H, ArH), 6.92 (s, 2H, CH=CH), 3.82 (s, 3H, OCH₃)

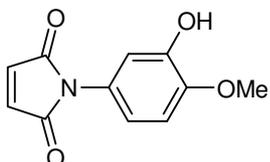
¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 169.7 (C=O), 159.1 (C-OCH₃), 134.1 (CH=CH), 127.5 (ArH), 123.7 (ArC), 114.5 (ArC), 112.5 (ArC), 112.4 (ArC), 55.94 (OCH₃)

ESI: M⁺= 226 (M+Na)⁺

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5μm)

210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 19,44 min

N-(4-methoxy-3-hydroxyphenyl)-maleinimid (70)



Exact Mass =219
Molecular Formula =C₁₁H₉NO₄
Molecular Composition =C 60.28% H 4.14%
N 6.39% O 29.20%

Darstellungsmethode B

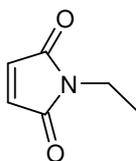
Ausbeute: 53 % d.Th.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.53 (s, 1H, ArH), 7.11 (d, 2H, 2x ArH), 6.89 (s, 2H, CH=CH), 3.81 (s, 3H, OCH₃)

ESI: M⁺ = 220 (M+H)⁺

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5μm)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
H₂O/CH₃CN (40% / 60 %) T_R = 27,85 min
Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf H₂O/CH₃CN
(0% / 100 %) T_R = 21,99

N-Ethylmaleinimid (71)



Exact Mass =125
Molecular Formula =C₆H₇NO₂
Molecular Composition =C 57.59% H 5.64%
N 11.19% O 25.57%

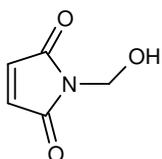
Von Aldrich

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 6.71 (s, 2H, 2x =CH), 3.58 (q, 2H, J= 7.1 Hz, CH₂), 1.41 (t, 3H, J= 7.1 Hz, CH₃)

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.4 (C=O), 133.9 (CH=CH), 32.5 (CH₂), 13.6 (CH₃)

ESI: M⁺ = 126 (M+H)⁺

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5μm)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 19.12 min

N-Ethoxymaleinimid (72)

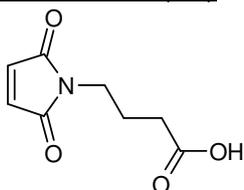
Exact Mass =127
 Molecular Formula =C₅H₅NO₃
 Molecular Composition =C 47.25% H 3.97%
 N 11.02% O 37.76%

Darstellungsmethode A

Ausbeute: 23 % d.Th.

ESI: M⁺ = 140 (M+Na)⁺

HPLC: Thermo Hypersil-Keystone[®] Bds Hypersil C18 (5μM), 250*4,6
 210 nm; 1ml/min; 5mM Tetrabutylammonium Phosphat pH 7,4 / CH₃CN
 (90% / 10%)T_R = 14,43 min

N-Maleinimido-butansäure (73)

Exact Mass =183
 Molecular Formula =C₈H₉NO₄
 Molecular Composition =C 52.46%
 H 4.95% N 7.65% O 34.94%

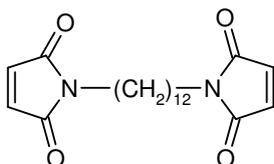
Darstellungsmethode A

Ausbeute: 22 % d. Th.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 6.71 (s, 2H, CH=CH), 3.61 (t, 2H, N-CH₂),
 2.37 (t, 2H, CH₂-COOH), 1.93 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂)

ESI: M⁺ = 206 (M+Na)⁺

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5μM)
 210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
 H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 24.3 min

Bis-maleinimido-dodecan (74)

Exact Mass =206
 Molecular Formula =C₉H₆N₂O₄
 Molecular Composition =C 52.44%
 H 2.93% N 13.59% O 31.04%

Darstellungsmethode A

Ausbeute 15 %

ESI: $M^+ = 207 (M+H)^+$

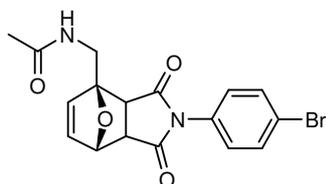
HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ M)
 210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
 H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) $T_R = 28.7$ min

6.3 Synthese der Diels-Alder Verbindungen:

6.3.1 Allgemeine Synthesevorschrift

Im Allgemeinen wurde 1 Äquivalent des Diens mit 1.2 Äquivalenten des Dienophiles in einem THF/Wasser Gemisch (3:2) gelöst und bei 50°C für 16 – 48 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung direkt mit flüssigen Stickstoff eingefroren und gefriergetrocknet. Die Aufreinigung erfolgte in der Regel mittels HPLC,

1-(N-Acetylaminomethyl-4-(4'-bromophenyl)-4-aza-3,5-dioxo-10-oxa-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en (75)



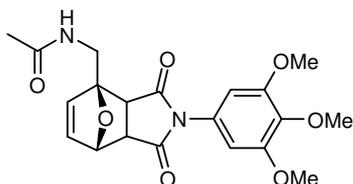
Exact Mass =391
 Molecular Formula =C₁₇H₁₅BrN₂O₄
 Molecular Composition =C 52.19% H 3.86%
 Br 20.42% N 7.16% O 16.36%

Ausbeute: 40 % d.Th

ESI: $M^+ = 414 (M+Na)^+$

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ m)
 210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (50% / 50%) in 40 min. auf
 H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) $T_R = 17.6$ min

1-(*N*-Acetylaminomethyl-4-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-4-aza-3,5-dioxo-10-oxa-tricyclo [5.2.1.0^{2,6}]*dec*-8-en (76)



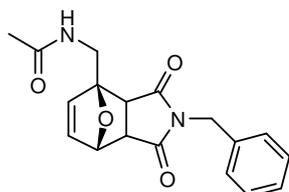
Exact Mass =402
 Molecular Formula =C₂₀H₂₂N₂O₇
 Molecular Composition =C 59.70% H 5.51%
 N 6.96% O 27.83%

Ausbeute: 52 % d.Th

ESI: M⁺ = 403 (M+H)⁺

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5μm)
 210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (50% / 50%) in 40 min. auf
 H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 15.3 min

1-(*N*-Acetylaminomethyl-4-(benzyl)-4-aza-3,5-dioxo-10-oxa-tricyclo [5.2.1.0^{2,6}]*dec*-8-en (77)



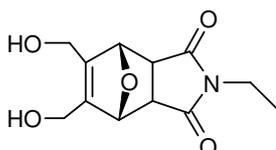
Exact Mass =326
 Molecular Formula =C₁₈H₁₈N₂O₄
 Molecular Composition =C 66.25% H 5.56%
 N 8.58% O 19.61%

Ausbeute: 56 % d.Th

ESI: M⁺ = 349 (M+Na)⁺

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5μm)
 210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (50% / 50%) in 40 min. auf
 H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 18.9 min

4-Ethyl-8,9-bis-hydroxymethyl-4-aza-3,5-dioxo-10-oxa-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]*dec*-8-en (78)



Exact Mass =253
 Molecular Formula =C₁₂H₁₅NO₅
 Molecular Composition =C 56.91% H 5.97%
 N 5.53% O 31.59%

Gesamte Ausbeute DA Produkt: 70% d.Th

Endo-Verbindung

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 5.32 (dd, 2H, $J= 3.6$ Hz) 4.36 (d, 2H, $J= 13.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 4.02 (d, 2H, $J= 13.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O}$), 3.65 (dd, 2H, $J= 3.6$ Hz) 3.39 (q, 2H, $J= 7.1$ Hz, N-CH_2), 1.03 (t, 3H, $J= 7.1$ Hz, CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 168.9 (C=O), 138.2 (CH=CH), 94.5 (C-O), 65.1 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 50.6 (CH-C=O), 34.9 (CH_2), 14.0 (CH_3)

Exo-Verbindung:

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 5.21 (s, 2H), 4.41 (d, 2H, $J= 13.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O}$) 4.28 (d, 2H, $J= 13.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-O}$) 3.91 (d, 2H, $J= 13.6$ Hz), 3.54 (q, 2H, $J= 7.1$ Hz, N-CH_2), 3.09 (s, 2H), 1.15 (t, 3H, $J= 7.1$ Hz, CH_3)

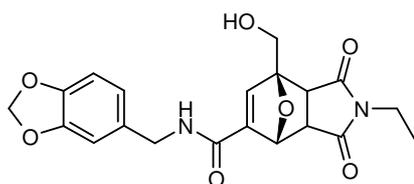
$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 177.6 (C=O), 140.0 (CH=CH), 94.6 (C-O), 62.8 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 52.3 (CH-C=O), 34.8 (CH_2), 12.7 (CH_3)

ESI: $\text{M}^+ = 276$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μm)
210 nm; 1ml/min; Gradient: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (100% / 0%) in 40 min. auf
 $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (0% / 100 %) $T_R = 8.67$ min

Präperative HPLC: LiChroCART[®] 250x25 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18(E)
(5 μm), 210 nm; 10 ml/min; Gradient: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (100% / 0%) in 100
min. auf $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (50% / 50 %) $T_R = 32.79$ min (*endo*); 37.13 min
(*exo*)

4-Ethyl-1-hydroxymethyl-3,5-dioxo-10-oxa-4-aza-tricyclo(5.2.1.0^{2,6})dec-8-en-carboxylsäure(benzo(1,3)dioxol-5-ylmethyl)-amid (79)



Exact Mass =400
Molecular Formula = $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_7$
Molecular Composition =C 60.00% H 5.03%
N 7.00% O 27.97%

Ausbeute: 74%

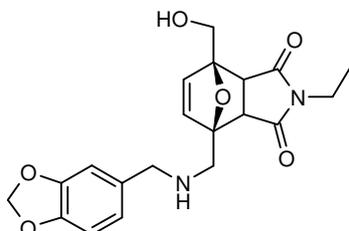
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6.86(s, 1H, CH=C), 6.77 (m, 3H, ArH), 5.95 (s, 2H, O- $\text{CH}_2\text{-O}$), 4.40 (m, 2H), 4.07 (d, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 3.56 (q, 2H, Et- CH_2), 3.25 (d, 1H, $J_{\text{gem CH}_2} = 6.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-OH}$) 3.01 (d, 1H, $J_{\text{gem CH}_2} = 6.2$ Hz, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 1.16 (t, 3H, Et- CH_3), 0.83 (broad s, 1H, NH)

ESI: $\text{M}^+ = 401$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μm)

210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (50% / 50%) in 40 min. auf H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 16.4 min

1-(((Benzo(1,3)dioxol-5-ylmethyl)-amino)-methyl)-3,5-dioxo-4-ethyl-7-hydroxymethyl-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en (80)



Exact Mass =386
Molecular Formula =C₂₀H₂₂N₂O₆
Molecular Composition =C 62.17% H 5.74%
N 7.25% O 24.84%

Ausbeute: 70% d.Th

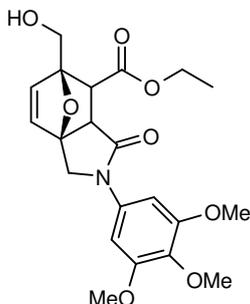
ESI: M⁺ = 409 (M+Na)⁺

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5µm)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 21.86 min

7-Hydroxymethyl-3-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-4-oxo-10-oxa-3-aza-tricyclo[5.2.1.0^{1,5}]dec-8-en-6-carboxylsäure-ethylester (81)

150 mg (1,02 mmol; 3 eq) Monoethylmaleinsäureester wurden in Dichlormethan gelöst, mit 0,08 ml (0,52 mmol, 1,5 eq) Diisopropylcarbodiimid versetzt und bei Raumtemperatur für 45 min gerührt. 100 mg (0,34 mmol, 1 eq) 5-((3,4,5-Trimethoxyphenylamino)-methyl)-2-hydroxymethylfuran (**47**), 0,1 ml DIEA und 20 mg DMAP wurden zugefügt, und die Reaktion für 36 h gerührt.

Die Reaktionsmischung wurde dann mit 50 ml Chloroform versetzt, die organische Phase anschließend mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, 10% iger HCl, und dann mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Nach dem Trocken über Natriumsulfat wurde die organische Phase im Vakuum eingengt und mittels HPLC aufgereinigt.



Exact Mass =419
Molecular Formula =C₂₁H₂₅NO₈
Molecular Composition =C 60.14% H 6.01%
N 3.34% O 30.52%

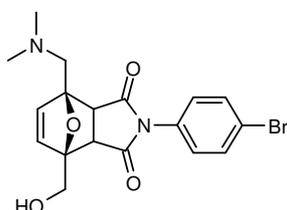
Ausbeute: 37% d.Th.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6.72 (s, 2H, ArH), 6.48 (d, 1H, $J = 3$ Hz), 6.15 (d, 1H, $J = 3$ Hz), 4.73 (d, 1H, $J_{\text{gemCH}_2\text{-NH}} = 12$ Hz; $\text{CH}_2\text{-NH}$), 4.32 (d, 1H, $J_{\text{gemCH}_2\text{-NH}} = 12$ Hz, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 4.26 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-OH}$), 4.15, (q, 2H, Et- CH_2), 3.83 (d, 1H, $J = 15$ Hz, endo/exo-H), 3.79 (s, 6H, m- OCH_3), 3.75 (s, 3H, p- OCH_3), 3.50 (d, 1H, $J = 15$ Hz, endo/exo-H) 1.27 (t, 3H, Et- CH_3)

ESI: $\text{M}^+ = 420 (\text{M}+\text{H})^+$

Präparative HPLC: Hibar Fertigsäule LiChrospher[®] 100 RP18 (5 μm) (Merck) 210nm; 15ml/min; Gradient: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (95% / 5%) in 50 min auf $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (40% / 60%) $T_r = 28.13$ min

4-(4'-Bromo-phenyl)-1-dimethylaminomethyl-7-hydroxymethyl-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-en-3,5-dion (**82**)



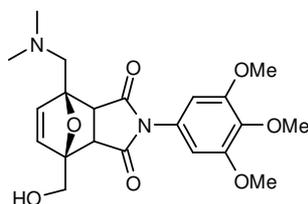
Exact Mass = 407
Molecular Formula = $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{BrN}_2\text{O}_4$
Molecular Composition = C 53.09% H 4.70%
Br 19.62% N 6.88% O 15.71%

Ausbeute: 64% d.Th.

ESI: $\text{M}^+ = 408 (\text{M}+\text{H})^+$

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μM) 210 nm; 1ml/min; Gradient: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (50% / 50%) in 40 min. auf $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (0% / 100 %) $T_R = 17.1$ min

4-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)-1-dimethylaminomethyl-7-hydroxymethyl-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-en-3,5-dion (**83**)



Exact Mass = 418
Molecular Formula = $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_7$
Molecular Composition = C 60.28% H 6.26%
N 6.69% O 26.76%

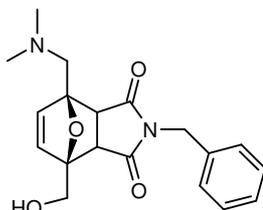
Ausbeute: 69% d.Th.

ESI: $\text{M}^+ = 419 (\text{M}+\text{H})^+$

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μM)

210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (50% /50%) in 40 min. auf H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 15.3 min

4-Benzyl-1-dimethylaminomethyl-7-hydroxymethyl-10-oxa-4-aza-tricyclo(5.2.1.02,6)-dec-en-3,5-dion (84)



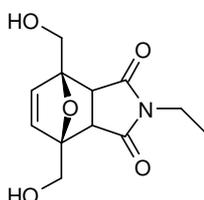
Exact Mass =342
Molecular Formula =C₁₉H₂₂N₂O₄
Molecular Composition =C 66.65% H 6.48%
N 8.18% O 18.69%

Ausbeute: 72 % d.Th.

ESI: M⁺ = 365 (M+Na)⁺

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5μM)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (50% / 50%) in 40 min. auf H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 18.1 min

4-Ethyl-1,7-bis-hydroxymethyl-10-oxa-4-aza-tricyclo(5.2.1.02,6)dec-8-en-3,5-dion (85)



Exact Mass =253
Molecular Formula =C₁₂H₁₅NO₅
Molecular Composition =C 56.91% H 5.97%
N 5.53% O 31.59%

Gesamte Ausbeute DA Produkt: 88% d.Th.

Endo-Verbindung:

¹H-NMR (250 MHz, CD₃OD) δ(ppm): 6.35 (s, 2H), 4.36 (d, 2H, J= 13.6Hz, CH₂-OH), 4.02 (d, 2H, J= 13.6 Hz, CH₂-OH), 3.54 (s, 2H), 3.35 (q, 2H, J= 7.2 Hz, N-CH₂), 1.02 (t, 3H, J= 7.2 Hz, CH₃)

¹³C-NMR (63 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 167.1 (CH=O), 137.6 (CH=CH), 93.9 (C-O), 62.1 (CH₂-O), 50.1 (CH-C=O), 34.2 (CH₃), 13.2 (CH₃)

Exo-Verbindung:

¹H-NMR (250 MHz, CD₃OD) δ(ppm): 6.58 (s, 2H), 4.16 (d, 2H, J= 12,6 Hz, CH₂-OH), 3.91 (d, 2H, J= 12.6 Hz, CH₂-OH), 3.48 (q, 2H, J= 7.1 Hz, N-CH₂), 3.07 (q, 2H, J= 5.2 Hz), 1.10 (t, 3H, J= 7.1 Hz, CH₃)

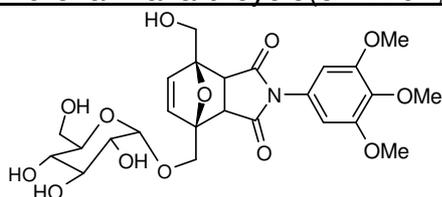
^{13}C -NMR (63 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 176.6 (C=O), 139.8 (CH=CH), 93.2 (C-O), 62.8 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 52.3 (CH-C=O), 34.7 (CH_2), 13.5 (CH_3)

ESI: $\text{M}^+ = 254 (\text{M}+\text{H})^+$

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μM)
210 nm; 1ml/min; Gradient: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (100% / 0%) in 40 min. auf
 $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (0% / 100 %) $T_{\text{R}} = 8.62$ min

Präperative HPLC: LiChroCART[®] 250x25 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18(E)
(5 μm), 210 nm; 10 ml/min; Gradient: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (100% / 0%) in 100
min. auf $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (50% / 50 %) $T_{\text{R}} = 34.33$ min (*endo*); 40.23 min
(*exo*)

4-(3',4',5'-Trimethoxyphenyl)-7-(hydroxymethyl)-1-(α -D-glucopyranosyl-oxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo(5.2.1.0^{2,6})dec-8-en-3,5-dion (**86**)



Exact Mass = 553
Molecular Formula = $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{NO}_{13}$
Molecular Composition = C 54.25%
H 5.65% N 2.53% O 37.58%

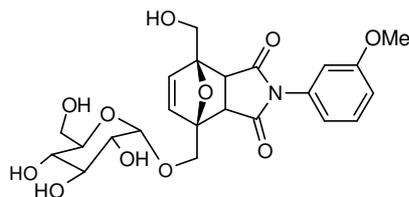
Ausbeute: 76% d.Th

ESI: $\text{M}^+ = 554 (\text{M}+\text{H})^+$

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μM)
210 nm; 1ml/min; Gradient: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (100% / 0%) in 40 min. auf
 $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (0% / 100 %) $T_{\text{R}} = 14.2$ min

Präperative HPLC: LiChroCART[®] 250x25 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18(E)
(5 μm), 210 nm; 10 ml/min; Gradient: $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (100% / 0%) in 60 min.
auf $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (50% / 50 %) $T_{\text{R}} = 34.87$ min; 37.16 min; 56.72 min;
58.17 min

4-(3'-Methoxyphenyl)-7-(hydroxymethyl)-1-(α -D-glucopyranosyloxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo(5.2.1.0^{2,6})dec-8-en-3,5-dion (**87**)



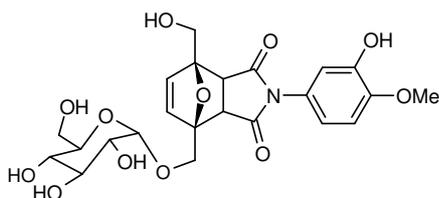
Exact Mass = 493
Molecular Formula = $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{NO}_{11}$
Molecular Composition = C 55.98%
H 5.52% N 2.84% O 35.66%

Ausbeute: 56% d.Th.

ESI: $M^+ = 516 (M+Na)^+$

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ M)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 16.3 min

4-(3'-Hydroxy-4'-methoxy-phenyl)-7-(hydroxymethyl)-1-(α -D-glucopyranosyl-oxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo(5.2.1.0^{2,6})dec-8-en-3,5-dion (**88**)



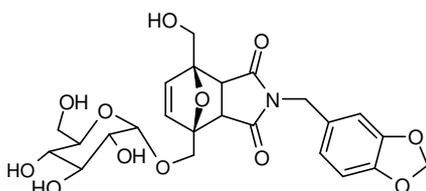
Exact Mass =509
Molecular Formula =C₂₃H₂₇NO₁₂
Molecular Composition =C 54.22% H 5.34%
N 2.75% O 37.68%

Ausbeute: 72% d.Th.

ESI: $M^+ = 510 (M+H)^+$

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ M)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 15.4 min

4-(3',4'-Methylenedioxybenzyl)-1-(hydroxymethyl)-7-(α -D-glucopyranosyloxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo(5.2.1.0^{2,6})dec-8-en-3,5-dion (**89**)



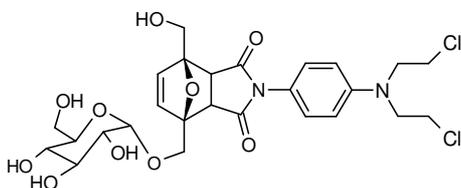
Exact Mass =521
Molecular Formula =C₂₄H₂₇NO₁₂
Molecular Composition =C 55.28% H 5.22%
N 2.69% O 36.82%

Ausbeute: 77%

ESI: $M^+ = 522 (M+H)^+$

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ M)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 14.6 min

4-(4'(Bis-(chloro-ethyl) amino)-phenyl)-7-(hydroxymethyl)-1-(α -D-glucopyranosyloxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo(5.2.1.0^{2,6})dec-8-en-3,5-dion (90)

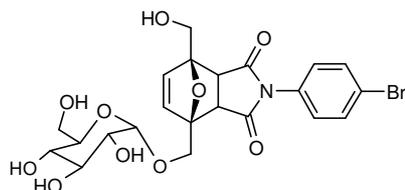


Exact Mass =602
 Molecular Formula =C₂₆H₃₂Cl₂N₂O₁₀
 Molecular Composition =C 51.75% H 5.35%
 Cl 11.75% N 4.64% O 26.51%

Ausbeute: 64% d.Th
 ESI: M⁺ = 603 (M+H)⁺

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ M)
 210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
 H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 25.7 min

4-(4'-Bromophenyl)-7-(hydroxymethyl)-1-(α -D-glucopyranosyloxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo(5.2.1.0^{2,6})dec-8-en-3,5-dion (91)



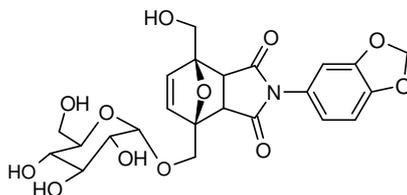
Exact Mass =542
 Molecular Formula =C₂₂H₂₄BrNO₁₀
 Molecular Composition =C 48.72% H 4.46%
 Br 14.73% N 2.58% O 29.50%

Ausbeute: 77% d.Th.

ESI: M⁺ = 565 (M+Na)⁺

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ M)
 210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
 H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 14.9 min

4-(3',4'-Methylenedioxyphenyl)-7-(hydroxymethyl)-1-(α -D-glucopyranosyloxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo(5.2.1.0^{2,6})dec-8-en-3,5-dion (92)



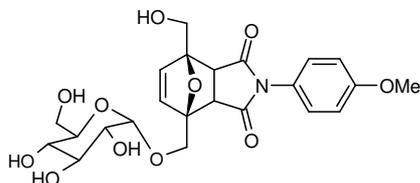
Exact Mass = 507
 Molecular Formula = C₂₃H₂₅NO₁₂
 Molecular Composition = C 54.44%
 H 4.97% N 2.76% O 37.83%

Ausbeute: 81 % d.Th.

ESI: M⁺ = 508 (M+H)⁺

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ M)
 210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
 H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 16.4 min

4-(4'-Methoxyphenyl)-7-(hydroxymethyl)-1-(α -D-glucopyranosyloxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-3,5-dion (93)



Exact Mass = 493
 Molecular Formula = C₂₃H₂₇NO₁₁
 Molecular Composition = C 55.98% H 5.52%
 N 2.84% O 35.66%

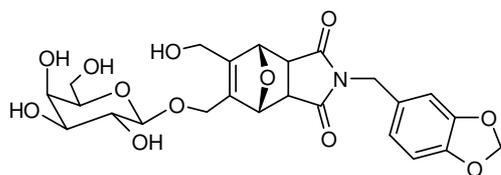
Ausbeute: 73 % d.Th.

ESI: M⁺ = 494 (M+H)⁺

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ M)
 210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
 H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 16.9 min

Präperative HPLC: LiChroCART[®] 250x25 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18(E)
 (5 μ m), 210 nm; 10 ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 60 min.
 auf H₂O/CH₃CN (50% / 50 %) T_R = 32.79 min ; 36.13 min, 54.61min;
 57.27 min

4-(3',4'-Methylenedioxybenzyl)-9-(hydroxymethyl)-8-(β-D-galactopyranosyl-oxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-3,5-dion (94)



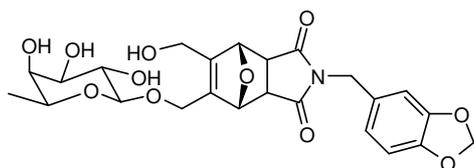
Exact Mass =521
 Molecular Formula =C₂₄H₂₇NO₁₂
 Molecular Composition =C 55.28% H 5.22%
 N 2.69% O 36.82%

Aubeute: 65% d.Th.

ESI: M⁺ = 522 (M+H)⁺

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5μM)
 210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
 H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 17.6 min

4-(3',4'-Methylenedioxybenzyl)-9-(hydroxymethyl)-8-(β-L-fucopyranosyl-oxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-3,5-dion (95)



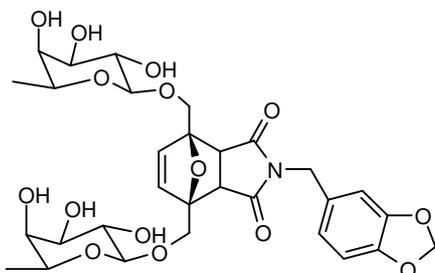
Exact Mass =505
 Molecular Formula =C₂₄H₂₇NO₁₁
 Molecular Composition =C 57.03% H 5.38%
 N 2.77% O 34.82%

Ausbeute: 74% d.Th.:

ESI: M⁺ = 528 (M+Na)⁺

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5μM)
 210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
 H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 17.9 min

4-(3',4'-methylenedioxybenzyl)-1,7-bis(β-L-fucopyranosyloxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-3,5-dion (96)



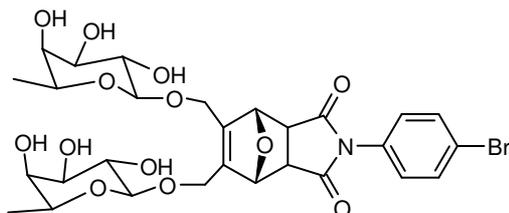
Exact Mass =651
 Molecular Formula =C₃₀H₃₇NO₁₅
 Molecular Composition =C 55.30% H 5.72%
 N 2.15% O 36.83%

Ausbeute: 49% d.Th.

ESI: $M^+ = 674 (M + Na)^+$; $1325 (2M + Na)^+$

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ M)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) $T_R = 15,7$ min

4-(4'-Bromo-phenyl)-8,9-bis-(β -L-fucopyranosyloxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-3,5-dion (**97**)



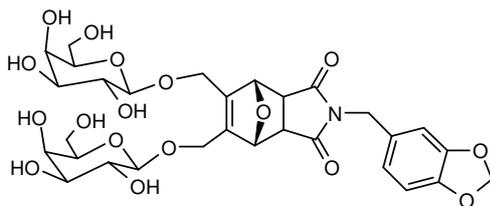
Exact Mass =672
Molecular Formula =C₂₈H₃₄BrNO₁₃
Molecular Composition =C 50.01% H 5.10%
Br 11.88% N 2.08% O 30.93%

Ausbeute: 95 % d.Th.

ESI: $M^+ = 673 (M + H)^+$; $1367 (2M+Na)^+$

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ M)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) $T_R = 15,28$ min / $16,79$ min (endo / exo : 15,6
% / 84,4 %)

4-(3'4'-methylendioxybenzyl)-8,9-bis(β -D-galactopyranosyloxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-3,5-dion (**98**)



Exact Mass =683
Molecular Formula =C₃₀H₃₇NO₁₇
Molecular Composition =C 52.71% H 5.46%
N 2.05% O 39.79%

Ausbeute: 55% d.Th.

ESI: $M^+ = 684 (M + H)^+$; $1389 (2M + Na)^+$

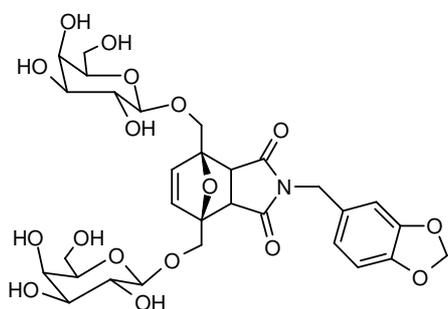
HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ M)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) $T_R = 12,6$ min

Nebenprodukt: Monogalactosid: (4-(3',4'-methylenedioxybenzyl)-8-(β -D-galactopyranosyl oxymethyl)-9-hydroymethyl-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-3,5-dion (34%))

ESI: $M^+ = 522 (M + H)^+$; $544 (M + Na)^+$

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ M)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) $T_R = 11,3$ min

4-(3',4'-methylenedioxybenzyl)-1,7-bis(β -D-galactopyranosyloxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-3,5-dion (99)



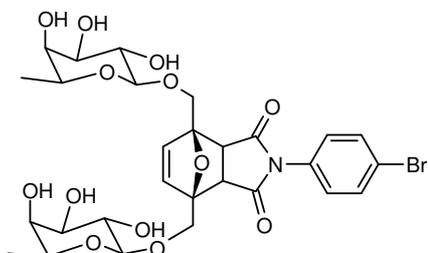
Exact Mass =683
Molecular Formula =C₃₀H₃₇NO₁₇
Molecular Composition =C 52.71% H 5.46%
N 2.05% O 39.79%

Ausbeute: 78 % d.Th.

ESI: $M^+ = 706 (M + Na)^+$; $1389 (2M+Na)^+$

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ M)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. Auf
H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) $T_R = 15,28$ min / $16,79$ min (endo / exo : 12 %
/ 88 %)

4-(4'-Bromo-phenyl)-1,7-bis-(β -L-fucopyranosyloxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-3,5-dion (100)



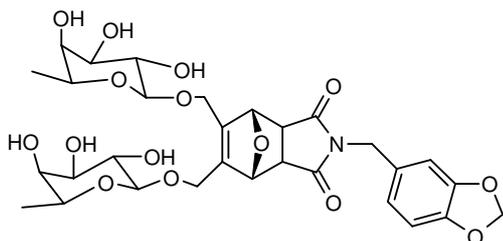
Exact Mass =672
Molecular Formula =C₂₈H₃₄BrNO₁₃
Molecular Composition =C 50.01% H 5.10%
Br 11.88% N 2.08% O 30.93%

Ausbeute: 76 % d.Th.

ESI: $M^+ = 673 (M + H)^+$, $1367 (2M + Na)^+$

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ M)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) $T_R = 16,91$

4-(3',4'-methylenedioxybenzyl)-8,9-bis(β -L-fucopyranosyloxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-3,5-dion (101)



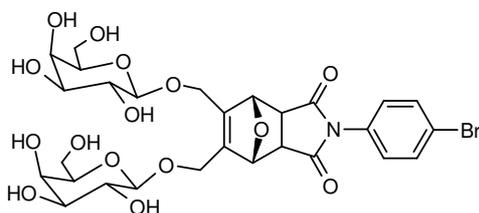
Exact Mass =651
Molecular Formula =C₃₀H₃₇NO₁₅
Molecular Composition =C 55.30% H 5.72%
N 2.15% O 36.83%

Ausbeute: 97% d.Th.

ESI: $M^+ = 674(M + Na)^+$; $1325 (2M + Na)^+$

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ M)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) $T_R = 14,04$ min / $14,37$ min (endo / exo : 44,4
% / 55,6%)

4-(4'-bromo-phenyl)-8,9-bis(β -D-galactopyranosyloxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo [5.2.1.0^{2,6}] dec-8-en-3,5-dion (102)



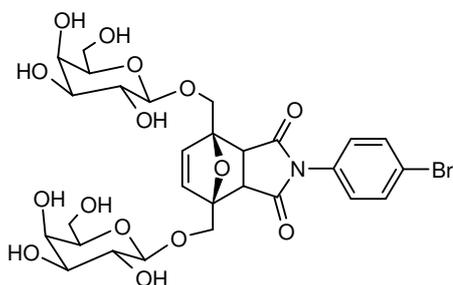
Exact Mass =704
Molecular Formula =C₂₈H₃₄BrNO₁₅
Molecular Composition =C 47.74% H 4.86%
Br 11.34% N 1.99% O 34.07%

Ausbeute: 57 % d.Th.

ESI: $M^+ = 727 (M + Na)^+$; $1431 (2M + Na)^+$

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ M)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) $T_R = 14,05$ min

4-(4'-Bromo-phenyl)-1,7-bis-(β-D-galactopyranosyloxymethyl)-10-oxa-4-azatricyclo [5.2.1.0^{2,6}] dec-8-en-3,5-dion (103)



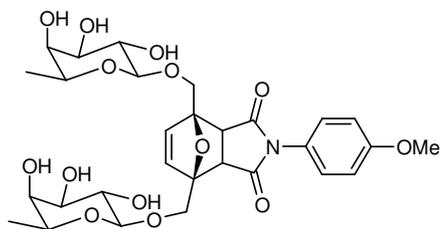
Exact Mass =704
 Molecular Formula =C₂₈H₃₄BrNO₁₅
 Molecular Composition =C 47.74% H 4.86%
 Br 11.34% N 1.99% O 34.07%

Ausbeute: 76 % D.Th.

ESI: M⁺ = 727 (M + Na)⁺

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5μM)
 210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
 H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 13,48 min / 14,04 min (endo / exo : 10,2
 % / 89,8 %)

4-(4-methoxy-phenyl)-1,7-bis-(β-L-fucopyranosyloxymethyl)-10-oxa-4-azatricyclo (5.2.1.0_{2,6}) dec-8-en-3,5-dion (104)



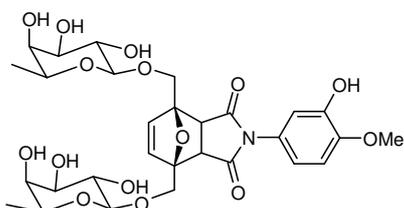
Exact Mass =623
 Molecular Formula =C₂₉H₃₇NO₁₄
 Molecular Composition =C 55.86% H 5.98%
 N 2.25% O 35.92%

Ausbeute: 69% d.Th.

ESI: M⁺ =624 (M+H)⁺

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5μM)
 210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
 H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 16.8 min

4-(3-hydroxy-4-methoxy-phenyl)-1,7-bis-(β-L-fucopyranosyloxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-3,5-dion (105)



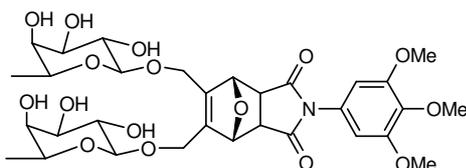
Exact Mass =639
 Molecular Formula =C₂₉H₃₇NO₁₅
 Molecular Composition =C 54.46% H 5.83%
 N 2.19% O 37.52%

Ausbeute: 66% d.Th

ESI: M⁺ = 640 (M+H)⁺; 1301 (2M+Na)⁺

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5μM)
 210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
 H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 16.1 min

4-(3',4',5'-Trimethoxyphenyl)-8,9-bis(β-L-fucopyranosyloxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-3,5-dion (106)



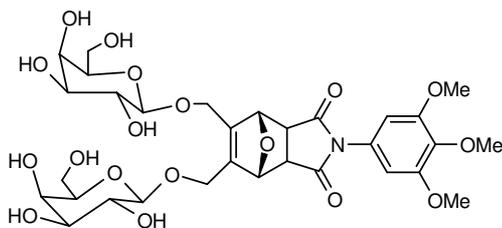
Exact Mass =683
 Molecular Formula =C₃₁H₄₁NO₁₆
 Molecular Composition =C 54.46% H 6.04%
 N 2.05% O 37.44%

Ausbeute 63% d.Th.

ESI: M⁺ = 706 (M+Na)⁺

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5μM)
 210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
 H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 16.7 min

4-(3'4'5'-Trimethoxyphenyl)-8,9-bis(β-D-galactopyranosyloxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-3,5-dion (107)



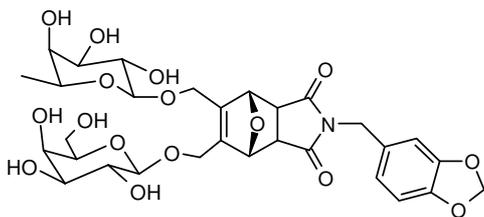
Exact Mass =715
 Molecular Formula =C₃₁H₄₁NO₁₈
 Molecular Composition =C 52.03% H 5.77%
 N 1.96% O 40.24%

Ausbeute: 84% d.Th.

ESI: $M^+ = 716 (M+H)^+$; $1453 (2M+Na)^+$

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ M)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) $T_R = 15.3$ min

4-(3'4'-Methylenedioxybenzyl)- 9-(β -L-fucopyranosyloxymethyl)-8-(β -D-galactopyranosyloxymethyl)- 10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-3,5-dion (108)



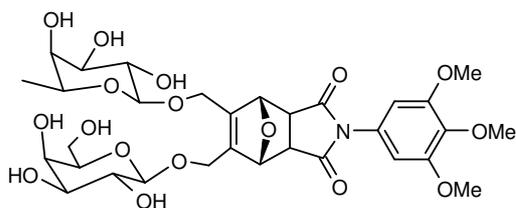
Exact Mass =667
Molecular Formula =C₃₀H₃₇NO₁₆
Molecular Composition =C 53.97% H 5.59%
N 2.10% O 38.34%

Ausbeute 68% d.Th.

ESI: $M^+ = 668 (M + H)^+$; $1359 (2M + Na)^+$

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ M)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) $T_R = 17,3$ min

4-(3'4'5'-Trimethoxyphenyl)- 9-(β -L-fuco pyranosyloxymethyl)-8-(β -D-galactopyranosyloxymethyl)- 10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-en-3,5-dion (109)



Exact Mass =699
Molecular Formula =C₃₁H₄₁NO₁₇
Molecular Composition =C 53.22% H 5.91%
N 2.00% O 38.87%

Ausbeute: 83% d.Th.

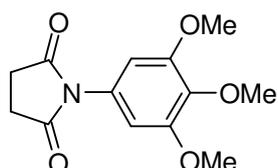
ESI: $M^+ = 700 (M+H)^+$

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ M)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) $T_R = 28.7$ min

6.4 Allgemeine Synthesebeschriftung zur Darstellung der Succinimide und hydrierten Diels-Alder Verbindungen

Die Substanzen wurden in Methanol gelöst, mit einer Spatelspitze Pd/C (10%) versetzt und unter einer Wasserstoffatmosphäre reduziert. Nach Beendigung der Reaktion (Kontrolle durch HPLC oder DC) wurde die Reaktionslösung filtriert und im Vakuum eingedunstet. Falls eine Aufreinigung benötigt wurde, erfolgte diese mittels Kieselgelchromatographie oder HPLC.

N-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)-succinimid (110)



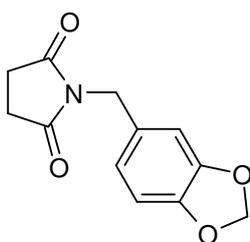
Exact Mass = 265
Molecular Formula = C₁₃H₁₅NO₅
Molecular Composition = C 58.86%
H 5.70% N 5.28% O 30.16%

Ausbeute: 88 % d.Th

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 6.76 (s, 2H, ArH), 3.86 (s, 9H, 3x OCH₃), 2,59 (s, 4H)

ESI: M⁺ = 288 (M+Na)⁺

N-(3,4-methylenedioxybenzyl)-succinimid (111)



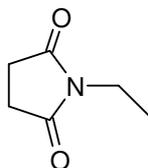
Exact Mass = 233
Molecular Formula = C₁₂H₁₁NO₄
Molecular Composition = C 61.80% H 4.75%
N 6.01% O 27.44%

Ausbeute: 69 %d.Th.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 6.87 (d, 2H, ArH), 6.72 (d, 1H, ArH), 5.92 (s, 2H, O-CH₂-O), 4.55 (s, 2H, N-CH₂), 2.69 (s, 4H, 2x -CH₂)

ESI: M⁺ = 234 (M+H)⁺

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5μM)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 16.69 min

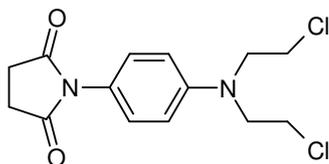
N-Ethyl-succinimid (112)

Exact Mass = 127
 Molecular Formula = C₆H₉NO₂
 Molecular Composition = C 56.68% H 7.13%
 N 11.02% O 25.17%

Ausbeute: 85% d.Th.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 4.13 (q, 2H, J= 7.2 Hz, N-CH₂), 2.69 (s, 4H, 2x -CH₂), 1.33 (t, 3H, J= 7.2 Hz, Et-CH₃)

ESI: M⁺ = 150 (M+Na)⁺

N-(4-(Bis-(2-chloro-ethyl)-amino)-phenyl)-succinimid (113)

Exact Mass = 314
 Molecular Formula = C₁₄H₁₆Cl₂N₂O₂
 Molecular Composition = C 53.35% H 5.12% Cl 22.50%
 N 8.89% O 10.15%

Ausbeute: 54 % d.Th.

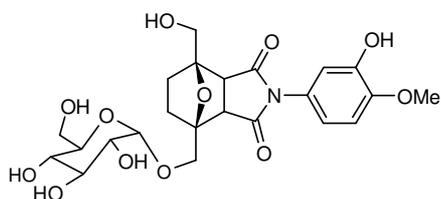
¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 7.1 (d, 2H, J= 9 Hz), 6.73 (s, 2H), 6.73 (d, 2H, J= 9 Hz), 3.74 (m, 4H), 3.64 (m, 4H), 2.86 (s, 4H)

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 176.6 (C=O), 128.2 (ArC), 127.8 (ArC), 125.4 (ArC), 112.5 (CH₂-Cl), 53.4 (CH₂-N), 40.2 (CH₂-CH₂), 28.3 (CH₂)

ESI: M⁺ = 315 (M+H)⁺

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5μM)
 210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
 H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 25,9 min

4-(3'-Hydroxy-4'-methoxy-phenyl)-1-(hydroxymethyl)-7-(α -D-glucopyranosyl-oxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]decan-3,5-dion (114)



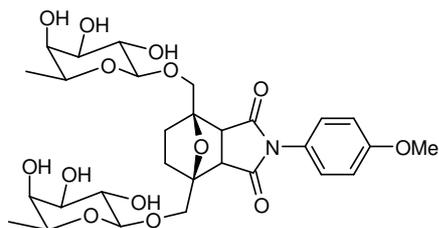
Exact Mass =511
 Molecular Formula =C₂₃H₂₉NO₁₂
 Molecular Composition =C 53.99 % H 5.72%
 N 2.69% O 37.62%

Ausbeute: 87% d.Th.

ESI: M⁺ = 512 (M+H)⁺

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ M)
 210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
 H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 16.1 min

4-(4'-Methoxyphenyl)-1,7-bis-(β -L-fucopyranosyloxymethyl)-10-oxa-4-aza-tricyclo [5.2.1.0^{2,6}] decan-3,5-dion (115)



Exact Mass =625
 Molecular Formula =C₂₉H₃₉NO₁₄
 Molecular Composition =C 55.68% H 6.28%
 N 2.24% O 35.80%

Ausbeute: 79% d.Th.

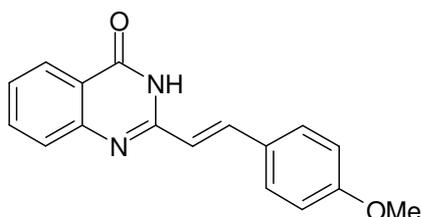
ESI: M⁺ = 626 (M+H)⁺; 1273 (2M+Na)⁺

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5 μ M)
 210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O/CH₃CN (100% / 0%) in 40 min. auf
 H₂O/CH₃CN (0% / 100 %) T_R = 28.7 min

6.5 Synthese von CP-391398

Um eine positiv-Kontrolle zur Aktivierung von mutiertem p53 zu erhalten, wurde CP-31398 synthetisiert (Jiang, *et al.*, 1990; Lee, *et al.*, 1995)

(p-Methoxy)-styrylquinazolin-(3H)-on (118)



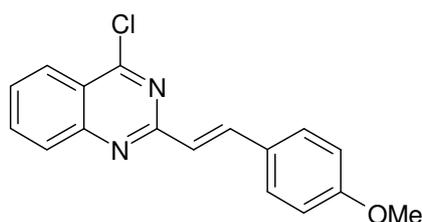
Exact Mass =278
Molecular Formula =C₁₇H₁₄N₂O₂
Molecular Composition =C 73.37%
H 5.07% N 10.07% O 11.50%

2 g 2-Methyl-(3H) chinazolinonhydrid (**116**) wurden in 10 ml Eisessig aufgenommen, 1.52 g p-Methoxabenzaldehyd (**117**) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde für 12 h unter Rückfluß gerührt. Nach dem Abkühlen wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert und mit warmen Methanol gewaschen. Es wurden 1.62 g des gewünschten Produktes erhalten (47%)

¹H-NMR (250 Mhz; DMSO-d₆) δ(ppm): 12.17 (broad s, 1H, NH); 8.09 (dd, 1H, Ar-H); 7.89 (d, 1H, J = 16.2 Hz); 7.79 (t, 1H, Ar-H); 7.67 (m, 3H, Ar-H); 7.44 (t, 1H, Ar-H); 7.01 (dd, 2H, Ar-H); 6.84 (d, 1H, J = 16.2 Hz); 3.79 (s, 3H, OCH₃)

ESI: M⁺ = 301 (M+Na⁺)

4-Chloro-2-(p-methoxy)styrylquinazolin (119)



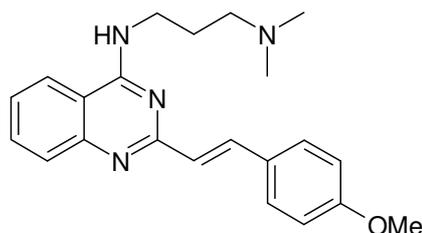
Exact Mass =296
Molecular Formula =C₁₇H₁₃ClN₂O
Molecular Composition =C 68.81%
H 4.42% Cl 11.95% N 9.44% O 5.39%

1 g (p-Methoxy)-styrylquinazolin-(3H)-on wurden 15 ml Phosphorylchlorid und 750 mg Phosphopentachlorid verestert und 30 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Die braune Lösung wurde unter Vakuum eingedunstet. Der braune Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und eingedunstet. Das Rohprodukt wurde gleich für die nächste Umsetzung weiterverwendet.

$^1\text{H-NMR}$ (250 Mhz; CDCl_3) δ (ppm): 8.19 (dd, 1H, Ar-H); 8.12 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz); 7.95 (m, 2H, Ar-H); 7.60 (m, 3H, Ar-H); 7.23 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz); 6.93 (d, 2H, Ar-H); 3.83 (s, 3H, OCH_3).

M^+ = ননট মগলিচ

4-(3-N,N-dimethylaminopropylamino)-2-(p-methoxy)styrylquinazolin (120)



Exact Mass = 362
Molecular Formula = $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}$
Molecular Composition = C 72.90%
H 7.23% N 15.46% O 4.41%

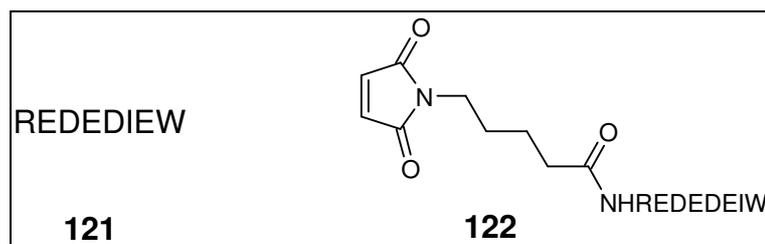
ডাস এহালতেনে রোহপ্রডুকট বন 4-ক্লোরো-2-(p-মথোক্সি)স্টাইরিলকুইনাজোলিন বুরে ইন 20 ml এসসিগেস্টার গেলট এবং মিত 2 ml 1-ডিমথাইলমিনোপ্রপাইল-3-অমিন বেসেট। ডি মিশুরং বুরে ফর 29 h উনট রুকফ্লুব গেরুহট। ডি সাসপেনসিওন বুরে ন্যচ ডেম অকুহলেন অফিলট্রিট এবং ইংগেংট। ডের রুকস্টান্ড বুরে ইন ক্লোরোফর্ম অফগেনমমেন এবং মিত গেসাত্তিগটর NaCl -লোসং গেসাশেন। ডি অর্গানিকেসে ফেসে বুরে উবের ন্যট্রিয়ামসালফেট গেরট্রোকনেট, অফিলট্রিট এবং ইংগেংট।

ডাস রোহপ্রডুকট বুরে অফ কিসেলগেল অফগেরিংট ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 7/2$).

আসবেউটে 530 mg (41 % অগেহেন্ড বন 1g 4-ক্লোরো-2-(p-মথোক্সি)-স্টাইরিলকুইনাজোলিন বেরেচনেট)

$^1\text{H-NMR}$ (250 Mhz; CDCl_3) δ (ppm): 8.50-8.47 (broad s, 1H, NH); 7.98 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz); 7.79 (d, 1H, Ar-H); 7.58 (m, 4H, Ar-H); 7.29 (d, 1H, Ar-H); 7.12 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz); 6.88 (d, 2H, Ar-H); 3.8 (m, 2H, N-CH_2); 3.76 (s, 3H, OCH_3); 2.51 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$); 2.30 (s, 6H, N-CH_3); 1.83 (m, 2H, $\text{-CH}_2\text{-}$).

6.6 Festphasensynthese des Peptides REDEDIEW-NH₂ (121) und des korrespondierenden N-hexylsäure Maleinimides (122)



Die Aminosäuresequenz wurde durch folgende Standardmethode dargestellt:
Das Harz (hier Wang-resin von Novabiochem mit bereits angekoppelten Fmoc-Trp(Boc)) wurde in DCM für 2 Stunden gequollen. Anschließend wurde intensiv mit DMF gewaschen, 1 min mit einer DMF-Piperidin (1:1) Lösung geschüttelt, die Lösung verworfen und erneut 5 min mit DMF-Piperidin (1:1) geschüttelt, so dass das restliche Fmoc abgespalten wurde. Anschliessend wurde das Harz intensiv mit DMF gewaschen. Die anzukoppelnde Aminosäure (1eq) wurde in einer Lösung von 4 eq HBTU in DMF aufgenommen und mit 1 eq DIPEA versetzt. Die gelbliche Lösung wurde zum Resin gegeben und 15 min unter Schütteln zu Reaktion gebracht. Das Harz wurde dann wieder mit DMF gewaschen, und wieder unter Abtrennung der Fmoc-Schutzgruppe zur Kopplung mit der nächsten Aminosäure vorbereitet.

Bei der Darstellung des Maleinimid-derivates, wurde am Harz noch N-Hexylsäure Maleinimid als letzte Säure unter den Bedingungen angekoppelt

Hier eingestetzte Aminosäuren in der Kopplungssequenz:

Harz-Fmoc-Trp(Boc), Fmoc-Glu(OtBu), Fmoc-Ile, Fmoc-Asp(OtBu), Fmoc-Glu(OtBu), Fmoc-Asp(OtBu), Fmoc-Glu(OtBu), Fmoc-Arg(Pbf)

Schutzgruppen - und Harz-Aspaltung:

Das Harz wurde 45 min mit einer Lösung TFA/ H₂O/TIS (95:2,5:2,5) geschüttelt und anschließend abfiltriert. Das Filtrat wurde mit Diethylether versetzt, um das Rohprodukt des Peptides auszufällen. Das Peptid wurde dann mittels HPLC aufgereinigt.

(121) :

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5µM)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O(+0.1%TFA) /CH₃CN (+0,1%TFA) (95% / 5%) in 30 min. auf H₂O(+0,1% TFA) /CH₃CN (+0,1% TFA) (5% / 95 %)
T_R = 12.09 min

ESI: M⁺ = 1220 (M+H)⁺

(122):

HPLC: LiChroCART[®] 250-4 Merck; LiChrospher[®] 100, RP-18 (5µM)
210 nm; 1ml/min; Gradient: H₂O(+0.1%TFA) /CH₃CN (+0,1%TFA) (95% / 5%) in 30 min. auf H₂O(+0,1% TFA) /CH₃CN (+0,1% TFA) (5% / 95 %)
T_R = 12.12 min

ESI: M⁺ = 1413 (M+H)⁺

7 Literatur

Ajay, Walters W.P., Murcko M.A., (1998), *Journal of Medicinal Chemistry*, **41**, 3314-3324

Alberts B., Bray D., Lewis J., (1995), *Molekular Biologie der Zelle*, Wiley/VCH-Verlag, Weinheim

Asch A.S., et al., (1987), *Journal of Clin. Investigation*, **79**,1054-1061

Babine R.E., Bender S.L., (1997), *Chemical Reviews*, **97**, 1359-1472

Baldwin S.A., (1993), *Biochimica et Biophysica Acta* **1154**, 17-49

Benett M., McDonald K., Chan S.W., Luzio P., Simari R., Weissberg P., (1998), *Science*, **282**, 290-293

Bergström C.A., Strafford M., Lazorova L., Avdeef A., Luthman K., Artursson P., *Journal of Medicinal Chemistry*, **46**, 558-570

Bernacki R.J., Niedbala M.J., Korytnyk W., (1985), *Cancer Metastasis Reviews*, **4**, 81-102

Bleicher K.H. Böhm H.J., Müller K., Alanine A., (2003), *Nature Reviews Drug Discovery*, **2**, 369-378

Böhm H.J., Klebe G., Kubinyi H., (1996), *Wirkstoffdesign*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Brock N., Pohl J., (2000), *Arzneimittelforschung / Drug-Research*, **50**, 947-53

Bullock A.N., Ferscht A.R., (2001), *Nature reviews cancer*, **1**, 68-76

Bykov V.J.N., Isseva N., Selivanova G., Wiman K., (2002-c), *Carcinogenesis*, **23**, 2011-2018

Bykov V.J.N., Isseva N., Shilov A., (2002-a) *Nature Medicine*, **8**, 282-288

Bykov V.J.N., Selivanova G., Wiman K., (2002-b), *International Patent WO02/24692 A1*

Bykov V.J.N., Selivanova G., Wiman K.G., (2003), *European Journal of Cancer*, **39**,

Caelles C., Helberg A. Karin M., (1994), *Nature*, **370**, 220-223

- Calvo P.**, Barba J.L., Cabezas J.A., (1982), *Clinica Chimica Acta*, **119**, 15-19
- Carr R.**, Hann M.M., (2002) *Modern Drug Discovery*, 45-48
- Chironis et al.**, (1992), *Journal of Medicinal Chemistry*, **35**, 1563-1572
- Cho Y.**, Gorina S., Jeffery P.D., Pavletich N.P., (1994), *Science*, **265**, 346-355
- Cohen J.J.**, (1993), *Immunology Today*, **14**, 126
- Cohen J.J.**, (1992), *Journal of Immunology*, **148**, 2207-2216
- Craig D.** , (1987), *Chemical Society Review*, **16**, 187-238,;
- De Martines N.R.**, Nemn N., Canto J.A., (1984), *Cancer Detection and Prevention*, **7**, 37-43
- Diels O.**, Alder K., (1928), *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, **460**, 98-122
- Duvall E.**, et al., (1985), *Immunology*, **56**, 351-358
- Eichhorst S.T.**, et al., (2000) *Molecular Cellular Biology*, **20**, 7826-7837
- El-Deiry W.S.**, (1998) *Seminar in Cancer Biology*, **8**, 345-357
- Fadock V.A.**, Voelker D.R., Campbell P.A., Cohen J.J., Bratton D.L., Henson P.M.,
- Foster B.A.**, Coffey H.A., Morin J.J., Rastinejad F., (1999), *Science*, **286**, 2507-2510
- Friedler A.**, Hansson L.O., Veprintsev D.B., et al., (2002) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **99**, 937-942
- Friesen C.**, Herr I., Krammer P.H., Debatin K.M., (1996), *Nature Medicine*, **2**, 574-577
- Fulda S.**, Scaffidi C., Pietsch T., Krammer P.H., Peter M.E., Debatin K.M., (1998), *Cell Death and Differentiation*, **5**, 884-893
- Gerlier D.**, Thomasset N., (1986), *Journal of Immunological Methods*, **94**, 57-63
- Gorina S.**, Pavletich N.P., (1996), *Science*, **274**, 1001-1005
- Graeber T.G.**, Osmanian C., Jacks T. Housman, D.E., Koch C.J. Lowe S.W., Giaccia J.J., (1996), *Nature*, **379**, 88-91

- Guan B.**, Yue P., Clayman G.L., Sun S.Y., (2001), *Journal of Cell Physiology*, **188**, 98-105
- Hanahan D.**, Weinberg R.A., (2000), *Cell*, **100**, 57-70
- Hann M.M.**, Leach A.R., Haper G., (2001) *Journal of Chem. Inf. Comput. Science*, **41**, 856-864
- Hatanaka M.**, (1974), *Biochimica et Biophysica Acta*, **355**, 77-104
- Herr I.**, Debatin K.M., (2001), *Blood*, **98**, 2603-2614
- Herrmann M.**, Lorenz H.M., Voll R., Grünke M. Woith W., Kalden J.R.,(1994), *Nucleic Acids Research*, **22**, 5506-5507
- Hollstein M.**, Rice, K, Greenblatt, M.S. Soussi T., Fuchs R., Sorlie T., Hovig E., Soernenschen B., Montesano R., Harris C.C., (1994), *Nucleic Acids Research*, **22**, 3551-3555
- Homburg C.H.E.**, de Haas M.,bon dem Borne A.E., Verhoeven A.J., Reutelingsperger C., Roos D., (1995) *Blood*, **85**,532
- Hong C.-Y.**, Huang C.Y., Lin S.K., Lee J.J., Chueh L.L., Lee C.H.K. Lin J.H., Hsiao M., (2000), *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **276**, 278-285
- Houghten R.A.** (1985), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **82**, 5131-5135
- Houghten R.A.**, Pinilla C., Blondelle S.E., Appel J.R., Dooley C.T., Cuervo J.H., (1991), *Nature*, **354**, 84-86
- Ichihara A.**, (1987), *Synthesis*, 207-222.
- Igney F.**, Krammer P.H., (2002), *Nature Reviews Cancer*, **2**, 277-288
- Jeffrey P.D.**, Gorina S., Paveltisch N.P., (1995), *Science* **267**, 1498-1502
- Jiang J.B.**, Hesson D.P., Dusak D.L., Kang G.J., Hamel E., (1990), *Journal of Medicinal Chemistry*, **33**, 1721-1728
- Jose J.**, Handel S, (2003), *Chembiochem*, **4**, 396-405
- Jones S.N.**, et al., (1995), *Nature*, **378**, 296-299
- Kelder J.**, Grootenhuis P.D., Bayada D.M., Delbressine L.P., Ploemen J.P., (1999) *Pharm. Res.*, **16**, 1514-1519

- Keller O.**, Rudinger J., (1975), *Helvetica chimica acta*, **58**, 531-541
- Kerr J.F.**, Winterford C.M., Harmon B.V. (1994) *Cancer*, **73**, 2013-2026
- Klebe G.**, (2000), *Perspectives in Drug Discovery and Design*, **20**,1-287
- Ko L.J.**, Prives C., (1996), *Genes and Development*, **10**, 1054-1072
- Komarov P.G.**, Komarov E.A., Kondratov R.V., Christov-Tselkov K., Coon J.S., Chernov M.V., Gudkov A.V., (1999), *Science*, **285**, 1733-1737
- Krammer P.H.**, Galle P.R., Moller P., Debatin K.M., (1998), *Advances in Cancer Research*, **75**, 251-273
- Krammer P.H.**, (1999), *Advances in Immunology*, **71**, 163-210
- Kubinyi H.**, (1998), *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, **1**, 4-15
- Kubinyi H.**, (2001) *Current Drug Discovery*, 9-11
- Kubinyi H.**, (2003), *Nature Reviews Drug Discovery*, **2**, 665-668
- Lam. K.S.**, Salmon S.E., Hersch E.M., Hruby V.J., Kazmierski W.M., Knapp R.J. (1991), *Nature*, **354**, 82-84
- Lane D.P.**, Benchimol S., (1990), *Genes and Development*, **4**, 1-8
- Lasne M.C.**, Ripoll J.L., (1985), *Synthesis*, 121-143
- Lee C.J.**, Konishi Y., Yu D.T., Miskowski T.A., Riviello C.M., Mcina T., Frierson M.R., Kondo K., Sugitani M., Sircar C. J., Blazejewski T.M., (1995), *Journal of Medicinal Chemistry*, **38**, 3547-3557
- Lee S.**, Elenbaas, B., Levine A.J., Griffith J., (1995), *Cell*, **81**, 1013-1020
- Levine A.J.**, (1997), *Cell*, **88**, 323-331
- Lichtenthaler et al.**, (1993), *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 967-969
- Lindhorst T.K.**, (2000), *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Wiley, VCH, Weinheim
- Lipiniski C.A.**, Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J., (1997), *Advances in Drug Delivery Reviews*, **23**, 3-25
- Lowe S.W.**, Ruley H.C., (1993), *Genes and Development*, **7**, 535-545

Luu Y., Bush J., Cheng Jr. K.J., Li G., (2002), *Experimental Cell Research*, **276**, 214-222

Mamillon C., Jerosch H., Bompart J., Calas M., Bonnet P.A., Escale R., (1998), *Tetrahedron Letters*, **39**, 6179-6180

Martin J.G., Hill R.K., (1961), *Chemical Reviews*. **61**,537-562

Martinou J.C., Green D.R., (2001), *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2**, 63-67

Mattson R.J., Pham K.M., Leuck D.J., Cowen K.A., (1990), *Journal of Organic chemistry*, **55**,2552-2554

McCormack M., (1976), *Journal of Clinical Pathology*, **29**, 124-129

Merrifield R.B., (1963) *Journal of the American Chemical Society*, **85**, 2149-2154

Mier W., (1998), *Saccharide und saccharidcluster als Carrier für Chemotherapeutika: Synthese, Charakterisierung und Testung tumorselektiver Prodrugs*, Dissertation, Universität Heidelberg

Miyashita T., Reed J.C.,(1995), *Cell*, **80**, 293-299

Muller M.,(1997), *Journal of Clinical Investigation*, **99**, 403-413

Müller M., Scaffidi C.A., Galle P.R., Stremmel W., Krammer P.H., (1998–b) *European Cytokine Network*, **9**, 685-686

Müller M., Wilder S., Bannasch D., Israeli D., Lehlbach K., Weber M.L. Friedmann S.L., Galle P.R., Stremmel W., Pren M., Krammer P.H., (1998-a), *Journal of Experimental Medicine*, **188**, 2033-2045

Mutschler E., Derendorf H., (1995), *Drug Actions: Basic Principles and Therapeutic Aspects*, CRC Press, Stuttgart

Nakano K, Vousden K.H.,(2001), *Molecular Cell*, **7**, 683-694

Nelson W.G., Kastan M.B., (1994) *Molecular Cell Biology*, **14**, 1815-1823
1828-1834

Newsholme R., Curl E.A., Mewsholme., (1986), *Biochemical Journal*, **239**, 121-125

Newton K., Strasser A., (2000), *Journal of Experimental Medicine*, **191**, 195-200

Nigro J.M., Baker S.J., Preisinger A.C., Jeeup J.M., Hosteller R., Cleary K., Signer S.H., Davidson N., Baylin S., Devilee P., Glover T., Collins R.S., Weslon A., Modali R., Harris C.C., Vogelstein B., (1989), *Nature*, **342**,705-708

North S., Pluquet O., Maurici D., El-Ghissassi F., Hainaut P., (2002), *Molecular Carcinogenesis*, **33**, 181-188

Norton J.A., (1942), *Chemical Reviews*, **31**,319-523,

Oda E., Ohiki M., Murasawa H, Nemoto J., Shibue T., Yamashita T., Tokino T., Tanguchi T., Tanaka N., (2000), *Science*, **288**, 1053-1058

Oda K., Arakawa H., Tanaka T., Matsuda K., Tanikawa C., Mori T., Nishimori H TamaiK., Tokino T., Nakamura Y. Taya Y.,(2000), *Cell*, **102**, 849-862

Oppolzer W., (1984), *Angewandte Chemie*, **96**, 840-854].

Oprea T., Davis A.M., Teague S.J., Leeson P.D., (2001) *Journal of Chem. Inf. Comput. Science*, **41**, 1308-1316

Paulsen H., Meinjohanns E., Reck F., Brockhausen I., (1993), *Liebigs Annalen der Chemie*, 737-750

Paulvannan K., Jacobs J.W., (1999) *Tetrahedron*, **55**, 7433-7440

PDB – (2003) : www.rcsb.org/pdb und www.biochem.uc.ac.uk/bsm/pdbsum

Pettit G.R., Lippert J.W., Harald D.L., (2000), *Journal of Organic Chemistry* , **65**, 7438-7444

Pettit G.R., Grealish M.P., (2002), *Journal of Organic Chemistry*, **66**, 8640-8642

Pettit G.R., (1993), *Journal of Natural Products*, **56**, 1682-1685

Pluquet O., North S., Bhoumik A., Kimask., Ronai Z., Hainaut P., (2003-a), *Journal of Biology and Chemistry*, **278**, 11879-11887

Pluquet O., North S., Richard M.J., Hainaut P., (2003-b), *Biochemical Pharmacology*, **65**,1129-1137

Pratt W.B., Ruddon R.W., Ensminger W.D., Maybaum J., (1994), *The anticancer drugs*, 2nd edition, Oxford press

Proudfoot J.R., (2002), *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **12**, 1647-1650

Pucci B., Bellincampi L., Tafani M., Masciullo V., Melino G., Giordano A., (1999), *Experimental Cell Research*, **252**, 134-143

Ramalingam K., Raju N., Nanjappan P. Nowotnik D.P., (1995), *Tetrahedron*, **51**, 2875-2894

Reinhard J., (2000), *Monosaccharid-Konjugate von Inhibitoren der O6 Mehtylguanin DNA Methyltransferase, der Poly-(ADP-Ribose) Polymerase und des Switch Phänomens des HIV-Hüllproteines GP120: Synthese, Biologische Aktivität und Struktur-Wirkungsbeziehung*; Dissertation, Universität Heidelberg

Rippin T.M., Bykov V.J.N., Freund S.M.V., Selivanova G., Wiman K., Ferscht A., (2002), *Oncogene*, **21**, 2119-2129

Robert-Koch-Institut - (1998): www.rki.de

Roche Molecular Biochemicals, *Apoptosis and Cell Proliferation*, 2nd revised edition, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Roche O., Schneider P., Zuegge J., Guba W., Kansy M., Alanine A., et al., (2002), *Journal of Medicinal Chemistry*, **45**, 137-142

Ryan K.M., Phillips A.C., Vousden K.H., (2001), *Current Opinion in Cell Biology*, **13**, 332-337

Saier M.H. Jr., (2000), *Molecular Microbiology*, **35**, 699-710

Samuels-Lev Y., O'Connor D.J., Bergamaschi D., et al., (2001), *Molecular Cell*, **8**, 781-794

Sauer J., (1967), *Angewandte. Chemie.*, **79**, 76-94

Sauer J., Sustmann R., (1980), *Angewandte. Chemie*, **92**, 773-801;

Savill J.S., et al., (1989) *Journal of Clinical Investigation*, **83**, 865

Savill J.S., Fadock V., Henson P., Haslett C., (1993), *Immunology Today*, **14**, 131-136

Schmidt R.R., Michel J., (1980), *Angewandte Chemie*, **92**, 763-765

Schmitz I., Kirchhoff S., Krammer P.H., (2000) *International Journal of Biochemical Cell Biology*, **32**, 1123-1136

Schwartz A.L., Lerner L.M., (1974), *Journal of Organic Chemistry*, **39**, 21-23

Schwartzman R.A., Cidlowski J.A., (1993), *Endocrine Reviews*, **14**, 133

Scudiero P.A., et al., (1988), *Cancer Research*, **48**, 4827-4833

Selivanova G., lotsova V, Okan I., et al., (1997), *Nature Medicine*, **3**, 632-638

Selivanova G., Ryabchenko L., Jansson E., Iotsova V., Wiman K., (1999), *Molecular and Cellular Biology*, **19**, 3395-3402

Sharpot V.S., (1979), *Advances in Cancer Research*, **30**, 89-150

Sherr C.J., (2000), *Cancer Research*, **60**, 3689-3695

Sherr C.J., (2001), *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2**, 731-737

Smyth D.G., Blumenfeld O.O., Konigsberg W., (1964), *Biochemical Journal*, **91** 589-591

Sorg B., (2001), *Synthese, Charakterisierung und pharmakologische Untersuchung zuckerknüpfter Therapeutika zur zielgerichteten Therapie von Krebserkrankungen*, Dissertation, Universität Heidelberg.

Stahnke K., Fulda S., Friesen C., Strauss G., Debatin K.M., (2001), *Blood*, **98**, 3066-3073

Takimoto R., Wang W., Dicker D.T., Rastinejad F., Lyssikatos J., El-Deiry W.S., (2002), *Cancer Biology and Therapy*, **1**, 47-55

Tanaka H., Arakawa H., Yamaguchi T., Shiraishi K., Fukuda S., Matsui K., Takei Y.Y., Nakamura Y (2000), *Nature*, **404**, 42-49

Tatlock, J.H., Linton M.A., Hou X.J., Kissiniger C.R., Pelletier L.A., Showalter R.E., Tempczyk A. Villafranca J.E., (1997), *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **7**, 1007-1012

Teague S.J., Davis A.M., Leeson P.D., Oprea T., (1999) *Angewandte Chemie International Edition*, **38**, 3743-3748

Telford W.G., King L. E., Fraker P.J., (1991), *Cell Proliferation*, **24**, 447-459

Terrett N.K., (1998), *Combinatorial Chemistry*, Oxford University Press, Great Britain

Tsauer W., Lin J.G., Lin P.Y., Hsu F.L. Chiang H.C., (1997), *Anticancer Research*, **17**, 2095-2098

Unverzagt C., (1994), *Angewandte Chemie*, **106**, 1170-1173

Veber D.F., Johnson S.R., Cheng H-Y., Smith B.R., Ward K.W., Kopple K.D., (2002), *Journal of Medicinal Chemistry*, **45**, 2615-2623

Vehyl M., Wagner K., Volk C., Gorboulev V., Baumgarten K., Weber W.M., Scharper M., Bertram B., Wiessler M., Koepsel H., (1998), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.*, **95**, 2914-19

Verhoven B., Schlegel R.A., Williamson P., (1995), *Journal of Experimental Medicine*, **182**, 1597

Vermes I., Haanan C., (1994), *Advances in Clinical Chemistry*, **31**, 177

Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C., (1995), *Journal of Immunological Methods*, **184**, 39

Vogelstein B., Lane, D., Levine A.J., (2000), *Nature*, 408, 307-310

Wang C.C., Wu C.H., Hsieh K.J., Yen K.Y., Yang L.L., (2000), *Toxicology*, **147**, 77-87

Wang W., Takimoto R., Rastinejad F., El-Deiry W.S., (2003), *Molecular and Cellular Biology*, **23**, 2171-2181

Warburg O., (1923), *Klinische Wochenschrift*, **2**, 317-333

Weber L., (2000), *Current Opinion in Chemistry and Biology*, **4**, 295-302

Weinreb S.M., Scola P.M., (1989), *Chemical Reviews.*, **89**, 1525-1534

Wesselborg S., Engels K.H., Rossmann E., Los M., Schulze-Osthoff K., (1999), *Blood*, **93**, 3053-3063

Wu G.S., Burns T.F., McDonald III R., Jiang W., Meng R., Krantz I.D., Kao G., Gau D.D., Zhou J.Y., Muschel R., Hamilton S.R., Spinner N.B., Markowitz S., Wu G., El-Deiry W.S., (1997), *Nature Genetics*, **17**, 141-143

Xiao Bing-Han, Zi-Hua Jing, Schmidt R.R., (1993), *Liebigs Annalen der Chemie*, 853-858

Yeh W., Pompa J.L., Mc Currach M.E., Shu H., Elia A.J., Shamhimian A., Wakeham M.A., Khoo W., Mitchell K., El-Deiry W.S., Lowe S.W., Goeddel D.V., Mak T.W., (1998), *Science*, **279**, 1954-1958

Zamzami N, Kroemer G.,(2001) *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2**, 67-71

Zeller W.J., zur Hausen H., (2000) *Onkologie*, 7. Erg-Lieferg., ecomed Verlag Landsberg

Zhu K., Wang J., Zhu J., Jiang J., Shou J., Chen X., (1999), *Oncogene*, **18**, 7740-7747

8 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt....

- **Herrn Prof. Dr. Wießler**, für die Möglichkeit diese interessante Aufgabenstellung mit viel Freiraum bearbeiten zu dürfen, seine Diskussionsbereitschaft, sein Ideen und Denkanstöße.
- **Herrn Prof. Dr. Metzler-Nolte**, für die freundliche Übernahme des zweiten Gutachtens.
- **Herrn Dr. Christian Kliem**, für seine engagierte Betreuung, die Korrektur dieser Arbeit, und seine Unterstützung die großen und kleinen Geheimnisse der Chemie und der NMR- Analyse zu ergründen.
- **Frau Dr. Evi Frei**, für ihre unermüdliche Hilfe und Diskussionsbereitschaft bei den komplexen biologischen Versuchen, die Korrektur dieser Arbeit und die immer „offene Tür“.
- **Herrn PD Dr. Heinz Schmeiser**, für seine kritischen Fragen und seine stete Motivation, doch zum Badmintonspielen zu gehen.
- **Der ganzen Abteilung Hollstein**, ganz besonders Karl Mühlbauer und Anette Weninger für die tolle Einführung in die Zellkultur, und deren unerschöpfliches Wissen über p53.
- **Andrea Breuer**, für ihre Freundschaft und den festen Glauben, daß diese Arbeit wohl doch noch fertig wird, sowie für die „motivierende“ Süßigkeitenschublade
- **allen Laborkollegen** der 3 schönen Jahre am DKFZ: **Volker, Bernd, Chris, Claas, Bettina, Evelyn, Nadine, Oli, Dirk, Michael, Erwin, Regine, Thomas, Christof, und Holger** für die freundliche Arbeitsatmosphäre
- **Ilse Schindler**, für die Pflanzenfürsorge und das saubere Geschirr,
- **Ed Müller und Peter Lorenz**, für ihre Hilfsbereitschaft und chemisches Wissen
- **Charlie Klokow**, für seine Einführung in die HPLC-Analytik
- **Herrn Prof. Granzow und Frau Dr. Kopun-Granzow**, für ihre Diskussionsbereitschaft und Expertise in Zellkulturfragen,
- **Helene Bottin, Marie Stiborova, Nicole di Gallo, Christina Grosch, Hans Hermann Schrenk**, für die nette Ansprache
- **Herrn PD Dr. Mier und Dr. Keith Graham** für die Hilfe bei der Synthese des Nonapeptides,
- **Herrn Dr. Rüttgen**, für die Berechnung der IC₅₀-Werte,
- **Uli Bauder-Wüst** für ihre Hilfe und Expertise bei der Durchführung der FACS-Experimente
- **Meinem Vater und Ursula**, für ihre Unterstützung und ständige Aufmunterung
- und natürlich **Thomas**, für seine Geduld, Unterstützung und anspornenden ironischen Bemerkungen!